

DAVID ENRIQUE SÁNCHEZ TORRES

**USO DA VITAMINA 1 ALFA HIDROXICOLECALCIFEROL E DE FITASE  
EM DIETAS DE FRANGOS DE CORTE NA FASE INICIAL**

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  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S211u  
2012

Sánchez Torres, David Enrique, 1975-

Uso da vitamina 1 alfa hidroxicolecalciferol e de fitase em dietas de frango de corte na fase inicial / David Enrique Sánchez Torres. – Viçosa, MG, 2012.  
ix, 28f. : il. ; 29cm.

Orientador: Horácio Santiago Rostagno.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 23-28.

1. Frango de corte - Nutrição. 2. Frango de corte - Alimentação e rações. 3. Cálcio na nutrição animal. 4. Fósforo na nutrição animal. 5. Vitaminas na nutrição animal. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.50852

DAVID ENRIQUE SÁNCHEZ TORRES

**USO DA VITAMINA 1 ALFA HIDROXICOLECALCIFEROL E DE FITASE  
EM DIETAS DE FRANGOS DE CORTE NA FASE INICIAL**

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: 07 de dezembro de 2012.



Sérgio Luiz de Toledo Barreto



Marcelo Dias da Silva



Luiz Fernando Teixeira Albino



Horácio Santiago Rostagno  
(Orientador)

A Deus, pelo bem mais importante: a vida.  
À minha mãe, pelo carinho e pelos ensinamentos.  
À minha esposa, pelo acompanhamento e apoio incondicional.  
À minha família, pelo apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todas suas bênçãos.

À minha família, pelo apoio.

À minha mãe, pelo carinho e pelos ensinamentos.

À minha esposa, pelo acompanhamento nos momentos difíceis e de alegrias.

À empresa Premex Inc., em especial ao Dr. Carlos Mesa e à sua família, pela confiança e pelo apoio na realização deste mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao professor Horácio Santiago Rostagno e Luiz Fernando Teixeira Albino, pela orientação, amizade e paciência.

Ao meu amigo Camilo Mejia, pela confiança e pelo apoio.

Ao meu amigo Rodrigo Knop, pela paciência e ajuda.

Aos meus amigos da equipe do Departamento de Zootecnia da UFV: Ana Lúcia, Neto, Gabriel, Valdir, Victor, Diego, Rodolfo, Guisella, pela amizade e pelo apoio.

Aos funcionários técnicos do Departamento de Zootecnia, pela colaboração.

Aos amigos José Enrique Perez e Eric Marco Balbino, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos amigos Juan Camilo Mendoza, Javier Garces, Rafael Otero e Rafael Vergara, pelo apoio e pela amizade.

## BIOGRAFIA

DAVID ENRIQUE SÁNCHEZ TORRES, filho de Evemeleth Sánchez Montero (*in memoriam*) e Julia Esther Torres Logreira, nasceu no dia 1.º de fevereiro de 1975, em Barranquilla, Colômbia.

Formou-se em Zootecnia pela Universidade de La Salle em Bogotá, Colômbia. Concluiu seus estudos de pós-graduação em Gerência na Universidade Industrial de Santander em Bucaramanga, Colômbia, no ano de 2007.

Entre os anos de 2002 e 2009, trabalhou para Alltech Inc. De 2009 até o momento, trabalha para Premex Inc. como Gerente Técnico Internacional.

## SUMÁRIO

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS .....                                  | vii  |
| RESUMO .....  | viii |
| ABSTRACT .....  | ix   |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                     | 1    |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                          | 4    |
| 2.1. Fitase .....                                       | 4    |
| 2.2. Classificação das fitases.....                     | 5    |
| 2.3. História da vitamina D.....                        | 6    |
| 2.4. Precursores da vitamina D.....                     | 7    |
| 2.5. Metabolismo e ativação da vitamina D .....         | 7    |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....                            | 11   |
| 3.1. Local .....  | 11   |
| 3.2. Animais .....                                      | 11   |
| 3.3. Delineamentos e dietas experimentais .....         | 12   |
| 3.4. Coletas de dados e características avaliadas ..... | 14   |
| 3.5. Temperatura e umidade.....                         | 14   |
| 3.6. Análises estatísticas .....                        | 15   |
| 4. RESULTADOS .....                                     | 16   |
| 5. DISCUSSÃO .....                                      | 20   |
| 6. CONCLUSÕES .....                                     | 21   |
| REFERÊNCIAS.....  | 22   |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Descrição dos tratamentos experimentais .....  | 12 |
| Tabela 2 - Níveis calculados de cálcio (Ca) e fósforo disponível (P disp.) com os aportes nutricionais dos aditivos utilizados no experimento ..... | 13 |
| Tabela 3 - Composição centesimal e nutricional da dieta basal da fase inicial   | 13 |
| Tabela 4 - Valores calculados das rações .....  | 14 |
| Tabela 5 - Resultados de desempenho em frangos de corte do primeiro aos 18 dias de idade.....   | 16 |
| Tabela 6 - Resultados de uniformidade em frangos aos 18 dias de idade.....  | 17 |
| Tabela 7 - Peso e conteúdo de cinzas da tíbia aos 18 dias de idade .....  | 18 |
| Tabela 8 - Conteúdo de Ca e P nas cinzas aos 18 dias de idade.....  | 19 |
| Tabela 9 - Peso de peito aos 18 dias de idade .....   | 19 |



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eixo de Ca, PTH e vitamina D na regulação da homeostase de Ca.10

## RESUMO

SÁNCHEZ TORRES, David Enrique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2012. **Uso da vitamina 1 alfa hidroxicolecalciferol e de fitase em dietas de frango de corte na fase inicial.** Orientador: Horácio Santiago Rostagno.

A suplementação de Ca e P é de muita importância na hora de formular dietas para aves. O primeiro por ocupar muito espaço na dieta, enquanto o segundo, pelo alto custo, pelas reservas limitadas na natureza e pelo potencial poluente; esses nutrientes representam uma fonte de melhoramento para os nutricionistas na procura de maior eficiência. Neste trabalho, avaliou-se o uso de dois dos aditivos disponíveis na indústria com maior eficácia avaliada por diferentes autores na liberação e absorção de Ca e P. O primeiro corresponde à utilização de uma fitase de origem bacteriana (*E. coli*) com maior liberação de Ca e P disponível; e, o segundo, ao uso de um metabolito da vitamina D 1 alfa hidroxicolecalciferol (1 $\alpha$ OH-D3), que tem sido descrita por vários autores como de maior potência na absorção de Ca e P. Os dois aditivos foram usados, segundo as recomendações dos fabricantes. Para medir o efeito da combinação dos aditivos sobre o desempenho e a retenção mineral, foi montado um experimento usando pintinhos Cobb machos de um dia de idade distribuídos de maneira aleatória em seis tratamentos com 10 repetições cada. Utilizaram-se seis dietas que atingem os níveis nutricionais das tabelas brasileiras de 2011, exceto para Ca (0,55 e 0,64%) e P disponível (0,17 e 0,24%). Foram realizadas medições de ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, cinzas de tíbias, Ca e P na tíbia. Os aditivos foram utilizados sozinhos e em combinação, o que evidenciou um efeito positivo no ganho de peso, no peso da tíbia e na retenção mineral. Encontraram-se diferenças estatísticas no peso final, ganho de peso, peso da tíbia e conteúdo de P na tíbia. Outros parâmetros como conversão alimentar (CA), conteúdo de Ca na tíbia e uniformidade apresentaram uma tendência positiva ao uso dos aditivos, mas não foi o suficiente para encontrar diferença estatística ( $p < 0,05\%$ ).

## ABSTRACT

SÁNCHEZ TORRES, David Enrique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2012. **Vitamin 1 alfa hidroxicolecalciferol and phytase in broiler diets during starter phase.** Adviser: Horácio Santiago Rostagno.

Calcium and Phosphorus supplementation are very important components of poultry diets. Calcium, because it takes up considerable space in the diet, and phosphorus, because of its high cost and potential negative environmental impact. The objective of this experiment was to combine two feed additives that work synergistically on calcium and phosphorus utilization. Published research has elucidated how bacterial (*E. coli*) phytase allows greater calcium and phosphorus release from phytate. Similarly several researchers have demonstrated that the vitamin D metabolite (1 $\alpha$ OH-D3) also shows an improvement in calcium and phosphorus utilization from phytate and that phytase and 1 $\alpha$ OH-D3 are additive. In order to measure the effect of both additives on broiler performance and bone mineral retention, an experiment was designed using day old Cobb males randomly distributed in floor pens among 6 treatments with 10 repetitions each. Six treatment diets were formulated based on Brazilian nutritional requirements, except for Ca (0.55% and 0.64%) and available P (0.17% and 0.25%). Both additives were used individually and in combination. Measurements of body weight gain, feed intake, gain:feed, tibia ash, and calcium and phosphorus from bone (tibia) was made. Addition of the additives showed a positive effect on broiler performance and mineral retention. Statistical differences ( $p < 0,05$ ) were observed on final weight, weight gain, total tibia weight and P retention. Other parameters such as gain:feed, uniformity, tibia ash and Ca showed a numerical difference, but not enough to achieve statistical significance.

## 1. INTRODUÇÃO

O cálcio é o mineral de maior concentração no organismo, ficando 99% nos ossos; portanto, uma de suas principais funções é fornecer suporte estrutural e proteção aos tecidos brandos. O cálcio do fluido extracelular (FEC) cumpre funções importantes como a contração muscular e condução nervosa. O desequilíbrio dos níveis desse mineral é responsável por múltiplas alterações como morte súbita por infarto. No caso do fósforo, a importância dele como componente da membrana celular pode ser sua principal função.

Os alimentos vegetais usados nas rações contêm a maior parte do fósforo na forma de fósforo fítico (myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakisfosfato). Entretanto, os monogástricos não produzem a quantidade suficiente de enzima fitase para quebrar o anel de fitato e absorver o fósforo contido nesse nutriente, o que levou a indústria avícola iniciar o uso da enzima fitase exógena há mais de 20 anos. As fitases podem ser produzidas por fungos ou bactérias como a *E. coli*. O trabalho da enzima fitase chega só até o intestino, acrescentando a quantidade de fósforo e cálcio para ser absorvido. Para garantir a absorção desses minerais, o organismo precisa da forma ativa da vitamina D: 1,25 dihidroxicolecalciferol. Atualmente, sabe-se que os frangos de corte não são capazes de produzirem quantidades suficientes de vitamina D (1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>) em sua forma ativa ou hormonal. Embora a natureza dessa deficiência seja desconhecida, acredita-se que o contínuo processo de melhoramento genético provocou redução em sua capacidade para transformar o 25-OH D<sub>3</sub> em sua forma ativa 1,25 OH<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Essa última está envolvida na absorção intestinal de cálcio e de fósforo na reabsorção pelo rim, tanto na mineralização quanto na desmineralização dos ossos, com deposição de cálcio e fósforo nos ossos e na mobilização desses (ATENCIO et al., 2009). Além disso, essa forma ativa mantém a homeostase do cálcio no organismo, o que é vital para o bom funcionamento dos sistemas muscular e nervoso (DE LUCA, 2008).

A maior parte da formação de tecido ósseo ocorre em frangos até aos 21 dias de idade. Dois processos que ocorrem simultaneamente são a ossificação intramembranosa no perióstio e ossificação endocondral no disco epifisário. A ossificação intramembranosa ocorre a partir do tecido conjuntivo

onde as células mesenquimatosas são diferenciadas em osteoblastos (SIMÃO, 2008).

O colecalciferol é produzido na pele pela ação dos raios ultravioleta (UV), que é transportado até o fígado onde se hidroxila a 25-OH D<sub>3</sub>, para posteriormente ser ativado no rim a 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>; a partir desse momento a molécula cumpre funções hormonais (KANIS, 1982). A ativação dessa molécula se realiza pela ação da enzima 1 $\alpha$  hidroxilase renal, que é controlada principalmente pelo paratormônio (PTH) e pelos níveis de cálcio e de fosfato circulantes (DE LUCA, 2008). O excesso do hormônio PTH é regulado, principalmente, por seu armazenamento no tecido gorduroso (KANIS, 1982).

As aves podem suprir a necessidade delas de vitamina D<sub>3</sub> a partir da suplementação de vitaminas, da produção endógena (radiação ultravioleta) e de subprodutos de origem animal (ATENCIO et al., 2009). Adicionalmente, um precursor da D<sub>3</sub>, a vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol), pode ser obtida das dietas de origem vegetal (KANIS, 1982).

Quanto ao efeito intestinal, o hormônio ativo estimula a absorção de cálcio (duodeno e primeira porção do jejuno) e de fósforo (jejuno e íleo) atuando nas células do epitélio intestinal.

Em relação ao efeito ósseo, a 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> produz elevação da calcemia, atuando nos osteoclastos, o que aumenta sua atividade e estimula a totalidade da superfície de reabsorção. Em casos de hipocalcemia, se ocupa de restabelecer os níveis adequados de cálcio circulante, estimulando a absorção de cálcio no intestino e sua reabsorção no tecido ósseo.

Já no efeito renal há o aumento da 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> que atua sobre a regulação renal do cálcio e fósforo, aumentando a reabsorção do primeiro e reduzindo o segundo.

Embora o uso do colecalciferol em dietas de frangos seja prática comum há muitos anos, Haussler et al. (1973, citado por EDWARDS et al., 2002) realizaram os primeiros trabalhos com 1 $\alpha$ OH-D<sub>3</sub> como substituto do colecalciferol (D<sub>3</sub>) em frangos jovens, encontrando que a 1 $\alpha$ OH-D<sub>3</sub> era pelo menos cinco vezes mais ativa que a D<sub>3</sub> na mobilização de cálcio nos ossos e atuavam em duas horas na absorção e no transporte de cálcio do intestino (BORIS et al., 1977). Adicionalmente, esses autores não encontraram

diferenças no uso da  $1\alpha\text{OH-D}_3$  e o hormônio ativo  $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ , concluindo que o uso de qualquer uma das duas moléculas produzirá resultados similares.

Deficiências da  $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$  podem repercutir em degenerações ósseas como discondroplasia tibial (DT), o que provoca grandes perdas na indústria avícola. Embora a suplementação com  $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$  ou com  $1\alpha\text{OH-D}_3$  reduza de maneira importante esse problema, Edwards et al. (2002) e Thorp et al. (1993) observaram que a suplementação dietética com  $5\ \mu\text{g/kg}$  de  $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$  reduziu a DT em frangos selecionados por sua alta incidência nessa deformação e que com  $10\ \mu\text{g/kg}$  eliminou-se quase por completo a incidência de lesões severas.

A vitamina  $1\alpha\text{OH-D}_3$  funciona sinergicamente com enzimas fitases exógenas, já que essa última atua no tubo intestinal superior com pH baixo para auxiliar na transformação do fitato a fosfato e inositol. A  $1\alpha\text{OH-D}_3$  tem maior incidência no tubo intestinal inferior a um pH mais alto (MITCHELL; EDWARDS JR, 1996).

Vários autores têm relatado a presença dos metabolitos  $1\alpha\text{OH-D}_3$  e o  $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$  na utilização de fósforo fítico (EDWARDS, 1993; BIEHL et al., 1995; MITCHELL; EDWARDS JR, 1996; BIEHL; BAKER, 1997). Entretanto, o mecanismo desse processo é desconhecido e encontra-se em investigação.

O uso dos aditivos fitase e vitamina  $1\alpha\text{OH-D}_3$  ou  $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$  permite redução dos níveis de Ca e P na ração, o que resulta numa melhor eficiência de absorção dos minerais traço, incluindo o zinco e manganês (ROBERSON; EDWARDS, 1994; BIEHL et al., 1995), que são conhecidos por dispor de menor utilização em presença de ácido fítico (O'DELL; SAVAGE, 1960; HALPIN; BAKER, 1986).

Este trabalho objetivou avaliar o uso de uma enzima fitase e da vitamina 1 alfa hidroxicolecalciferol em forma isolada e em sinergia sobre o desempenho e retenção de cálcio e fósforo em frangos de corte.

Especificamente, pretendeu-se avaliar os efeitos da enzima fitase e 1 alfa-hidroxicolecalciferol sobre o desempenho de frangos de corte e parâmetros ósseos., assim como sobre os parâmetros de rendimentos de peito.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Fitase

A fitase foi descoberta há mais de um século em 1907 por Suzucki nos grãos de arroz. Os primeiros trabalhos de desenvolvimento de uma fitase comercial para aves e suínos foram nos anos de 1960, relatados por Wodzinski e Ulha (1996), em resposta à capacidade do fitato de limitar a disponibilidade de cálcio (Ca) e de fósforo (P) em rações para aves, seguidos de outros autores que desenvolveram estudos na mesma linha de pesquisa (WARDEN; SCHAIBLE, 1962; NELSON et al., 1968b; ROJAS; SCOTT, 1969).

O intestino delgado dos monogástricos tem limitada capacidade de hidrolisar fitato, em razão da deficiência de enzima fitase e baixa população de bactérias na primeira parte do trato gastrointestinal (IQBAL et al., 1994).

A fitase foi comercializada como derivado do fungo *Aspergillus niger* para rações de aves e suínos até 1991. Inicialmente, o foco da utilização da fitase era para reduzir os níveis de descarga de P no meio ambiente. Num estudo desenvolvido por Simons (1990), foi demonstrado que 1.000 FTU reduzem a excreção de P em 35% para suínos e 47% em frangos.

A proibição do uso de farinhas de carne e ossos em vários países aumentou consideravelmente o uso da fitase nos anos de 1990 (BEDFORD, 2003).

O substrato fitato é encontrado em diferentes alimentos de origem vegetal, onde o componente P serve como reserva desse mineral durante a germinação. Além disso, o fitato cumpre uma função de proteção contra o estresse oxidativo durante a vida da semente (DORIA et al., 2009).

O fitato apresenta-se como sal conjugado do ácido fítico (*myo*-inositol hexafosfato, IP<sub>6</sub>) e tem peso molecular de 660 Da. A concentração de P é de 282 g por kg<sup>-1</sup> e consiste em seis moléculas de P localizadas sobre um anel de seis carbonos (C<sub>6</sub>H<sub>18</sub>O<sub>24</sub>P<sub>6</sub>).

O fitato é importante não só pelo conteúdo de P; é uma molécula que tem a capacidade de carregar 12 cargas negativas, dando alta afinidade para quelar cátions divalentes como Ca<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup> e Cu<sup>++</sup>. A formação do complexo Ca-fitato reduz a disponibilidade de Ca e P (EVANS; PIERCE, 1981).

As enzimas fitases exógenas têm a capacidade de degradar o IP6 até inositol e liberar seis moléculas de P. Hope e Schwarz (1993) concluíram que 500 FTU são equivalentes a 1 g de P na forma de fosfato monocálcico em dietas milho e soja. Segundo Bedford e Partridge (2001), uma ração de milho e soja contém 2,8 g de fitato/kg<sup>-1</sup>, e 500 FTU degradam 40% desse fitato.

Além dos efeitos da fitase na liberação de P e no aumento na disponibilidade de Ca, as pesquisas evidenciam efeitos positivos na energia. Pirgozliev et al. (s.d.) observaram que em aves o uso da fitase tem impacto menor na energia metabolizável (EM) e maior na energia líquida. Baker (1998) sugeriu que o impacto positivo da fitase sobre a utilização da energia é por causa do acúmulo do aumento da proteína, da gordura e do amido digestíveis. Essa proposta foi conferida por Camden et al. (2001).

## 2.2. Classificação das fitases

As enzimas fitases podem ser classificadas de acordo com diferentes parâmetros como mecanismo catalítico, pH de ação ou dependendo o número do carbono onde é iniciada a defosforização (MULLANEY; ULLAH, 2003). De acordo com o mecanismo catalítico, essas enzimas podem ser classificadas em fitase histidina ácida (HAPhy),  $\beta$ -propeller fitase (BPPhy), cisteína fitase (CPhy) ou fitase púrpura ácida (PAPhy) (MULLANEY; ULLAH, 2003; GREINER, 2006). Segundo o pH de ação, as fitases podem ser ácidas ou alcalinas e com base no carbono onde é iniciada a defosforização são 3-fitase, 6-fitase ou 5 fitase. A maioria das fitases do mercado é da subfamília da fitase histidina ácida (WODZINSKI; ULLAH, 1996; MELLANEY et. al., 2000; KONIETZNY; GREINER, 2002; LEI; PORRES, 2003).

De acordo com o início da defosforilação, têm sido estudadas as 3-fitases e as 6-fitases. Inicialmente as 3-fitases têm sido consideradas de origem microbial e as 6-fitases, de sementes e plantas (GREINER, 2002).

Pesquisas *in vitro* com fitases purificadas e fitato de sódio como substrato amostram que essas fitases hidrolisam o fitato pela contínua defosforilação, gerando ortofosfato e uma série de fosfatos de *myo-inositol* parcialmente fosforizados. Os produtos dessas reações servem como substrato para hidrólises posteriores (KONIETZNY; GREINER, 2002).



Geralmente, as fitases não têm a capacidade de hidrolisar o anel de fitato completamente. A posição C-2 no anel de *myo-inositol* tem mostrado ser resistente à ação dessas enzimas. Além de sua origem bacteriana ou de fungos, a maioria das fitases histidina ácida libera cinco dos seis fósforos do fitato, e o produto final tem sido identificado como *myo-inositol* (2) fosfato (COSGROVE, 1970; LIM; TATE, 1973; HAYAKAWA et al., 1990; WYSS et al., 1999b; GREINER et al., 2000a, 2001a, 2002, 2007a e 2009; NAKANO et al., 2000).

### **2.3. História da vitamina D**

A vitamina D foi descoberta por Mellanby (McDOWELL, 2000) quando esse estudioso observou características especiais relacionadas a uma substância antirraquítica contida no óleo de fígado de peixe. Embora Mellanby ter sido o primeiro a identificar a substância, foi McCollum quem esclareceu a dúvida em 1922, por meio da destruição da vitamina A no óleo de peixe, injetando borbulhas de oxigênio e aquecendo. Mesmo depois da destruição da vitamina A, essa substância ainda era capaz de curar o raquitismo. Assim, em 1922, McCollum concluiu que aquela substância desconhecida representava outra vitamina lipossolúvel que depois foi chamada de vitamina D (McDOWELL, 2000).

Em 1966, De Luca demonstrou maior atividade antirraquítica de outros compostos mais potentes que a vitamina D<sub>3</sub>. O primeiro desses metabólitos foi 25OHD<sub>3</sub>, que é produzido no fígado. O metabólito 25OHD<sub>3</sub> foi quimicamente produzido por Blunt e colaboradores em 1968. Utilizando-se de químicos radioativos, foi demonstrado que o 25OHD<sub>3</sub> é transformado em outros três compostos distintos, sendo o mais importante deles o 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. No início dos anos de 1970, determinou-se que os rins são o principal tecido na produção de 1,25OHD<sub>3</sub>. A partir dos descobrimentos que demonstram que a forma ativa da vitamina D é produzida nos rins e é encontrada nos núcleos das células intestinais, foi introduzido o conceito que, em termos de estrutura e modo de ação, a vitamina D é similar aos hormônios (McDOWELL, 2000).

## **2.4. Precursores da vitamina D**

Vários compostos são derivados dos esteróis e pertencem à família da vitamina D; todos esses realizam as mesmas funções. O mais importante deles é o colecalciferol ou vitamina D<sub>3</sub>. Esse composto é formado pela radiação solar a partir do 7-deidrocolesterol. O colecalciferol ingerido na ração é idêntico ao produzido pelos raios solares. Existem mais de 10 pró-vitaminas que depois da irradiação formam compostos com atividade antirraquitismo. Os dois compostos mais encontrados na natureza são o ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) e o colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>). Todos os esteróis com atividade de vitamina D têm o mesmo núcleo de esteroide. Esses só diferem no tipo da cadeia ligada ao carbono 17 (McDOWELL, 2000).

O ergocalciferol é oriundo de um esteroide vegetal comum, o ergosterol, e é usualmente uma fonte de vitamina D nas dietas. O colecalciferol é produzido unicamente a partir de produtos de origem animal. O 7-deidrocolesterol é derivado a partir do colesterol ou do óleo de fígado de peixe, que é sintetizado no organismo e permanece armazenado na pele, parede intestinal e outros tecidos (McDOWELL, 2000). Os precursores da vitamina D não têm atividade antirraquítica até que o anelo B é aberto pela irradiação entre as posições 9 e 10, formando duplo enlace entre os carbonos 10 e 19 para formar a vitamina D (McDOWELL, 2000).

## **2.5. Metabolismo e ativação da vitamina D**

A vitamina D é absorvida no trato gastrointestinal em associação com outros lipídeos, igual às outras vitaminas lipossolúveis, sendo necessária a presença de sais biliares para sua absorção. Depois de ser absorvida, a vitamina D com outros lipídeos é transportada pelo portomicron até o fígado (McDOWELL, 2000).

A vitamina D ou colecalciferol da dieta é a forma não ativa dessa vitamina D que precisa ser ativada pelo fígado para ser transformada em 25 OH D<sub>3</sub>. Nos rins é novamente hidroxilada até 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. O processo no fígado não é regulado, embora nos rins o processo de hidroxilação no carbono

$1\alpha$  seja estritamente regulado pelos hormônios PTH e calcitonina, sendo a taxa de ativação dos rins menor que a do fígado.

A hidroxilação da 25OHD<sub>3</sub> depende da ação da enzima NADP-citocromo dependente (P450-redutase), tendo seu desenvolvimento no sistema microsomal hepático; a ação dessa enzima é dependente da concentração de 25(OH)D<sub>3</sub> armazenado (BARRAL et al., 2007).

O processo no fígado é regulado somente pela retroação da mesma 25OHD<sub>3</sub>. Ainda que a vitamina D<sub>3</sub> seja ingerida várias vezes, a concentração de 25OHD<sub>3</sub> não aumenta (GUYTON, 2006). O hormônio PTH é necessário para a ativação do metabólito 25OHD<sub>3</sub> a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Na ausência da PTH é produzida uma quantidade mínima de 1,25 dihidroxicolecalciferol (GUYTON; HALL, 2006).

Parte da 25(OH)D<sub>3</sub> é excretada na bile e reabsorvida no intestino delgado, criando uma circulação êntero-hepática (BAYNES; DOMONICZAK, 2000); o restante se une a uma proteína transportadora, a transcalciferina, sintetizada no fígado, que são levados aos rins.

Os níveis de íons de cálcio são inversamente proporcionais aos níveis de PTH. Portanto, o Ca exerce papel determinante na hora da secreção de PTH. No caso dos mamíferos, o nível de Ca médio é de 9-10 mg/100 ml. Caso o nível esteja acima ou abaixo dessa faixa, o hormônio PTH vai ser secretado ou inibido (GUYTON; HALL, 2006).

Boris (1977) avaliou a atividade de vários metabólitos da vitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 25OHD<sub>3</sub>; 1 $\alpha$ OHD<sub>3</sub>; e colecalciferol), mensurando o peso das tíbias de frangos de corte. Segundo Boris (1977), o metabólito 1 $\alpha$ OHD<sub>3</sub> é cinco vezes mais ativo que o colecalciferol e o 25OHD<sub>3</sub>. Entretanto, esse autor encontrou diferença significativa entre os metabolitos 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e 1 $\alpha$ OHD<sub>3</sub>.

## **2.6. Calcitonina**

A calcitonina é um hormônio secretado pela glândula tiroide e sua principal função é diminuir os níveis de cálcio plasmático. De modo geral, os efeitos desse hormônio são opostos aos do PTH (GUYTON; HALL, 2006). A calcitonina inibe a enzima 1 $\alpha$  hidroxilase e estimula a 24 hidroxilase. O resultado é uma inibição na síntese de 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e a produção da

24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, que praticamente não tem atividade na absorção de Ca e P. Esse hormônio estimula a ação dos osteoblastos para a deposição de Ca e P nos ossos.

## **2.7. Absorção intestinal de Ca e P**

Depois da ativação da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nos rins, essa é aderida ao enterócito por meio de um receptor chamado VDR (*Vitamin D Receptor*) e é transferida ao núcleo da célula onde interage com o material genético (SCOTT et al., 1982). Em resposta à ação da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, aumenta a síntese de proteínas responsáveis na absorção de Ca (*Calcium Binding Protein*, CaBP) e P (Fosfatase Alcalina) (MILLER et al., 1965). A CaBP não foi encontrada no intestino de frangos com raquitismo; entretanto, pôde-se verificar seu aparecimento depois da administração de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Além do incremento na produção de CaBP e fosfatase alcalina promovido pela 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, também foi demonstrado um incremento de outras proteínas na mucosa intestinal como Ca-stimulated ATPase e enzima fitase (COLLINS; NORMAN, 1991).

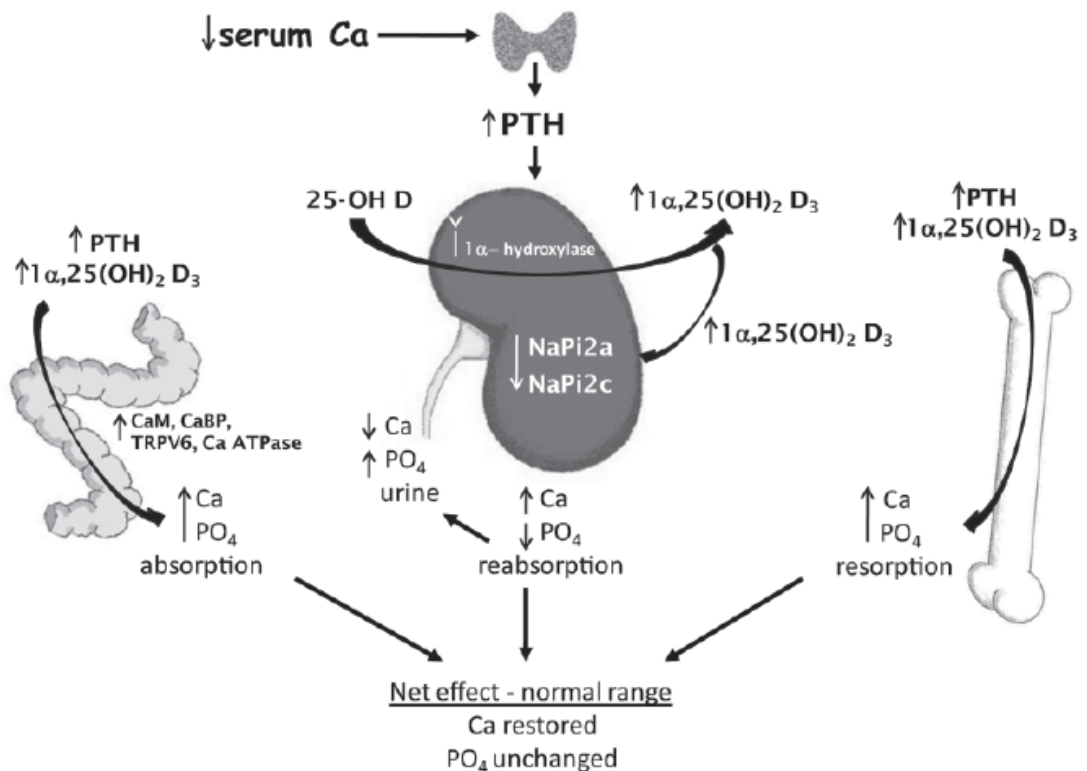
## **2.8. FGF – 23 (*Fibroblast Growth Factor 23*)**

Recentemente, foi esclarecida a participação do hormônio FGF-23 (*Fibroblast Growth Factor 23*), que é secretado pelos ossos, atribuindo esses uma nova função, a de glândula secretora, além de suporte estrutural.

O hormônio FGF 23 é um peptídeo de 32 kD (251 aa) produzido principalmente nos osteoblastos e osteócitos, é responsável pela regulação do nível de P na urina. Esse hormônio exerce sua função na ativação ou inibição da enzima 1 $\alpha$  hidroxilase e das proteínas transportadoras Na-P. Depois da ativação da vitamina D em sua forma hormonal 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aumenta a reabsorção do Ca nos rins e reduz a reabsorção de P pela via de inibição dos transportadores de sódio-fosfato (NaPi2a e NaPi 2c). A resposta líquida dos rins é acrescentar o Ca e diminuir o P na urina para restabelecer de maneira rápida a relação Ca:P no conteúdo extracelular (CRENSHAW, 2011).

As funções elementares dos ossos como suporte estrutural e reserva mineral já são conhecidas. Estudos recentes descrevem que os ossos também possuem função endócrina (FUKUMOTO; MARTIN, 2009; PRIÉ; FRIEDLANDER, 2010). A síntese e secreção de duas proteínas, FGF23 e osteocalcina, pelos osteoblastos, constituem suficiente evidência para considerar que os ossos atuam também como uma glândula endócrina. A osteocalcina é um hormônio produzido pelos osteoclastos e atua no pâncreas para regular a síntese de insulina (CRENSHAW, 2012).

Os resultados evidenciam interação entre o FGF23 e a vitamina  $1\alpha(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Shimada et al. (2004) observaram que os níveis de FGF23 aumentaram depois da injeção de  $1\alpha(\text{OH})_2\text{D}_3$  em ratos. O FGF23 está diretamente envolvido na expressão de enzimas necessárias na ativação e degradação renal da vitamina D (Figura 1) (CRENSHAW et al., 2011).



Fonte: Crenshaw et al. (2011).

Figura 1 - Eixo de Ca, PTH e vitamina D na regulação da homeostase de Ca.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Local**

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

#### **3.2. Animais**

Foram utilizados 1.080 frangos de corte, Cobb 500 machos, do primeiro aos 18 dias de idade, com peso médio inicial de 39,7 gramas/ave. As aves foram criadas no galpão experimental da UFV, em boxes com dimensões de 1,0 x 1,5 m, com população de 18 aves cada e densidade final de 12 aves/m. As aves foram sexadas e pesadas com um dia de idade, recebendo ração inicial formulada à base de milho e farelo de soja, atendendo às exigências propostas por Rostagno et al. (2011) e manejadas segundo manual da linhagem.

Durante a primeira semana da fase inicial, a ração foi fornecida em bandejas de plástico e os bebedouros eram do tipo copo, sendo depois substituídos por comedouros tubulares e bebedouros tipo copo, que foram mantidos até a fase final de criação; água e ração foram fornecidos à vontade durante todo o período experimental.

O galpão construído em concreto possuía como cobertura do piso cama de maravalha nova. O aquecimento artificial foi realizado com lâmpadas de luz infravermelha de 250 w entre os dias primeiro e oitavo de idade.

Diariamente foram registradas as temperaturas máximas e mínimas no interior das instalações, por meio de dois termômetros colocados na altura das aves, localizados em diferentes partes da instalação.

### 3.3. Delineamentos e dietas experimentais

Com um dia de idade os pintos foram pesados e distribuídos num delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), com 10 repetições e 18 aves por unidade experimental (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos experimentais

| Trat. | Descrição                  | Conteúdo basal |             | Aditivo |                                   |
|-------|----------------------------|----------------|-------------|---------|-----------------------------------|
|       |                            | Ca (%)         | P disp. (%) | Fitase  | Vit. 1 $\alpha$ OH-D <sub>3</sub> |
| T-1   | Controle negativo          | 0,640          | 0,250       | -       | -                                 |
| T-2   | T-1 + Vitamina D3          | 0,640          | 0,250       | -       | +                                 |
| T-3   | Controle positivo.         | 0,840          | 0,400       | -       | -                                 |
| T-4   | Controle negativo + Fitase | 0,547          | 0,170       | +       | -                                 |
| T-5   | T-4 + Vitamina D3          | 0,547          | 0,170       | +       | +                                 |
| T-6   | Controle positivo + Fitase | 0,697          | 0,270       | +       | -                                 |

A dieta basal foi formulada segundo as recomendações de Rostagno et al. (2011), exceto para Ca e P (Tabela 2). Foi determinado o desempenho zootécnico das aves por meio de parâmetros como uniformidade, cinzas totais de tibia, Ca e P da tibia.

A enzima fitase (Quantum ®) utilizada foi disponibilizada pela empresa AB Vista. Foram usados 500 FTU, usando a matriz nutricional de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 2).

A vitamina 1 alfa hidroxicolecalciferol foi fornecida pela empresa *Vitamin Derivatives*; foram utilizados 5 $\mu$ g/kg de ração, conforme as recomendações de uso (Tabela 2).

Tendo em conta as recomendações dos fabricantes para cada um dos aditivos usados na ração do experimento, os níveis calculados para cálcio (Ca) e fósforo disponível (P disp.) estão demonstrados na Tabela 2.

A composição centesimal das rações utilizadas no experimento é apresentada na Tabela 3. Os valores calculados da composição das rações são apresentados na Tabela 4.

Tabela 2 - Níveis calculados de cálcio (Ca) e fósforo disponível (P disp.) com os aportes nutricionais dos aditivos utilizados no experimento

| Trat. | Conteúdo basal |             | Aporte aditivo |           | Vit. 1 $\alpha$ OH $D_3$ |             | Valor total |             |
|-------|----------------|-------------|----------------|-----------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
|       | Ca (%)         | P disp. (%) | Fitase         |           | Ca (%)                   | P disp. (%) | Ca (%)      | P disp. (%) |
|       |                |             | Ca (%)         | Pdisp.(%) |                          |             |             |             |
| T-1   | 0,640          | 0,250       |                |           |                          |             | 0,640       | 0,250       |
| T-2   | 0,640          | 0,250       |                |           | 0,150                    | 0,100       | 0,790       | 0,350       |
| T-3   | 0,840          | 0,400       |                |           |                          |             | 0,840       | 0,400       |
| T-4   | 0,547          | 0,170       | 0,143          | 0,130     |                          |             | 0,690       | 0,300       |
| T-5   | 0,547          | 0,170       | 0,143          | 0,130     | 0,100                    | 0,050       | 0,790       | 0,350       |
| T-6   | 0,697          | 0,270       | 0,143          | 0,130     |                          |             | 0,840       | 0,400       |

T1: Controle negativo, T2: T1+Vitamina 1 $\alpha$ D3, T3: Controle positivo, T4: Controle negativo + fitase, T5: T4 + Vitamina 1 $\alpha$ D3 e T6: Controle positivo+fitase.

Tabela 3 - Composição centesimal e nutricional da dieta basal da fase inicial

|                           | T-1    | T-2    | T-3    | T-4    | T-5    | T-6    |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Milho                     | 53,12  | 53,12  | 53,12  | 53,12  | 53,12  | 53,12  |
| Farelo de soja            | 38,66  | 38,66  | 38,66  | 38,66  | 38,66  | 38,66  |
| Óleo de soja              | 4,11   | 4,11   | 4,11   | 4,11   | 4,11   | 4,11   |
| Sal                       | 0,35   | 0,35   | 0,35   | 0,35   | 0,35   | 0,35   |
| DL-Metionina 99%          | 0,29   | 0,29   | 0,29   | 0,29   | 0,29   | 0,29   |
| Bicarbonato de sódio      | 0,20   | 0,20   | 0,20   | 0,20   | 0,20   | 0,20   |
| L- Lisina HCL 79%         | 0,156  | 0,156  | 0,156  | 0,156  | 0,156  | 0,156  |
| Suplemento mineral        | 0,11   | 0,11   | 0,11   | 0,11   | 0,11   | 0,11   |
| Suplemento vitamínico     | 0,11   | 0,11   | 0,11   | 0,11   | 0,11   | 0,11   |
| Cloreto de colina         | 0,10   | 0,10   | 0,10   | 0,10   | 0,10   | 0,10   |
| Salinomicina (12%)        | 0,055  | 0,055  | 0,055  | 0,055  | 0,055  | 0,055  |
| Treonina                  | 0,042  | 0,042  | 0,041  | 0,041  | 0,041  | 0,041  |
| Avilamicina (10%)         | 0,01   | 0,01   | 0,01   | 0,01   | 0,01   | 0,01   |
| BHT                       | 0,01   | 0,01   | 0,01   | 0,01   | 0,01   | 0,01   |
| Calcáreo                  | 0,942  | 0,942  | 0,945  | 0,976  | 0,976  | 1,022  |
| Fosfato bicálcico         | 0,72   | 0,72   | 1,53   | 0,288  | 0,288  | 0,829  |
| Inerte                    | 1,015  | 0,965  | 0,202  | 1,404  | 1,354  | 0,817  |
| Vit. Alfa D3 <sup>1</sup> |        | 0,05   |        |        | 0,05   |        |
| Fitase <sup>2</sup>       |        |        |        | 0,01   | 0,01   | 0,01   |
| Total                     | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |

T1: Controle negativo, T2: T1+Vitamina 1 $\alpha$ D3, T3: Controle positivo, T4: Controle negativo + fitase, T5: T4+ Vitamina 1 $\alpha$ D3, T6: Controle positivo + fitase. Composição do premix vitamínico mineral (quantidade por kg de ração): Vitamina A 7500 UI, Vitamina D3: 1900, Vitamina E 28 UI, Vitamina K3: 1,50 mg, Vitamina B1: 2mg, Vitamina B2: 5,00 mg, Ácido nicotínico: 30 mg, Ácido pantoténico: 10 mg, Vitamina B6: 2,80 mg, Vitamina B12: 0,012 mg, Ácido fólico: 0,70 mg, Biotina: 0,07 mg, Colina: 300 mg, Cobre: 10 mg, Ferro: 50,0 mg, Iodo: 1,00 mg, Manganês: 70 mg, Selênio: 0,3 mg, Zinco: 65,0 mg. <sup>1</sup> Vitamina 1 Alpha D3 prevista por Sanphar S.A. <sup>2</sup> Enzima Fitase Quantum® prevista por AV Vista.



Tabela 4 - Valores calculados das rações

| Valores calculados       | T1    | T2    | T3    | T4    | T5    | T6    |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Energia Met. Kcal/kg     | 3050  | 3.050 | 3050  | 3050  | 3050  | 3050  |
| Proteína bruta (%)       | 21,84 | 21,84 | 21,84 | 21,84 | 21,84 | 21,84 |
| Cálcio (%)               | 0,640 | 0,790 | 0,840 | 0,687 | 0,787 | 0,840 |
| Fósforo disponível (%)   | 0,250 | 0,350 | 0,400 | 0,300 | 0,350 | 0,400 |
| Fósforo total (%)        | 0,483 | 0,483 | 0,632 | 0,403 | 0,403 | 0,503 |
| LIS Digestível (%)       | 1,217 | 1,217 | 1,217 | 1,217 | 1,217 | 1,217 |
| MET.+CIS. digestível (%) | 0,876 | 0,876 | 0,876 | 0,876 | 0,876 | 0,876 |
| MET digestível (%)       | 0,577 | 0,577 | 0,577 | 0,577 | 0,577 | 0,577 |
| TREO digestível (%)      | 0,792 | 0,792 | 0,791 | 0,791 | 0,791 | 0,791 |
| TRP digestível (%)       | 0,251 | 0,251 | 0,251 | 0,251 | 0,251 | 0,251 |
| Ca analisado (%)         | 0,590 | 0,550 | 0,910 | 0,530 | 0,600 | 0,550 |
| P Total analisado (%)    | 0,503 | 0,503 | 0,570 | 0,420 | 0,430 | 0,460 |

T1: Controle negativo, T2: T1+Vitamina 1 $\alpha$ D3, T3: Controle positivo, T4: Controle negativo + fitase, T5: T4+ Vitamina 1 $\alpha$ D3 e T6: Controle positivo + fitase.

### 3.4. Coletas de dados e características avaliadas

As aves e as rações foram pesadas no início e no final do experimento, quando foram obtidos parâmetros como: ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar do primeiro aos 18 dias de idade. Cinco aves na média do peso foram abatidas por cada repetição, para determinar as cinzas na tíbia. Foram coletados os peitos das aves abatidas, determinando-se a pesagem com e sem ossos para a análise estatística.

As tíbias foram processadas no laboratório da UFV para a análise de Ca por espectrofotometria de absorção atômica (EAA). Para o caso do fósforo, foi determinado pela intensidade da cor azul após reagir com molibdato de amônio e vitamina C como redutor (SILVA, 2006).

Todos os procedimentos experimentais em relação ao uso de animais para a pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética.

### 3.5. Temperatura e umidade

Com o auxílio de termômetros localizados em diferentes lugares do galpão, foram registradas as temperaturas máxima e mínima durante todo

período experimental. A temperatura média foi de  $27,6^{\circ}\text{C} \pm 3,5^{\circ}\text{C}$ . Para o caso da umidade, foi mensurada em  $54 \pm 8\%$  durante todo período de experimentação.

### **3.6. Análises estatísticas**

Os parâmetros de desempenho zootécnico, rendimento de peito e cinzas foram avaliados e submetidos à análise de variância por médio do *software* SAS (*Statistical Analysis System*), utilizando o teste F a 5% de probabilidade. A diferença entre as médias foi determinada pelo método *Student Newman Keuls*.

#### 4. RESULTADOS

Os aditivos utilizados evidenciaram um efeito positivo no ganho de peso (Anova  $P < 0,05$ ). Os tratamentos T3 e T6, controle positivo com e sem fitase, respectivamente, obtiveram as maiores ganhos. Esses resultados são semelhantes aos dados obtidos por Driver (2005).

A adição da vitamina  $1\alpha\text{OHD}_3$  aos tratamentos T2 e T5 não foi estatisticamente diferente aos tratamentos T3, T6, T1 e T4 para o parâmetro de ganho de peso. Foram encontradas diferenças significativas para os parâmetros de consumo e conversão alimentar (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados de desempenho em frangos de corte do primeiro aos 18 dias de idade

| Tratamento | Peso 18 dias (g)     | Ganho de peso (g)    | Consumo de ração (g) | Conversão Alimentar |
|------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| T-1        | 665,75 <sup>b</sup>  | 626,02 <sup>b</sup>  | 825,31 <sup>b</sup>  | 1,32 <sup>ab</sup>  |
| T-2        | 673,94 <sup>ab</sup> | 634,22 <sup>ab</sup> | 857,74 <sup>a</sup>  | 1,35 <sup>a</sup>   |
| T-3        | 699,40 <sup>a</sup>  | 659,71 <sup>a</sup>  | 855,57 <sup>a</sup>  | 1,30 <sup>b</sup>   |
| T-4        | 659,18 <sup>b</sup>  | 619,47 <sup>b</sup>  | 823,03 <sup>b</sup>  | 1,33 <sup>ab</sup>  |
| T-5        | 675,10 <sup>ab</sup> | 635,39 <sup>ab</sup> | 833,90 <sup>a</sup>  | 1,31 <sup>b</sup>   |
| T-6        | 698,42 <sup>a</sup>  | 658,71 <sup>a</sup>  | 858,80 <sup>a</sup>  | 1,31 <sup>b</sup>   |
| CV         | 3,912                | 4,153                | 3,131                | 2,492               |

T1: Controle negativo, T2: T1+Vitamina  $1\alpha\text{D}_3$ , T3: Controle positivo, T4: Controle negativo + Fitase, T5: T4+ Vitamina  $1\alpha\text{D}_3$ , T6: Controle positivo + Fitase.

Nota: Os valores com letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas pelo método SNK ( $p > 0,05\%$ ).

Foi considerada a uniformidade do peso das aves aos 18 dias de idade. Foram pesadas todas as aves, determinando-se a média do peso por cada repetição. Os resultados sobre as aves que ficaram na faixa do peso médio  $\pm 10\%$  são apresentadas na Tabela 6. Para o caso da uniformidade, do desvio-padrão e do coeficiente de variação (CV) do peso, não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados de uniformidade em frangos aos 18 dias de idade

| Tratamento | Uniformidade (%) | Desvio-padrão | Coefficiente (Variação) |
|------------|------------------|---------------|-------------------------|
| T-1        | 79,00            | 63,46         | 9,63                    |
| T-2        | 77,00            | 59,30         | 8,82                    |
| T-3        | 77,00            | 62,26         | 8,91                    |
| T-4        | 71,00            | 65,85         | 10,04                   |
| T-5        | 74,00            | 64,71         | 9,66                    |
| T-6        | 69,00            | 68,13         | 9,77                    |
| CV         | 13,09            | 21,16         | 23,02                   |

T1: Controle negativo, T2: T1+Vitamina 1 $\alpha$ D3, T3: Controle positivo, T4: Controle negativo + fitase, T5: T4+ Vitamina 1 $\alpha$ D3, T6: Controle positivo + fitase.

Nota: Anova (P > 0,05) NS.

Cinco aves na média do peso de cada repetição foram abatidas para análises em laboratório. O peso das tíbias secas foi estatisticamente diferente entre os tratamentos T3 e T6, controle positivo com e sem fitase, respectivamente, com respeito aos demais tratamentos.

Observou-se diferença significativa (P < 0,05) entre os tratamentos (Tabela 7). Após a secagem, verificou-se que a adição da vitamina 1 $\alpha$ OHD<sub>3</sub> no tratamento T2 aumentou o peso das tíbias em 7,63% (P < 0,05) comparado com o peso do tratamento T1 (sem fitase). No caso do tratamento T5, foram 4,2% mais pesadas comparadas com aquelas do T4 (com fitase). Entretanto, não foram encontradas diferenças estatísticas.

Tabela 7 - Peso e conteúdo de cinzas da tíbia aos 18 dias de idade

|     | Peso/Tíbia úmida (g) | Peso/Tíbia seca (g) | Cinza (%)            | Cinza (g)          |
|-----|----------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
| -   |                      |                     |                      |                    |
| T-1 | 3,442 <sup>c</sup>   | 1,283 <sup>b</sup>  | 43,04% <sup>c</sup>  | 0,552 <sup>c</sup> |
| T-2 | 3,682 <sup>b</sup>   | 1,381 <sup>b</sup>  | 43,47% <sup>bc</sup> | 0,601 <sup>c</sup> |
| T-3 | 3,791 <sup>a</sup>   | 1,582 <sup>a</sup>  | 46,53% <sup>a</sup>  | 0,736 <sup>a</sup> |
| T-4 | 3,454 <sup>b</sup>   | 1,349 <sup>b</sup>  | 41,71% <sup>d</sup>  | 0,563 <sup>c</sup> |
| T-5 | 3,679 <sup>a</sup>   | 1,406 <sup>b</sup>  | 42,40% <sup>cd</sup> | 0,596 <sup>c</sup> |
| T-6 | 3,813 <sup>a</sup>   | 1,519 <sup>a</sup>  | 44,37% <sup>b</sup>  | 0,675 <sup>b</sup> |
| CV  | 5,412                | 7,607               | 2,66                 | 8,84               |

T1: Controle negativo, T2: T1+Vitamina 1 $\alpha$ D3, T3: Controle positivo, T4: Controle negativo + fitase, T5: T4+ Vitamina 1 $\alpha$ D3, T6: Controle positivo + fitase.

Nota: Os valores com letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas significativas pelo método SNK ( $p > 0,05\%$ ).

No caso das cinzas (porcentagem e peso), as aves do tratamento T3 apresentaram a maior porcentagem, seguido do T6 com diferença estatística entre esses. A adição da vitamina 1 alfa hidroxicolecalciferol aumentou a porcentagem e o peso das cinzas, comparado com T1 e T4, que correspondem aos controles negativos sem e com fitase (Tabela 7). A porcentagem de cinza no T2 (com adição da vitamina 1 alfa hidroxicolecalciferol sem fitase) não foi estatisticamente diferente à porcentagem de cinzas do T1. No T5 (com adição da vitamina 1 alfa hidroxicolecalciferol com fitase) não foi apresentada diferença estatística comparado ao T4 (controle negativo com fitase).

A análise do conteúdo de fósforo foi realizada em termos de porcentagem e peso. A adição da vitamina 1 $\alpha$ OHD<sub>3</sub> isolada apresentou diferença estatística significativa na retenção de fósforo na tíbia, comparado com o tratamento T1. O uso da enzima fitase e da vitamina 1 $\alpha$ OHD<sub>3</sub> aumentou o conteúdo de fósforo, mas não foi estatisticamente diferente entre T4, T5 e T6 (Tabela 8). Esses dados concordam com os encontrados por Edwards (2002).

O conteúdo de Ca nos ossos não foi estatisticamente diferente entre os tratamentos, possivelmente pela maior eficiência das aves para absorver Ca quando os níveis estão abaixo dos requerimentos (Tabela 8).

Tabela 8 - Conteúdo de Ca e P nas cinzas aos 18 dias de idade

|     | Ca (%) | Ca (g) | P (%)              | P (g)              |
|-----|--------|--------|--------------------|--------------------|
| T-1 | 30,29  | 0,167  | 19,57 <sup>b</sup> | 0,108 <sup>d</sup> |
| T-2 | 32,74  | 0,198  | 22,08 <sup>a</sup> | 0,132 <sup>c</sup> |
| T-3 | 29,08  | 0,214  | 22,94 <sup>a</sup> | 0,168 <sup>a</sup> |
| T-4 | 31,23  | 0,175  | 22,05 <sup>a</sup> | 0,124 <sup>c</sup> |
| T-5 | 30,23  | 0,180  | 22,88 <sup>a</sup> | 0,135 <sup>c</sup> |
| T-6 | 29,63  | 0,200  | 22,47 <sup>a</sup> | 0,151 <sup>b</sup> |
| CV  | 12,63  | 15,29  | 7,55               | 10,90              |

T1: Controle negativo, T2: T1+Vitamina 1 $\alpha$ D3, T3: Controle positivo, T4: Controle negativo + fitase, T5: T4+ Vitamina 1 $\alpha$ D3, T6: Controle positivo + fitase.

Nota: Anova (P > 0,05) NS.

Foram pesados os peitos das aves (com e sem ossos) aos 18 dias de idade, mas não foram encontradas diferenças estatísticas significativas para esse parâmetro (Tabela 9).

Tabela 9 - Peso de peito aos 18 dias de idade

|    | Rendimento   |       | Rendimento   |       |
|----|--------------|-------|--------------|-------|
|    | Com Osso (g) | %     | Sem Osso (g) | %     |
| T1 | 143,18       | 21,00 | 110,76       | 16,24 |
| T2 | 142,06       | 20,85 | 109,69       | 16,02 |
| T3 | 149,48       | 21,17 | 114,93       | 16,32 |
| T4 | 144,40       | 21,20 | 111,04       | 16,29 |
| T5 | 146,12       | 21,25 | 112,71       | 16,44 |
| T6 | 150,66       | 21,26 | 116,12       | 16,48 |
| CV | 4,96         | 1,36  | 5,58         | 3,91  |

T1: Controle negativo, T2: T1+Vitamina 1 $\alpha$ D3, T3: Controle positivo, T4: Controle negativo + fitase, T5: T4+Vitamina 1 $\alpha$ D3, T6: Controle positivo + fitase.

Nota: Anova (P > 0,05) NS.

## 5. DISCUSSÃO

Os grupos T2 e T5 foram comparados com os tratamentos T1 e T4 respectivamente por esses terem tido a mesma dieta, com a única diferença do uso da vitamina  $1\alpha\text{OHD}_3$ . As rações dos tratamentos T2 e T5 não atingiram os requerimentos nutricionais como foi o caso dos grupos T3 e T6, que foram utilizados como valores de referência.

O uso da enzima fitase e da vitamina  $1\alpha\text{OHD}_3$  foi significativo para os parâmetros de ganho de peso e conteúdo de fósforo nos ossos. Em vários trabalhos foram relatados a sinergia entre a enzima fitase e a  $1\alpha\text{OHD}_3$  (EDWARDS, 1993; BIEHL et al., 1995; MITCHELL; EDWARDS, 1996; BIEHL; BAKER, 1997).

O conteúdo de Ca foi superior quando foram utilizados os aditivos, mas não evidenciaram diferenças estatísticas significativas, possivelmente pela maior eficiência das aves para absorver Ca em níveis baixos desse mineral. Segundo Mitchel e Edwards (1996) e Yan et al. (2006), a fitase tem impacto menor na liberação de Ca nas dietas de frangos. Farkvam (1989) observou que o aumento nas concentrações de Ca nas rações de frangos acrescentava a quantidade de Ca ligada ao anelo do fitato.

Foi determinada a composição percentual e em gramas das cinzas, em que o tratamento T3 foi o grupo de maior concentração ( $p < 0,05\%$ ). Entre os T3 e T6, que atingem 100% dos requerimentos das tabelas nutricionais, encontrou-se diferença estatística ( $p < 0,05\%$ ), tendo em conta os aportes fornecidos pelo fabricante da enzima.

A adição da vitamina  $1\alpha\text{OHD}_3$  não aumentou o conteúdo total de cinzas nem em porcentagem nem gramas, quando foi comparado com os tratamentos T1 e T4 que tinham as mesmas dietas. As aves dos tratamentos T3 e T6 foram as que apresentaram maior porcentagem e peso nas cinzas.

A combinação de fitase e vitamina 1 alfa hidroxicolecalciferol pode ser utilizada para reduzir os níveis de inclusão de fontes de cálcio e fosfatos nas rações, permitindo economia nesses alimentos além de redução na excreção ao médio ambiente.

## 6. CONCLUSÕES

O uso de aditivos na liberação e absorção de Ca e P dos alimentos são alternativa viável para a indústria de frangos de corte. As aves dos tratamentos T2 ( $1\alpha\text{OHD}_3$ ) e T5 ( $1\alpha\text{OHD}_3$  + fitase) resultaram com ganho de peso similar ao controle positivo. A suplementação de  $1\alpha\text{OHD}_3$  e fitase aumentou o porcentagem de P na tíbia com relação ao controle negativo.



## REFERÊNCIAS

- ATENCIO, A.; EDWARDS JR, H.M.; PESTI, G.M.; WARET, G.O. Vitamin D3 requirements of broiler breeders. **Poultry Science**, v. 85, p. 674-692, 2006.
- BAKER, D.H. Beyond phosphorus: phytase effects on protein, energy and trace mineral utilization of swine and poultry. In: BASF TECHNICAL SYMPOSIUM PROCEEDING CAROLINA SWINE NUTRITION CONFERENCE, 1998, Durham, North Carolina. **Proceedings...** Durham, 1998. p. 48-62.
- BARRAL, D.; BARROS, A.C.; ARAÚJO, R.P.C. Vitamina D: uma abordagem molecular. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 7, n. 3, p. 309-315, 2007.
- BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. **Bioquímica médica**. São Paulo: Manole, 2000. p. 566.
- BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G. **Enzymes in animal nutrition**. 2001.
- BEDFORD, M.R. New enzyme technologies for poultry feeds. **British Poultry Science**, v. 44, n. 1, p. S14-S16, 2003.
- BIEHL, R.R.; BAKER, D.H. Utilization of phytate and non-phytate phosphorus in chicks as affected by source and level of vitamin D . **Journal Animal Science**, v. 75, p. 2986-2993, 1997.
- BIEHL, R.R.; BAKER, D.H.; DeLUCA, H.F. 1 $\alpha$ -hydroxyl-3 $\beta$ -ated cholecalciferol compounds act additively with microbial phytase to improve phosphorus, zinc and manganese utilization in chicks fed soy-based diets. **Journal Nutrition**, v. 125, p. 2407-2416, 1995.
- BIEHL, R.R.; BAKER, D.H.; DeLUCA, H.F. Activity of various hydroxylated vitamin D 3 $\beta$  analogs for improving phosphorus utilization in chicks receiving diets adequate in vitamin D 3. **Poultry Science**, v. 39, p. 408-412, 1998.
- BORIS, A.; HURLEY, J.; TRMAL, T. Relative activities of some metabolites and analogs o-Cholecalci-erol in stimulation of tibia ash weight in chicks otherwise deprived of vitamin D. Nutley, New Jersey: Department of Cell Biology, Roche Research Center, 1977.
- CAMDEM, B.J.; MOREL, P.C.H.; THOMAS, D.V.; RAVINDRAM, V.; BEDFORD, M.R. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soya meal diets for broilers. **Animal Science**, v. 73, p. 289-297, 2001.

COLLINS, E.D.; NORMAN, A.W. **Handbook of vitamins**. New York: Marcel Dekker, 1991.

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

CRENSHAW, T.D.; RORTVEDT, L.A.; HASSEN, Z. A novel pathway for vitamin D-mediated phosphate homeostasis: implications for skeleton growth and mineralization. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1957-1964, 2011.

DeLUCA, H.F. **Cálcio, fósforo, vitamina D y parathormona**. Disponível em: <[http://www.engormix.com/s\\_articles\\_view.asp?art=269](http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=269)>. Acesso em: 2008.

DORIA, E.; GALLESHI, L.; CALUCCI, L.; PINZINO, C.; PILU, R.; CASSANI, E. et al. Phytic acid prevents oxidative stress in sedes: evidence from maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 967-978, 2009.

DRIVER, J.P.; PESTI, G.M.; BAKALLI, R.I.; EDWARDS JR, H.M. Phytase and 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol supplementation of broiler chickens during the starting and growing/finishing phases. **Poultry Science**, v. 84, p. 1616-1628, 2005.

EDWARDS JR, H.M.; SHIRLEY, R.B.; ESCOE, W.B.; PESTI, G.M. Quantitative evaluation of 1 $\alpha$ -hidroxicholecalciferol as cholecalciferol substitute for broilers. **Poultry Science**, v. 81, p. 664-669, 2002.

EVANS, W.J.; PIERCE, A.G. Calcium phytate complex formation studies. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 58, p. 850-851, 1981.

FARKVAM, D.O.; NELSON, T.S.; KIRBY, L.K.; JOHNSON, Z.B.; STAMPS, A.T. Calcium and phytic acid in chick nutrition. **Nutrition Reports International**, v. 40, p. 33-42, 1989.

FUKUMOTO. S.; MARTIN, T.J. Bone as an endocrine organ. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 20, p. 230-236, 2009.

GREINER, R. Purification and characterization of three phytases fro germinated lupine seeds (*Lupinus albus* var. *Amiga*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6858-6864, 2002.

GREINER, R.; FAROUK, A. Purification and characterization of a bacterial phytase whose outstanding properties make it exceptionalle useful as a feed supplement. **The Protein Journal**, v. 26, p. 467-474, 2007.

GREINER, R.; CARLSSON, N.G.; LARSSON ALMINGER, M. Stereospecificity of myo-inositol hexakiphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 143-161, 2000.

GREINER, R.; LARSSON ALMINGER, M.; CARLSSON, N.G. Stereospecificity of myo-inositol hexakiphosphate dephosphorylation by a phytase degrading enzyme of baker's yeast. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 49, p. 2228-2233, 2001.

GREINER, R. et al. **Phytate-degrading enzymes**: regulation of synthesis in microorganisms and plants. Wallingford, UK: CAB International, 2006. p. 78-96. (Linking Agricultural and Environment).

GREINER, R.; GOMES DA SILVA, L.; COURI, S. Purification and characterization of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, 2009.

GUYTON, C.G.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HALPIN, K.M.; BAKER, D.H. Long-term effects of corn, soybean meal, wheat bran and fish meal on manganese utilization in the chick. **Poultry Science**, v. 65, p. 1371-1374, 1986.

HAYAKAWA, T.; SUZUKI, K.; MIURA, H.; OHNO, T.; IGUAE, I. Myo-inositol polyphosphate intermediates in the dephosphorylation of phytic acid by acid phosphatase with phytase activity from rice bran. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 279-286, 1990.

HOPPE, P.P.; SCHAWARZ, G. Experimental approaches to establish phosphorus equivalency of *Aspergillus niger* - phytate in pigs. In: SYMPOSIUM ON ENZYMES IN ANIMAL NUTRITION, 1996, Kartauselttingen, Switzerland. **Proceedings...** Kartauselttingen, Switzerland, 1996. p. 187-191.

IQBAL, T.H.; LEWIS, K.O.; COOPER, B.T. Phytase activity in the human and rat small intestine. **Gut**, v. 35, p. 1233-1236, 1994.

KANIS, J.A. Vitamin D metabolism and its clinical application. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 64, 1982.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalitic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 791-812, 2002.

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

LIM, P.E.; TATE, M.E. The phytases: II. Properties of phytase fraction F1 and F2 from wheat bran and the myo-inositol phosphates produced by fraction F2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 302, p. 326-328, 1973.

McDOWELL, L.R. **Vitamins in animal and human nutrition**. 2.ed. 2000.

MILLER, E.R.; ULLREY, D.E.; ZUTAUT, C.L.; HOEFFER, J.A.; LUECKE, R.W. **Journal Nutrition**, v. 85, p. 255, 1965.

MITCHELL, R.D.; EDWARDS JR, H.M. Additive effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on phytate phosphorus utilization and related parameters in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 75, p. 111-119, 1996.

MULLANEY, E.J.; DALY, C.B.; ULLAH, A.H.J. Advances in phytase research. **Advances in Applied Microbiology**, v. 47, p. 157-199, 2000.

MULLANEY, E.J.; ULLAH, A.H.J. The term fitase comprises several different classes of enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, p. 179-184, 2003.

NAKANO, T.; JOH, T.; NARITA, K.; HAYAKAWA, T. The pathway of dephosphorylation of *myo-inositol* hexakiphosphate by phytases from wheat bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin 61. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 995-1003, 2000.

NELSON, T.S.; SHIEH, T.R.; WODZINSKI, R.J.; WARE, J.H. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. **Poultry Science**, v. 47, p. 1842-1848, 1968.

O'DELL, B.L.; SAVAGE, J.E. Effect of phytic acid on zinc availability. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 103, p. 304-306, 1960.

PIRGOZLIEV, V.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M.R. The effect of exogenous phytase on dietary net energy for chicken. **Poultry Science**, s.d.

PRIE, L.; FRIEDLANDER G. Mechanisms of disease: genetic disorders of renal phosphate transport. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 2399-2409, 2011.

ROBERSON, K.D.; EDWARDS JR, H.M. Effects of 1,25dihydroxycholecalciferol and phytase on zinc utilization in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 73, p. 1312-1326, 1994.

ROJAS S.W.; SCOTT, M.L. Factors affecting the nutritive value of cottonseed meal as a protein source in chicks diets. **Poultry Science**, v. 48, p. 819-835, 1969.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONCELE, J.L. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa: UFV, 2011. 252 p.

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

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM – SAS. **Statistical analysis system user's guide**: Version 8.0. Cary: 1999.

SCOTT, M.L.; NESHEIM, M.C.; YOUNG, R.J. **Nutrition of the chicken**. Ithaca, New York: Scott, 1982.

SHIMADA, T.; HASEGAWA, Y.; YAMAZAKI, T.; MUTO, R.; HINO, Y.; TAKEUCHI, T.; FUJITA, K.; NAKAHARA, S.; FUKUMOTO, A.; YAMASHITA, T. FGF 23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, p. 429-435, 2004.

SILVA J.; DE QUEIROZ, A. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 2006.

SIMÃO, A.M.S. **Estudos das características cinéticas da fosfatase alcalina reconstituída em sistemas vesiculares**. 2008. 148 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

SIMONS, P.C.M.; VERSTEEGH, H.A.J.; JONGBLOED, A.W.; KEMME, P.A.; SLUMP, P.; BOS, K.D. et al. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 64, p. 525-540, 1990.

SUZUCKI, U.; YOSHIMURA, K.; TAKAISHI, M. UBER. Ein enzym "phytase" das anhydroxy-methylen-diphosposaura spaltet. **College of Agriculture Bulletin**, v. 7, p. 503-505, 1907.

THORP, B.H.. DUCRO, B.; FARQUHARSON, C.; SORENSEN, P.; WHITEHEAD, C.C. Avian tibial dyschondroplasia: the interaction of genetic selection and dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol. **Avian Pathology**, v. 22, p. 311-324, 1993.

WARDEN, W.K.; SCHAIBLE, P.J. Preliminary investigation concerning utilization of phytin phosphorus by the chick. **Poultry Science**, v. 41, p. 1692. 1962.

WODZINSKI, R.J.; ULLAH, A.H. Phytase. **Advances in Applied Microbiology**, v. 42, p. 263-303, 1996.

WYSS, M.; PASAMONTES, L.; FRIEDLEIN, A.; RÉMY, R.; TESSIER, M.; KRONENBERGER, A. et al. Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakiphosphate phosphohydrolase): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 359-366.

YAN, F.; KERSEY, J.H.; FRITTS, C.A.; WALDROUP, P.W. Effect of phytase supplementation on the calcium requeriment of broiler chicks. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, p. 112-120, 2006.