



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GRAZIELA DROCIUNAS PACHECO

**EFEITOS DO ACIDO FITICO DIETÉTICO E DA ENZIMA
FITASE EM SUÍNOS NA FASE DE TERMINAÇÃO E AÇÃO DO
ACIDO FÍTICO SOBRE A INTEGRIDADE EPITELIAL DAS
CÉLULAS IPEC-1**

GRAZIELA DROCIUNAS PACHECO

**EFEITOS DO ACIDO FITICO DIETÉTICO E DA ENZIMA
FITASE EM SUÍNOS NA FASE DE TERMINAÇÃO E AÇÃO DO
ACIDO FÍTICO SOBRE A INTEGRIDADE EPITELIAL DAS
CÉLULAS IPEC-1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Caio Abércio da Silva

Londrina
2010

GRAZIELA DROCIUNAS PACHECO

**EFEITOS DO ACIDO FITICO DIETÉTICO E DA ENZIMA FITASE EM
SUÍNOS NA FASE DE TERMINAÇÃO E AÇÃO DO ACIDO FÍTICO
SOBRE A INTEGRIDADE EPITELIAL DAS CÉLULAS IPEC-1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Caio Abércio da Silva
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dr. Ivan Moreira
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof. Dra. Ana Maria Bridi
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dra. Ana Paula F. R. Loureiro Bracarense
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dra. Elza Iouko Ida
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Londrina, 30 de abril de 2010.

Dedico e ofereço

A meus pais, *Francisco* e *Lucília* e às minhas irmãs *Michele* e *Evelin*, pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos de minha trajetória.

Agradecimentos

A *Deus*, pela minha vida, por guiar e iluminar meus caminhos...

À Universidade Estadual de Londrina, ao Departamento de Zootecnia, Fazenda Escola e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela oportunidade da realização da Graduação em Medicina Veterinária, Mestrado e Doutorado em Ciência Animal.

Ao Professor Dr. *Caio Abércio da Silva*, que além de um excelente orientador, é um grande amigo. Agradeço sua confiança e transmissão conhecimentos tanto para a vida profissional quanto para minha vida pessoal.

À Professora Dra. *Ana Maria Bridi*, que considero minha orientadora e também uma grande amiga, sempre disposta a ajudar, não importando dia, hora ou continente e pelos seus conselhos particulares.

À Professora Dra. *Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense* por ter proporcionado minha ida à Toulouse para realização do doutorado sanduíche e pela sua amizade.

À Dra. *Isabelle P. Oswald* pela orientação e transmissão de conhecimentos durante o período de doutorado sanduíche no Institut National de la Recherche Agronomique em Toulouse, França.

Ao Professor Dr. *Amauri Alcindo Alfieri* pelo trabalho e dedicação como Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Aos professores doutores *Alexandre Oba*, *Edson Luís de Azambuja Ribeiro* e *José Antonio Fregonesi*, membros da banca de qualificação, pelas contribuições no enriquecimento deste trabalho.

Aos Professores Dr. *Alexandre Oba*, Dr. *Antônio Carlos Farias dos Reis*, Dr. *Edson Luís de Azambuja Ribeiro*, Dr. *João Waine Pinheiro*, Dr. *José Antonio Fregonesi*, Dra. *Laila Talarico Dias Teixeira*, Dr. *Leandro das Doreis Ferreira da Silva*, Dr. *Marco Antônio da Rocha*, Dr. *Marcelo Marcondes Seneda*, Dra. *Nilva Aparecida Nicolao Fonseca*, Dr. *Paulo Eduardo Miranda Costa* pela amizade, apoio e conhecimentos transmitidos.

Aos pesquisadores e colaboradores do Institut National de la Recherche Agronomique, em especial ao *Philippe Pinton, Christiane Berin, Joëlle Laffitte, Anne Marie Cossalter, Romain Solinac e Bertrand Grenier.*

À secretária *Helenice Kieski* por sua dedicação, atenção e extrema eficiência.

Aos funcionários da Fazenda Escola Sr. *Pedro, Sr. Mauro, Inácio, Gilberto, Jorge, Sr. Antônio* pela ajuda durante todo experimento e pelos bons momentos de prosa.

Aos técnicos de laboratório *Tânia Mara Sedemaka Milane, Rogério Muther, José Roberto Campos de Magalhães (ZÉ)* e *Márcio* dos Laboratórios de Análise de Alimentos e Nutrição Animal, Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Medicina Veterinária e Laboratório de Solos do Departamento de Agronomia da UEL, pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Aos funcionários e pós-graduandos do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela colaboração durante as análises laboratoriais.

Aos amigos e companheiros da suinocultura, em especial ao *Arturo Pardo Lozano* (Arturito) que conduziu o experimento comigo, e também a *Sylvia Luíza Vinckurovas* (Louis), *Roberta Abrami Monteiro Silva* (Robs), *Piero da Silva Agostini* (Pi), *Mauro Ywazaki* (Maurão), *Juliana Contrera Belé, Julian Cristina Borosky e Mara Cristina Ribeiro da Costa.*

Aos estagiários de ontem e mestrandos exemplares de hoje: *Danyel Bueno Dalto, David Fernandes Gavioli* (Dhomini), *Eduardo Racle de Oliveira* (Du), *Marina Avena Tarsitano, Thales de Almeida Bitencourt Cardoso* (Thathá) e *Camila Constantino.*

Aos estagiários da suinocultura *Rita de Cássia Dourado* (Ritinha), *Christiane Gual Menegucci, Juliana Nogueira Ruiz, João Paulo Orsi, Rimena do Amaral Vercellino, Daniela F.M.A. Rodrigues, Louise Manha Peres* e a todos os alunos envolvidos nas diversas etapas do experimento.

Aos amigos *Alice Marmugi, Amine Benarbia, Ana Paula de Souza Fortaleza, André Eduardo Pirolla Sena, Augusto Arrebola de Moraes Presoto, Cinthia Maria Ribeiro, Cleiton Ramos (MA), Flaviana Alves Dias, Juliana Alves Dias, Leticia Yamazaki Buck, Luciana Takemura, Ricardo Borges, Sérgio Marcelo Câmara Lima, Thereza Cristina Duque Dall'agnol* que sempre estiveram presentes, independentemente do momento. Foram pessoas fundamentais, sendo muito atenciosos e sempre dando força para continuar nessa caminhada.

Aos meus grandes amigos mexicanos e gregos, que foram durante 1 ano minha família em Toulouse: *Verónica Rocío Vázquez-Garzón, Nadia Florencia Ojeda-Robertos, Cintli Martínez Ortiz de Montellano, Juan Pablo Hurtado Montero, Fotini Manclaraki e Athanasios Fysikepoulos*. Gracias, amigos e Ευχαριστώ πολύ, φίλοι μου!!! (efharisto poli, fili mou).

A CAPES e ao COFECUB, pela concessão das bolsas de estudo.

A todos aqueles que em algum momento passaram pela minha vida, deixando sempre palavras de amizade, incentivo e em muitos casos, saudades, meus sinceros agradecimentos!

“C’est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante...”

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa, que fez tua rosa tão importante...”

Antoine de Saint-Exupéry (Le Petit Prince)

PACHECO, Graziela Drociunas. **Efeitos do ácido fítico dietético e da fitase em suínos na fase de terminação e ação do ácido fítico sobre a integridade epitelial das células IPEC-1**. 2010. 126f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010).

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência do ácido fítico, veiculado na ração de suínos na fase de terminação, principalmente pelo farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD), e da adição de fitase sobre os parâmetros de desempenho, perfil sérico e qualidade da carcaça, da carne e da linguiça tipo frescal. Para o experimento foram utilizados 32 suínos de linhagem comercial Pen Ar Lan (16 machos castrados e 16 fêmeas) com peso médio inicial \pm desvio padrão de $60,31 \pm 5,32$ kg. Os animais foram distribuídos em um delineamento em blocos casualizados num esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, sendo os fatores: dietas sem inclusão de FGMD e com inclusão de 40% de FGMD, dietas sem inclusão de fitase e com inclusão de 1000 FTU, machos castrados e fêmeas. Os animais receberam água e ração à vontade durante todo o período experimental. Foram avaliados o consumo diário de ração, o ganho diário de peso e a conversão alimentar. O sangue dos animais foi colhido para hemograma e determinação das concentrações de fósforo, cálcio, ferro, triglicérides, colesterol e uréia. Os teores de fósforo e cálcio foram determinados nas fezes. Ao atingirem $87,19 \pm 7,08$ kg de peso vivo, os animais foram abatidos e submetidos à avaliação das características de carcaça. Foram coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi* para análise da qualidade da carne e para confecção de uma linguiça tipo frescal. As amostras de lombo foram submetidas às avaliações de pH, cor, marmoreio, perda de líquido, maciez, composição química, análise sensorial, composição de ácidos graxos e oxidação lipídica. Na linguiça frescal foram avaliadas a cor, o pH, a composição química e a oxidação. O FGMD, como principal fonte de ácido fítico na ração, promoveu maior consumo de ração pelos animais. As demais variáveis de desempenho, carcaça e parâmetros hematológicos não foram influenciadas pelos fatores FGMD e fitase. A utilização da enzima fitase na ração foi efetiva na redução da excreção de fósforo e cálcio pelas fezes. Em relação ao fator gênero, machos castrados apresentaram maior excreção de uréia, maiores peso vivo e de carcaça e maior espessura de toucinho. Fêmeas apresentaram maior rendimento de carne na carcaça. Dietas com FGMD melhoraram a estabilidade lipídica da carne e da linguiça frescal. A inclusão da enzima fitase não interferiu na oxidação. Foi desenvolvido um experimento em cultivo celular, com o objetivo de avaliar a ação do ácido fítico e da micotoxina deoxinivalenol (DON) sobre a integridade da membrana das células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1 de suínos. Foram realizados os testes de viabilidade celular e medida da resistência elétrica transepitelial (TEER). Para o teste de viabilidade celular foram empregadas as concentrações 0; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mM de ácido fítico. Foram utilizadas, em média, 5000 células/poço. Para o teste de resistência elétrica transepitelial, utilizou-se as concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mM de ácido fítico e 25 μ M de DON. As células foram pré-tratadas com ácido fítico e posteriormente desafiadas ao DON. A análise dos dados revelou que o ácido fítico diminuiu o número de células nos poços de maneira dose dependente, e que em cultivo celular, o ácido fítico diminuiu os efeitos negativos da micotoxina deoxinivalenol sobre a integridade da membrana das células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1 de suínos.

Palavras-chave: Antioxidante. Enzima. Fitato. Micotoxina.

PACHECO, Graziela Drociunas. **Effects of dietary phytic acid and phytase for finishing pigs and action of phytic acid on the integrity of epithelial cells IPEC-1.** 2010. 126p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Londrina State University, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of phytic acid, carried mainly by defatted corn germ meal (DCGM) in the finishing pigs' diet and the addition of phytase on the performance parameters, carcass and serum profiles, meat and fresh sausage qualities. Thirty two pigs from a commercial line Pen Ar Lan (16 barrows and 16 gilts) averaging (\pm SD) 60.31 ± 5.32 kg of body weight. The experimental design was a 2x2x2 factorial, having as factors: diets without and with 40% of DCGM; diets without and with 1000 FTU of phytase; animal's gender. The animals were fed and had water available *ad libitum* during all experimental period. The daily feed intake, daily weight gain and feed conversion were calculated. Blood samples were taken to evaluate the serum values of phosphorus, calcium, iron, triglycerides, cholesterol and urea. Also, the levels of phosphorus and calcium in the feces were determined. Upon reaching 87.19 ± 7.08 kg body weight, the animals were slaughtered and their carcass traits were evaluated. Samples from *Longissimus dorsi* muscle were analyzed for meat and fresh sausage qualities. Samples from the loin muscle were assessed for pH, color, marbling, drip loss, texture, chemical composition, sensory analysis, fatty acid composition and lipid oxidation. Also, color, pH, chemical composition and oxidation of fresh sausage were evaluated. No differences were found between the factors for performance, serum profile and carcass characteristics ($P > 0.05$). DCGM in the diets promoted greater feed intake. The other performance variables and carcass and hematological parameters were not influenced by the DCGM and phytase factors. Animals fed with diet with phytase had a lower fecal level of phosphorus and calcium ($P < 0.05$). For the gender factor, barrows had a greater excretion of urea, increased carcass weight and backfat thickness. Females had a better yield of meat in the carcass. Diets with DCGM influenced the lipid stability of meat and fresh sausage. The inclusion of phytase had no effect in the oxidation. A study was carried out in order to evaluate the effects of phytic acid, as a possible inhibitor of cellular changes induced by toxic substances, such as mycotoxin deoxynivalenol (DON), on the line of intestinal epithelial cells of pigs (IPEC-1). Cell viability test was carried out followed by transepithelial electrical resistance (TEER) measurements. This cell viability test was measured using phytic acid at concentrations of 0, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 mM phytic and 5000 cells/well. For the transepithelial electrical resistance analysis was used concentrations at 0.5, 1.0 and 5.0 mM phytic acid and 25 mM of DON. The cells were previously treated with phytic acid and then challenged with the DON. Data analysis showed a dose-dependent reduction of the number of cells in the wells, and a negative effect on the cells was observed at concentrations of 5.0 mM phytic acid. The results indicated that phytic acid in cell culture decreased the negative effects of the mycotoxin deoxynivalenol on the membrane integrity of pig intestinal epithelial cell line IPEC-1.

Keywords: Antioxidant. Enzyme. Phytate. Mycotoxin.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1 – Anatomia do grão de milho e suas partes constituintes	18
Figura 2 – Estrutura do ácido fítico	21
Figura 3 – Ácido fítico quelatado com proteínas e aminoácidos	23
Figura 4 – Ação da fitase sobre o fitato.....	26
Figura 5 – Fitase de <i>Aspergillus sp.</i> com o centro catalítico enfatizado	27

Ação do ácido fítico e do deoxinivalenol (DON) sobre a integridade da membrana de células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1 de suínos

Figura 1 – Efeito do ácido fítico sobre a viabilidade de células epiteliais intestinais de suínos (IPEC-1)	107
Figura 2 – Efeito do ácido fítico e do deoxinivalenol (DON) sobre a resistência elétrica transepitelial (TEER) de células epiteliais intestinais de suínos (IPEC-1).....	108

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1 – Composição química do farelo de gérmen de milho desengordurado empregado em diferentes estudos..... 19

Artigo 1 – Farelo de gérmen de milho desengordurado, como principal fonte de ácido fítico, associado à fitase na dieta de suínos: efeitos sobre desempenho, perfil sérico e carcaça

Tabela 1 – Composição química do farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD), do grão de milho e do farelo de soja utilizados nas dietas experimentais..... 52

Tabela 2 – Composição percentual, química e energética das dietas experimentais 53

Tabela 3 – Médias e (desvios-padrão) do consumo diário de ração (CDR), ganho diário de peso (GDP) e conversão alimentar (CA) de suínos submetidos a diferentes tratamentos..... 56

Tabela 4 – Médias e (desvios-padrão) dos teores fecais de fósforo e cálcio e das concentrações séricas de fósforo, cálcio e ferro de suínos submetidos a diferentes tratamentos..... 58

Tabela 5 – Médias e (desvios-padrão) dos valores de hemácia, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), proteína total plasmática (PTP) e fibrinogênio de suínos submetidos a diferentes tratamentos..... 61

Tabela 6 – Interação entre fitase e gêneros para as variáveis hematócrito e hemoglobina de suínos submetidos a diferentes tratamentos..... 61

Tabela 7 – Médias e (desvios-padrão) dos valores séricos de triglicerídeos, colesterol e uréia de suínos submetidos a diferentes tratamentos..... 62

Tabela 8 – Médias e (desvios padrão) do peso vivo final (PV), peso da carcaça quente (PCQ), peso da carcaça resfriada (PCR), rendimento de carcaça (RC) e rendimento de carne na carcaça resfriada (RCC) de suínos submetidos a diferentes tratamentos.....	63
Tabela 9 – Médias e (desvios-padrão) do comprimento de carcaça (CC), profundidade de músculo (PM), espessura de toucinho (ET) e área de olho do lombo (AOL) de suínos submetidos a diferentes tratamentos.....	64

Artigo 2 – Utilização do farelo de gérmen de milho desengordurado, como principal fonte de ácido fítico, associado à fitase em rações de suínos: efeitos sobre a qualidade da carne e da linguiça tipo frescal

Tabela 1 – Composição química do farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD), do grão de milho e do farelo de soja utilizados nas dietas experimentais	74
Tabela 2 – Composição percentual, química e energética das dietas experimentais	75
Tabela 3 – Médias e (desvios-padrão) do pH inicial, pH final, luminosidade (L*), marmoreio (Marm), perda de líquido por gotejamento (PLG), perda de líquido no descongelamento (PLD) e perda de líquido no cozimento (PLC) do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos	79
Tabela 4 – Interação entre os fatores farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD) e gêneros e fitase e gêneros para o componente de cor vermelho-verde (a*) do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos	80
Tabela 5 – Interação entre fitase e gêneros para o componente amarelo-azul (b*), índice de saturação (c*) e ângulo de tonalidade (h*) do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos	82
Tabela 6 – Interação entre fitase e gêneros para maciez do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos	83
Tabela 7 – Médias e (desvios-padrão) da umidade, cinzas, extrato etéreo, proteína e oxidação (TBARS) do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos	84

Tabela 8 – Composição de ácidos graxos (g/100g) da carne de suínos submetidos a diferentes tratamentos	87
Tabela 9 – Interação entre farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD) e fitase para ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e ômega-6 (ω -6) do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos	88
Tabela 10 – Médias e (desvios-padrão) da umidade, cinzas e extrato etéreo da linguiça frescal elaborada com carne de suínos submetidos a diferentes tratamentos	90
Tabela 11 – Médias e (desvios-padrão) do pH, luminosidade (L^*), componente de cor vermelho-verde (a^*), componente amarelo-azul (b^*) e oxidação lipídica (TBARS) da linguiça frescal elaborada com carne de suínos submetidos a diferentes tratamentos	91

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 FARELO DE GÉRMEN DE MILHO DESENGORDURADO	18
2.2 SUBSTRATOS: ÁCIDO FÍTICO, FITATO E FITIN	21
2.3 ENZIMA: FITASE.....	25
2.4 OXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	31
2.5 MICOTOXINAS	33
REFERÊNCIAS	35
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	46
ARTIGO 1 – FARELO DE GÉRMEN DE MILHO DESENGORDURADO, COMO PRINCIPAL FONTE DE ÁCIDO FÍTICO, ASSOCIADO À FITASE NA DIETA DE SUÍNOS: EFEITOS SOBRE DESEMPENHO, PERFIL SÉRICO E CARCAÇA	47
RESUMO	48
ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES.....	65
LITERATURA CITADA	66

ARTIGO 2 – UTILIZAÇÃO DO FARELO DE GÉRMEN DE MILHO DESENGORDURADO, COMO PRINCIPAL FONTE DE ÁCIDO FÍTICO, ASSOCIADO À FITASE EM RAÇÕES DE SUÍNOS: EFEITOS SOBRE A QUALIDADE DA CARNE E DA LINGUIÇA TIPO FRESCAL	69
RESUMO	70
ABSTRACT	71
INTRODUÇÃO	72
MATERIAL E MÉTODOS	73
RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
CONCLUSÕES.....	92
LITERATURA CITADA	93
ARTIGO3 – AÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO E DO DEOXINIVALENOL (DON) SOBRE A INTEGRIDADE DA MEMBRANA DE CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS DA LINHAGEM IPEC-1 DE SUÍNOS	97
RESUMO	98
ABSTRACT	99
INTRODUÇÃO.....	100
MATERIAL E MÉTODOS	103
RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
CONCLUSÕES.....	113
LITERATURA CITADA	114
5 CONCLUSÃO GERAL	117
ANEXO	118
ANEXO A	119

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura mundial vem se desenvolvendo por meio da evolução genética, de estudos detalhados sobre as reais exigências nutricionais para cada categoria animal e da geração e aplicação de novos produtos que levam em consideração melhorias em todos os setores que englobam a cadeia de produção.

A alimentação do suíno, composta basicamente por milho e soja, representa aproximadamente 70% dos custos totais de produção. Contudo, em épocas de elevação de preços, é interessante que o produtor disponha de alternativas que não comprometam o investimento no setor.

A carne suína é a proteína animal mais consumida no mundo, sendo considerada um alimento saudável por apresentar excelentes níveis de proteínas, minerais e vitaminas, principalmente B₁, B₂, B₆, B₁₂, A e C (BRAGAGNOLO; AMAYA, 2002).

Por ser um produto rico em ácidos graxos insaturados, a carne suína está predisposta a maiores chances de oxidação. As reações bioquímicas que ocorrem no músculo no pós-abate facilitam o desencadeamento de processos oxidativos dos lipídios da carne (MORRISSEY et al., 1998) e contribuem para mudanças indesejáveis nos parâmetros de sua qualidade, afetando assim a cor, o sabor, a maciez e a capacidade de retenção de água (DIRINCK et al., 1996).

Com a finalidade de minimizar os processos oxidativos, durante o processamento dos alimentos, podem ser introduzidas substâncias antioxidantes, como nitrito (SHAHIDI, 1992), fenólicos sintéticos (HUANG et al., 1997), fenólicos naturais, ácido cítrico, ácido ascórbico (MIELCHE; BERTELSEN, 1994), vitamina E (SOUZA et al., 2007) e o ácido fítico (COSTA, 2005).

O ácido fítico é encontrado principalmente no gérmen do milho (BOHN et al., 2008) e sua estrutura sugere elevado poder de quelação, com alta afinidade pelos cátions polivalentes como cálcio, ferro, zinco, cobre e manganês. Esta informação coloca o ácido fítico como um componente apropriado para a carne suína, uma vez que esta apresenta elevado teor de ferro, e quelatando-se esse mineral, as possibilidades de oxidação diminuem consideravelmente.

A propriedade do ácido fítico em induzir a quelação de minerais torna-o também benéfico à saúde humana e indica seu uso na prevenção de cálculos renais, hipercalcinúria (GRAF; EATON, 1990), diminuição da toxicidade por metais pesados

(MINIHANE; RIMBACH, 2002) e dos níveis de colesterol e triglicérides no plasma (JARIWALLA et al., 1990). Dentre as múltiplas funções biológicas descritas acima, o ácido fítico destaca-se também por apresentar atividade anticancerígena (CHOLEWA et al., 2008). Em nível celular, o ácido fítico e os intermediários do fosfato de inositol estão envolvidos na regulação de genes, exportação de RNA mensageiro, edição de RNA e reparo do DNA (YORK et al., 1999; YORK, 2006).

O ácido fítico é considerado um antinutriente, por interferir na biodisponibilidade de minerais para suínos (FIREMAN; FIREMAN; 1998). A desfosforilação do ácido fítico ocorre pela ação da fitase dos grãos e da mucosa intestinal, da fosfatase alcalina da mucosa intestinal ou da fitase da flora intestinal (SEYNAEVE et al., 1999). Porém, um ponto pouco discutido é que ao suplementar as rações com fitase, há liberação de minerais, como o ferro e zinco, que são catalisadores das reações de oxidação lipídica (GEBERT et al., 1999). Estudos demonstram que o uso da fitase em rações animais diminui a suplementação do fósforo inorgânico e leva a uma redução considerável da excreção de fósforo. Além disso, a fitase microbiana pode melhorar a taxa de crescimento e a conversão alimentar dos suínos.

O êxito da suplementação de fitase é influenciado pelo nível de fósforo da dieta (total e disponível), pela quantidade de enzima suplementada, pelo nível de vitamina D e pela relação entre cálcio e fósforo (KORNEGAY; QUIAN, 1996).

Cerca de 25% da colheita total anual de cereais é afetada por micotoxinas, definidas como metabólitos secundários produzidos por fungos e amplamente distribuídas, causando prejuízos econômicos mundiais (WHITLOW; HAGLER Jr., 2008). Uma das mais importantes micotoxinas que afeta a produção animal é o deoxinivalenol, que causa transtornos gastrointestinais nos suínos, e dependendo da concentração, pode levar a perdas na saúde do rebanho e diminuição na performance dos animais.

Diante desses fatores, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos e a possível interação do ácido fítico, contido principalmente no farelo de germen de milho desengordurado (FGMD), e da enzima fitase sobre o desempenho, perfil sérico e características de qualidade da carcaça, da carne e da linguiça frescal de suínos. Observou-se também a ação do ácido fítico e da micotoxina deoxinivalenol sobre a integridade da membrana das células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1 de suínos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FARELO DE GÉRMEN DE MILHO DESENGORDURADO

O farelo de germen de milho desengordurado é um co-produto do milho. Na indústria, o grão de milho é degerminado por meio de moagem úmida, dando origem à canjica e ao germen. Este passa por moagem, peneiração, peletização e secagem, obtendo-se um produto peletizado rico em lipídios. Na sequência, o óleo é extraído com solvente. Como resultado, tem-se o germen Lex, que após ajuste dos níveis de minerais é novamente peletizado, dando origem ao farelo de germen de milho desengordurado (LEAL, 2000).

Na comparação entre o milho e seus co-produtos, Rodrigues et al. (2001) observaram que o farelo de germen de milho desengordurado apresentou entre todos, os maiores valores de cálcio, fósforo e ferro (0,74%, 0,73% e 207,15 ppm, respectivamente).

O ácido fítico está presente principalmente em cereais. No milho, sua maior concentração situa-se no germen do grão (Figura 1).

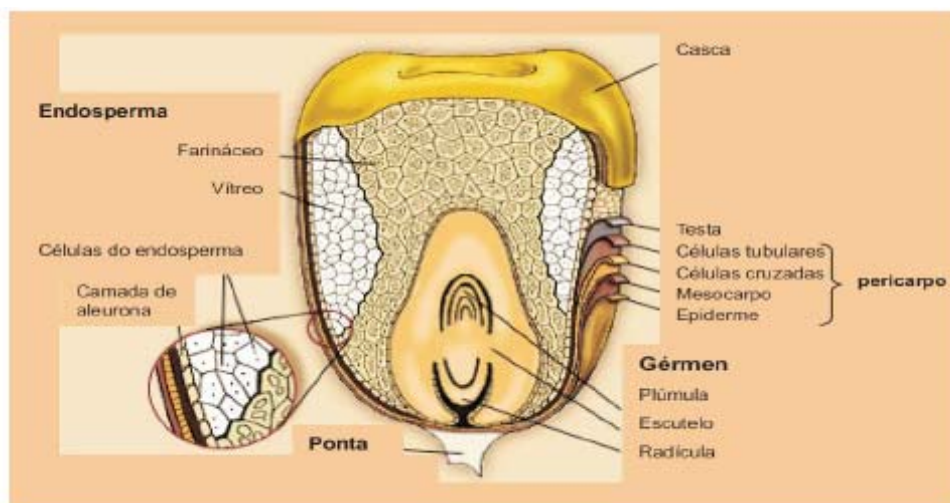


Figura 1 – Anatomia do grão de milho e suas partes constituintes

Fonte: Paes (2006)

Ao avaliar o teor de ácido fítico de híbridos de milho e alguns produtos industrializados, Fukuji et al. (2008) observaram que produtos derivados do milho, elaborados basicamente com endosperma - canjica, creme de milho, farinha de milho e fubá fino -

apresentaram menores teores de ácido fítico, quando comparados aos originários dos germens desengordurado, fino, gordo e película de milho. Os valores de ácido fítico encontrados para o germen gordo, fino e desengordurado foram 4,87; 3,58 e 2,81%, respectivamente.

Filgueiras et al. (2009), avaliaram a atividade antioxidante do ácido fítico do germen de milho desengordurado e concluíram que este apresentou potencial antioxidante, confirmado pela atividade de sequestro de radicais livres e quelação de metais. A atividade de sequestro do radical hidroxil foi dependente da concentração de ácido fítico. A atividade quelante para o ferro aumentou com a elevação da concentração do ácido fítico e com o tempo de contato com o mineral.

Estudos sobre a utilização do farelo de germen de milho desengordurado em rações para suínos têm sido desenvolvidos com resultados ainda controversos, estando envolvidas a forma de inclusão do produto e também as variações de composição dos ingredientes que, fruto de processos industriais, como a extração do óleo, podem apresentar valores diferentes entre si (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química do farelo de germen de milho desengordurado empregado em diferentes estudos

Referências	Composição (%) do FGMD				
	Matéria Seca	Proteína Bruta	Fibra Bruta	Extrato Etéreo	Matéria Mineral
Rodrigues et al. (2001)	90,16	10,85	2,78	1,29	6,59
Moreira et al. (2002)	91,14	10,20	-	1,27	-
Soares et al. (2004)	90,33	10,68	8,21	0,86	3,75
Costa (2005)	87,30	10,99	4,29	2,12	3,51
Lozano (2009)	88,19	10,88	-	0,22	3,91
Costa (2009)	87,35	10,72	3,67	2,49	4,69

Em dietas para suínos na fase de crescimento, Moreira et al. (2002), utilizando níveis crescentes de FGMD (0, 15, 30 e 45%) não observaram influência do farelo sobre o consumo diário de ração e sobre a conversão alimentar dos animais. Por outro lado, o ganho diário de peso apresentou redução linear com a inclusão do produto. Na fase de terminação, o consumo diário de ração apresentou efeito quadrático, tendo como valor mais baixo o nível de inclusão de 23,1%, e queda linear para as características de ganho diário de peso e conversão alimentar em função do aumento de inclusão do farelo na ração. As características de carcaça avaliadas não foram influenciadas pelos diferentes tratamentos

adotados. Em relação ao custo da ração, os autores destacaram que o nível de 15% de FGMD apresentou resultados mais econômicos em ambas as fases (crescimento e terminação).

Em estudo com um co-produto do milho que combina porções de pericarpo e endosperma do milho com farelo de gérmen de milho desengordurado na alimentação de suínos em crescimento, López et al. (2003) verificaram que a substituição do milho por até 40% do co-produto, não afetou o ganho de peso dos animais, porém, afetou negativamente a conversão da dieta.

Utilizando FGMD em diferentes concentrações (0, 10, 20 e 30%) em rações de suínos em crescimento e terminação, Soares et al. (2004) observaram redução linear do consumo diário de ração e da conversão alimentar com o aumento dos níveis de inclusão do farelo na ração, porém, não observaram diferenças nos parâmetros de carcaça avaliados.

Ao utilizar inclusões de 0, 10, 20 e 40% de FGMD para suínos em terminação durante 25 dias, Costa (2005) constatou que o FGMD pode ser utilizado em até 40% na ração sem efeitos deletérios no desempenho dos animais. Em relação às características de carcaça, foi observada maior profundidade de músculo e rendimento de carne.

Os maiores níveis de inclusão de FGMD na ração foram os que determinaram maior estabilidade lipídica, indicando que este agiu como um antioxidante na carne suína. O melhor resultado econômico foi com 40% de inclusão, porém esse critério depende da variação de preço dos ingredientes das rações.

Ao fornecer 50% de FGMD para suínos 0, 7, 14 e 21 dias antes do abate, Costa (2009) verificou que a inclusão do farelo na dieta dos animais não influenciou os resultados zootécnicos, as características de carcaça e a qualidade da carne. A inclusão do ingrediente mostrou-se economicamente viável, além de aumentar a vida útil do lombo refrigerado, sendo a preservação proporcional ao período de inclusão antes do abate dos animais.

Associando 40% de FGMD nas rações com diferentes concentrações de fitase (0, 500, 1000 e 1500 FTU) para suínos em terminação, Lozano (2009) não encontrou alterações sobre as características de desempenho, carcaça e carne dos animais.

2.2 SUBSTRATOS: ÁCIDO FÍTICO, FITATO E FITIN

Três terminologias são utilizadas para descrever o substrato da enzima fitase: ácido fítico, fitato e fitin. O ácido fítico é a forma livre do myo-inositol hexa&zsfosfato ou IP₆. Fitato é a forma aniônica do IP₆, encontrado nas plantas. O termo fitin refere-se especificamente aos complexos de IP₆ com potássio, magnésio e cálcio e pode às vezes também estar ligado a proteínas e amidos (ANGEL et al., 2002; SELLE; RAVINDRAN, 2007).

O myo-inositol (1, 2, 3, 4, 5,6) hexa&zsfosfato possui seis grupos fosfato ligados ao anel de inositol (Figura 2). O prefixo "myo" refere-se à conformação dos grupos hidroxil no anel de inositol. Utilizar o prefixo "hexa/as" no lugar de "hexa" indica que os fosfatos não estão internamente conectados (JOHNSON; TATE, 1969).

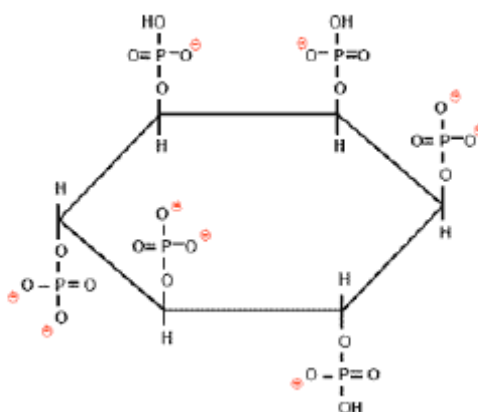


Figura 2 – Estrutura do ácido fítico

Fonte: www.ergomix.com)

A liberação dos seis grupos fosfato depende da fitase utilizada, podendo ocorrer em diferentes ordens e velocidades. Na conformação energética mais favorável do fitato, cinco dos grupos fosfatos estão em posição equatorial, enquanto um está em posição axial (WYSS et al., 1999).

Ésteres fosfóricos menores de wyo-inositol (InsP₄, InsP₃, InsP₂, InsP) possuem um papel importante no processo de transmissão de sinais e na mobilização de cálcio no armazenamento celular de animais e plantas (DASGUPTA et al., 1996).

De acordo com Lott et al. (2000), a colheita mundial de cevada, milho, sorgo, trigo, algodão, colza e soja, que são ingredientes fundamentais para as rações de animais, contém cerca de 16 milhões de toneladas de fitato.

O ácido fítico é o componente primário de estocagem de fósforo nas sementes, representando até 80% do total de fósforo e contribuindo com cerca de 1,5% do peso seco da semente. A função primária do ácido fítico é estocar fosfatos como fonte de energia e antioxidante para a germinação da semente (RABOY, 2003).

O fitato pode ser armazenado na camada aleurona (trigo, cevada, arroz) ou no gérmen (milho) da semente. A proporção do fósforo na forma fitato é de 60% no farelo de soja e 72% no milho. Já a proporção de fósforo disponível no farelo de soja varia entre 23 a 31%, enquanto no milho varia de 12 a 14% (SELLE; RAVINDRAN, 2008).

Teoricamente, uma molécula de IP_6 contém 28,2% de fósforo, o que corresponde a cerca de 282 g de fósforo inorgânico para cada quilograma de fitin dietético. Entretanto, o fósforo presente é apenas parcialmente disponível para o suíno, uma vez que a atividade endógena da fitase gerada pela mucosa do intestino delgado é insuficiente para desfosforilar efetivamente o fitato. Consequentemente faz-se necessário incluir outra fonte de fósforo na dieta para manter os níveis adequados do mineral. A combinação de altas concentrações de fósforo com as perdas endógenas do mineral, aliadas à pobre utilização do fitato, culmina em níveis excessivos de fósforo excretados.

Os fitatos são altamente eletronegativos, e por isso, podem quelatar íons positivos como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} e K^+ , diminuindo a absorção desses minerais pelos monogástricos. Eles podem também se integrar a íons positivos de proteínas, aminoácidos, carboidratos e lipídios, diminuindo sua solubilidade e digestibilidade (NOCERA, 2005) (Figura 3). O fitato pode se ligar ao amido diretamente via ponte de hidrogênio, ou indiretamente, associado às proteínas ou ao amido (RICKARD; THOMPSON, 1997).

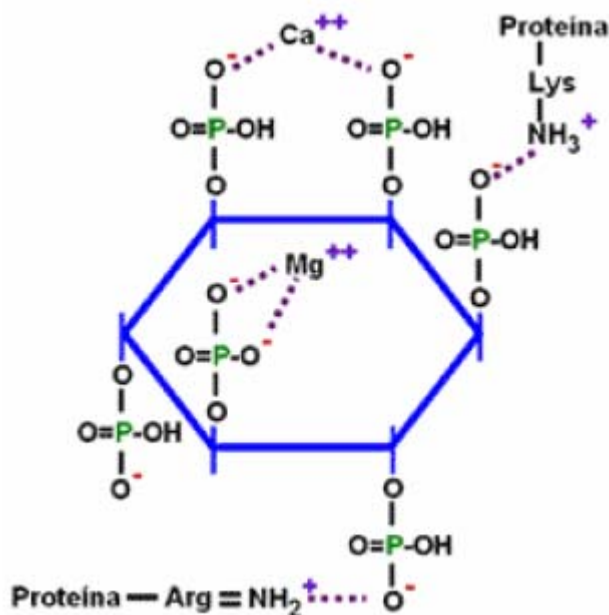


Figura 3 – Ácido fítico quelatado com proteínas e aminoácidos

Fonte: www.ergomix.com

Os fitatos geralmente são solúveis em pH baixo e quase completamente insolúveis em pH intestinal. A interação entre fitatos e minerais leva à formação de complexos que se precipitam no duodeno. Como o intestino delgado é o principal local de absorção dos cátions divalentes (JONGBLOED et al., 1993), isso implica em baixa biodisponibilidade dos minerais ligados ao fitato.

Em suínos, os complexos de proteína e fitato são formados nas condições ácidas do estômago (KIES et al., 2006). Porém, a formação desses complexos depende de alguns fatores, como: pH, fonte e solubilidade das proteínas e níveis de cálcio e magnésio da dieta (KEMME et al., 1999). Por exemplo, os complexos proteína-fitato formados em dietas à base de trigo são maiores em relação aos das dietas à base de milho.

Há evidências de interação entre fitato e lipídios no milho. São os chamados "lipofitins", que são um complexo de Ca/Mg-fitato, lipídios e peptídios. É possível que os complexos Ca-fitato e lipídios possam estar envolvidos na formação de sabões metálicos no lúmen intestinal, o que seria a maior restrição na utilização da energia derivada dos lipídios (LEESON, 1993).

Monogástricos, tais como aves e suínos, são capazes de utilizar apenas uma pequena quantidade do fitin, pois apresentam carência da enzima necessária para degradação do composto formado. Dependendo do vegetal, a digestibilidade do fitin pode variar de zero

até 40% nos suínos. A maior parte da fração de fósforo é excretada pelas fezes. A adição de fitase aumenta a digestibilidade do fósforo total contido nos alimentos de origem vegetal. Dessa forma, uma maior quantidade de fósforo estará disponível para absorção no intestino delgado dos monogástricos (BASF, 2010).

Existem três grandes problemas gerados pela dificuldade de digestão do fósforo de fitato pelos animais monogástricos. Primeiro, é que o fósforo que não é aproveitado na alimentação é excretado, causando sérios problemas de poluição ambiental (KIM et al., 2006). Um dos problemas mais sérios é a eutrofização, que ocorre quando o fosfato é depositado em rios, propiciando o crescimento de cianobactérias, hipóxia e morte de animais aquáticos (VATS; BANERJEE, 2004). O segundo problema é a necessidade de suplementação de fosfato na dieta dos suínos para satisfazer as exigências nutricionais de fósforo, o que representa aumento nos custos da ração. O terceiro problema é que o fósforo inorgânico é não-renovável, e as fontes naturais de fósforo podem se esgotar em até 80 anos, com a atual taxa de extração (KIM et al., 2006).

Em nutrição animal o fitato é descrito como um fator antinutricional. Por outro lado, a presença do fitato em dietas humanas pode ter consequências positivas, incluindo propriedades anticarcinogênicas, como descrito por Harland e Morris (1995). Desta forma, devido às várias propriedades desse composto, o interesse pelo ácido fítico não se limita somente à nutrição de suínos e aves, mas se estende à nutrição humana, ciência médica, tecnologia de alimentos, fisiologia e melhoramento vegetal (FEIL, 2001).

Uma das principais propriedades do ácido fítico é sua habilidade antioxidante, por meio da ligação e inativação dos íons ferro. Isso impede que os íons férricos participem da reação de Fenton (a formação do radical hidroxil OH é consequência da oxidação de Fe^{+2} para Fe^{+3} durante a reação do Fe^{+2} com H_2O_2 ou peróxidos) (WONG; KITTS, 2001). Esses radicais são moléculas altamente reativas que rapidamente reagem com proteínas, lipídios ou DNA, podendo causar desde injúria até morte celular. As doenças de Alzheimer e Parkinson, cirrose, artrite e câncer são ligadas a esses radicais (BENZIE, 2003) e o ácido fítico é considerado um potente inibidor das alterações que podem levar a essas doenças.

Após ingestão, o ácido fítico é desfosforilado a fosfatos de inositol menores. Estes podem agir como antioxidantes pela inibição do ferro mediador de reações de oxidação, aumentando a imunidade pelo aumento da função e da atividade das células *Natural Killer*, ou por estimular a morte de bactérias por neutrófilos (VUCENIK; SHAMSUDDIN, 2006).

O ácido fítico tem implicações na digestibilidade do amido, na resposta à glicose sanguínea (LEE et al., 2006), na diminuição das taxas de colesterol e de triglicérides (ONOMI et al., 2004) e na prevenção tanto da calcificação distrófica em tecidos moles (GRASES et al., 2004) quanto na prevenção das formações de cálculos renais (SELVAM, 2002).

A habilidade do ácido fítico em inibir as reações ferro-dependentes tem sido testada com sucesso no armazenamento de carnes (STODOLAK et al., 2007).

A análise das concentrações de fitato é complexa, e com isso, determinações precisas dos níveis de fitato em alimentos individuais, rações completas, digesta e fezes tornam-se difíceis. De acordo com Selle e Ravindran (2007), a falta de um método rápido e exato para analisar o conteúdo de fitato impede avanços nas investigações científicas e na aplicação prática da enzima fitase. As determinações rápidas das concentrações de fósforo total e fósforo ligado ao fitato permitiriam a formulação de dietas que atenderiam às exigências reais de fósforo pelos animais. Isso, por sua vez, reduziria o fósforo nos dejetos.

Os métodos analíticos padrões para determinação das concentrações de fitato são baseados no princípio de que o fitato e o cloreto férrico formam precipitados insolúveis de Fe^{+3} -fitato em pH ácido. As técnicas padrões são indicadas para a maioria dos ingredientes alimentares, porém, o método da precipitação do cloreto férrico não é aconselhável para amostras complexas, como as dietas completas (SELLE et al., 2003).

Uma importante limitação dessas técnicas, é que elas detectam o fósforo da molécula de fitato, porém, elas não têm a capacidade de identificar os diferentes ésteres de myo-inositol do fitato. Entretanto, é possível diferenciar os ésteres de fitato por meio da cromatografia líquida e cromatografia de troca iônica. Porém, essas técnicas são caras e consomem muito tempo para realização (KWANYUEN; BURTON, 2005). A técnica da espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo (NIRS) também tem sido utilizada por alguns pesquisadores, permitindo a análise de fósforo total e fósforo ligado ao fitato em ingredientes simples e em rações completas.

2.3 ENZIMA: FITASE

A fitase (myo-inositol hexa&isfosfato fosfohidrolase) é a enzima necessária para que ocorra a hidrólise e liberação do fósforo da molécula de fitato via uma série de

reações de desfosforilação que geram séries menores de ésteres de fosfato de *myo*-inositol, sendo eles, penta- e, *tetrakis*-, tris-, bis-, monofosfato ($IP_5 \rightarrow IP_4 \rightarrow IP_3 \rightarrow IP_2 \rightarrow IP_1$) e, por último, fósforo inorgânico (VATS; BANERJEE, 2004) (Figura 4). A fitase gera em média, 282 g de fósforo inorgânico de cada quilograma de fitato da dieta (SELLE; RAVINDRAN, 2008).

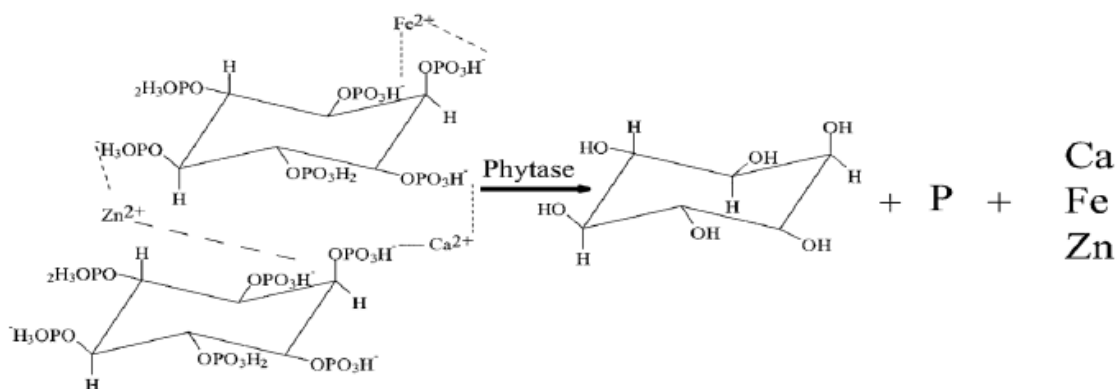


Figura 4 – Ação da fitase sobre o fitato

Fonte: Lei e Porres (2003)

A União Internacional de Química Pura e Aplicada e a União Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB) distinguem duas classes de fitases: para a EC 3.1.3.8, o nome recomendado é 3-fitase e o nome sistemático é *myo*-inositol hexa/asfosfato-3-fosfohidrolase. Para a EC 3.1.3.26, o nome recomendado é 6-fitase e o nome sistemático é *myo*-inositol hexakisfosfato-6-fosfohidrolase. A 3-fitase, libera preferencialmente o fósforo na posição C3, e a 6-fitase inicia a hidrólise na posição C6 do anel de *myo*-inositol hexa- e isfosfato (SELLE; RAVINDRAN, 2007).

Fitases são amplamente distribuídas na natureza e 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).

Apesar de o estudo da fitase ter começado em 1962, apenas a partir de 1991 é que a fitase do *Aspergillus niger* (Figura 5) foi comercialmente introduzida, quando a legislação introduzida nos Países Baixos para controlar a poluição por fosfatos em unidades de criação de suínos e aves amplificou seu desenvolvimento e aceitação. O que antes era mais restrito aos países que adotavam essa legislação tornou-se globalmente utilizado com o

reconhecimento do perigo ecológico da eutrofização. Além disso, essa proliferação das fitases no mercado gerou redução de preços e facilidades na aplicação da criação de animais monogástricos. Com a proibição da adição das farinhas de carne e ossos de animais na criação de monogástricos, houve um novo incentivo. Essas farinhas, que foram proibidas na União Européia em 2000, forneciam 57% do fósforo adicionado às rações. Essa proibição teoricamente gerou uma demanda de 110 mil toneladas de fósforo, mas a utilização da fitase microbiana reduziu essa demanda para 26 mil toneladas (SELLE; RAVINDRAN, 2008).

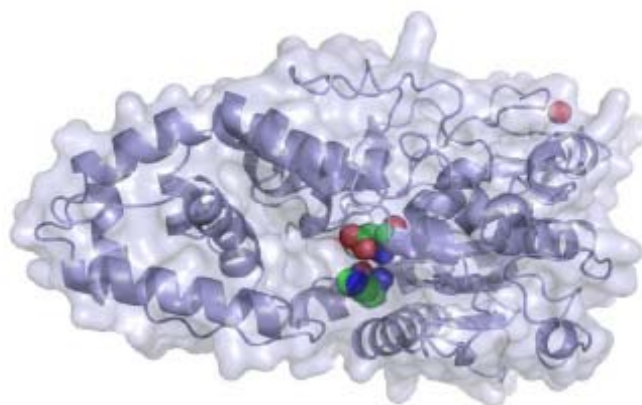


Figura 5 – Fitase de *Aspergillus sp.* com o centro catalítico enfatizado

Fonte: Kostrewa et al. (1997)

Classicamente, a atividade da fitase é definida em unidades de fitase, e expressa como FTU/kg. Uma FTU é a quantidade de enzima que libera 1 micromol (umol) de fósforo inorgânico por minuto de uma solução a 0,0051 mol/L de fitato de sódio em pH 5,5 e temperatura de 37°C (Engelen et al., 1994).

Existem quatro formas de os suínos degradarem o fitato por meio da atividade enzimática:

- 1) Enzimas endógenas produzidas pela mucosa do intestino delgado;
- 2) Atividade da microflora enzimática presente no intestino grosso;
- 3) Atividade intrínseca de fitase das plantas, que permanecem nas dietas, mas que são dependentes do tratamento térmico dado aos grãos;
- 4) Inclusão de fitases exógenas na dieta.

A atividade da fitase da mucosa intestinal sempre foi considerada como de pouca importância, porém, Hu et al. (1996) estudaram sua ação e observaram que a atividade mais pronunciada dessa enzima ocorria no jejuno. A eficácia foi maior para o IP3 e diminuiu

com o aumento da fosforilação do fitato, o que está associado à diminuição da solubilidade da molécula. Os autores sugeriram que a fitase presente na mucosa pode contribuir para a desfosforilação dos ésteres menores de fosfato de myo-inositol e, dessa forma, complementar a atividade das fitases exógenas.

Alguns alimentos de origem vegetal apresentam atividade intrínseca de fitase. Estudos comprovaram essa atividade em alguns vegetais, como trigo, cevada, centeio, triticale. Entretanto, a temperatura de peletização das rações pode reduzir ou até eliminar a atividade intrínseca de fitase dos vegetais.

Atualmente, as fitases microbianas mais utilizadas derivam de fungos (*Aspergillus niger*, *Peniophora lycii*) ou de bactérias (*Escherichia coli*). As propriedades catalíticas dessas enzimas que degradam o fitato têm sido revisadas por diversos pesquisadores. Em um estudo, Igbasan et al. (2000) encontraram que fitases derivadas do *A. niger* e da *E. coli* melhoraram a digestibilidade total de fósforo (33-34%) e de cálcio (18-20%) em leitões que recebiam dietas à base de milho e soja. Brana et al. (2006) compararam a eficácia de fitases derivadas do *A. niger* e da *E. coli* em dietas com níveis reduzidos de fósforo por um período de 130 dias, e verificaram que 500 FTU/kg da *E. coli* melhorou o ganho de peso em 9,9% e a eficiência alimentar em 8%, enquanto 500 FTU/kg do *A. niger* melhorou em 9,5% e 6% essas características, respectivamente.

O estudo sobre a eficácia das fitases deve ter ênfase sobre a tolerância térmica e sobre a ação de enzimas proteolíticas endógenas. Kim et al. (2006) conseguiram diminuir o pH de atividade máxima da fitase do *A. niger* de 5,5 para 3,8, o que é mais coerente com o pH do estômago do suíno. Como resultado, a degradação *in vitro* de fitato de soja aumentou 2,7 vezes. Com isso, concluiu-se que mudando o perfil do pH da fitase do *Aspergillus niger* para coincidir com o pH do estômago do suíno aumentou-se sua eficácia como aditivo para alimentação animal.

Ruminantes digerem o fitato pela ação de fitases produzidas pela flora microbiana do rúmen, sendo que o fosfato inorgânico hidrolisado do fitato é utilizado tanto pelo ruminante quanto pelos microrganismos. Porém, essa situação é diferente com animais monogástricos. O rato possui uma alta atividade de fitase, da ordem de 30 mUI/mg de proteínas da mucosa do intestino delgado. Uma UI corresponde a um micromol de fósforo hidrolisado/min a 37°C em pH neutro. A atividade pode ser pelo menos duas vezes mais elevada no duodeno. O suíno possui atividade de 0,5 a 1,5 mUI/mg. O fósforo vegetal é frequentemente melhor utilizado pelas aves do que pelos suínos para os mesmos cereais. Isso

pode ser explicado, ao menos em parte, pela presença de uma atividade de fitase considerável no tubo digestível das aves (POINTILLART, 1994).

A capacidade de hidrolisar o fitato no trato digestório dos animais monogástricos pode ser influenciada por vários fatores, entre os quais se destacam a variação do pH, da umidade, da temperatura, a presença de certos minerais como cálcio e de outras enzimas, além do tempo de passagem da digesta (HAEFNER et al., 2005).

As fitases vegetais são ativas em pH próximo a 5, sendo muito sensíveis às variações. Dessa forma, meios muito ácidos ou muito alcalinos podem inativá-las de maneira irreversível. As fitases vegetais dos alimentos não podem, dessa forma, ser ativadas no pH do estômago dos animais. Esse fato foi confirmado por Kemme e Jongbloed (1992) que utilizaram cânulas duodenais em suínos. Nesse estudo, houve uma relação linear entre a atividade fitásica do alimento e a degradação do ácido fítico medida no duodeno. Essa degradação foi dependente do tempo de retenção do alimento no estômago.

O principal problema em utilizar as fitases, sejam as adicionadas à ração ou aquelas presentes naturalmente nos cereais, é a sua conservação no curso da fabricação dos alimentos. Um aquecimento muito intenso durante a granulação (70 a 80°C) leva a perdas importantes de atividade da fitase (30 a 50%, e perto de 100% quando o aquecimento passa dos 80°C). Para o trigo, milho e triticale, a atividade ótima está em torno 50°C (POINTILLART, 1994).

A digestibilidade do fitato varia com o conteúdo mineral das dietas (MAENZ, 2001). De acordo com Quian et al. (1996), a suplementação com fitase em rações para suínos deve ocorrer quando esta apresenta uma relação Ca: P o mais baixa possível, próxima a 1,2: 1. Quando a relação molar de cátions (cálcio ou fósforo) estiver acima de 2:1 ou 3:1, a formação do complexo insolúvel torna-se maior. Como consequência, a formação dos cristais de fitato diminui a acessibilidade da enzima fitase (RAVINDRAN et al., 1995).

A capacidade das fitases microbianas em aumentar a digestibilidade total do fósforo já está bem estabelecida. Dungalhoef et al. (1994), ao utilizarem 750 FTU/kg, observaram um aumento de três vezes da disponibilidade do fósforo do milho (0,56 *versus* 0,18). As fitases também podem aumentar a digestibilidade ileal do cálcio (32,8%), do magnésio (55,2%) e da proteína (3,8%).

Segundo alguns autores, a fitase é estimulada pela vitamina D, favorecendo a absorção do cálcio em nível intestinal e impedindo a formação de fitatos de cálcio insolúveis, que são pouco digestíveis nas partes mais distais do intestino (POINTILLART et al., 1989).

Outro fator que afeta a eficácia da fitase é a fonte de fitato na ração. Dekker et al. (1992) estudaram o efeito de duas fontes de fitato na eficácia da fitase microbiana. As dietas eram à base de milho e de farelo de girassol, ou seja, dois níveis de fitato. Foi observado que o alto nível de fitato nas dietas à base de milho gerou substancialmente uma quantidade maior de fósforo digestível e que o fitato do milho é mais facilmente disponível que o fitato do farelo de girassol.

O conteúdo natural de fitase intrínseca na dieta também deveria ser observado. Alimentos como trigo, cevada, farelo de trigo e arroz são ricos em atividade fitásica; entretanto, milho e farelo de soja, ingredientes mais utilizados na fabricação de rações, contêm pouca ou nenhuma atividade (SELLE, 1997).

Com referência a idade e status fisiológico dos animais, Kemme et al. (1997) relataram que a eficiência da fitase (Nathuphós®, 500 FTU/kg dieta) em gerar fósforo digestível diminuiu na ordem de porcas lactantes, suínos em crescimento e terminação, porcas no final da gestação, leitões e porcas no meio da gestação. As quantias médias de fósforo digestível geradas foram: 1,03; 0,83; 0,74; 0,66 e 0,32 g/kg dieta, respectivamente. Os autores concluíram que na formulação das dietas de suínos, a quantidade de fitase a ser adicionada deve ser dirigida diferentemente para cada categoria.

Há evidências de que a fitase tem a capacidade de aumentar a performance de crescimento dos suínos que recebem dietas com baixo nível de fósforo (SELLE; RAVINDRAN, 2008). Porém, estudos indicam também a melhora da performance de animais que recebem dietas com quantidades adequadas de fósforo. Neste sentido, Beers & Jongbloed (1992), utilizando 1450 FTU/kg em rações de leitões, observaram aumento de 12,8% na taxa de crescimento, 8,5% na ingestão alimentar e melhora de 4,4% na conversão alimentar. Uma explicação para isso é que a fitase possui efeitos "extra-fosfóricos", confirmado pelo aumento da digestibilidade de proteínas e aminoácidos.

Vários experimentos com fitase microbiana exógena têm sido desenvolvidos com o intuito de quantificar o efeito da digestibilidade aparente do fósforo e de sua disponibilidade.

Um dos primeiros trabalhos foi em relação ao efeito dose-resposta da fitase microbiana Natuphós® na digestibilidade aparente de fósforo para suínos em fase de crescimento entre 20 a 55 kg de peso vivo (BEERS; JONGBLOED, 1992). Seis doses de fitase (de 0 a 1800 FTU/kg) foram usadas em dois tipos de dieta para crescimento (baseadas em milho e farelo de soja ou em produtos ricos em fitato). A eficácia da fitase microbiana está relacionada à dose e ao tipo de dieta. De 0 a 400 FTU/kg houve um rápido aumento na

eficácia da fitase. Na maioria dos casos, a relação dose-dependente pode ser descrita por uma curva exponencial. A essa mesma conclusão chegaram os autores Cromwell et al. (1995), utilizando a fitase comercial Allzyme Phytase®. Para Beers e Jongbloed (1992), a eficácia da fitase microbiana por FTU parece ser maior a partir de 500 FTU/kg de ração. Essa dose é equivalente a aproximadamente 0,8 g de fósforo digestível por quilograma de dieta.

Mroz et al. (1994), utilizando 800 FTU/kg de fitase microbiana Natuphós®, observaram aumento de 2,3% na digestibilidade de proteína bruta. Ketaren et al. (1993), trabalhando dietas suplementadas com 1000 FTU/kg para fêmeas suínas, verificaram um aumento na deposição de proteínas e lipídios. Entretanto, existem outros estudos que não demonstraram efeito da fitase microbiana sobre a digestibilidade de aminoácidos e proteína bruta (LANTZSCH et al., 1995; VALAJA et al., 1998).

Em resumo, além das considerações ecológicas, a fitase é de suma importância, pois fornece aos nutricionistas a possibilidade de formular dietas para suínos com mais critério, sem prejudicar o desempenho dos animais, reduzindo o custo das dietas e aumentando a rentabilidade das indústrias.

2.4 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os lipídios contidos nos alimentos estão relacionados a diversas características sensoriais, tais como, aroma, cor, maciez e suculência. Eles podem ser degradados sob diversas formas, entre elas, oxidação, hidrólise, polimerização e pirólise (ARAÚJO, 2004).

A oxidação lipídica corresponde a uma série de reações químicas que envolvem a deterioração oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados (DUTHIE, 1993). A reação é iniciada sob a ação do oxigênio, luz e metais de transição (FERRARI, 1999).

Esse processo estende-se de acordo com o número de duplas ligações do ácido graxo, motivo pelo qual os ácidos graxos poliinsaturados são particularmente mais susceptíveis à oxidação. Com a retirada do hidrogênio ou do elétron há formação de radicais livres, que são substâncias instáveis e reativas (MORRISSEY et al., 1998). Na presença de metais como o ferro ou o zinco, o radical livre forma o radical hidroxil (OH'), altamente reativo. Esse radical provoca danos em proteínas, ácidos nucleicos e em outras biomoléculas e retira o hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados.

Por essa razão, a oxidação lipídica torna-se uma das maiores causas da perda de qualidade nos alimentos, principalmente em tecidos musculares (LEE; HENDRICKS, 1995), com efeitos negativos nas qualidades sensoriais dos produtos (GHIRETTI et al., 1997). A oxidação lipídica é considerada um problema para todos os envolvidos na produção de carne, desde produtores primários e processadores até distribuidores.

A fase mais expressiva da oxidação lipídica ocorre durante o processamento, estoque e preparo da carne, pela liberação do ferro da hemoglobina e mioglobina (MORRISSEY et al., 1998).

Uma alternativa para minimizar a oxidação lipídica das carnes é a suplementação das rações animais com substâncias que protegem os músculos desta reação, substâncias estas conhecidas como antioxidantes.

Os cereais são excelentes fontes de antioxidantes naturais, sendo que estes componentes se concentram principalmente no gérmen do grão.

Os antioxidantes atuam inibindo a formação de radicais livres através do sequestro destes, absorvendo oxigênio ou formando quelato com metais envolvidos na oxidação. Os antioxidantes que agem capturando os radicais livres ou absorvendo o oxigênio são conhecidos como antioxidantes primários e aqueles denominados quelantes ou sequestrantes, antioxidantes secundários (SOARES, 1998; SOUZA, 2001).

Atualmente, tem-se buscado alternativas para reduzir o uso de antioxidantes exógenos (administrando diretamente no alimento de consumo humano), substituindo-os pelos endógenos (oferecido nas rações animais visando indiretamente efeitos antioxidantes na carne), dada a tendência em consumir produtos naturais com mínima dosagem de aditivos.

A introdução de antioxidantes através da dieta de animais corresponde a um método efetivo para o aumento da estabilidade oxidativa de produtos cárneos, principalmente naqueles produtos onde a adição exógena é dificultada (SOUZA, 2001).

Neste sentido, os grãos são uma excelente fonte de princípios antioxidantes que podem ser veiculados nas dietas de animais.

2.5 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos, por exemplo, por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Alternaria*. São contaminantes relativamente comuns e estima-se que em média 25% das colheitas mundiais de cereais sejam afetadas anualmente (WHITLOW; HAGLER Jr., 2008). As principais micotoxinas envolvidas nesse processo são as aflatoxinas, as fumonisinas, os tricotecenos, as ocratoxinas, as patulinas e as zearalenonas.

Ao longo de toda a cadeia alimentar, os fungos são susceptíveis de se desenvolver e produzir toxinas. A contaminação pode ocorrer antes ou durante a estocagem dos alimentos e as condições que conduzem à invasão do substrato pelos fungos com consequente produção de micotoxinas são múltiplas e complexas, sendo elas: taxa de umidade, temperatura, tempo de estocagem, danos ao envelope dos grãos, presença de oxigênio e de CO₂, composição do substrato, interações microbianas e presença de insetos (SINHA et al., 1986).

A exposição às micotoxinas se faz principalmente pela via alimentar, mas também pela via respiratória. Dentre as principais micotoxinas de ocorrência mundial, destaca-se o deoxinivalenol (DON).

O DON, também conhecido como vomitoxina, faz parte da família dos tricotecenos. É produzido pelos fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*. Em geral, os tricotecenos exercem sua toxicidade através da inibição da síntese protéica, em nível ribossomal. São imunossupressivos, tóxicos às membranas celulares, induzem a apoptose e a carcinogênese (SHIFRIN; ANDERSON, 1999). Os efeitos tóxicos dos tricotecenos incluem efeitos gastrointestinais, tais como vômito, diarreia e inflamação intestinal, além de leucopenia, irritação cutânea, refugagem de alimentos, redução no crescimento e falhas reprodutivas.

Níveis de ingestão superiores a 1 ppm de DON podem levar a uma redução no consumo de ração e conseqüentemente, a uma diminuição na taxa de ganho de peso. Concentrações acima de 5 ppm levam à recusa do alimento e acima de 10 ppm podem ocasionar vômitos e perda de peso.

O epitélio intestinal, que constitui a primeira barreira durante a ingestão de alimentos, pode ser exposto a concentrações elevadas de micotoxinas que podem alterar a capacidade dos enterócitos em assegurar a função de barreira intestinal (BOUHET;

OSWALD, 2005). Dessa forma, os contaminantes podem afetar diretamente a capacidade de renovação celular e também alterar a função de barreira física do epitélio intestinal.

As células epiteliais estão conectadas entre si por meio de junções de membrana, que modulam a permeabilidade paracelular (entre as células) e a permeabilidade transcelular (através das células) (SODERHOLM; PERDUE, 2001). Sabe-se que o DON perturba as funções de membrana (BUNNER; MORRIS, 1988) e altera a comunicação intercelular (KHERA et al., 1982). Por um mecanismo chamado "estresse ribotóxico", o DON se liga à peptidil transferase, que faz parte da subunidade ribossomal 60S, inibindo a síntese protéica e ativa as proteínas MAPK (mitogen-activated protein kinase). Os tricotecenos estimulam a peroxidação lipídica (Rizzo et al., 1994), e a ativação das MAPK pode ser induzida por compostos como o peróxido de hidrogênio (WANG et al., 1998).

São poucos os estudos sobre os efeitos do DON sobre as células epiteliais intestinais de suínos. Pinton et al. (2009), ao testarem diferentes concentrações de DON (0; 5; 10; 20; 50 e 100 μM) em células intestinais de suínos da linhagem IPEC-1, observaram diminuição da resistência elétrica transepitelial e aumento da permeabilidade paracelular. O DON diminuiu a expressão das claudinas, que são proteínas da membrana celular, levando a alteração na função de barreira do intestino.

Nesse contexto, as similaridades anatômicas e fisiológicas entre o homem e o suíno, em particular em relação ao sistema digestório e imunitário, fazem do suíno um modelo excelente de estudo para o homem (ROTHKOTTER et al., 2002)

REFERÊNCIAS

ANGEL, R.; TAMIM, N.M.; APPLGATE, T.J. et al. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.11, p.471-480, 2002.

ARAÚJO, J. M. A. Oxidação de lipídios em alimentos. In: **Química de Alimentos**. 3.ed. Viçosa : UFV, 2004. p.1-67.

BASF. **Enzymes in pigs**. Disponível em: <<http://www.natuphos.com>>. Acesso em: 04 jan. 2010.

BEERS, S.; JONGBLOED, A.W. Apparent overall (total tract) digestibility of P in relation to doses of *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs. **Journal of Animal Science**, v.70 (Suppl.1), p.242, 1992.

BENZIE, I.F. Evolution of dietary antioxidants. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v.136, n.1, p. 113-126, 2003.

BOHN, L.; MEYER, A.S.; RASMUSSEN, S.K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.9, n.3, p.165-191, 2008.

BOUHET, S., OSWALD, I. P. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.108, p.199-209, 2005.

BRAGAGNOLO, N.; AMAYA, D.B.R. Teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em cortes de carne suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, p.98-104, 2002.

BRANA, D.V.; ELLIS, M.; CASTANEDA, E.O. et al. Effect of a novel phytase on growth performance, bone ash, and mineral digestibility in nursery and grower-finisher pigs. **Journal of Animal Science**, v.84, p.1839-1849, 2006.

BUNNER, D. L.; MORRIS, E. R. Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin: an important mechanism of action. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.92, p.113-121, 1988.

CHOLEWA, K.; PARFINIEWICZ, B.; BEDNAREK, I. et al. The influence of phytic acid on TNF-alpha and its receptors genes' expression in colon cancer Caco-2 cells. **Acta Polish Pharmacology**, v.65 , n.1, p.75-79, 2008.

COSTA, M.C.R. **Farelo de gérmen de milho desengordurado na alimentação de suínos como fonte de ácido fítico**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

COSTA, M.C.R. **Farelo de gérmen de milho desengordurado: ingrediente na dieta de suínos e fonte de antioxidante endógeno na carne**. 2009. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

CROMWELL, G.L.; STAHLY, T.S.; COFFEY, R.D. et al. 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, 1995.

DASGUPTA S.; DASGUPTA D.; SEN, M. et al. Interaction of myoinositol trisphosphate – phytase complex with the receptor for intercellular Ca²⁺ mobilization in plants. **Biochemistry**, v.35, n.15, p.4994-5001, 1996.

DEKKER, R.A.; KEMME, P.A.; JONGBLOED, A.W. Methodological comparison of the assessment of P digestibility of tapioca and maize, and the influence of amount and origin of phytic acid on the efficacy of microbial phytase from *Aspergillus niger*. **Report IVVO-DLO**, n. 244, 1992.

DIRINCK, P.; DE WINNE, A.; CASTEELS, M. et al. Studies on vitamin E and meat quality. 1. Effect of feeding high vitamin E levels on time-related pork quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.65-68, 1996.

DUNGELHOEF, M.; RODEHUTSCORD, M.; SPIEKERS, H. et al. Effects of supplemental microbial phytase on availability of phosphorus contained in maize, wheat and triticale to pigs. **Animal Feed Science Technology**, v.49, p. 1-10, 1994.

DUTHIE, G. G. Lipid peroxidation. **European Journal of Clinical Nutrition**, n.47, p.759-764, 1993.

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

FEIL, B. Phytic acid. **Journal of New Seeds**, v.3, p.1-35, 2001.

FERRARI, C. K. B. Oxidação de lipídios e antioxidantes: importância nas ciências animal e dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v.13, n.60, p. 16-19, 1999.

FILGUEIRAS, C.T.; SOARES, A.L.; SHIMOKOMAKI, M. et al. Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1787-1791, 2009.

FIREMAN, F.A.T; FIREMAN, A.K.B.A.T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, v.28, n.1, p.173-178, 1998.

FUKUJI, T.S.; FERREIRA, D.L.; SOARES, A.L. et al. Ácido fítico de híbridos de milho e alguns produtos industrializados. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.30, n.1, p.31-35, 2008.

GEBERT, S.; BEE, G.; PFIRTER, H.P. et al. Phytase and vitamin E in the feed of growing pigs: 2. influence on carcass characteristics, meat and fat quality. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, n.81, p.20-30, 1999.

GHIRETTI, E.Z.; ZANARDI, E.; NOVELLI, G. et al. Comparative evaluation of some antioxidants in salame milano and mortadella production. **Meat Science**, v.47, n.1/2, p.167-176, 1997.

GRAF, E.; EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, n.1, p.61-69, 1990.

GRASES, F.; PERELLO, J.; PRIETO, R.M. et al. Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in wistar rats. **Life Sciences**, v.75, n.1, p.11-19, 2004.

HAEFNER, S.; KNIETSCH, A.; SCHOLTEN, E. et al. Biotechnological production and applications of phytases. **Applied Microbiology and Technology**, v.68, n.5, 2005.

HARLAND, B.F.; MORRIS, E.R. Phytate: a good or bad food component? **Nutrition Research**, v.15, p.733-754, 1995.

HU, H.L.; WISE, A.; HENDERSON, C. Hydrolysis of phytate and inositol tri-, tetra-, and penta-phosphates by the intestinal mucosa of the pig. **Nutrition Research**, v. 16, p.781-787, 1996.

HUANG, S.W.; FRANKEL, E.N.; AESCHBACH, R. et al. Partition of selected antioxidants in corn oil-water model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1991-1994, 1997.

IGBASAN, F.A.; SIMON, O.; MILKSCH, G. et al. Comparative studies of the *in vitro* properties of phytases from various microbial origins. **Archives of Animal Nutrition**, v.53, p.353-373, 2000.

JARIWALLA, R.J.; SABIN, R.; LAWSON, S. et al. Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. **Journal of Applied Nutrition**, v.42, n.1, p.18-28, 1990.

JOHNSON, L.F.; TATE, M.E. Structure of phytic acids. **Canadian Journal of Chemistry**, v.47, n.1, p.63-73, 1969.

JONGBLOED, A.W.; KEMME, P.A.; MROZ, Z. The role of microbial phytases in pig production, In: ENZYMES IN ANIMAL PRODUCTION, 1993, Kartause Ittingen. **Proceedings...**, Kartause Ittingen, Switzerland, 1993. p.173-180.

KEMME, P.A.; JONGBLOED, A.W. Degradation of phytic acid in the stomach of the pig as influenced by phytase of plant origin. **Rapport IWO-DLO** n.236, p.27, 1992.

KEMME, P.A.; JONGBLOED, A.W.; MROZ, Z. et al. The efficacy of *Aspergillus niger* phytase in rendering phytate phosphorus available for absorption in pigs is influenced by pig physiological status. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2129-2138, 1997.

KEMME, P.A.; JONGBLOED, A.W.; MROZ, Z. et al. Digestibility of nutrients in growing—finishing pigs is affected by *Aspergillus niger* phytase, phytate and lactic acid levels. 1. Apparent ileal digestibility of amino acids. **Livestock Production Science**, v.58, p.107—117, 1999.

KEMME, P.A.; SCHLEMMER, U.; MROZ, Z. et al. Monitoring the stepwise phytate degradation in the upper gastrointestinal tract of pigs. **Journal of the Science of the Food and Agriculture**, v.86, p.612—622, 2006.

KETAREN, P.P.; BATTERHAM, E.S.; DETTMANN, E.B. et al. Phosphorus studies in pigs. 3. Effect of phytase supplementation on the digestibility and availability of phosphorus in soyabean meal for grower pigs. **British Journal of Nutrition**, v.70, p.289-311, 1993.

KHERA, K. S.; WHALEN, C.; ANGERS, G. et al. Embryotoxicity of 4-deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.29, p.487-49, 1982.

KIES, A.K.; DE JONGE, L.H.; KEMME, P.A. et al. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. *In vitro* studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.1753—1758, 2006.

KIM, T.; MULLANEY, E. J.; PORRES, J. M. et al. Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.6, p.4397-4403, 2006.

KORNEGAY, E.T.; QUIAN, H. Replacement of inorganic phosphorus by microbial phytase for young pigs fed on a maize-soybean-meal diet. **British Journal of Nutrition**, v.76, n.4, p.563-578, 1996.

KOSTREWA, D.; GRÜNINGER-LEITCH, F.; D'ARCY, A. et al. Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution **Nature Structural Biology**, v.4, p.185-190, 1997.

KWANYUEN, P.; BURTON, J.W. A simple and rapid procedure for phytate determination in soybeans and soy products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.82, p.81—85, 2005.

LANTZSCH, H.J.; WJST, S.; DROCHNER, W. The effect of dietary calcium on the efficacy of microbial phytase in rations for growing pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.73, p.19-26, 1995.

LEAL, E.S. **Extração, obtenção e caracterização parcial de ácido fítico do germe grosso de milho e aplicação como antioxidante**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) — Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

LEE, B.J.; HENDRICKS, D.G. Phytic acid protective effect against beef round muscle lipid peroxidation. **Journal of Food Science**, v.60, n.2, p.241-244, 1995.

LEE, S.H.; PARK, H.J.; CHUN, H.K et al. Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. **Nutrition Research**, v.26, n.9, p.474-479, 2006.

LEESON, S. Recent advances in fat utilisation by poultry. In: Recent Advances in Animal Nutrition in Australia. **Proceedings...**The University of New England, Armidale, NSW, 1993. p.170-1981.

- LEI, X.G.; PORRES, J.M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters**, v.25, n.21, p.1787-1794, 2003.
- LÓPEZ, N.; CHICCO, C.F.; GODOY, S. Nutritive value of bran and defatted corn germ meal in swine feeding. **Zootecnia Tropical**, v.21, n.3, p.219-235, 2003.
- LOTT, J.N.A.; OCKENDEN, I.; RABOY, V. et al. Phytic acid and phosphorus in crop seed and fruits: a global estimate. **Seed Science Research**, v.10, p. 11—33, 2000.
- LOZANO, A.P. **Desempenho, carcaça e qualidade da carne de suínos alimentados com ração de elevado nível de ácido fítico e diferentes níveis de fitase**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- MAENZ, D.D. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. In: Enzymes in farm animal nutrition. **Proceedings...** Bedford M.R. & Partridge G.G. 2001. 406p.
- MIELCHE, M.M.; BERTELSEN, G. Approaches to the prevention of warmed over flavour. **Trends in Food Science and Technology**, v.5, p.322-327, 1994.
- MINIHANE, A.M.; RIMBACH, G. Iron absorption and the iron binding and anti-oxidant properties of phytic acid. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p.741-748, 2002.
- MOREIRA, I.; RIBEIRO, C.R.; FURLAN, A.C. et al. Utilização do farelo de germe de milho desengordurado na alimentação de suínos em crescimento e terminação — digestibilidade e desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2238 -2246, 2002.
- MORRISSEY, P. A.; SHEEHY, P.J.A.; GALVIN, K. et al. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v.49, n.1, p.73-86, 1998.
- MROZ, Z.; JONGBLOED, A.W.; KEMME, P.A. Apparent digestibility and retention of dietary nutrients bound to phytase complexes as influenced by microbial phytase and feeding regimen in pigs. **Journal of Animal Science**, v.72, p.126-132, 1994.
- NOCERA, G. A. **Efeito da fitase e do diâmetro geométrico médio do milho na dieta sobre o desempenho de frangos de corte**. 2005. Dissertação (Mestrado em Produção Animal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ONOMI, S.; OKAZAKI, Y.; KATAYAMA, T. Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.68, n.6, p.1379-1381, 2004.

PAES, M.C.D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**, Circular 75, EMBRAPA milho e sorgo, Sete Lagoas, MG, 2006.

PINTON, P.; NOUGAYRÈDE, J.P.; DEL RIO, J.C. et al. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.237, n.1, p.41-48, 2009.

POINTILLART, A. Phytates, phytases: leur importance dans l'alimentation des monogastriques. **INRA Productions Animales**, v.7, p.29-39, 1994.

POINTILLART, A.; COLIN, C.; CAYRON, B. et al. Apport vitaminique D et absorption du phosphore phytique chez le porc. **Journées de la Recherche Porcine**, v.21, p.39-44, 1989.

QUIAN, H.; KORNEGAY, E. T.; CONNER JR., D. E. Adverse effects of wide calcium: phosphorus ratios on supplemental phytase. Efficacy for weanling pigs fed two dietary phosphorus levels. **Journal of Animal Science**, v.74, n.6, p.1288-1297, 1996.

RABOY, V. α -Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. **Phytochemistry**, v.64, n.6, p.1033-1043, 2003.

RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W.L.; KONERGAY, E.T. Phytases: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. **Poultry and Avian Biology Reviews**, v.6, p.125-143, 1995.

RICKARD, S.E.; THOMPSON, L.U. Interactions and biological effects of phytic acid. In: Antinutrients and Phytochemicals in Food. **Proceedings...** American Chemical Society, Washington, DC, 1997. p.294-312.

RIZZO, A. F.; ATROSHI, F.; AHOTUPA, M. et al. Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. **Zentralbl Veterinarmed A**, v.41, p.81-90, 1994.

RODRIGUES, P. B.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L.F.T. et al. Valores energéticos do milho, do milho e subprodutos do milho, determinados com frangos de corte e galos adultos, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.2046-2058, 2001.

ROTHKOTTER, H.J.; SOWA, E.; PABST, R. The pig as a model of developmental immunology. **Human & Experimental Toxicology**, v.21, p.533, 2002.

SELLE, P.H. The potential of microbial phytase the sustainable production of pigs and poultry. In: 7th Short Course and Feed Technology. **Proceedings**. Korea: Korean Society of Animal Nutrition and feedstuffs, 1997. p.124.

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

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. **Livestock Science**, v.113, p.99-122, 2008.

SELLE, P.H.; WALKER, A.R.; BRYDEN, W.L. Total and phytate-phosphorus contents and phytase activity of Australian sourced feed ingredients for pigs and poultry. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.45, p.475-479, 2003.

SELVAM, R. Calcium oxalate stone disease: role of lipid peroxidation and antioxidants. **Urological Research**, v.30, n.1, p.35-47, 2002.

SEYNAEVE, M.; JANSSES, G.; HESTA, C. et al. Effects of dietary Ca/P ratio, P level and microbial phytase supplementation on nutrient digestibilities in growing pigs: breakdown of phytic acid, partition of P and phytase activity along the intestinal tract. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, n.83, p.193-204, 1999.

SHAHIDI, F. Prevention of lipid oxidation in muscle foods by nitrite and nitrite-free composition. **ACS Symposium Series**, v.500, p. 161-182, 1992.

SHIFRIN, V. I. ; ANDERSON, P. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p.13985-13992, 1999.

SINHA, R.N.; ABRAMSON, D.; MILLS, J.T. Interrelations among ecological variables in stored cereals and associations with mycotoxin production in the climatic zones of western Canada. **Journal of Food Protection**, v. 49, p.608-617, 1986.

SOARES, A.L. **Ação de ácido fítico e vitamina E na oxidação lipídica e aroma de requeijado em filés de peito de frango**. 1998. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1998.

SOARES, L.L.P.; SILVA, C.A.; PINHEIRO, J.W. et al. Farelo de gérmen de milho desengordurado na alimentação de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1768-1776, 2004.

SODERHOLM, J. D.; PERDUE, M. H. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, p.7-13, 2001.

SOUZA, V.L.F. **A influência de dietas suplementadas com vitamina E desde o crescimento e terminação do suíno até o presunto cozido no seu período de validade: índices zootécnicos, estabilidade oxidativa, perfil de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol.** 2001. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.

SOUZA, V.L.F.; SILVA, R.S.F.; SILVA, C.A. et al. Vitamina E no desempenho, características de carcaça e qualidade do presunto cozido de suínos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.4, p.581-587, 2007.

STODOLAK, B.; STARZYNSKA, A.; CZYSZCZON, M. et al. The effect of phytic acid on oxidative stability of raw and cooked meat. **Food Chemistry**, v.101, n.3, p.1041- 1045, 2007.

VALAJA, J.; PLAAMI, S.; SILJANDER-RASI, H. Effect of microbial phytase on digestibility and utilization of phosphorus and protein in pigs fed wet barley protein with fiber. **Animal Feed Science and Technology**, v.72, p.221-233, 1998.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n.1, p.3-14, 2004.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A.M., Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. **Nutrition and Cancer**, v.55, n.2, p.109-125, 2006.

YORK, J.D. Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1761, n.5-6, p.552- 559, 2006.

YORK, J.D.; ODOM, A.R.; MURPHY, R. et al. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. **Science**, v.285, n.542, p.96-100, 1999.

WANG, X.; MARTINDALE, J. L.; LIU, Y. et al. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. **Biochemical Journal**, v.333, n.2, p.291-300, 1998.

WHITLOW, L.W.; HAGLER JR, W.M. Mycotoxins in feeds. **Feedstuffs**, september 10, 2008.

WONG, P.Y.Y.; KITTS, D.D. An iron binding assay to measure activity of known food sequestering agents: studies with buttermilk solids. **Food Chemistry**, v.72, n.2, p.245- 254, 2001.

WYSS, M. et al. Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.2, p.367-373, 1999.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar os efeitos e as possíveis interações da inclusão de farelo de gérmen de milho desengordurado, como principal fonte de ácido fítico, e da enzima fitase em dietas de suínos em fase de terminação.
- Avaliar a ação do ácido fítico sobre a integridade da membrana das células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1 de suínos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho zootécnico, o perfil sérico e as características de carcaça de suínos em fase de terminação que receberam dietas com ou sem inclusão de 40% de farelo de gérmen de milho desengordurado e dietas com ou sem suplementação de 1000 FTU.
- Avaliar os efeitos da inclusão de 40% de farelo de gérmen de milho desengordurado, como principal fonte de ácido fítico na ração, e da enzima fitase em dietas de suínos em fase de terminação sobre a qualidade e estabilidade lipídica da carne e da linguiça tipo frescal.
- Avaliar os efeitos e possíveis interações da inclusão de 40% de farelo de gérmen de milho desengordurado e da enzima fitase em dietas de suínos em fase de terminação sobre os gêneros machos castrados e fêmeas.
- Estudar os efeitos do ácido fítico sobre a viabilidade celular das células epiteliais intestinais da linhagem (IPEC-1) de suínos e os efeitos da micotoxina deoxinivalenol e do ácido fítico sobre a integridade da membrana celular das células IPEC-1.

4. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

Artigo 1. Farelo de gérmen de milho desengordurado, como principal fonte de ácido fítico, associado à fitase na dieta de suínos: efeitos sobre desempenho, perfil sérico e carcaça

Artigo 2. Utilização do farelo de gérmen de milho desengordurado, como principal fonte de ácido fítico, associado à fitase em rações de suínos: efeitos sobre a qualidade da carne e da linguiça tipo frescal

Artigo 3. Ação do ácido fítico e do deoxinivalenol (DON) sobre a integridade da membrana de células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1 de suínos

ARTIGO 1. FARELO DE GÉRMEN DE MILHO DESENGORDURADO, COMO PRINCIPAL FONTE DE ÁCIDO FÍTICO, ASSOCIADO À FITASE NA DIETA DE SUÍNOS: EFEITOS SOBRE DESEMPENHO, PERFIL SÉRICO E CARÇAÇA

Artigo editado de acordo com as normas de publicação da *Revista Brasileira de Zootecnia*

Farelo de gérmen de milho desengordurado, como principal fonte de ácido fítico, associado à fitase na dieta de suínos: efeitos sobre desempenho, perfil sérico e carcaça

RESUMO: O objetivo do trabalho foi avaliar a influência e a possível interação entre o ácido fítico, veiculado na ração de suínos em fase de terminação, principalmente pelo farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD), e a fitase sobre os parâmetros de desempenho, perfil sérico e características de carcaça. Para o experimento foram utilizados 32 suínos de linhagem comercial Pen Ar Lan (16 machos castrados e 16 fêmeas) com peso médio inicial e desvio padrão de $60,31 \pm 5,32$ kg e idade média de 112 dias. Os animais foram distribuídos em um delineamento em blocos casualizados num esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, sendo os fatores: dietas sem inclusão de FGMD e com inclusão de 40% de FGMD; dietas sem inclusão de fitase e com inclusão de 1000 FTU; machos castrados e fêmeas. Os animais receberam água e ração à vontade durante todo o período experimental. Foram avaliados o consumo diário de ração, o ganho diário de peso e a conversão alimentar. No 14º dia do experimento realizou-se a colheita de sangue para hemograma e avaliação das concentrações séricas de fósforo, cálcio, ferro, triglicérides, colesterol e uréia por meio de kits enzimáticos colorimétricos. Para a determinação dos teores de fósforo e cálcio nas fezes, adotou-se a técnica da coleta parcial de fezes, utilizando como marcador o óxido crômico 0,3%. Ao atingirem $87,19 \pm 7,08$ kg de peso vivo, os animais foram abatidos em frigorífico comercial e submetidos à avaliação das características de carcaça. O FGMD, como principal fonte de ácido fítico na ração, promoveu maior consumo de ração pelos animais. As demais variáveis de desempenho, carcaça e parâmetros hematológicos não foram influenciadas pelos fatores FGMD e fitase. A utilização da enzima fitase na ração foi efetiva ($P < 0,05$) na redução da excreção de fósforo e cálcio pelas fezes. Machos castrados apresentaram maior excreção de uréia, maiores peso vivo e de carcaça e maior espessura de toucinho, enquanto as fêmeas apresentaram maior rendimento de carne na carcaça.

Palavras-chave: Antioxidante. Enzima. Fitato. Meio ambiente.

Defatted corn germ meal as a main source of phytic acid, associated with phytase in the diet of pigs: effects on performance, serum profile and carcass traits

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of phytic acid present in some feed stuffs food for pigs during finishing phase, usually in defatted corn germ meal (DCGM), and the addition of phytase on the performance parameters, serum profile and carcass traits. Thirty two pigs from a commercial line Pen Ar Lan (16 barrows and 16 females) with 60.31 ± 5.32 kg of body weight and 112 days of age were used. The experimental design was a 2x2x2 factorial, having as factors: diets without and with 40% of DCGM; diets without and with 1000 FTU of phytase; animal gender. Feed and water were provided *ad libitum* during the experiment period. Daily feed intake, average daily weight gain and feed conversion were measured. Blood samples were taken at 14th day of the experiment for CBC and serum phosphorus, calcium, iron, triglycerides, cholesterol and urea were evaluated by enzymatic colorimetric kits. The levels of phosphorus and calcium in feces, were evaluated through of partial collection method, using the chromic oxide 0.3% as marker. Upon reaching 87.19 ± 7.08 kg of body weight, the animals were slaughtered and their carcass traits were evaluated. DCGM in the diets promoted greater feed intake. The other performance variables and carcass and hematological parameters were not influenced by the DCGM and phytase factors. Animals fed with diet with phytase had a lower fecal level of phosphorus and calcium ($P < 0.05$). For the gender factor, barrows had a greater excretion of urea, increased carcass weight and backfat thickness. Females had a better yield of meat in the carcass.

Keywords: Antioxidant. Environment. Enzyme. Phytate.

Introdução

A poluição ambiental causada pelo excesso de minerais provenientes dos dejetos animais e a limitação do uso das fontes minerais não renováveis representam uma grande preocupação na produção sustentável de suínos. Nos últimos anos, formas de minimizar a excreção do fósforo pelas fezes dos suínos foram exploradas em razão do impacto negativo da contaminação de mananciais nas zonas de alta densidade animal (Castillon, 2005).

O fósforo, na forma de fitato ou ácido fítico, é a principal fonte de reserva deste mineral nos grãos, sendo estocado principalmente na camada aleurona e no gérmen da semente (Bohn et al., 2008). No farelo de gérmen de milho desengordurado, um co-produto da industrialização do milho, o ácido fítico encontra-se em elevada concentração.

O ácido fítico possui elevado poder de quelação, com alta afinidade pelos cátions polivalentes cálcio, ferro, zinco, cobre e manganês, interferindo na biodisponibilidade desses minerais (Selle et al., 2000), que, não estando na forma ionizada, apresentam limitada absorção pelo organismo do animal (Lopez et al., 2002).

Todavia, a digestibilidade dos minerais pode ser aumentada com a adição de fitase microbiana às rações (Pointillart, 1997; Fireman & Fireman, 1998), melhorando a performance de animais alimentados com níveis adequados de fósforo. Ao mesmo tempo, é possível que as fitases também atuem sobre a utilização de outros nutrientes. Esse efeito, denominado “extra-fosfórico”, corresponde à maior disponibilidade de minerais e à melhor utilização de proteínas, aminoácidos e energia pelos animais.

Inúmeros fatores influenciam a eficácia das fitases microbianas, entre eles os níveis de substrato da dieta, a taxa de inclusão de fitase e o tipo de fitase utilizada (Selle & Ravindran, 2008).

Estudos demonstram que a utilização da enzima pode reduzir a excreção total de fósforo entre 30 a 50%. Assim, os principais benefícios das fitases seriam poupar as reservas não renováveis de fósforo inorgânico e proteger o ambiente da poluição por excesso de minerais nos dejetos (Lei & Porres, 2003).

Diante desses fatores, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência e a possível interação entre a enzima fitase e o ácido fítico, presente sob maior concentração em dietas formuladas com 40% de farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD), sobre os parâmetros de desempenho, perfil sérico e características de carcaça de suínos em fase de terminação.

Material e Métodos

O experimento de desempenho foi conduzido no Setor de Suinocultura da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia e Laboratório de Solos do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

Foram utilizados 32 suínos de linhagem comercial Pen Ar Lan (16 machos castrados e 16 fêmeas) com peso médio inicial e desvio padrão de $60,31 \pm 5,32$ kg. Os animais foram alojados individualmente em baias de alvenaria, com piso compacto e área de 3 m², equipadas com comedouros metálicos semi-automáticos e bebedouros tipo *nipple*.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, de acordo com o peso dos animais, num modelo fatorial 2x2x2 sendo os fatores: dietas sem inclusão de FGMD e com inclusão de 40% de FGMD, dietas sem inclusão de fitase e com inclusão de 1000 FTU, machos castrados e fêmeas. Cada animal foi considerado uma unidade experimental.

Os animais receberam água e ração à vontade durante todo o período experimental (29 dias). As rações eram isoenergéticas, isolisina, isometionina e isoprotéicas, formuladas visando atender às exigências nutricionais mínimas para a fase de terminação estabelecidas pelo NRC (1998), com exceção do nível energético (Energia Metabolizável) que foi 3,7% menor. A fonte de fitase utilizada foi o produto comercial Natuphós[®] 5000.

A composição química do farelo de gérmen de milho desengordurado, do grão de milho e do farelo de soja utilizados nas dietas experimentais está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química do farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD), do grão de milho e do farelo de soja utilizados nas dietas experimentais

Ingredientes	Matéria Seca (%)	Proteína Bruta (%)	Extrato Etéreo (%)	Matéria Mineral (%)
FGMD	88,19	10,88	0,22	3,91
Grão de milho	87,39	8,44	0,80	1,28
Farelo de soja	87,67	43,87	3,85	6,69

Os ingredientes, a composição percentual e os valores calculados das dietas experimentais encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Composição percentual, química e energética das dietas experimentais

Ingredientes (%)	Dietas			
	Sem FGMD/ sem fitase	Sem FGMD/ com fitase	Com FGMD/ sem fitase	Com FGMD/ com fitase
FGMD ¹	-	-	40,00	40,00
Milho grão	72,34	72,36	38,46	38,03
Farelo de soja	20,18	20,18	15,80	15,87
Óleo de soja	1,20	1,20	3,18	3,34
Núcleo suíno ²	2,00	2,00	2,00	2,00
Sal	0,30	0,30	0,30	0,30
Fosfato bicálcico	-	-	0,19	0,19
L-Lisina-HCl	-	-	0,07	0,07
Fitase (1000 FTU) ³	-	0,20	-	0,20
Inerte (Sabugo de milho)	3,98	3,76	-	-
Total	100	100	100	100
Valores calculados				
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.142	3.142	3.142	3.142
Fibra bruta (%)	3,99	3,92	3,49	3,49
Fósforo disponível (%)	0,25	0,25	0,25	0,25
Fósforo total (%)	0,45	0,45	0,58	0,58
Cálcio (%)	0,69	0,69	0,74	0,74
Sódio (%)	0,16	0,16	0,14	0,14
Lisina total (%)	0,75	0,75	0,75	0,75
Metionina total (%)	0,25	0,25	0,25	0,25
Proteína bruta (%)	15,50	15,50	15,50	15,50
Gordura (%)	3,87	3,87	4,82	4,94
Ácido fítico (%) ⁴	2,98	2,98	4,85	4,85

¹Farelo de Gérmen de Milho Desengordurado ²Composição do núcleo único suínos por kg de produto: vit. A, 239.000 UI; vit.B12, 538 mcg; vit.D3, 66.000 UI; vit.E, 517 mg; vit.K3, 60 mg; ácido fólico, 32 mg; ácido pantotênico, 254 mg; biotina, 1,1 mg; niacina, 422 mg; piridoxina, 41 mg; riboflavina, 90 mg; tiamina, 33 mg; colina, 4 g; promotor de crescimento, 2595 mg; Ca, 231 g; Co, 5,5 mg; Cu, 5.000 mg; Fe, 2.760 mg; F, 881 mg; P, 59 g; I, 43 mg; Mn, 1,310 mg; Se, 8,46 mg; Na, 50 g; Zn, 3720 mg; ³Unidades de Fitase (FTU); ⁴Determinado pela técnica descrita por Chen et al. (1956) e por Thompson & Erdman (1982).

Os suínos foram pesados semanalmente e posteriormente, foram calculados o consumo diário de ração, o ganho diário de peso e a conversão alimentar dos animais.

No 14^o dia do experimento, sem submeter os animais ao jejum, realizou-se colheita de sangue por venopunção da jugular externa. O volume de sangue destinado à análise hematológica foi acondicionado em frascos contendo etilenodiaminotetracético-potássico (EDTA) a 10% como anticoagulante. O volume de sangue destinado à determinação das concentrações de triglicerídeos, colesterol, uréia, fósforo, cálcio e ferro foi acondicionado em frascos sem anticoagulante para obtenção do soro.

As amostras foram encaminhadas ao laboratório e as análises foram realizadas por meio de métodos hematológicos tradicionais (Jain, 1993), compreendendo: contagem total de hemácias, realizada em hematocítmetro manual; determinação do volume globular ou hematócrito, por meio da técnica de microhematócrito (Centrifuga para microhematócrito, Fanem[®]); mensuração da hemoglobina, por meio da técnica de cianometahemoglobina com leitura espectrofotométrica (Bio 200, Bioplus[®]); cálculo dos índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). As concentrações de proteína total plasmática (PTP) e fibrinogênio foram determinadas no plasma, após centrifugação do sangue total, por meio da refratometria (refratômetro ATTAGO Co.). O soro foi obtido por centrifugação após a retração do coágulo e foi conservado por congelamento à temperatura de -20°C até o momento do processamento laboratorial, sendo determinadas posteriormente as concentrações de triglicerídeos, colesterol, uréia, fósforo, cálcio e ferro por meio de kits enzimáticos colorimétricos Analisa[®] e a leitura realizada por meio do analisador bioquímico colorimétrico Airone 200[®].

Quando os animais atingiram o peso médio de $76,25 \pm 8,18$ kg foi realizada a técnica de coleta parcial de fezes, para determinação das concentrações de fósforo e cálcio, com a utilização do óxido crômico (0,3%) como marcador fecal. As rações marcadas foram oferecidas aos suínos e após três dias de consumo, as fezes foram coletadas, armazenadas em sacos plásticos e mantidas em temperatura de congelamento. Posteriormente, as fezes foram descongeladas, secas em estufa de ventilação forçada a 60°C por três dias e trituradas. Em seguida, foram encaminhadas ao laboratório para análise de acordo com a técnica proposta por Malavolta et al. (1992) e Silva (1999).

O manejo pré-abate consistiu na retirada da ração 12 horas antes do embarque, permanecendo os animais em dieta hídrica até o abate. Os animais foram abatidos com 141 dias de idade em frigorífico comercial localizado a 45 km da cidade de Londrina, pesando em média $87,19 \pm 7,08$ kg de peso vivo. O processo de abate consistiu primeiramente em uma insensibilização via corrente elétrica, com o equipamento da marca Petrovina[®] IS 2000 com dois eletrodos, utilizando-se 350 volts e 1,3 ampères. O choque elétrico foi aplicado por um período de aproximadamente três segundos. A sangria foi realizada por meio da secção dos grandes vasos do pescoço, com os animais na posição vertical, suspensos pelo membro posterior. Após o abate, escaldagem e evisceração, as carcaças foram divididas ao meio longitudinalmente e resfriadas à temperatura de $2 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas, na câmara de resfriamento do frigorífico.

As carcaças foram avaliadas individualmente de acordo com as orientações de Bridi & Silva (2007), obtendo-se os dados de comprimento de carcaça (CC), espessura de toucinho (ET), profundidade do músculo (PM), área de olho do lombo (AOL), peso da carcaça quente (PCQ), peso da carcaça fria (PCF) e rendimento de carcaça (RC). A espessura de toucinho e a profundidade do músculo *Longissimus dorsi* foram medidas na altura da última costela a 6 cm da linha média do corte. A partir dos valores dessas medidas, estimou-se o rendimento de carne na carcaça (RCC), de acordo com a metodologia estabelecida por Guidoni (2000).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey utilizando-se o programa SAEG (1997).

Resultados e Discussão

Avaliando-se o fator FGMD, observa-se que somente o parâmetro consumo diário de ração apresentou-se diferente, sendo maior ($P < 0,05$) para os animais que receberam dietas com FGMD (Tabela 3). Não houve interação ($P \geq 0,05$) entre os fatores.

Tabela 3. Médias e (desvios-padrão) do consumo diário de ração (CDR), ganho diário de peso (GDP) e conversão alimentar (CA) de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	Parâmetros		
	CDR (kg)	GDP (kg)	CA
Sem FGMD	2,36 (0,38) b	0,91 (0,14)	2,64 (0,51)
Com FGMD	2,59 (0,25) a	0,95 (0,14)	2,75 (0,22)
Sem fitase	2,43 (0,37)	0,93 (0,13)	2,68 (0,53)
Com fitase	2,52 (0,31)	0,93 (0,15)	2,70 (0,20)
Machos castrados	2,65 (0,33) a	0,97 (0,11)	2,75 (0,39)
Fêmeas	2,30 (0,25) b	0,89 (0,15)	2,63 (0,40)
C.V. (%)	12,8	10,8	11,9

^{a,b} letras distintas nas colunas, para cada fator, indicam diferença ($P < 0,05$)

O maior consumo do FGMD pelos animais pode ser devido à sua maior palatabilidade em relação às dietas sem o co-produto. Segundo Freitas (1998), o gérmen de milho possui boa palatabilidade, e é facilmente consumido pelos suínos. Esse resultado discorda de Soares et al. (2004), que trabalhando com diferentes inclusões de FGMD (0, 10, 20 e 30%), constataram redução linear do consumo diário de ração com o aumento do FGMD na ração de suínos em terminação. Este efeito, segundo os autores, foi atribuído à maior adição de óleo de soja nas rações com níveis progressivamente maiores de FGMD, o que limitou o consumo pelo incremento da concentração energética das mesmas.

Avaliando rações à base de milho, farelo de soja e diferentes inclusões de FGMD (0, 15, 30 e 45%), Moreira et al. (2002) observaram que o ganho de peso e a conversão alimentar dos animais pioraram de forma linear com a inclusão do FGMD na fase de

terminação e apontaram questões relacionadas a menor digestibilidade do farelo como causa desta piora.

Todavia, Harbach et al. (2007) verificaram que a inclusão de FGMD nas concentrações de 0, 10, 20 e 40% não resultou em diferença ($P>0,05$) para nenhum dos parâmetros de desempenho avaliados.

Estas variações nos resultados de trabalhos com o FGMD podem ser explicadas pelas diferenças nutricionais ocasionadas por diferenças nas condições de solo, clima, cultivares, além das várias formas de processamento pelo qual passa o milho grão, determinando farelos de gérmen com características distintas.

Em relação ao fator fitase, não houve diferença entre os tratamentos para as características de desempenho.

Ao utilizarem 1450 FTU/kg em rações de suínos, Beers & Jongbloed (1992), observaram 8,5% de aumento no consumo de ração e melhora de 4,4% na conversão alimentar. A suplementação da ração de suínos em crescimento com 1000 FTU por Ketaren et al. (1993), também determinou melhora na conversão alimentar dos animais.

Numa comparação entre rações com e sem fitase (1000 FTU) e com e sem antioxidante (vitamina E), Gebert et al. (1999), observaram que o fator fitase foi responsável pelo aumento no consumo de ração ($P<0,01$), aumento no ganho de peso ($P<0,001$) e melhora na conversão alimentar dos animais ($P<0,01$). Porém, os animais iniciaram o experimento com 26 kg e foram abatidos com 106 kg de peso vivo e as dietas eram à base de cevada (35%), milho (30%), soja (10%), farelo de girassol (10%) e batata (5%).

Por outro lado, Silva et al. (2004) concluíram que a utilização da enzima fitase (1250 FTU) em rações à base de milho (65%), farelo de soja (18,63%) e farelo de arroz desengordurado (12,5%) melhorou a conversão alimentar dos suínos, decorrente da

maior utilização dos nutrientes da ração. Porém, o experimento teve duração de 35 dias e os animais iniciaram o teste com 30 kg de peso vivo.

Os machos castrados apresentaram consumo de ração superior ($P < 0,05$) ao das fêmeas. Este parâmetro tipicamente apresenta-se superior para os machos, que têm fisiologicamente, um maior apetite. Neste aspecto, os resultados obtidos concordam com Costa (2005), que ao avaliar com dietas à base de FGMD até o nível de 40% para suínos em terminação também observou diferença entre os gêneros para a mesma característica.

A Tabela 4 indica os teores de fósforo e cálcio nas fezes e as concentrações séricas de fósforo, cálcio e ferro dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. Não foi observado efeito ($P > 0,05$) de interação entre os fatores.

Tabela 4. Médias e (desvios-padrão) dos teores fecais de fósforo e cálcio e das concentrações séricas de fósforo, cálcio e ferro de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	Parâmetros				
	Fezes (mg/100g)		Sangue (mg/dL)		
	Fósforo	Cálcio	Fósforo	Cálcio	Ferro
Sem FGMD	1,55 (0,52) b	0,88 (0,18) b	9,25 (1,57)	10,24 (1,29)	210,50 (74,28)
Com FGMD	2,10 (0,56) a	1,03 (0,26) a	9,64 (1,00)	10,34 (1,84)	181,50 (72,67)
Sem fitase	2,26 (0,38) a	1,03 (0,24) a	9,12 (1,20)	10,16 (1,76)	180,81 (51,61)
Com fitase	1,38 (0,42) b	0,88 (0,21) b	9,78 (1,42)	10,41 (1,39)	215,43 (91,47)
Machos castrados	1,94 (0,54)	1,10 (0,20) a	9,43 (1,22)	10,19 (1,40)	189,14 (43,02)
Fêmeas	1,71 (0,66)	0,82 (0,16) b	9,44 (1,46)	10,39 (1,75)	203,81 (93,81)
C.V. (%)	13,7	14,7	14,4	8,9	37,9

^{a,b} letras distintas nas colunas, para cada fator, indicam diferença ($P < 0,05$)

Analisando-se a quantidade de fósforo e cálcio eliminados pelas fezes, observa-se que os animais que receberam as dietas com o FGMD eliminaram maior quantidade ($P < 0,05$) dos minerais, respectivamente 35,48 e 12,04%. Isso ocorreu provavelmente devido à ligação do fitato com macro e micro-elementos (Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, Mo e Co) reduzir a solubilidade e a biodisponibilidade dos nutrientes da ração, pois os complexos formados se precipitam e tornam-se indisponíveis para o animal. Desta

forma, os nutrientes não utilizados pelo animal são excretados pelas fezes, aumentando a deposição de minerais no meio ambiente (Lei & Porres, 2003).

Os animais que receberam rações contendo a enzima fitase apresentaram melhor aproveitamento dos minerais avaliados, com menos 38,93% de excreção de fósforo e menos 14,56% de excreção de cálcio. Isso pode ser confirmado pela menor quantidade desses minerais nas fezes ($P < 0,05$). O resultado desse estudo concorda com Figueirêdo et al. (2000), que utilizaram fitase e farelo de arroz integral em suas rações e também observaram redução na excreção de fósforo. Simons et al. (2005) constataram que a adição de fitase microbiana (1000 FTU) para suínos em crescimento reduziu a excreção de fósforo em 35%. A fitase atua nas ligações do grupo fosfato, liberando fósforo e outros minerais que fazem parte dessa molécula (Moreira et al., 2003). Essa diminuição na excreção de elementos como nitrogênio, fósforo e cálcio por suínos em terminação é de extrema importância, pois ameniza a carga de poluição ambiental. Este fato é importante, pois comprova que independentemente da dieta apresentar mais ou menos ácido fítico (2,98% na dieta sem FGMD e 4,85% na dieta com FGMD) a fitase melhorou o aproveitamento destes minerais.

Os machos castrados eliminaram uma quantidade maior ($P < 0,05$) de cálcio nas fezes. Segundo McDowell (1992), as fezes são a principal via de excreção do cálcio, sendo o cálcio das fezes resultado do cálcio não absorvido da dieta, e da secreção intestinal desse elemento. Possivelmente a maior excreção de cálcio pelos machos castrados está relacionada às diferenças na metabolização do mineral entre os gêneros, de tal forma que o excesso do mineral foi excretado pelas fezes dos animais.

Não houve diferença ($P > 0,05$) para as concentrações séricas de fósforo, cálcio e ferro. De acordo com Figueirêdo et al. (2000), a ação da enzima fitase também não influenciou o fósforo do plasma, o que difere de Young et al. (1993), que constataram

aumento na concentração de fósforo no plasma com o aumento dos níveis de fitase nas dietas (0, 500 e 1000 FTU).

Almeida et al. (2007), trabalhando com dietas com fitase e níveis reduzidos de fósforo para suínos em terminação, não encontraram diferenças ($P > 0,05$) para as concentrações de ferro sérico. Todavia, Gebert et al. (1999) observaram que animais que receberam dietas com fitase (1000 FTU) apresentaram aumento na concentração plasmática de ferro ($P < 0,05$) e de fósforo ($P < 0,001$).

A presença de fitatos, oxalatos e fosfatos formam complexos com o ferro, retardando sua absorção. O ferro é vital para todas as células e está incluído no grupo heme de citocromos, peroxidases, catalases, mioglobina e hemoglobina. Por outro lado, o ferro pode lesar diferentes tecidos por catalisar a reação que converte peróxidos de oxigênio em íons radicais livres, que destroem a membrana celular, proteínas e o DNA (Zago et al., 2001; Hentze et al., 2004). Considerando que o excesso e a deficiência de ferro podem causar morte celular, os níveis desse elemento devem ser controlados. Os valores de referência de ferro para a espécie suína, segundo Kaneko et al. (1997), são de 91-199 $\mu\text{g/dL}$.

Os resultados referentes ao hemograma (Tabela 5) indicam que não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos para os fatores FGMD, fitase ou gênero. Além disso, todos os valores encontrados permaneceram dentro dos níveis de referência, de acordo com Kaneko et al. (1997).

Tabela 5. Médias e (desvios-padrão) dos valores de hemácia, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), proteína total plasmática (PTP) e fibrinogênio de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	Parâmetros					
	Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	PTP (g/dL)	Fibrinogênio (mg/dL)
Sem FGMD	6,4 (1,0)	58,6 (9,2)	19,0 (2,6)	32,6 (1,4)	8,0 (0,4)	406,2 (161,1)
Com FGMD	6,6 (0,8)	57,8 (6,1)	18,6 (2,1)	32,3 (1,2)	8,2 (0,4)	562,5 (294,1)
Sem Fitase	6,4 (1,0)	58,4 (8,3)	18,8 (2,7)	32,3 (1,0)	8,1 (0,4)	475,0 (220,6)
Com Fitase	6,6 (0,9)	58,0 (7,4)	18,9 (1,9)	32,6 (1,5)	8,1 (0,4)	493,7 (276,8)
M. castrados	6,6 (1,0)	58,8 (9,4)	18,9 (2,8)	32,3 (1,3)	8,2 (0,4) a	418,7 (213,6)
Fêmeas	6,5 (0,9)	57,5 (5,7)	18,8 (1,8)	32,6 (1,3)	7,9 (0,4) b	550,0 (265,8)
C.V. (%)	13,8	13,5	12,7	4,3	4,6	50,9

^{a,b} letras distintas nas colunas, para cada fator, indicam diferença ($P < 0,05$)

Para as proteínas plasmáticas totais (PTP), os machos castrados apresentaram valores superiores aos das fêmeas, porém, esses valores encontram-se dentro da normalidade, em torno de 7,9-8,9 g/dL (Kaneko et al., 1997). Em relação ao fibrinogênio não houve diferença ($P < 0,05$) entre os fatores. Todavia houve interação entre os fatores gênero e fitase para as características hematócrito e hemoglobina (Tabela 6).

Tabela 6. Interação entre fitase e gêneros para as variáveis hematócrito e hemoglobina de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	Sem Fitase	Com Fitase	C.V. (%)
Hematócrito (%)			
Machos castrados	39,00 (2,5) aA	36,75 (3,2) aA	7,4
Fêmeas	34,37 (2,1) bB	39,37 (3,1) aA	6,0
Hemoglobina (g/dL)			
Machos castrados	12,57 (1,0) aA	11,85 (1,0) aA	8,6
Fêmeas	11,35 (0,9) bB	12,72 (1,2) aA	7,2

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas e letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença no teste de Tukey ($P < 0,05$)

Os resultados indicam que na ausência da fitase, as fêmeas apresentaram valores menores ($P < 0,05$) de hematócrito e hemoglobina em relação aos machos. Quando se comparam as fêmeas, nota-se que as dietas que continham fitase aumentaram ligeiramente as mesmas variáveis citadas, porém, os valores apresentados

permaneceram dentro dos níveis normais para a espécie suína, que são de 32-50% para o hematócrito e 10-16 g/dL para a hemoglobina.

Em relação às variáveis triglicerídeos, colesterol e uréia, observou-se diferença apenas para a concentração de uréia entre os gêneros, sendo que os machos castrados apresentaram maiores ($P < 0,05$) teores quando comparados às fêmeas (Tabela 7).

Tabela 7. Médias e (desvios-padrão) dos valores séricos de triglicerídeos, colesterol e uréia de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	Parâmetros		
	Triglicerídeos (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Uréia (mg/dL)
Sem FGMD	62,3 (16,2)	88,0 (9,6)	39,9 (31,6)
Com FGMD	69,7 (18,2)	96,5 (16,0)	37,7 (16,4)
Sem Fitase	64,9 (21,0)	92,3 (17,1)	34,4 (13,1)
Com Fitase	67,1 (13,3)	92,2 (9,5)	43,2 (32,5)
Machos castrados	61,2 (19,5)	93,4 (14,0)	47,3 (29,4) a
Fêmeas	70,7 (13,9)	91,1 (13,6)	30,3 (15,8) b
C.V. (%)	22,4	13,4	57,9

^{a,b} letras distintas nas colunas, para cada fator, indicam diferença ($P < 0,05$)

De acordo com Minihane & Rimbach (2002), o ácido fítico atua na diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesterol no plasma. Costa (2005), ao utilizar dietas que apresentavam 0, 10, 20 e 40% de FGMD, observou redução nos níveis séricos de triglicérides e colesterol com a evolução do experimento, cuja duração foi de 28 dias.

A ausência de diferença ($P > 0,05$) nas concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol no presente estudo provavelmente são devido a não aplicação do jejum antes da colheita do sangue dos animais.

Fialho et al. (2004) determinaram as concentrações de uréia plasmática ao suplementar níveis crescentes de fitase (0, 400, 800 e 1200 FTU) na ração de suínos em crescimento. Os autores observaram efeito quadrático, com ponto de mínima concentração de uréia plasmática para 750 FTU, indicando que o uso da enzima pode ter aumentado o aproveitamento de proteínas da dieta, determinando assim, a

diminuição dos valores de uréia no plasma. A taxa de síntese da uréia é influenciada pelos valores de proteína utilizada da dieta e pelo catabolismo protéico. No presente experimento, os dois gêneros receberam a mesma quantidade de proteína na dieta, porém, como as exigências de proteína para os machos são menores, provavelmente os valores mais elevados de uréia plasmática foram decorrentes desse fato.

A análise dos resultados referentes ao peso e ao rendimento das carcaças (Tabela 8) revelou ausência de diferença ($P>0,05$) entre os fatores FGMD e fitase, porém, em relação aos gêneros, os machos apresentaram maior peso vivo final, peso de carcaça quente e peso de carcaça resfriada. As fêmeas, porém, apresentaram maior rendimento de carne na carcaça ($P<0,05$). A diferença de deposição dos tecidos entre os gêneros é um fator determinante no rendimento de carcaça e de carne na carcaça. À medida que aumenta a deposição de tecido adiposo na carcaça, a proporção de carne diminui.

Tabela 8. Médias e (desvios-padrão) do peso vivo final (PV), peso da carcaça quente (PCQ), peso da carcaça resfriada (PCR), rendimento de carcaça (RC) e rendimento de carne na carcaça resfriada (RCC) de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	Parâmetros				
	PV (kg)	PCQ (kg)	PCR (kg)	RC (%)	RCC (kg)
Sem FGMD	86,5 (8,6)	65,5 (6,7)	63,7 (6,6)	75,8 (1,6)	62,9 (2,8)
Com FGMD	87,9 (5,4)	66,5 (4,5)	64,8 (4,4)	75,7 (1,6)	63,0 (2,5)
Sem fitase	87,0 (7,5)	65,7 (5,4)	63,9 (5,3)	75,5 (1,5)	62,9 (2,1)
Com fitase	87,3 (6,9)	66,3 (6,0)	64,5 (5,9)	75,9 (1,7)	63,1 (3,1)
Machos castrados	90,2 (4,4) a	68,6 (4,3) a	66,7 (4,3) a	76,0 (1,9)	61,6 (2,8) b
Fêmeas	84,2 (8,1) b	63,5 (5,8) b	61,7 (5,6) b	75,4 (1,2)	64,3 (1,6) a
C.V. (%)	6,1	6,4	6,4	1,5	2,9

^{a,b} letras distintas nas colunas, para cada fator, indicam diferença ($P<0,05$)

Os resultados referentes à avaliação quantitativa das carcaças (Tabela 9) indicam que não houve diferenças ($P>0,05$) em relação aos fatores FGMD e fitase nem interação entre eles.

Tabela 9. Médias e (desvios-padrão) do comprimento de carcaça (CC), profundidade de músculo (PM), espessura de toucinho (ET) e área de olho do lombo (AOL) de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	Parâmetros			
	CC (cm)	PM (mm)	ET (mm)	AOL (cm ²)
Sem FGMD	89,0 (4,3)	59,62 (5,6)	10,09 (4,2)	38,47 (4,3)
Com FGMD	90,1 (3,0)	60,39 (5,6)	9,94 (3,4)	38,41 (4,1)
Sem fitase	89,0 (4,5)	58,84 (4,0)	10,00 (3,1)	37,14 (2,9)
Com fitase	90,1 (2,6)	61,17 (6,6)	10,03 (4,5)	39,74 (4,8)
Machos castrados	89,7 (3,1)	60,94 (4,0)	12,00 (3,2) b	37,95 (4,8)
Fêmeas	89,4 (4,2)	59,07 (6,7)	8,03 (2,4) a	38,94 (3,3)
C.V. (%)	3,5	9,5	25,5	10,3

^{a,b} letras distintas nas colunas, para cada fator, indicam diferença (P<0,05)

De acordo com Moreira et al. (2002), os níveis crescentes de FGMD nas rações de suínos, em fase de crescimento e terminação levaram à redução da espessura de toucinho e não afetaram a profundidade do lombo. Silva et al. (2004) não observaram influência da inclusão do FGMD sobre as características de carcaça, indicando que esse produto não levou a efeitos deletérios sobre as mesmas. Costa (2005) observou aumento no rendimento de carcaça e na profundidade de músculo *Longissimus dorsi* com o aumento dos níveis de inclusão do FGMD (até 40% de inclusão).

As diferenças observadas entre os vários experimentos (Moreira et al., 2002; Soares et al. 2004; Costa, 2005) que utilizaram o FGMD como ingrediente revelam que as diferenças na composição do co-produto podem ter sido responsáveis pelos resultados distintos observados.

Para o fator fitase, os resultados foram semelhantes aos obtidos por Santos et al. (2008), que não verificaram diferença (P>0,05) para as variáveis espessura de toucinho, área de olho do lombo, comprimento de carcaça e peso da carcaça, mas demonstraram que a média de rendimento de carcaça dos animais que receberam ração com fitase e reduzido teor de fósforo foi superior à média dos animais que receberam ração sem adição de fitase. Os resultados foram similares aos de Fandrejewski et al. (1999) e

Ludke et al. (2002), que também não encontraram efeito significativo nas características de carcaça dos animais alimentados com dietas suplementadas com fitase.

Para os dados de carcaça observou-se apenas diferença entre os gêneros para a variável espessura de toucinho. As fêmeas apresentaram valores relativamente menores ($P < 0,05$) em relação aos machos para essa característica, possivelmente devido às diferenças fisiológicas próprias de deposição desse tecido, visto que machos castrados possuem maior tendência ao acúmulo de gordura, em relação às fêmeas.

Conclusões

A participação de 40% de FGMD nas rações à base de milho e farelo de soja para suínos na fase de terminação promoveu maior ingestão alimentar e manteve adequados os índices de ganho de peso e conversão alimentar.

Independentemente da inclusão do FGMD e da fitase nas rações, os machos castrados apresentaram carcaças mais pesadas e maior espessura de toucinho, e as fêmeas maior rendimento de carne na carcaça.

A utilização da enzima fitase mostrou ser efetiva na redução dos níveis fecais de cálcio e fósforo, sem influenciar as características de desempenho e carcaça.

Literatura Citada

- ALMEIDA, R.F.; LOPES, E.L.; NUNES, R.C. Ferro e imunidade humoral em suínos alimentados com fitase e níveis reduzidos de fósforo. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.4, p.767-776, out. /dez. 2007.
- BEERS, S.; JONGBLOED, A.W. Apparent overall (total tract) digestibility of P in relation to doses of *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs. **Journal of Animal Science**, v.70, p.242, 1992.
- BOHN, L.; MEYER, A.S.; RASMUSSEN, S.K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.9, n.3, p.165-191, 2008.
- BRIDI, A.M.; SILVA, C.A. **Métodos de avaliação da carcaça e da carne suína**. Londrina: Midiograf, 2007. 97p.
- CASTILLON, P. Le phosphore: sources flux et roles pour la production végétale et l'eutrophisation. **INRA Productions Animales**, v.18, n.3, p.153-158, 2005.
- CHEN, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v.28, p.1756-1758, 1956.
- COSTA, M.C.R. **Farelo de germen de milho desengordurado na alimentação de suínos como fonte de ácido fítico**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.
- FANDREJEWSKI, H.; WEREMKO, D.; RAJ, S. et al. Performance, body and carcass composition and bone characteristics of pigs fed rapeseed and soybean meal-cereal diets supplemented with microbial phytase. **Journal of Animal Feed Science**, v.8, p.533–547, 1999.
- FIALHO, E.T.; SILVA, H.O.; LIMA, J.A.F. et al. Efeito da fitase sobre o desempenho, e teor de uréia no plasma de suínos na fase de crescimento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, n.41, 2004, Campo Grande. **Anais...Campo Grande: EMBRAPA gado de corte**, 2004.
- FIGUEIRÊDO, A.V.; FIALHO, E.T.; VITTI, D.M.S.S. et al. Ação da fitase sobre a disponibilidade biológica do fósforo, por intermédio da técnica de diluição isotópica, em dietas com farelo de arroz integral para suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.1, p.177-182, 2000.
- FIREMAN, F.A.T; FIREMAN, A.K.B.A.T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.1, p.173-178, 1998.
- FREITAS, R.M. Fontes alternativas para o milho. In: SEMINÁRIO NUTRON DE SUINOCULTURA, 2., 1998, Campinas, **Anais...Local: NUTRON**, 1998. p.15-24.

- GEBERT, S.; BEE, G.; PFIRTER, H.P. et al. Phytase and vitamin E in the feed of growing pigs: 1. influence on growth, mineral digestibility and fatty acids in digesta. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, n.81, p.9-19, 1999.
- GUIDONI, A.L. Melhoria de processos para tipificação e valorização de carcaças suínas no Brasil. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE A QUALIDADE DE CARNE SUÍNA. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 2000. p.221-234.
- HARBACH, A. P.; COSTA, M. C. R.; SOARES, A. L. et al. Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**, n.100, p.1630-1633, 2007.
- HENTZE, W.M.; MUCHENTHALER, M.U; ANDREWS, N.C. et al. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v.117, p.285-297, 2004.
- JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th. Academic Press, 1997.
- KETAREN, P.P.; BATTHERHAM, E.S.; DETTMANN, E.B. Phosphorus studies in pigs: 3. Effect of phytase supplementation on the digestibility and availability of phosphorus in soya-bean meal for grower pigs. **British Journal of Nutrition**, v.70, n.1, p.289-311, 1993.
- LEI, X.G.; PORRES, J.M. Phytase enzymology, applications and biotechnology. **Biotechnology Letters**, v.25, n.21, p.1787-1794, 2003.
- LOPEZ, H.W.; LEENHARDT, F.; COUDRAY, C. et al. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? **International Journal of Food Science and Technology**, n.37, p.727-739, 2002.
- LUDKE, M.C.M.; LÓPEZ, J.; LUDKE, J.V. Fitase em dietas para suínos em crescimento: (2) parâmetros de carcaça e ossos. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.97-102, 2002.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicação**. 2.ed. São Paulo: Potafós, 1992. 234p.
- McDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. New York: Academic, 1992. 232p.
- MINIHANE, A.M.; RIMBACH, G. Iron absorption and the iron binding and anti-oxidant properties of phytic acid. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p.741-748, 2002.
- MOREIRA, I.; RIBEIRO, C.R.; FURLAN, C. et al. Utilização do farelo de gérmen de milho desengordurado na alimentação de suínos em crescimento e terminação – digestibilidade e desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2238-2246, 2002.

- MOREIRA, J.A.; VITTI, D.M.S.S.; LOPES, J.B. et al. Biodisponibilidade e perdas endógenas mínimas de P em dietas com níveis crescentes de fitase para suínos em crescimento pela técnica de diluição isotópica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, p.350-356, 2003.
- NUTRIENT REQUIREMENT OF SWINE - NRC. 10. ed. Washington: National Academic of Sciences, 1998.
- POINTILLART, A. Importância dos fitatos e das fitases na alimentação dos suínos. **A Hora Veterinária**, n.95, p.66-72, jan./fev. 1997.
- SANTOS, S.P.; NUNES, R.C; LOPES, E.L. et al. Retirada do suplemento micro mineral, redução de fósforo inorgânico e adição de fitase em rações de suínos na fase de terminação. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.663-671, 2008.
- SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V.; CALWELL, R.A. et al. Phytate and phytase: consequences for protein utilization. **Nutrition Research Reviews**, n.13, p.255-248, 2000.
- SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. **Livestock Science**, v.133, p.99-122, 2008.
- SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solo, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 370p.
- SILVA, H.O.; FIALHO, E.T.; FREITAS, R.T.F. et al. Phytase in rations of growing pigs: performance, blood parameters and bone mineral content. **Ciência Agrotécnica**, v.28, n.6, p.1428-1436, nov./dez., 2004.
- SIMONS, P.C.M.; VERSTEEGH, A.J.; JONGBLOED, A.W. et al. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. **British Journal of Nutrition**, v.93, p.136-152, 2005.
- SOARES, L.L.P.; SILVA, C.A.; PINHEIRO, J.W. et al. Farelo de gérmen de milho desengordurado na alimentação de suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1768 – 1776, 2004.
- THOMPSON, D.B.; ERDMAN, J.W. Phytic acid determination in soybeans. **Journal of Food Science**, v.47, n.2, p.513-517, 1982.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 7.1. Viçosa, MG, 1997. 150p.
- YOUNG, G.L.; LEUNISSEN, M.; ATKINSON, J.L. Addition of microbial phytase to diets of young pigs. **Journal of Animal Science**, v.71, n.8, 2147-2150, 1993.
- ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. 1081p.

ARTIGO 2. UTILIZAÇÃO DO FARELO DE GÉRMEN DE MILHO DESENGORDURADO, COMO PRINCIPAL FONTE DE ÁCIDO FÍTICO, ASSOCIADO À FITASE EM RAÇÕES DE SUÍNOS: EFEITOS SOBRE A QUALIDADE DA CARNE E DA LINGUIÇA TIPO FRESCAL

Artigo editado de acordo com as normas de publicação da *Revista Brasileira de Zootecnia*

Utilização do farelo de gérmen de milho desengordurado, como principal fonte de ácido fítico, associado à fitase em rações de suínos: efeitos sobre a qualidade da carne e da linguiça tipo frescal

RESUMO - O objetivo do trabalho foi avaliar a influência e a possível interação do ácido fítico, veiculado principalmente pelo farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD), e da fitase em rações de suínos em fase de terminação sobre os parâmetros relacionados à qualidade da carne e da linguiça tipo frescal. Para o experimento foram utilizados 32 suínos da linhagem Pen Ar Lan (16 machos castrados e 16 fêmeas) com peso médio inicial \pm desvio padrão de $60,31 \pm 5,32$ kg. Os animais foram distribuídos em um delineamento em blocos casualizados num esquema fatorial $2 \times 2 \times 2$, sendo os fatores: rações sem inclusão de FGMD e com inclusão de 40% de FGMD, rações sem inclusão de fitase e com inclusão de 1000 FTU, machos castrados e fêmeas. Os animais receberam água e ração à vontade durante o período experimental de 29 dias. Ao atingirem $87,19 \pm 7,08$ kg de peso vivo, os animais foram abatidos em frigorífico comercial. Foram coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi* para análise das características de qualidade da carne e para confecção de uma linguiça tipo frescal. As amostras de lombo foram submetidas à avaliação de pH, cor, marmoreio, perda de líquido, maciez, composição química, análise sensorial, composição de ácidos graxos e oxidação lipídica. Na linguiça frescal foi avaliada a cor, o pH, a composição química e a oxidação. Os resultados demonstraram que dietas com farelo de gérmen de milho desengordurado melhoraram a estabilidade lipídica da carne e da linguiça fresca, agindo como fonte de antioxidante endógeno. A inclusão de fitase na dieta não exerceu influência sobre a oxidação lipídica.

Palavras-chave: Ácido fítico. Antioxidante. Enzima. Oxidação.

Defatted corn germ meal as a source of phytic acid, associated with phytase in pigs' diets: effects on meat quality and fresh sausage

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the influence of phytic acid, mainly carried by the defatted corn germ meal (DCGM), and the addition of phytase in pigs' diet during finishing phase on the parameters related to meat and fresh sausage qualities. Thirty two pigs (16 males and 16 females) from a commercial line Pen Ar Lan, averaging (\pm SD) 60.31 ± 5.32 kg of initial body weight were allocated in a 2x2x2 factorial design, having as factors: diets without and with 40% of DCGM; diets without with 1000 FTU of phytase; animal gender. The animals were fed *ad libitum* and water was available during all experimental period. Upon reaching 87.19 ± 7.08 kg body weight, the animals were slaughtered. Samples were collected from the *Longissimus dorsi* muscle for analysis of meat and fresh sausage qualities. Samples from the loin muscle were assessed for pH, color, marbling, drip loss, texture, chemical composition, sensory analysis, fatty acid composition and lipid oxidation. Also the color, pH, chemical composition and oxidation of fresh sausage were evaluated. The results showed that diets with defatted corn germ meal increased the lipid stability of meat and fresh sausage. However, the inclusion of phytase in the diets had no effect on meat oxidation.

Keywords: Antioxidant. Enzyme. Oxidation. Phytic acid.

Introdução

A carne suína é a proteína animal mais consumida no mundo, atendendo aos mercados sob a apresentação *in natura* e sob a forma de produtos processados (Mello Júnior, 2004). A industrialização da carne suína torna-se uma alternativa para o escoamento desta matéria-prima, e para alguns produtos, pode representar uma forma de aumento do prazo de validade (Cassens, 2002). Assim, o consumidor tem à disposição uma enorme gama de derivados cárneos destacando-se as linguiças, salsichas, presuntos e apresuntados.

Sob as formas *in natura* ou processada, a carne suína é considerada um alimento saudável por apresentar excelentes níveis de proteínas, vitaminas do complexo B e minerais, com destaque ao ferro (Bragagnolo & Amaya, 2002). Entretanto, a participação relevante dos ácidos graxos insaturados expõe o produto a maiores riscos de oxidação. Este fato ganha maiores dimensões durante o processamento industrial da carne, uma vez que durante a manipulação do produto ocorrem reações que facilitam a liberação do ferro da hemoglobina e da mioglobina, desencadeando reações oxidativas (Morrissey et al. 1998).

A oxidação lipídica afeta diretamente a qualidade da carne (Lee & Hendricks, 1995) prejudicando seu valor nutritivo, sensorial e conseqüentemente reduzindo seu prazo de validade (Araújo, 2004). A utilização de antioxidantes na dieta dos animais corresponde a um método efetivo para o aumento da estabilidade oxidativa dos produtos cárneos (Souza, 2001).

Neste particular, o ácido fítico, presente em muitos cereais e com grande concentração no farelo de gérmen de milho desengordurado, é visto como um potente antioxidante natural, capaz de inibir a formação de radicais livres ao ser veiculado pelos

ingredientes das rações, formando quelatos com metais envolvidos na oxidação, como por exemplo, o ferro (Ghiretti et al., 1997).

A enzima fitase é utilizada nas rações à base de cereais com o objetivo de melhorar a disponibilidade dos minerais da dieta, com destaque ao fósforo do complexo fitato (Fireman & Fireman, 1998). Porém, um ponto pouco discutido, é que ao suplementar as rações com fitase, há liberação de outros minerais, como o ferro e o zinco, que catalisam as reações de oxidação lipídica.

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos e a possível interação do ácido fítico, veiculado principalmente pelo farelo de gérmen de milho desengordurado e da enzima fitase sobre os parâmetros de qualidade e sobre a estabilidade lipídica da carne e da linguiça tipo frescal suína produzida a partir da carne de machos castrados e fêmeas.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Suinocultura da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, ambos da Universidade Estadual de Londrina e no Laboratório de Química da Universidade Estadual de Maringá.

Foram utilizados 32 suínos da linhagem comercial Pen Ar Lan (16 machos castrados e 16 fêmeas) com peso médio inicial \pm desvio-padrão de $60,31 \pm 5,32$ kg. Os animais foram alojados individualmente em baias de alvenaria, com piso compacto e área de 3 m^2 , equipadas com comedouros metálicos semi-automáticos e bebedouros tipo *nipple*. Cada animal foi considerado uma unidade experimental.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, de acordo com o peso dos animais, num modelo fatorial 2x2x2, sendo os fatores: rações sem inclusão de FGMD e com inclusão de 40% de FGMD, rações sem inclusão de fitase e com inclusão de 1000 FTU, machos castrados e fêmeas.

Os animais receberam água e ração à vontade durante todo o período experimental (29 dias). As rações eram isoenergéticas, isolisina, isometionina e isoprotéicas, formuladas visando atender às exigências nutricionais mínimas para a fase de terminação estabelecidas pelo NRC (1998), com exceção do nível energético (Energia Metabolizável) que foi 3,7% menor. A fonte de fitase utilizada foi o produto comercial Natuphós® 5000.

A composição química do farelo de gérmen de milho desengordurado, do grão de milho e do farelo de soja utilizados nas dietas experimentais está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química do farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD), do grão de milho e do farelo de soja utilizados nas dietas experimentais

Ingredientes	Matéria Seca (%)	Proteína Bruta (%)	Extrato Etéreo (%)	Matéria Mineral (%)
FGMD	88,19	10,88	0,22	3,91
Grão de milho	87,39	8,44	0,80	1,28
Farelo de soja	87,67	43,87	3,85	6,69

Os ingredientes, a composição percentual e os valores calculados das dietas experimentais encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Composição percentual, química e energética das dietas experimentais

Ingredientes (%)	Dietas			
	Sem FGMD/ sem fitase	Sem FGMD/ com fitase	Com FGMD/ sem fitase	Com FGMD/ com fitase
FGMD ¹	-	-	40,00	40,00
Milho grão	72,34	72,36	38,46	38,03
Farelo de soja	20,18	20,18	15,80	15,87
Óleo de soja	1,20	1,20	3,18	3,34
Núcleo suíno ²	2,00	2,00	2,00	2,00
Sal	0,30	0,30	0,30	0,30
Fosfato bicálcico	-	-	0,19	0,19
L-Lisina-HCl	-	-	0,07	0,07
Fitase (1000 FTU) ³	-	0,20	-	0,20
Inerte (Sabugo de milho)	3,98	3,76	-	-
Total	100	100	100	100
Valores calculados				
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.142	3.142	3.142	3.142
Fibra bruta (%)	3,99	3,92	3,49	3,49
Fósforo disponível (%)	0,25	0,25	0,25	0,250
Fósforo total (%)	0,45	0,45	0,58	0,58
Cálcio (%)	0,69	0,69	0,74	0,74
Sódio (%)	0,16	0,16	0,14	0,14
Lisina total (%)	0,75	0,75	0,75	0,75
Metionina total (%)	0,25	0,25	0,25	0,25
Proteína bruta (%)	15,50	15,50	15,50	15,50
Gordura (%)	3,87	3,87	4,82	4,94
Ácido fítico (%) ⁴	2,98	2,98	4,85	4,85

¹Farelo de Gérmen de Milho Desengordurado ²Composição do núcleo único suínos por kg de produto: vit. A, 239.000 UI; vit.B12, 538 mcg; vit.D3, 66.000 UI; vit.E, 517 mg; vit.K3, 60 mg; ácido fólico, 32 mg; ácido pantotênico, 254 mg; biotina, 1,1 mg; niacina, 422 mg; piridoxina, 41 mg; riboflavina, 90 mg; tiamina, 33 mg; colina, 4 g; promotor de crescimento, 2595 mg; Ca, 231 g; Co, 5,5 mg; Cu, 5.000 mg; Fe, 2.760 mg; F, 881 mg; P, 59 g; I, 43 mg; Mn, 1,310 mg; Se, 8,46 mg; Na, 50 g; Zn, 3720 mg; ³Unidades de Fitase (FTU); ⁴Determinado pela técnica descrita por Chen et al. (1956) e por Thompson & Erdam (1982).

Ao atingirem $87,19 \pm 7,08$ kg de peso vivo os animais foram abatidos em frigorífico comercial localizado a 45 km da cidade de Londrina. O processo de abate consistiu primeiramente em uma insensibilização via corrente elétrica, com o equipamento da marca Petrovina[®] IS 2000 com dois eletrodos, utilizando-se 350 volts e 1,3 ampères. O choque elétrico foi aplicado por um período de aproximadamente três segundos. A sangria foi realizada por meio de secção dos grandes vasos do pescoço, com os animais na posição vertical, suspensos pelo membro posterior.

Após o abate, escaldagem e evisceração, as carcaças foram divididas ao meio longitudinalmente e resfriadas à temperatura de $2 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas, na câmara de resfriamento do frigorífico. O pH da carne foi medido no músculo *Longissimus dorsi*, na altura da última costela, aos 45 minutos após o abate (pH inicial) e após 24 horas de resfriamento (pH final) com o potenciômetro da marca Sentron 1001.

Após 24 horas de resfriamento, foram retiradas de cada meia carcaça esquerda amostras do músculo *Longissimus dorsi* (lombo) para análises da qualidade da carne e para a confecção de uma linguiça tipo frescal. De cada lombo retirou-se a gordura adjacente, sendo coletadas amostras de aproximadamente 2,5 cm de espessura cada. Na primeira amostra avaliou-se a cor, marmoreio e estimou-se a perda de água por gotejamento; na segunda amostra foi medida a perda de água no descongelamento, a perda de água na cocção e a maciez da carne; na terceira amostra realizou-se a análise de oxidação lipídica; na quarta amostra realizou-se a análise química da carne (umidade, proteína, extrato etéreo e cinzas) e a quinta amostra foi submetida à quantificação da composição dos ácidos graxos. Com exceção das amostras de cor e marmoreio, as demais foram acondicionadas individualmente em sacos plásticos, vedadas e armazenadas em freezer a -20°C até a realização das análises.

A linguiça frescal foi preparada obedecendo à seguinte formulação da EMATER (1992): para 1 kg de lombo suíno, adicionou-se 30 g de sal, 1 g de alho em pó, 1 g de pimenta do reino moída, 1 g de pimenta malagueta e noz moscada. Após o preparo, o produto foi embutido em tripas naturais e separado em amostras, sendo estas armazenadas em temperatura de refrigeração (4°C). Após 7 dias de armazenamento em geladeira a 4°C , foram realizadas as análises de pH, cor, composição química (umidade, cinzas e extrato etéreo) e oxidação lipídica.

Para a análise de cor, as amostras de carne foram avaliadas 24 horas após o abate, utilizando o colorímetro portátil Minolta® CR10, com esfera de integração e ângulo de visão de 8°, ou seja, iluminação d/8 e iluminante C. Os componentes L* (luminosidade), a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema de cor CIELAB. Com esses valores calculou-se o ângulo de tonalidade (h*) pela equação $h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*)$, e o índice de saturação (c*) a partir da equação $c^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0,5}$. Estas mesmas amostras também foram avaliadas subjetivamente para marmoreio, utilizando-se padrões fotográficos (National Pork Producers Council, 1991), onde foram atribuídas notas de 1 a 5 (1 = traços de marmoreio e 5 = marmoreio abundante).

A capacidade de retenção de água da carne foi avaliada por três metodologias: perda de água por gotejamento, perda de água no descongelamento e perda de água na cocção. A perda de água por gotejamento foi avaliada segundo a técnica descrita por Boccard et al. (1981). A perda de água no descongelamento foi obtida pela diferença de peso da amostra congelada e após o degelo por 24 horas à temperatura de 2 ± 2 °C. A perda de água na cocção foi obtida pela diferença de peso da amostra descongelada e após o cozimento em forno pré-aquecido a 170 °C, até alcançarem a temperatura interna de aproximadamente 71°C (Bridi & Silva, 2007).

Para a avaliação da maciez da carne utilizou-se as amostras das análises de perda de água por descongelamento e cocção, sendo que após a cocção, as amostras permaneceram armazenadas por 24 horas a 2 ± 2 °C. Foram retiradas sub-amostras cilíndricas de 2,5 cm de comprimento e 1,27 cm de diâmetro, utilizando-se um amostrador de aço cilíndrico. A força de cisalhamento foi tomada perpendicularmente à orientação das fibras musculares com a lâmina Warner-Bratzler adaptada no

texturômetro Stable Mycro Systems TA-XT2i (Bouton et al., 1971). As velocidades utilizadas foram de 5 mm/s no pré e pós teste e de 2 mm/s no teste.

A composição química da carne e da linguiça foram determinadas de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (1984). A análise sensorial foi avaliada pelo Teste de Ordenação (Dutcosky,1996), por meio de 40 painelistas não treinados, que após a mastigação de uma pequena porção de carne assada sem adição de tempero, classificaram as carnes em ordem crescente de sabor.

A oxidação lipídica foi determinada no músculo *Longissimus dorsi* e na linguiça pelo método Indicativo de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), conforme procedimento descrito por Tarladgis et al. (1964) e modificado por Crackel et al (1988).

Para a determinação da composição de ácidos graxos, os lipídios totais foram extraídos conforme metodologia de Bligh & Dyer (1959) e a transesterificação dos ácidos graxos realizada segundo os procedimentos de Hartman & Lago (1973), onde utilizou-se para a separação dos ésteres de ácidos graxos um cromatógrafo a gás 14-A (Shimadzu).

Os resultados da análise sensorial foram submetidos ao Teste de Friedman, utilizando-se a Tabela de Newel e Mac Farlane, ao nível de 5% de significância, (Dutcosky,1996). O teste indica a diferença crítica entre os totais de ordenação de acordo com o número de tratamentos testados e o número de julgamentos obtidos. Os demais resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey utilizando-se o programa SAEG (1997).

Resultados e Discussão

A análise dos resultados indica que os fatores FGMD e fitase, não influenciaram ($P>0,05$) as variáveis estudadas (Tabela 3). Os valores de pH inicial e final encontram-se dentro da normalidade. Contrariamente, Gebert et al. (1999) verificaram que o fator fitase foi responsável pela diminuição dos valores de pH inicial das carcaças, mas ainda assim, dentro da faixa desejável de pH inicial, que é em torno de 6,0.

Tabela 3. Médias e (desvios-padrão) do pH inicial, pH final, luminosidade (L^*), marmoreio (Marm), perda de líquido por gotejamento (PLG), perda de líquido no descongelamento (PLD) e perda de líquido no cozimento (PLC) do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	Parâmetros						
	pH inicial	pH final	L^*	Marm	PLG (%)	PLD (%)	PLC (%)
Sem FGMD	6,1 (0,5)	5,6 (0,3)	55,6 (2,6)	1,6 (0,2)	7,1 (3,4)	7,0 (2,2)	40,2 (3,0)
Com FGMD	6,4 (0,5)	5,7 (0,2)	55,1 (3,5)	1,6 (0,3)	7,1 (3,2)	7,0 (2,4)	39,2 (3,3)
Sem fitase	6,4 (0,6)	5,6 (0,2)	55,0 (2,6)	1,6 (0,2)	7,6 (4,0)	6,8 (2,2)	40,5 (3,6)
Com fitase	6,2 (0,4)	5,7 (0,3)	55,7 (3,5)	1,7 (0,2)	6,6 (2,3)	6,8 (2,4)	39,0 (2,5)
Machos castrados	6,2 (0,5)	5,7 (0,3)	56,4 (3,2) a	1,7 (0,3)	7,4 (3,2)	6,8 (2,6)	39,7 (3,3)
Fêmeas	6,3 (0,5)	5,6 (0,2)	54,2 (2,4) b	1,6 (0,2)	6,8 (3,4)	6,9 (1,9)	39,8 (3,1)
C.V. (%)	7,1	4,4	5,7	13,2	39,3	33,2	7,9

^{a,b} letras distintas nas colunas, para cada fator, indicam diferença ($P<0,05$)

Os resultados do presente estudo identificam-se com os obtidos por Shelton et al. (2004), que também não observaram efeitos negativos da adição da fitase em dietas para suínos sobre as características de cor, marmoreio e perda de líquido por gotejamento.

Para o fator gênero, observou-se diferença ($P<0,05$) de luminosidade (L^*) entre as carnes dos machos castrados e as das fêmeas. Machos castrados apresentaram maiores valores de L^* em relação às fêmeas, o que representa carnes mais claras. Estudos demonstram que o gênero pode influenciar a composição das fibras musculares. De acordo com Savastano (2000), em uma mesma espécie animal, nos machos predominam fibras brancas (glicolíticas) e nas fêmeas fibras vermelhas (oxidativas), o que pode também implicar em diferenças de cor no músculo das categorias sexuais

distintas. Lefaucheur & Gerrard (1998) constataram que, em bovinos, a castração aumenta consideravelmente a proporção das fibras glicolíticas em relação às fibras intermediárias (oxidativas-glicolíticas).

Segundo Ryu & Kim (2005), existe uma correlação moderada ($r = 0,33$) entre as características de luminosidade e porcentagem de fibras glicolíticas. O músculo *Longissimus dorsi* possui em sua maior proporção fibras do tipo glicolíticas. Essas fibras têm como propriedade número inferior de capilares, baixo número de mitocôndrias e baixa quantidade de mioglobina, o que confere ao músculo uma coloração mais clara. Possivelmente, a diferença de luminosidade entre as carnes possa ter sido em razão da maior proporção de fibras glicolíticas a favor dos machos castrados, que em razão de suas características metabólicas, resultam em carnes mais claras, com maior dispersão de luz.

A análise estatística indicou interação entre FGMD e gêneros e entre fitase e gêneros para a característica componente de cor vermelho-verde (a^*) (Tabela 4).

Tabela 4. Interação entre os fatores farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD) e gêneros e fitase e gêneros para o componente de cor vermelho-verde (a^*) do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos

a^*	Sem FGMD	Com FGMD	Sem fitase	Com fitase	C.V. (%)
Machos castrados	3,41 (2,03) aA	3,87 (2,21) aA	4,74 (1,63) aA	2,54 (1,93) bA	35,6
Fêmeas	4,45 (2,29) aA	2,85 (0,67) bA	2,86 (1,20) bB	4,44 (2,07) aA	36,6

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas e letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença no teste de Tukey ($P < 0,05$)

De acordo com Pinheiro et al. (2009), a cor da carne é influenciada pela luminosidade (L^*) e intensidade do vermelho (a^*), enquanto a intensidade do amarelo (b^*) é mais significativa na cor da gordura. A cor da carne reflete a quantidade e o estado químico de seu principal elemento, a mioglobina.

Em relação ao fator FGMD, foi observada diferença ($P < 0,05$) apenas entre fêmeas, sendo que as que receberam dietas com FGMD provavelmente sofreram influência do ácido fítico como antioxidante endógeno, prevenindo a oxidação do ferro, e conseqüentemente, preservando a cor da carne. Já as fêmeas que receberam dietas sem FGMD apresentaram maiores valores do componente vermelho-verde na carne, ou seja, maior teor de vermelho, devido possivelmente a uma maior oxidação do ferro da mioglobina na carne.

Em relação ao fator fitase, quando se compara apenas os machos castrados entre si, a presença da enzima diminuiu o valor do componente a^* . Sabe-se que a enzima fitase tem a propriedade de disponibilizar os minerais, e nesse caso, o ferro é o metal de interesse, pois seu estado químico irá influenciar a cor da carne. Com a presença da fitase, espera-se um aumento nos valores do componente vermelho-verde, uma vez que as chances de auto-oxidação da mioglobina são maiores. Esse resultado foi observado apenas comparando-se as fêmeas entre si, de tal forma que, as que receberam fitase na dieta, apresentaram maiores valores de a^* . Um efeito contrário foi observado quando comparamos machos entre si, porém, esse resultado não era o esperado. Na diferença observada entre os gêneros, nota-se que na ausência da fitase ocorreu uma diminuição da média do componente vermelho-verde para as fêmeas. No entanto, pode-se atribuir essa alteração ao fator gênero, uma vez que não eram esperadas alterações significativas na cor da carne na ausência da enzima fitase.

Houve interação entre fitase e gêneros para as características componente amarelo-azul (b^*), índice de saturação e ângulo de tonalidade (Tabela 5).

Tabela 5. Interação entre fitase e gêneros para o componente amarelo-azul (b^*), índice de saturação (c^*) e ângulo de tonalidade (h^*) do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	Sem fitase	Com fitase	C.V. (%)
b^*			
Machos castrados	10,05 (2,03) aA	9,36 (1,91) aA	16,7
Fêmeas	8,41 (1,28) bB	9,84 (1,92) aA	12,7
Saturação			
Machos castrados	11,16 (2,38) aA	9,78 (2,34) aA	18,4
Fêmeas	8,92 (1,55) bB	10,86 (2,49) aA	14,7
Tonalidade			
Machos castrados	65,22 (5,91) bB	76,17 (8,04) aA	6,6
Fêmeas	71,64 (5,21) aA	66,80 (7,14) aB	8,4

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas e letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença no teste de Tukey ($P < 0,05$)

A variação de b^* observada entre machos castrados e fêmeas, na ausência da enzima fitase, possivelmente é decorrente da proporção de fibras glicolíticas presente na carne dos machos castrados, o que pode ter elevado os valores de L^* e de b^* . De acordo com Barbosa et al. (2006), as características de luminosidade (L^*) e componente amarelo-azul (b^*) apresentam uma correlação alta ($r=0,70$). Comparando-se fêmeas entre si, observa-se que na presença da fitase, as carnes das fêmeas apresentaram maiores valores de amarelo-azul.

Segundo Ferreira (1991), saturação é a “força da cor”, que pode ser utilizada na distinção de uma cor fraca e de uma cor forte, ou seja, intensidade de um tom distinto ou a intensidade da cor. Seu cálculo depende dos valores de a^* e b^* . Assim, quando se comparou machos castrados e fêmeas na ausência de fitase, observou-se maior saturação para a carne dos machos, provavelmente devido aos maiores valores também de a^* e de b^* desse gênero. Quando se comparou fêmeas entre si, a maior saturação aparece na carne dos animais que receberam fitase na dieta. Nesse caso, a maior saturação pode ser explicada pela possível auto-oxidação da mioglobina, confirmada pelos maiores valores de a^* , o que levou a carnes mais vermelhas.

A tonalidade é o atributo pelo qual se identificam as cores (violeta, azul, amarelo, laranja, vermelho e púrpura). É a percepção da absorção da energia radiante em vários comprimentos de onda (Bridi & Silva, 2007).

Em relação ao ângulo de tonalidade, observa-se que os machos castrados demonstraram maior média de ângulo de tonalidade na presença de fitase. Isso indica carnes mais vermelhas. Novamente, a auto-oxidação do ferro da mioglobina, desencadeada pela liberação de minerais, pode ter levado ao aumento da tonalidade da carne para mais escura. Na ausência de fitase, as fêmeas apresentaram maior ângulo de tonalidade em relação aos machos.

Foi observada interação entre os fatores fitase e gênero para o parâmetro maciez (Tabela 6).

Tabela 6. Interação entre fitase e gêneros para maciez do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Maciez (kgf.)	Sem fitase	Com fitase	C.V. (%)
Machos castrados	4,57 (0,86) aA	3,52 (0,72) bB	18,8
Fêmeas	5,11 (1,51) aA	5,48 (1,41) aA	16,1

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas e letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença no teste de Tukey ($P < 0,05$)

Analisando a interação, conclui-se que para os machos castrados, a presença de fitase promoveu uma maior maciez na carne em relação aos tratamentos sem a enzima, constatado pelos menores valores de força de cisalhamento. Entre gêneros, a presença de fitase foi responsável por um aumento da maciez na carne dos machos castrados. Gebert et al. (1999) concluíram que a inclusão da fitase microbiana na dieta dos animais afetou significativamente ($P < 0,05$) a maciez da carne. Ao suplementar a ração com fitase aumenta-se a disponibilidade de minerais, entre eles, o cálcio, um agente que sob maior concentração promove a ativação da m-calpaína, uma enzima proteolítica que atua na resolução do *rigor mortis* melhorando a maciez da carne (Pedreira et al., 2003).

Quanto à ausência de diferença para as fêmeas alimentadas com rações contendo fitase, devem ser levados em consideração fatores fisiológicos relacionados ao sexo.

Os valores de composição química do lombo encontram-se de acordo com os citados pela literatura, com exceção dos valores de extrato etéreo (Tabela 7). A análise estatística indica que não houve interação entre os fatores.

Tabela 7. Médias e (desvios-padrão) da umidade, cinzas, extrato etéreo, proteína e oxidação (TBARS) do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	Parâmetros				
	Umidade (%)	Cinzas (%)	Extrato etéreo (%)	Proteínas (%)	TBARS (mg/kg)
Sem FGMD	74,65 (0,98)	1,08 (0,62)	0,53 (0,36)	23,84 (1,82)	0,21 (0,73) a
Com FGMD	74,87 (1,10)	1,08 (0,81)	0,42 (0,30)	23,42 (1,56)	0,16 (0,34) b
Sem Fitase	75,12 (0,87)	1,09 (0,75)	0,39 (0,32) b	23,56 (1,59)	0,18 (0,50)
Com Fitase	74,39 (1,07)	1,06 (0,58)	0,56 (0,33) a	23,70 (1,81)	0,19 (0,72)
M. castrados	74,45 (0,98)	1,10 (0,88)	0,50 (0,37)	23,40 (1,41)	0,17 (0,59) b
Fêmeas	75,07 (1,00)	1,07 (0,47)	0,45 (0,30)	23,85 (1,93)	0,20 (0,61) a
C.V. (%)	0,7	6,3	46,1	7,0	24,1

^{a,b} letras distintas nas colunas, para cada fator, indicam diferença ($P < 0,05$)

De acordo com Roça (2000), a composição geral da carne magra de suínos consiste em 75% de água, 21-22% de proteína, 1-2% de gordura, 1% de mineral e menos de 1% de carboidratos. Os baixos valores de extrato etéreo encontrados na análise podem ser devido à utilização da porção central do bife de lombo para realização da análise, descartando-se assim, a capa de gordura que envolvia o músculo.

Analisando-se o fator FGMD, observa-se diferença ($P < 0,05$) apenas para o parâmetro de oxidação, medida pelo método Indicativo de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). As carnes dos animais que receberam dietas com FGMD apresentaram menores valores de oxidação, apesar das rações com FGMD apresentarem maior quantidade de óleo de soja em comparação às dietas sem inclusão do FGMD, fato que sugere a ação de um fator antioxidante contido no FGMD. Pode-se sugerir que o ácido fítico, devido à sua capacidade quelante principalmente com

minerais, interagiu especificamente com o ferro e inibiu sua capacidade de formar os radicais hidroxil, inibindo assim, a peroxidação lipídica (Graf & Eaton, 1990). Por essa propriedade, o ácido fítico é indicado como um antioxidante ideal para a carne suína, já que esta possui elevado teor de ferro, um mineral catalisador da oxidação.

Harbach et al. (2007), ao trabalharem com a inclusão de 40% de gérmen de milho desengordurado para suínos em fase de terminação, também obtiveram melhora significativa na redução da oxidação da carne.

Em relação ao fator fitase, os lombos dos animais que receberam dietas com a enzima, apresentaram maior porcentagem de extrato etéreo. Sabe-se que a enzima fitase hidrolisa complexos formados pelo fitato, liberando minerais, aminoácidos, proteínas, amido e lipídios. No trato digestório, os minerais complexados com o ácido fítico formam juntamente com os lipídios, reações de saponificação, prejudicando dessa forma, a utilização de lipídios. A enzima fitase, nesse caso, age liberando o complexo fitato mineral e impedindo a formação de sabões metálicos, o que acaba disponibilizando os lipídios e minerais para o uso do animal (Ravindran et al., 2001). O lipídio que não for utilizado pelo animal como fonte de energia, poderá ser depositado pelo mesmo nos tecidos.

Dessa forma, pode-se sugerir que os maiores valores de extrato etéreo encontrados nas carnes dos animais que receberam a enzima fitase foram devido à liberação de lipídios dos complexos formados com metais e fitato, que não utilizados como fonte de energia, acabaram se depositando nos tecidos dos animais, no caso o tecido muscular.

A fitase não influenciou a estabilidade lipídica da carne, contrariando Gebert et al. (1999) que constataram maior oxidação lipídica na carne dos animais que receberam

reações com fitase, indicando que esta, ao aumentar a disponibilidade dos minerais, provavelmente catalisou reações de oxidação lipídica, com liberação do radical hidroxil.

Quanto ao fator gênero, observou-se menor oxidação lipídica a favor dos machos. Provavelmente essa diferença possa ser devido às diferenças entre as fibras musculares entre machos e fêmeas. Como dito anteriormente, nos machos predominam as fibras brancas (glicolíticas), que apresentam menor teor de lipídios. Nas fêmeas predominam as fibras vermelhas (oxidativas), que contém alto teor lipídico. Esse fato pode ser a explicação para os maiores valores de oxidação encontrados na carne das fêmeas.

A análise da composição de ácidos graxos no lombo dos suínos demonstra que não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para os fatores analisados (Tabela 8).

Tabela 8. Composição de ácidos graxos (g/100g) da carne de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Ác. Graxos (g/100g)	Sem FGMD	Com FGMD	Sem Fitase	Com Fitase	Machos castrados	Fêmeas	C.V. (%)
AGS							
14	0,033	0,021	0,030	0,024	0,025	0,029	73,3
16	0,564	0,570	0,524	0,611	0,616	0,518	30,2
17	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007	0,005	57,3
18	0,282	0,321	0,273	0,330	0,321	0,281	25,5
20	0,007	0,009	0,009	0,007	0,009	0,007	76,1
21	0,006	0,009	0,006	0,009	0,007	0,008	37,4
22	0,026	0,017	0,020	0,024	0,017	0,026	92,3
24	0,006	0,012	0,005	0,013	0,010	0,008	107,6
AGMI							
16:1n-5	0,007	0,004	0,005	0,006	0,004	0,007	100,3
16:1n-7	0,057	0,056	0,054	0,059	0,066	0,046	52,8
17:1n-10	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,004	51,8
18:1n-9t	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004	0,002	55,5
18:1n-9c	1,001	1,011	0,905	1,107	1,046	0,966	31,1
18:1n-7	0,092	0,088	0,081	0,099	0,092	0,088	29,4
20:1n-9	0,024	0,006	0,024	0,006	0,003	0,027	276,3
AGPI							
18:2n-ct	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	59,8
18:2n-tc	0,009	0,011	0,001	0,001	0,001	0,001	66,0
18:2n-6	0,165	0,199	0,174	0,190	0,204	0,159	28,4
18:3n-6	0,006	0,004	0,005	0,006	0,003	0,008	145,5
18:3n-cct	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002	81,6
18:3n-ttc	0,003	0,003	0,000	0,003	0,002	0,005	174,1
18:3n-3	0,020	0,019	0,013	0,026	0,018	0,021	52,05
AGS	0,920	0,962	0,864	1,017	1,010	0,871	26,6
AGMI	1,166	1,171	1,283	1,054	1,220	1,118	31,1
AGPI	0,201	0,234	0,202	0,233	0,235	0,200	29,0
ω -3	0,026	0,026	0,020	0,032	0,023	0,028	57,0
ω -6	0,175	0,208	0,182	0,201	0,211	0,172	28,0
Trans	0,014	0,013	0,013	0,014	0,012	0,015	54,7
AGPI/AGPS	0,226	0,240	0,231	0,235	0,232	0,234	21,3
ω -6/ ω -3	8,356	9,266	9,801	7,821	10,079	7,543	46,3
Lipídios	2,205	2,211	1,957	2,459	2,441	1,975	26,9

AGS = ácidos graxos saturados, AGMI = ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = ácidos graxos poliinsaturados; ω -6 = ácido graxo ômega-6; ω -3 = ácido graxo ômega-3

Entre os ácidos graxos saturados (AGS), o ácido palmítico (16:0), considerado como hipercolesterolêmico apresentou a maior concentração (24,79%) em todas as dietas. O ácido esteárico (18:0), que não exerce influência nos níveis sanguíneos de colesterol (Yu et al., 1995), apresentou a segunda maior concentração (13,16%). O ácido oléico (18:1 *n*-9t), um ácido graxo monoinsaturado (AGM), reconhecido por seu efeito hipocolesterolêmico (Fernandes et al., 2009), foi o que apresentou a maior

concentração entre todos os ácidos graxos determinados (43,99%). Em relação aos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), o ácido linoléico (18:2 *n*-6) apresentou a maior concentração (7,96%).

Não houve diferença ($P>0,05$) no percentual do somatório de AGS (40%), AGMI (51%) e AGPI (9%), entre os tratamentos. Esses valores estão de acordo com os estabelecidos pela literatura. A gordura da carne suína, no presente trabalho, atende às normas quantitativas exigidas pela American Heart Association e também as características qualitativas. Ela contém menos gordura saturada (38%), e mais gordura monoinsaturada (52%) e poliinsaturada (10%) (Roppa, 1999).

A razão de AGPI/AGS encontrada no presente trabalho foi de 0,58, ou seja, ligeiramente superior ao valor mínimo recomendado de 0,45 pelo British Department of Health (1994) para a dieta total. A razão ω -6/ ω -3 encontrada nesse trabalho foi em média de 8,81. De acordo com a World Health Organization (Martin et al., 2006), os valores recomendados para a razão entre os ácido graxos ω -6 e ω -3 para a dieta de humanos devem ficar entre 5:1 e 10:1.

Houve interação entre os fatores FGMD e fitase para os parâmetros ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e ω -6 (ω -6) (Tabela 9).

Tabela 9. Interação entre farelo de gérmen de milho desengordurado (FGMD) e fitase para ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e ω -6 (ω -6) do lombo de suínos submetidos a diferentes tratamentos

AGPI	Sem Fitase	Com Fitase	C.V. (%)
Sem FGMD	0,151 (0,03) bB	0,250 (0,07) aA	27,0
Com FGMD	0,252 (0,08) aA	0,215 (0,05) aA	26,8
ω -6			
Sem FGMD	0,135 (0,03) bB	0,214 (0,05) aA	26,7
Com FGMD	0,228 (0,06) aA	0,186 (0,05) aA	27,5

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas e letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença no teste de Tukey ($P<0,05$)

Dietas sem fitase e com FGMD determinaram uma maior concentração de AGPI e ômega-6 ($P < 0,05$) na carne dos animais em relação às dietas sem FGMD e sem fitase. Esse resultado pode ser devido à maior proporção de óleo nas rações com FGMD. As rações que continham FGMD apresentaram em média 3,26% de óleo de soja, contra 1,20% das rações sem o FGMD. O óleo de soja é composto em sua maioria (54,5%) pelo ácido linoléico (ω -6) (Vieira et al., 2005). Os monogástricos, como as aves e suínos, tendem a depositar uma composição de ácidos graxos parecida com a recebida via dieta. Assim, como os animais receberam uma fonte de alimento com maiores quantidades de ácidos graxos insaturados, a tendência foi depositar mais AGI no seu tecido adiposo.

Observou-se também que na presença de fitase e sem FGMD houve aumento do AGPI e ômega-6 na carne em relação às dietas sem FGMD e sem fitase, provavelmente também pela liberação dos complexos fitato-mineral-lipídios, sendo que os lipídios não utilizados pelos animais como fonte de energia acabaram se depositando nos tecidos.

A análise sensorial foi realizada com o objetivo de se detectar possíveis alterações provocadas pelas reações de oxidação lipídica, como por exemplo, rancidez da gordura da carne, influenciadas principalmente pela adição da fitase, o que poderia ocasionar a alteração no sabor da carne. Não houve diferença entre os tratamentos para a característica sabor. A diferença crítica entre os totais de ordenação ao nível de 5% de significância, de acordo com a Tabela de Newel e Mac Farlane (Dutcosky, 1996), deveria ser de no mínimo 30 pontos entre os tratamentos, porém, a pontuação máxima obtida pela apreciação dos provadores foi de 17 pontos.

Para o produto derivado da carne suína, a linguiça tipo frescal, os resultados referentes à composição química estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10. Médias e (desvios-padrão) da umidade, cinzas e extrato etéreo da linguiça fresca elaborada com carne de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fator	Umidade (%)	Cinzas (%)	Extrato Etéreo (%)
Sem FGMD	70,95 (1,73)	3,20 (0,40)	1,72 (0,74)
Com FGMD	71,47 (1,42)	3,17 (0,17)	1,65 (0,90)
Sem Fitase	71,44 (1,24)	3,13 (0,40)	1,54 (0,69)
Com fitase	70,99 (1,87)	3,23 (0,15)	1,82 (0,92)
Machos castrados	70,61 (1,67) b	3,15 (0,39)	1,99 (0,77) a
Fêmeas	71,81 (1,27) a	3,22 (0,20)	1,38 (0,79) b
C.V.(%)	1,6	9,5	44,5

^{a,b} letras distintas nas colunas, para cada fator, indicam diferença ($P < 0,05$)

As diferenças para a composição química da linguiça limitaram-se ao fator gênero. As linguiças provenientes da carne dos machos castrados apresentaram menores ($P < 0,05$) valores de umidade e maiores ($P < 0,05$) teores de extrato etéreo em relação às fêmeas. Lawrie (2005) reportou uma relação inversa entre os teores de umidade e gordura na carne, o que pode afetar diretamente as características sensoriais dos produtos cárneos em geral.

A maior concentração de extrato etéreo na linguiça em comparação ao lombo é provavelmente devido à capa de gordura que envolvia os lombos. Para análise de extrato etéreo do lombo, utilizou-se somente a parte central do bife. Já para a confecção da linguiça, o lombo foi utilizado integralmente, inclusive a pequena capa de gordura que o envolvia, uma vez que a receita de linguiça fresca não continha gordura, que é um ingrediente indispensável para a emulsificação da massa durante o processo de fabricação da linguiça.

Costa (2009), analisando os efeitos de 50% de inclusão de FGMD sobre uma linguiça fresca em diferentes períodos de armazenamento (0, 7, 14 e 21 dias) não observou diferença entre os tratamentos para as mesmas variáveis analisadas.

O pH da linguiça, além de exercer influência direta sobre sua conservação, está diretamente relacionado à sua coloração e sabor. O pH deve ser suficientemente ácido para facilitar a ação do óxido de nitrogênio com a mioglobina, que produzirá a

coloração rósea típica da linguiça (Milani et al., 2003). As linguiças dos animais que não receberam FGMD na ração apresentaram menores valores de pH ($P < 0,05$), quando comparadas às linguiças dos animais que receberam o FGMD, porém, esses valores encontram-se dentro da normalidade (Tabela 11).

Tabela 11. Médias e (desvios-padrão) do pH, luminosidade (L^*), componente de cor vermelho-verde (a^*), componente amarelo-azul (b^*) e oxidação lipídica (TBARS) da linguiça frescal elaborada com carne de suínos submetidos a diferentes tratamentos

Fatores	pH	L	a^*	b^*	TBARS
Sem FGMD	5,51 (0,34) b	52,60 (3,77)	3,31 (1,44)	14,58 (1,74)	1,68 (0,32) a
Com FGMD	5,55 (0,73) a	51,60 (3,85)	3,22 (1,18)	14,49 (1,41)	1,47 (0,31) b
Sem Fitase	5,53 (0,55)	50,90 (3,32) b	3,16 (1,33)	14,29 (1,75)	1,61 (0,36)
Com fitase	5,53 (0,66)	53,30 (3,93) a	3,37 (1,30)	14,78 (1,36)	1,53 (0,29)
M. castrados	5,54 (0,69)	54,05 (3,36) a	3,42 (1,26)	15,04 (1,36) a	1,62 (0,30)
Fêmeas	5,52 (0,49)	50,14 (3,19) b	3,11 (1,35)	14,04 (1,63) b	1,53 (0,35)
C.V.(%)	0,9	5,7	41,5	9,1	19,4

^{a,b} letras distintas nas colunas, para cada fator, indicam diferença ($P < 0,05$)

Analisando-se os resultados referentes à oxidação, observou-se que as linguiças com presença de FGMD apresentaram menor oxidação ($P < 0,05$), o que sugere um fator antioxidante presente na dieta e seu efeito sobre a estabilidade lipídica da linguiça.

Animais que receberam fitase na ração apresentaram maiores valores ($P < 0,05$) de luminosidade. O mesmo efeito da enzima sobre a luminosidade da carne foi observado por Gebert et al. (1999), porém esperava-se que com a utilização da fitase, a luminosidade diminuísse, uma vez que a enzima fitase ao aumentar a disponibilidade de minerais, como o ferro, pode iniciar reações de oxidação pela autooxidação da mioglobina ou pela formação do radical hidroxil, alterando a cor da carne para mais escura.

Linguiças provenientes dos lombos de machos castrados apresentaram maior luminosidade e maior valor do componente amarelo-azul. A explicação para esse resultado é a mesma para as variações de L^* e b^* do lombo, uma vez que amostras de lombo dos mesmos animais foram utilizadas para a confecção da linguiça frescal.

Conclusões

A utilização de farelo de gérmen de milho desengordurado e da fitase na ração de suínos em terminação não causou prejuízos nas características de qualidade da carne e da linguiça. A inclusão do FGMD nas dietas melhorou a estabilidade lipídica da carne e da linguiça frescal, agindo como um antioxidante endógeno. A participação da fitase na dieta não exerceu influência sobre a oxidação lipídica.

Literatura Citada

- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Washington, A.O.A.C., ed. 14, 141p.,1984.
- ARAÚJO, J.M.A. Oxidação de lipídios em alimentos. In: **Química de alimentos**. 3.ed.Viçosa:UFV, 2004. p.1-67.
- BARBOSA, L.; LOPES, P.S.; REGAZZI, A.J. et al. Avaliação de características de qualidade da carne de suínos por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n. 4, p.1635-1645, 2006.
- BLIGH, E.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry**, v.37, p.911-917, 1959.
- BOCCARD, R. et al. Proceedings for measuring meat quality characteristics in beef production experimentals. Report of working group in the Commission of the European Communitis (CEC). **Beef Production Program**, 1981.
- BOUTON, P.E. et al. Effect of ultimate pH upon the water-holding capacity and tenderness of mutton. **Journal of Food Science**, v.36, p.435-439, 1971.
- BRAGAGNOLO, N.; AMAYA, D.B.R. Teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em cortes de carne suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, p.98-104, 2002.
- BRIDI, A.M.; SILVA, C.A. **Métodos de avaliação da carcaça e da carne suína**. Londrina: Midiograf, 2007. 97p.
- BRITHISH DEPARTMENT OF HEALTH. 1994. **Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease**. Report on Health and Social Subjects n° 46. London.
- CASSENS, R.G. Historical and current aspects of pork meat quality in the USA. **Food Chemistry**, v.69, p.357-363, 2002.
- CHEN, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v.28, p.1756-1758, 1956.
- COSTA, M.C.R. **Farelo de gérmen de milho desengordurado: ingrediente na dieta de suínos e fonte de antioxidante endógeno na carne**. 2009. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- CRACKEL, R. L. et al. Some further observations on the TBA test as an index of lipid oxidation in meats. **Food Chemistry**, v.28, p.187-196, 1988.
- DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial dos alimentos**. 2.ed. Curitiba: Universitária Champagnat, 1996. 123p.
- EMATER. Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Processamento artesanal da carne suína**, Série Produtor, Curitiba, 1992.

- FERNANDES, A.R.M.; SAMPAIO, A.A.M.; HENRIQUE, W. et al. Composição em ácidos graxos e qualidade da carne de tourinhos Nelore e Canchim alimentados com dietas à base de cana-de-açúcar e dois níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.328-337, p. 2009.
- FERREIRA, V. L. P. **Colorimetria em alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1991. 43p.
- FIREMAN, F.A.T; FIREMAN, A.K.B.A.T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, v.28, n.1, p.173-178, 1998.
- GEBERT, S.; BEE, G.; PFIRTER, H.P. et al. Phytase and vitamin E in the feed of growing pigs: 2. influence on carcass characteristics, meat and fat quality. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, n.81, p. 20-30, 1999.
- GHIRETTI, E.Z.; ZANARDI, E.; NOVELLI, G. et al. Comparative evaluation of some antioxidants in salame milano and mortadella production. **Meat Science**, v. 47, n.1/2, p.167-176, 1997.
- GRAF, E.; EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, n.1, p.61-69, 1990.
- HARBACH, A. P.; COSTA, M. C. R.; SOARES, A. L. et al. Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**, n.100, p.1630-1633, 2007.
- HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, n.8, p.175-176, 1973.
- LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384p.
- LEE, B.J.; HENDRICKS, D.G. Phytic acid protective effect against beef round muscle lipid peroxidation. **Journal of Food Science**, v.60, n.2, p.241-244, 1995.
- LEFAUCHEUR, L.; GERRARD, D. Muscle fiber plasticity in farm mammals. IN: AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 1998. **Proceedings...**Denver, Colorado, 1998.
- MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R. Ácidos graxos poliinsaturados ômega -3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.6, p.761-770, 2006.
- MELLO JÚNIOR, A.S. Considerações importantes durante o processamento de carcaças suínas. **Revista Nacional da Carne**, n.328, p.82-85, abr. 2004.
- MILANI, L.I.G; FRIES, L.L.M.; PAZ, P.B. et al. Bioproteção de linguiça de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, 2003.
- MORRISSEY, P.A.; SHEEHY, P.J.A.; GALVIN, K. et al. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v.49, n.1, p.73-86, 1998.

- NATIONAL PORK PRODUCERS COUNCIL. **Procedures to evaluated market**. 3.ed. Des Moines, Iowa, 1991.
- NUTRIENT REQUERIMENT OF SWINE - **NRC**. 10. ed. Washington: National Academic of Sciences, 1998.
- PEDREIRA, A.C.M.S.; LUCHIARI FILHO, A.; LEITE, V.B. et al. Quality characteristics of *Longissimus dorsi* muscle from *Bos indicus* animals treated with vitamin D3. **Scientia Agricola**, v.60, n.4, p.637-642, 2003.
- PINHEIRO, R.S.B.; SILVA SOBRINHO, A.G.; SOUZA, H.B.A. et al. Qualidade de carnes provenientes de cortes da carcaça de cordeiros e de ovinos adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.9, p.1790-1796, 2009.
- RAVINDRAN, V.; SELLE, P.H.; RAVINDRAN, G. et al. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. **Poultry Science**, v.80, n.3, p.338-344, 2001.
- ROÇA, R.O. **Tecnologia da carne e produtos derivados**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, 2000. 202p.
- RYU, Y.C; KIM, B.C. The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate and meat quality of pig *longissimus dorsi* muscle. **Meat Science**, v.71, p.351-357, 2005.
- ROPPA, L. Atualização sobre os níveis de Colesterol, Gordura e Calorias da Carne. **SuiNews**, (Boletim Técnico), n. 6, maio, 8p. 1999.
- SAVASTANO, S. **Efeito da castração sobre o desempenho e características de carcaça e de carne do bovino superprecoce**. 2000. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2000.
- SHELTON, J.L.; SOUTHERN, L.L.; GASTON, L.A. et al. Evaluation of nutrient matrix values for phytase in broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, p.213–221, 2004.
- SOUZA, V.L.F. **A influência de dietas suplementadas com vitamina E desde o crescimento e terminação do suíno até o presunto cozido no seu período de validade: índices zootécnicos, estabilidade oxidativa, perfil de ácidos graxos, colesterol e óxidos de colesterol**. 2001. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.
- TARLADGIS, B. G.; PEARSON, A.M.; DUGAN JR., L.R. Chemistry of the 2-thiobarbituric test for determination of oxidative rancidity in foods II. Formation of the TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.5, p.602-604, 1964.
- THOMPSON, D.B.; ERDMAN, J.W. Phytic acid determination in soybeans. **Journal of Food Science**, v.47, n.2, p.513-517, 1982.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA-UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 7.1. Viçosa, MG, 1997. 150p.

VIEIRA, F.C.V.; PIERRE, C.T.; CASTRO, H.F. Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 2005, Campinas. **Anais...**Campinas: COBEQ, 2005.

YU, S.; DERR, J.; ETHELTON, T.D. et al. Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monosaturated fatty acids are hypocholesterolemic. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p.1129-1139, 1995.

**ARTIGO 3. AÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO E DO DEOXINIVALENOL (DON)
SOBRE A INTEGRIDADE DA MEMBRANA DE CÉLULAS EPITELIAIS
INTESTINAIS DE SUÍNOS DA LINHAGEM IPEC-1**

Artigo editado de acordo com as normas de publicação da *Revista Brasileira de Zootecnia*

Ação do ácido fítico e do deoxinivalenol (DON) sobre a integridade da membrana de células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1 de suínos

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do ácido fítico como um inibidor das alterações celulares induzidas por substâncias tóxicas, como as micotoxinas, sobre a linhagem de células epiteliais intestinais de suínos (IPEC-1). A micotoxina escolhida para o estudo foi o deoxinivalenol (DON), produzida pelos fungos do gênero *Fusarium*. Para avaliar os efeitos do ácido fítico e do DON sobre as células IPEC-1, foram realizados os testes de viabilidade celular e a medida da resistência elétrica transepitelial (TEER). Para o teste de viabilidade celular foram empregadas as concentrações 0; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mM de ácido fítico. Foram utilizadas, em média, 5000 células/poço. As células foram incubadas a 37°C por 48h em placas de cultura celular. Adicionou-se uma mistura de MTS-PMS nas células para avaliar a quantidade de formazan resultante da redução celular do MTS. A leitura da reação foi realizada por meio de espectrofotômetro. A análise dos dados revelou que o ácido fítico diminuiu o número de células nos poços de maneira dose dependente, e que um efeito negativo sobre as células foi observado com a concentração de 5 mM de ácido fítico. Para o teste de resistência elétrica transepitelial, utilizou-se as concentrações de 0; 0,5; 1,0 e 5,0 mM de ácido fítico e 25 µM de DON. As células foram pré-tratadas com ácido fítico e posteriormente desafiadas com o DON. Foram realizadas medidas da TEER às 0h, 24h e 48h, após a incubação das células, por meio do Volt-ohmímetro Millicell-ERS. Os resultados indicam que o ácido fítico, em cultivo celular, diminuiu os efeitos negativos da micotoxina deoxinivalenol sobre a integridade da membrana das células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1.

Palavras-chave: Cultivo celular. Inositol hexakisfosfato. IP₆. Micotoxina.

Action of phytic acid and deoxynivalenol (DON) on the line of intestinal epithelial cells of pigs IPEC-1

ABSTRACT: The objective of this study was evaluate the effects of phytic acid (IP₆) as a possible inhibitor of cellular changes induced by toxic substances such as mycotoxins, on the line of intestinal epithelial cells of pigs (IPEC-1). The mycotoxin chosen was the deoxynivalenol (DON), produced by fungi of gender *Fusarium*. To evaluate the effects of phytic acid and DON on the IPEC-1 cells were analyzed the cell viability test and the measurement of transepithelial electrical resistance (TEER). To the cell viability test were measured the concentrations of 0, 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM and 5 mM phytic acid. Were used 5000 cells / well. The cells were incubated at 37°C for 48h in cell culture plates. Were added a mixture of MTS-PMS cells to assess the amount of formazan resulting from cellular reduction of MTS. The reaction was reading by the spectrophotometer. Data analysis showed that phytic acid reduced the number of cells in the wells in a dose-dependent, and a negative effect on the cells was observed at concentrations of 5 mM phytic acid. To the transepithelial electrical resistance test, were used the concentrations of 0.5 mM, 1 mM and 5 mM phytic acid and 25 mM of DON. The cells were pretreated with phytic acid and then challenged with the DON. Measurements were made of TEER at 0, 24 and 48 hours after incubation of the cells through the Volt-ohmmeter Millicell-ERS. The results indicated that phytic acid in cell culture decreased the negative effects of the mycotoxin deoxynivalenol on the membrane integrity of intestinal epithelial cell line IPEC-1.

Key-words: Cell culture. Inositol hexakisfosfato. IP₆. Mycotoxin.

Introdução

O inositol hexafosfato (IP₆, Ins P₆, ácido fítico) é um carboidrato fosforilado naturalmente encontrado em células vegetais e animais (Graf & Eaton, 1993), apresentando um anel de *myo*-inositol com seis grupos fosfatos ligados. Nas células de mamíferos, a molécula está presente em concentrações que variam de 10 µM a 1 mM, além de seus ésteres menores de IP₁₋₅. Nos grãos representa a maior forma de armazenamento de fósforo (Thompson, 1993).

Devido à sua capacidade de quelação, principalmente com minerais, o ácido fítico é considerado um antioxidante *in vivo* por inibir a peroxidação lipídica (Graf et al., 1987). Essa ação está relacionada à sua estrutura única, que agrupa os fosfatos nas posições 1,2,3 (axial-equatorial-axial), interagindo especificamente com o ferro e inibindo sua capacidade de formar os radicais hidroxil, inibindo assim a peroxidação lipídica e fazendo do IP₆ um potente antioxidante (Graf & Eaton, 1990). O radical hidroxil gerado pela interação do ferro com o O₂⁻ causa danos ao DNA das células (Halliwell & Aruoma, 1991).

As micotoxinas, definidas como metabólitos secundários produzidos por fungos, também são responsáveis por causar danos celulares. A micotoxina deoxinivalenol (DON) se destaca pela grande ocorrência mundial e por pertencer à família dos tricotecenos, sendo produzido principalmente pelos fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*. Os principais efeitos tóxicos dos tricotecenos incluem os transtornos gastrointestinais, como vômitos, diarreia e inflamação intestinal, além de anemia, leucopenia, irritação na pele, refugagem de alimentos, redução no crescimento e falhas reprodutivas (Whitlow & Hagler Jr, 2008).

Os suínos estão naturalmente expostos às micotoxinas, uma vez que os cereais constituem a base de sua alimentação. As espécies animais não apresentam o mesmo grau de sensibilidade ao DON. Os suínos aparecem como os mais sensíveis a essa micotoxina, seguido dos roedores, das aves e dos ruminantes. Os efeitos observados estão diretamente ligados à atividade e ao modo como a molécula é metabolizada. Os parâmetros da farmacocinética do DON, tais como absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, diferem entre as espécies e seu conhecimento permite compreender a sensibilidade à toxina e avaliar os riscos ao animal e ao homem (Rotter et al., 1996).

As similaridades anatômicas e fisiológicas entre o homem e o suíno, em particular em relação ao sistema digestório e imunitário, fazem com que o suíno represente um modelo de estudo excelente para o homem (Almond, 1996; Rothkotter et al., 2002).

O epitélio do trato gastrintestinal representa a primeira barreira do organismo contra as moléculas químicas ingeridas e os contaminantes alimentares, como as toxinas e as bactérias. As células epiteliais intestinais formam uma camada contínua unidas entre si por meio de junções celulares que modulam a permeabilidade celular (entre células) e a permeabilidade transcelular (através das células), o que representa o principal componente da barreira intestinal (Soderholm & Perdue, 2001).

No caso de uma intoxicação por via oral, as células do epitélio intestinal formam uma barreira mecânica entre o conteúdo do lúmen intestinal e os tecidos subjacentes.

Além de seu papel de barreira, elas também são conhecidas por participar ativamente da função imunológica regional (Weglarz et al., 2007), secretando uma gama de citocinas envolvidas na resposta inflamatória (Stadnyk, 2002).

Após a ingestão de um alimento contaminado por micotoxinas, as células epiteliais intestinais podem ser expostas a fortes concentrações de toxina (Prelusky et al., 1996). Na espécie suína, 15 minutos após a administração oral, o DON já é

encontrado no soro do animal, o que indica que a absorção da micotoxina é rápida e começa provavelmente no estômago ou na parte superior do duodeno (Eriksen et al., 2003; Danicke et al., 2004). A concentração máxima esperada, segundo estudos, pode ser observada até 1,65 horas após a ingestão do alimento contaminado (Goyarts & Danicke, 2006).

Sabe-se que o DON perturba as funções de membrana (Bunner & Morris, 1988) e altera a comunicação intercelular (Khera et al., 1982). Por um mecanismo chamado “estresse ribotóxico”, o DON se liga à peptidil transferase, que faz parte da subunidade ribossomal 60S e inibe a síntese protéica e ativa as MAPKs (mitogen-activated protein kinase). Esse grupo de proteínas é ativado pelo estresse oxidativo. De fato, os tricotecenos estimulam a peroxidação dos lipídios (Rizzo et al., 1994) e a ativação das MAPK pode ser induzida por compostos como o peróxido de hidrogênio (Wang et al., 1998).

Considerando que o ácido fítico é uma substância abundante em produtos vegetais, inclusive em co-produtos da indústria da extração de óleos e que o deoxinivalenol é uma micotoxina amplamente distribuída e que causa principalmente transtornos gastrointestinais nos suínos, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação do ácido fítico e da micotoxina deoxinivalenol sobre a integridade da membrana das células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Toulouse, França, no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia.

a) Cultura celular

Inicialmente foram realizadas a manutenção e proliferação da linhagem celular IPEC-1 (Intestinal Porcine Epithelial Cells) obtida a partir do epitélio intestinal (jejuno e íleo) de leitões recém-nascidos (Bouhet et al., 2004). O meio de cultura utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle's Medium/HAMF12 (DMEM/HAMF F12 Sigma D8062), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Eurobio); 2 mM de L-glutamina (Eurobio); 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Eurobio); 10 µg/mL de insulina de pâncreas bovino, 5 µg/mL de transferrina e 5 ng/mL de selenito de sódio (ITS - Sigma I3146); 5 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF, Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, France Becton Dickinson).

As células foram mantidas em frascos de cultura celular padrão de 75 cm², a 39°C, numa atmosfera de 5% de CO₂, sendo observadas regularmente em microscópio óptico com o intuito de acompanhar seu aspecto morfológico, seu nível de diferenciação e sua densidade. Assim que a monocamada celular tornava-se confluenta (cerca de sete dias), as células passavam pelo processo de repicagem. Eliminava-se o meio de cultura do frasco de cultura celular, lavava-se a monocamada celular uma primeira vez com uma solução de tripsina/ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (0,5 g/L de tripsina 1/250 e 0,2 g/L de EDTA) (Eurobio) e após, incubava-se novamente as células com um volume suficiente dessa mesma solução até a dissociação das células e seu descolamento do fundo do frasco (em torno de 15 minutos). Em seguida, as células eram centrifugadas (10 minutos, velocidade de 300g e temperatura de 15°C).

Após, as células eram ressuspensas em cerca de 5 mL de meio de cultura completo. Retirava-se 10 µL dessa solução e adicionava-se a 90 µL do corante trypan blue, totalizando 100 µL finais. Em seguida, as células eram contadas em Câmara de Neubauer e semeadas novamente em frascos de cultura celular na razão de $0,5 \times 10^6$ células por frasco de 75 cm². Esse protocolo de manutenção e proliferação da linhagem de células IPEC-1 era realizado semanalmente.

b) Teste de viabilidade celular – teste MTS

O teste de viabilidade celular foi realizado com o objetivo de avaliar se o ácido fítico, nas diferentes concentrações testadas, apresentaria efeito tóxico sobre as células, inibindo a viabilidade das células do epitélio intestinal de suínos da linhagem IPEC-1. Essa avaliação foi possível devido ao uso do método colorimétrico MTS, que determina as células metabolicamente ativas, pela formação do formazan.

Para o teste foi utilizado o kit Test CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Promega. Os reativos utilizados foram o Tetrazolium MTS: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium e o PMS: phénazine methosulfate. O preparo dos reativos consistiu em adicionar 1 mL da solução PMS dentro do frasco de 20 mL de MTS, seguida de sua homogeneização. O MTS é convertido em formazan pelas enzimas desidrogenases das células metabolicamente ativas.

Utilizou-se microplacas de 96 poços para cultura celular (Greiner). Inicialmente o ácido fítico (Phytic acid sodium salt hydrate, Sigma-Aldrich Co.) foi dissolvido em água esterilizada (0,4g/mL) e estocado a -20°C antes da diluição em meio de cultura. As concentrações de ácido fítico escolhidas para o teste foram: 0; 0,5; 1,0, 2,5 e 5,0 mM e uma concentração de 5000 células/poço. Para cada concentração de ácido fítico foram realizadas 7 repetições.

Imediatamente o pH das soluções foi ajustado com NaOH 1N para valores próximos a 7,0. Na sequência as soluções foram esterilizadas por passagem em filtros de membrana de 0,22 μm .

As células foram postas em cultura com 100 μL de solução recém-preparada de ácido fítico/poço. Para o controle utilizou-se células diretamente em meio de cultura. As células foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, adicionou-se 20 μL da mistura de MTS-PMS em cada poço (20 μL da mistura em 100 μL da solução pré-existente). Incubou-se novamente a placa por 4 horas. Após, fez-se a leitura no espectrofotômetro Thermo Scan Elisa TECAN, com absorvância de 492 nm. A coloração, que variava de amarelo a marrom, era proporcional à quantidade de formazan solúvel produzida pela redução celular do MTS.

c) **Medida da resistência elétrica transepitelial (TEER)**

A resistência elétrica transepitelial é considerada um parâmetro indicador da integridade da monocamada de células cultivadas em filtros porosos (Bouhet et al., 2004).

Para a medida da resistência elétrica transepitelial, inicialmente as células IPEC-1 foram repicadas em frascos de cultura celular, como descrito anteriormente, e após cultivadas em placas de 24 poços (Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, France, Falcon 353504) de 0,3 cm^2 de superfície acopladas com filtros porosos de 0,4 μm de diâmetro (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) na concentração de $0,3 \times 10^3$ células/poço. As células foram mantidas em meio de cultura padrão durante três dias, necessários para a formação da monocamada celular confluenta. Após esse período, o meio de proliferação celular foi substituído por um meio de diferenciação celular, dentro do qual, em relação ao meio padrão, o soro fetal bovino foi suprimido e o hormônio dexametasona (Sigma D4902) foi adicionado a uma concentração de 10^{-7} M

com o objetivo de facilitar a aceleração da diferenciação celular. O meio de cultura foi trocado três vezes por semana. As medidas da resistência elétrica transepitelial foram realizadas a partir do sétimo dia de cultura com o Volt-ohmímetro Millicell-ERS (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, França). Os valores da TEER foram expressos em kOhms x cm².

O deoxinivalenol purificado (Sigma) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocado à -20°C antes da diluição no meio de cultura celular.

A concentração de DON escolhida teve como base estudos anteriores realizados por Pinton et al. (2009).

As concentrações de ácido fítico (AF) utilizadas para esse teste foram de 0; 0,5; 1,0 e 5,0 mM, e 25 µM de deoxinivalenol (DON). Foram feitas 10 repetições por tratamento.

No dia zero, a TEER foi medida em todas as placas e em seguida as células foram tratadas com ácido fítico nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mM. Os tratamentos controle e DON permaneceram somente com o meio de diferenciação celular. Em seguida, as células foram incubadas a 39°C por 24 horas.

Após esse período, foi realizada a medida de resistência elétrica transepitelial das células. Em seguida, as células foram tratadas com a micotoxina DON, sendo os tratamentos: A- controle; B- DON (25 µM); C- 0,5 mM AF + DON (25 µM); D- 1mM AF + DON (25 µM); E- 5 mM AF + DON (25 µM). As células foram novamente incubadas por 24 horas e após esse período, foi realizada nova medida da TEER.

d) Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de PLSD de Fisher com nível de significância de 5%, por meio do programa Statview, versão 5.0 (SAS Institute Inc.).

Resultados e Discussão

A análise do teste de viabilidade celular mostra que o ácido fítico reduziu o número de células de maneira dose-dependente. Houve efeito ($P < 0,05$) do ácido fítico sobre a redução da viabilidade celular na concentração de 5 mM (Figura 1). Esse resultado indica que a partir dessa concentração, o ácido fítico começa a afetar a viabilidade celular.

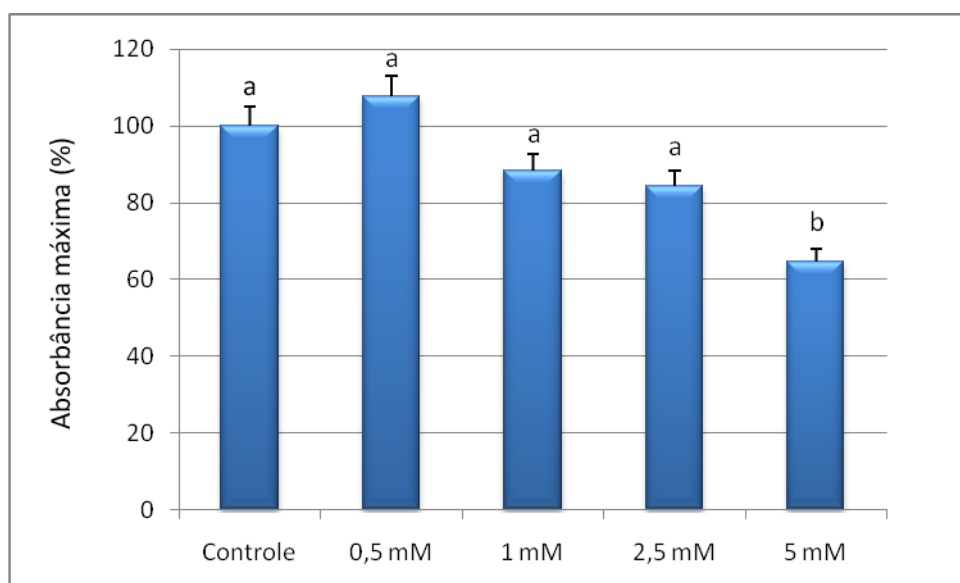


Figura 1 – Efeito do ácido fítico sobre a viabilidade de células epiteliais intestinais de suínos (IPEC-1)

Em relação à análise da resistência elétrica transepitelial (TEER) (Figura 2), observa-se no início do experimento (0h) não havia variação da TEER ($P > 0,05$) entre os tratamentos, indicando que a integridade das membranas celulares permaneceu, estando todas as células aptas para o início do experimento.

Analisando os valores da TEER 24h, observa-se que não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos com 0,5 mM e 1 mM de ácido fítico e o tratamento controle.

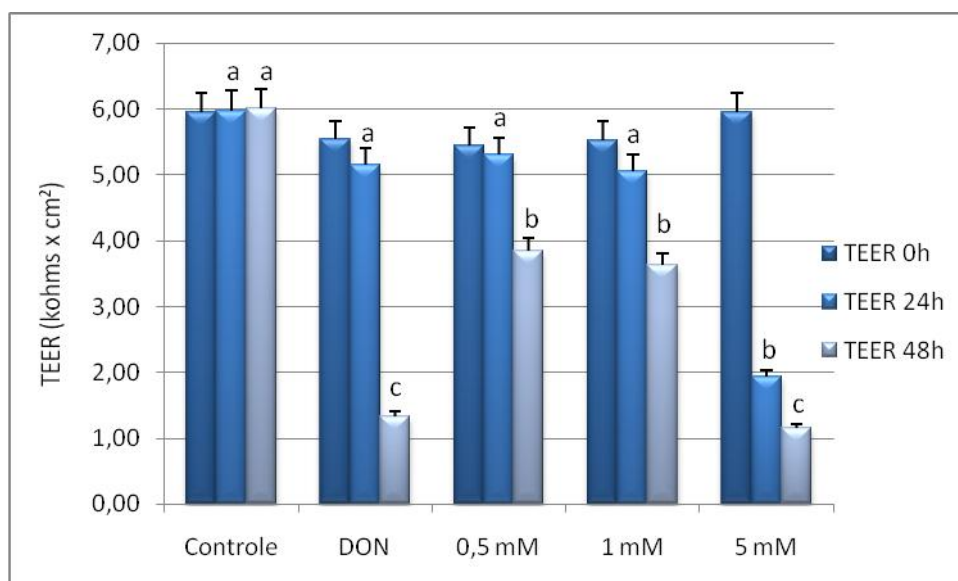


Figura 2 – Efeito do ácido fítico e do deoxivalenol (DON) sobre a resistência elétrica transepitelial (TEER) de células epiteliais intestinais de suínos (IPEC-1)

Nota-se que no tratamento nomeado DON, que era constituído somente por meio de diferenciação, também não diferiu do controle, indicando que a integridade celular permaneceu adequada para a próxima etapa do experimento, que constituiu da aplicação da micotoxina DON. O tratamento com 5 mM de ácido fítico diferiu dos demais ($P < 0,001$), confirmando que o ácido fítico nessa concentração afetou negativamente a integridade da membrana celular, fato que também foi observado no teste de viabilidade celular.

Os resultados após a aplicação de 25 μ M DON (48h) indicam que a micotoxina afetou a integridade das membranas celulares, evidenciada pela diminuição dos valores da resistência elétrica transepitelial. O tratamento DON apresentou queda significativa ($P < 0,001$) dos valores de TEER em comparação ao tratamento controle, porém, não diferiu do tratamento 5 mM AF+25 μ M DON, uma vez que as células desse tratamento já estavam comprometidas pelo possível efeito tóxico dos 5 mM de ácido fítico aplicados na primeira etapa do experimento.

Os tratamentos com 0,5 mM AF+25 μ M DON e 1 mM AF+25 μ M DON, apresentaram valores intermediários de TEER ($P < 0,001$), indicando que o ácido fítico, com sua função antioxidante, pode ter impedido o estresse oxidativo induzido pelo DON.

Os efeitos do DON na diminuição dos valores da TEER, e conseqüentemente na integridade da membrana celular também foram observadas por Pinton et al. (2009). Os autores utilizaram 5,0; 10; 20; 50 e 100 μ M de DON em células IPEC-1. Segundo os autores, as alterações na função de barreira provocadas pela micotoxina foram associadas à diminuição na expressão das claudinas - proteínas de membrana que compõem as junções oclusivas de membrana - e com isso houve diminuição da função de barreira do epitélio intestinal. Dessa forma, alimentos contaminados com DON podem induzir a danos intestinais com conseqüências na saúde animal.

A medida de resistência elétrica transepitelial (TEER) da mucosa intestinal reflete a funcionalidade das junções celulares produzidas pelas proteínas transmembranárias, como por exemplo, as ocludinas, as claudinas e a molécula de adesão juncional (JAM), interagindo com as proteínas citoplasmáticas: zônula de oclusão-1 (ZO-1), ZO-2, ZO-3, ASIP (atípica proteína quinase C que interage especificamente com proteínas) e a proteína AF-6. A fosforilação da maioria das proteínas de junção celular é necessária para garantir a regulação juncional responsável pela manutenção da polaridade celular e da função de barreira, sendo que algumas dessas proteínas estão envolvidas na sinalização celular (Sergent et al., 2006).

Estudos têm demonstrado que o DON altera a sinalização celular por meio da indução da fosforilação das MAPKs (mitogen-activated protein kinase). A ativação dessa cascata de sinalização é iniciada pelas toxinas em nível ribossomal, através de um mecanismo conhecido como “estresse ribotóxico” (Laskin et al., 2002).

De acordo com a literatura, o DON se liga à peptidil transferase do ribossomo, levando à inibição da síntese de proteínas e de DNA e conseqüentemente reduzindo a proliferação celular.

Pesquisas realizadas com células de adenocarcinoma humano (Caco-2) demonstraram efeitos do DON sobre a TEER e as MAPKs. Sergent et al. (2006), utilizando concentrações de DON que variaram entre 0,125 a 6 µg/ml, observaram queda da TEER após 24h de incubação das células. Ao mesmo tempo, a exposição ao DON provocou fosforilação das MAPKs Erk1/2, p38 e SAP/JNK. De acordo com os autores, o DON inibiu a proliferação celular intestinal e foi absorvido pelo epitélio intestinal por difusão simples, provavelmente por uma rota paracelular, e afetou a sinalização celular das MAPKs com um efeito concomitante sobre a permeabilidade intestinal, sugerindo também que o DON pode ser causador de inflamação intestinal.

Kouadio et al. (2005), trabalhando com células Caco-2 e concentrações de DON que variaram entre 5 e 40 µM durante 24h, observaram que a micotoxina foi capaz de induzir a peroxidação lipídica em concentrações acima de 10 µM, gerando o aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo a mitocôndria a principal organela alvo. Isso porque a mitocôndria é uma importante fonte celular de produção de substâncias reativas ao oxigênio (ROS) e por isso, mais susceptível ao estresse oxidativo (Cadenas & Davies, 2000). Sabe-se que as ROS podem induzir numerosas alterações moleculares em componentes celulares, levando a mudanças na morfologia celular e na sua viabilidade. A super produção de ROS pode induzir a injúria celular oxidativa, tais como dano ao DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica (Mates, 2000). Dessa forma, é possível sugerir que as ROS desempenham um importante papel na indução ao dano ao DNA produzido pelo DON.

Rizzo et al. (1992) sugeriram que o DON exerce sua toxicidade por meio da peroxidação lipídica mediada pelos radicais livres.

Em um estudo sobre o efeito protetor de antioxidantes contra a peroxidação lipídica induzida pelo DON e pela toxina T-2, também pertencente ao grupo dos tricotecenos, Rizzo et al. (1994) demonstraram que as duas micotoxinas estimularam a peroxidação lipídica com consequente diminuição da glutatona (GSH), porém, o uso de antioxidantes na dieta, como o selênio, o α -tocoferol e o ácido ascórbico forneceram a proteção contra a toxicose aguda causada pelo DON e pela T-2.

O pré-tratamento de células intestinais Caco-2 com o antioxidante hidroxitirosol (HT) preveniu o estresse oxidativo produzido pelo DON (Manna et al., 1997). De maneira similar, Zhang et al. (2009) observaram o efeito do mesmo antioxidante e do DON (0; 3,75; 7,5 e 15 μ M) sobre células de hepatoma humano (HepG2). Os autores observaram aumento nos níveis de TBARs e das substâncias reativas ao oxigênio (ROS), sugerindo que esses compostos foram determinantes para a indução ao dano do DNA celular.

Não está claro se as micotoxinas estimulam a peroxidação lipídica diretamente pelo aumento da produção de radicais livres ou se o aumento da susceptibilidade dos tecidos à peroxidação lipídica é resultado de um sistema antioxidante comprometido (Rezar et al., 2007). Em geral, o sistema antioxidante natural do organismo compreende antioxidantes solúveis em gordura (vitamina A, α -tocoferol, carotenóides), antioxidantes solúveis em água (ácido ascórbico, ácido úrico), enzimas antioxidantes (glutatona peroxidase e outras enzimas selênio-dependentes, catalase e superóxido dismutase), e o sistema tiol-redox (sistema glutatona e sistema tioredoxina) (Placha et al., 2009).

Sugere-se que o poder protetor do ácido fítico seja baseado no seu efeito antioxidante ou por sua habilidade em alterar a via de sinalização celular e as enzimas antioxidantes que detoxificam as ROS (Shamsuddin et al., 1997). Tanto o ácido fítico, como seus produtos de hidrólise (IP₅, IP₄, IP₃, IP₂ e IP₁) são capazes de proteger a membrana lipossomal da peroxidação lipídica através da inibição dos radicais livres (Miyamoto et al., 2000).

Apesar do uso de alguns antioxidantes serem efetivos no controle de algumas doenças, Halliwell (1999) afirmou que essas substâncias chamadas de “antioxidantes” podem agir em alguns casos como pró-oxidantes, dependendo da concentração dessas substâncias. Contrariamente, danos oxidativos ao DNA não foram observados mesmo com grandes concentrações de ácido fítico. Esse fato sugere que o ácido fítico não atue como um agente pró-oxidante, como acontece com outros antioxidantes, como a vitamina A e a vitamina E (Midorikawa et al., 2001).

Essa abordagem permite sugerir, que no presente experimento, o ácido fítico por sua ação antioxidante, agiu como um agente protetor da membrana das células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1 contra os danos celulares induzidos pela micotoxina DON. Provavelmente, a administração de produtos ricos em ácido fítico na dieta animal, como por exemplo, co-produtos derivados do milho e do arroz, possam agir de forma endógena na proteção dos sistemas celulares contra os efeitos induzidos por substâncias que induzam alterações celulares, como as micotoxinas, diminuindo os efeitos deletérios causados por essas toxinas. Dessa forma, as perdas na produção e na sanidade serão consideravelmente menores. Porém, outros estudos são necessários para confirmar os efeitos do estresse oxidativo celular produzido pelo DON no epitélio intestinal das células IPEC-1, e como o ácido fítico pode agir efetivamente minimizando estes efeitos.

Conclusões

O ácido fítico na condição avaliada afetou a viabilidade celular na concentração de 5 mM, porém, nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM, o ácido fítico diminuiu os efeitos negativos do deoxinivalenol sobre a integridade da membrana das células epiteliais intestinais da linhagem IPEC-1.

Literatura citada

- ALMOND, G.W. Research applications using pigs. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.12, p.707-716, 1996.
- BOUHET, S.; HOURCADE, E.; LOISEAU, N. et al. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. **Toxicology Science**, v.77, p.165-171, 2004.
- BUNNER, D. L.; MORRIS, E. R. Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin: an important mechanism of action. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.92, p.113-121, 1988.
- CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v.29, p.222-230, 2000.
- DANICKE, S.; VALENTA, H.; DOLL, S. On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. **Archives of Animal Nutrition**, v.58, p.169-180, 2004.
- ERIKSEN, G. S.; PETTERSSON, H.; LINDBERG, J. E. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. **Arch Tierernahr**, v.57, p.335-345, 2003.
- GRAF, E.; EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, n.1, p.61-69, 1990.
- GRAF, E.; EATON, J. W. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. **Nutrition and Cancer**, v.19, p.11-19, 1993.
- GRAF, E.; EMPSON, K.L.; EATON, J.W. Phytic acid: a natural antioxidant. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.11647-11650, 1987.
- GOYARTS, T.; DANICKE, S. Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. **Toxicology Letters**, v.163, n.3, p.171-182, 2006.
- HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation Research**, v.443, p.37-52, 1999.
- HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Letters**, v.281, p.9-19, 1991.
- KHERA, K. S.; WHALEN, C.; ANGERS, G. et al. Embryotoxicity of 4-deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.29, p.487-491, 1982.

- KOUADIO, J.H.; MOBIO, T.A.; BAUDRIMONT, I. et al. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. **Toxicology**, v.213, p.56-65, 2005.
- LASKIN, J.; HECK, D.; LASKIN, D. The ribotoxic stress response as a potential mechanism for MAPkinase activation in xenobiotic toxicity. **Toxicology Science**, v.69, p.289-291, 2002.
- MANNA, C.; GALLETTI, P.; CUCCIOLA, V. et al. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl) ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. **Journal of Nutrition**, v.127, p.286-292, 1997.
- MATES, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, p.83-104, 2000.
- MIDORIKAWA, K.; MURATA, M.; OIKAWA, S. Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.288, p.552-557, 2001.
- MIYAMOTO, S.; KUWATA, G.; IMAI, M. Protective effect of phytic acid hydrolysis products on iron-induced lipid peroxidation of liposomal membranes. **Lipids**, v.35, n.12, p.1411-1414, 2000.
- PINTON, P.; NOUGAYRÈDE, J.P.; DEL RIO, J.C. et al. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.237, n.1, p.41-48, 2009.
- PLACHA, I.; BORUTOVA, R.; GRESAKOVA, L. Effects of excessive selenium supplementation to diet contaminated with deoxynivalenol on blood phagocytic activity and antioxidative status of broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.93, p.695-702, 2009.
- PRELUSKY, D. B.; TRENHOLM, H. L.; ROTTER, B. A. et al. Biological fate of fumonisin B1 in food-producing animals. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.392, p.265-278, 1996.
- REZAR, V.; FRANKIČ, T.; NARAT, M. et al. Dose-dependent effects of T-2 toxin on performance, lipid peroxidation, and genotoxicity in broiler chickens. **Poultry Science**, v.86, p.1155-1160, 2007.
- RIZZO, A.F.; ATROSHI, F.; HIRVI, T. The hemolytic activity of deoxynivalenol and T-2 toxin. **Natural Toxins**, v.1, n.2, p.106-110, 1992.
- RIZZO, A. F.; ATROSHI, F.; AHOTUPA, M. et al. Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. **Zentralblatt Veterinärmedizin A**, v.41, p.81-90, 1994.
- ROTHKOTTER, H.J.; SOWA, E.; PABST, R. The pig as a model of developmental immunology. **Human & Experimental Toxicology**, v.21, p.533, 2002.

- ROTTER, B. A.; PRELUSKY, D. B.; PESTKA, J. J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.48, p.1-34, 1996.
- SERGET, T.; PARYS, M.; GARSOU, S. Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentration. **Toxicology Letters**, v.164, p.167-176, 2006.
- SHAMSUDDIN, A. M.; VUCENIK, I.; COLE, K. Minireview-IP6: a novel anticancer agent. **Life Science**, v.61, n.4, p.343–354, 1997.
- SODERHOLM, J. D.; PERDUE, M. H. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.280, p.7-13, 2001.
- STADNYK, A.W. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v.16, p.241, 2002.
- THOMPSON, L. U. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. **Food Research**, v.26, p.131–149, 1993.
- WANG, X.; MARTINDALE, J. L.; LIU, Y. et al. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. **Biochemical Journal**, v.333, p.291-300, 1998.
- WEGLARZ, L.; WAWSZCZYK, J.; ORCHEL, A. Phytic acid modulates in vitro IL-8 and release from colonic epithelial cell stimulated with LPS and IL-1 β . **Digestive Diseases and Science**, v.52, p.93-102, 2007.
- WHITLOW, L.W.; HAGLER JR, W.M. Mycotoxins in feeds. **Feedstuffs**, september 10, 2008.
- ZHANG, X.; LIPING, J.; CHENGYAN, G. et al. The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells, **Toxicol**, v.54, p.513-518, 2009.

5 CONCLUSÃO GERAL

A participação de 40% de farelo de gérmen de milho desengordurado nas rações à base de milho e farelo de soja para suínos na fase de terminação promoveu maior consumo de ração e manteve adequados os índices de ganho de peso e conversão alimentar.

Independentemente da inclusão do FGMD e da fitase nas rações, os machos castrados apresentaram carcaças mais pesadas e com maior espessura de toucinho, e as fêmeas maior rendimento de carne na carcaça.

A utilização da enzima fitase mostrou ser positiva na redução dos níveis fecais de cálcio e fósforo, sem demonstrar melhora nos parâmetros de desempenho e carcaça.

O FGMD exerceu influência positiva sobre a estabilidade lipídica do lombo e da lingüiça tipo frescal, agindo como um antioxidante endógeno.

O ácido fítico, em cultivo celular, diminuiu os efeitos negativos da micotoxina deoxinivalenol sobre a integridade da membrana das células epiteliais intestinais de suínos da linhagem IPEC-1.

ANEXOS

ANEXO A – Normas para preparação de trabalhos científicos para publicação na Revista Brasileira de Zootecnia

Preparo do artigo - Instruções gerais

O envio dos manuscritos é feito exclusivamente pela *home page* da RBZ (<http://www.sbz.org.br>), link Revista, juntamente com a carta de encaminhamento, conforme instruções no link "Envie seu manuscrito". O texto deve ser elaborado segundo as normas da RBZ e orientações disponíveis no link "Instruções aos autores".

O autor deve encaminhar uma correspondência informando os seguintes dados: título, autoria e área de publicação do manuscrito, além da identificação completa do responsável (nome, CPF e endereços residencial e eletrônico).

A RBZ publica artigos científicos originais nas áreas de Aquicultura, Forragicultura, Melhoramento, Genética e Reprodução, Monogástricos, Produção Animal, Ruminantes, e Sistemas de Produção e Agronegócio.

Linguagem

O artigo deverá ser escrito em português ou inglês.

Formatação do texto

O texto deve ser digitado em fonte Times New Roman 12, espaço duplo (exceto Resumo, Abstract e Tabelas, que devem ser elaborados em espaço 1,5), margens superior, inferior, esquerda e direita de 2,5; 2,5; 3,5; e 2,5 cm, respectivamente. O manuscrito pode conter até 25 páginas, numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. As páginas devem apresentar linhas numeradas (a numeração é feita da seguinte forma: MENU ARQUIVO/CONFIGURAR PÁGINA/LAYOUT/NÚMEROS DE LINHA.../NUMERAR LINHAS), com paginação contínua e centralizada no rodapé.

Estrutura do artigo

O artigo deve ser dividido em seções com cabeçalho centralizado, em negrito, na seguinte ordem: Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos e Literatura Citada. Não são aceitos cabeçalhos de terceira ordem. Os parágrafos devem iniciar a 1,0 cm da margem esquerda.

Título

Deve ser preciso e informativo. Quinze palavras são ideal e 25, o máximo. Digitá-lo em negrito e centralizado, segundo o exemplo: Valor nutritivo da cana-de-açúcar para bovinos em crescimento. Deve apresentar a chamada "1" somente no caso de a pesquisa ter sido financiada. Não citar "parte da tese"

Autores

Deve-se listar até **seis autores**. A primeira letra de cada nome/sobrenome deve ser maiúscula (Ex.: Anacleto José Benevenuto). Não listá-los apenas com as iniciais e o último sobrenome (Ex.: A.J. Benevenuto). Outras pessoas que auxiliaram na condução do experimento e/ou preparação/avaliação do manuscrito devem ser mencionadas em **Agradecimentos**. Digitar o nome dos autores separados por vírgula, centralizado e em negrito, com chamadas de rodapé numeradas e em sobrescrito, indicando apenas a instituição e/ou o endereço profissional dos autores. Não citar o vínculo empregatício, a profissão e a titulação dos autores. Informar o endereço eletrônico somente do responsável.

Resumo

Deve conter no máximo 1.800 caracteres com espaço. As informações

do resumo devem ser precisas e informativas. Resumos extensos serão devolvidos para adequação às normas. Deve sumarizar objetivos, material e métodos, resultados e conclusões. Não deve conter introdução. Referências nunca devem ser citadas no resumo. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO, iniciado a 1,0 cm da margem esquerda.

Abstract

Deve aparecer obrigatoriamente na segunda página e ser redigido em inglês científico, evitando-se traduções de aplicativos comerciais. O texto deve ser justificado e digitado em espaço 1,5, começando por ABSTRACT, em parágrafo único, iniciado a 1,0 cm da margem esquerda.

Palavras-chave e Key Words

Apresentar até seis (6) palavras-chave e Key Words imediatamente após o RESUMO e ABSTRACT, respectivamente, em ordem alfabética. Devem ser elaboradas de modo que o trabalho seja rapidamente resgatado nas pesquisas bibliográficas. Não podem ser retiradas do título do artigo. Digitá-las em letras minúsculas, com alinhamento justificado e separado por vírgulas. Não devem conter ponto final.

Introdução

Deve conter no máximo 2.500 caracteres com espaço. Deve-se evitar a citação de várias referências para o mesmo assunto. Trabalhos com introdução extensa serão devolvidos para adequação às normas.

Material e Métodos

Descrição clara e com referência específica original para todos os procedimentos biológicos, analíticos e estatísticos. Todas as modificações de procedimentos devem ser explicadas.

Resultados e Discussão

Os resultados devem ser combinados com discussão. Dados suficientes, todos com algum índice de variação incluso, devem ser apresentados para permitir ao leitor a interpretação dos resultados do experimento. A discussão deve interpretar clara e concisamente os resultados e integrar resultados de literatura com os da pesquisa para proporcionar ao leitor uma base ampla na qual possa aceitar ou rejeitar as hipóteses testadas. Evitar parágrafos soltos e citações pouco relacionadas ao assunto.

Conclusões

Devem ser redigidas em parágrafo único e conter no máximo 1.000 caracteres com espaço. Não devem ser repetição de resultados. Devem ser dirigidas aos leitores que não são necessariamente profissionais ligados à ciência animal. Devem explicar claramente, sem abreviações, acrônimos ou citações, o que os resultados da pesquisa concluem para a ciência animal.

Agradecimentos

Deve iniciar logo após as Conclusões.

Abreviaturas, símbolos e unidades

Abreviaturas, símbolos e unidades devem ser listados conforme indicado na home page da RBZ, link "Instruções aos autores".

- Usar 36%, e não 36 % (sem espaço entre o no e %)
- Usar 88 kg, e não 88Kg (com espaço entre o no e kg, que deve vir em minúsculo)
- Usar 136,22, e não 136.22 (usar vírgula, e não ponto)
- Usar 42 mL, e não 42 ml (litro deve vir em L maiúsculo, conforme padronização internacional)
- Usar 25oC, e não 25 oC (sem espaço entre o no e oC)
- Usar (P<0,05), e não (P < 0,05) (sem espaço antes e depois do <)

- Usar $521,79 \pm 217,58$, e não $521,79\pm 217,58$ (com espaço antes e depois do \pm)
- Usar $r^2 = 0,95$, e não $r^2=0,95$ (com espaço antes e depois do $=$)
- Usar asterisco nas tabelas apenas para probabilidade de P: (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$)

Deve-se evitar o uso de abreviações não consagradas e de acrônimos, como por exemplo: "o T3 foi maior que o T4, que não diferiu do T5 e do T6". Este tipo de redação é muito cômoda para o autor, mas é de difícil compreensão para o leitor.

Tabelas e Figuras

É imprescindível que todas as tabelas sejam digitadas segundo menu do Word "Inserir Tabela", em células distintas (não serão aceitas tabelas com valores separados pelo recurso ENTER ou coladas como figura). Tabelas e figuras enviadas fora de normas serão devolvidas para adequação. Devem ser numeradas sequencialmente em algarismos arábicos e apresentadas logo após a chamada no texto. O título das tabelas e figuras deve ser curto e informativo, devendo-se adotar as abreviaturas divulgadas oficialmente pela RBZ. A legenda das Figuras (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura. Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas e unidades entre parênteses. Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas, que deve ser referenciada. As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados. Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios). As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico. As figuras devem ser gravadas no programa Word, Excel ou Corel Draw (extensão CDR), para possibilitar a edição e possíveis

correções. Usar linhas com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura. No caso de gráfico de barras, usar diferentes efeitos de preenchimento (linhas horizontais, verticais, diagonais, pontinhos etc). Evite os padrões de cinza porque eles dificultam a visualização quando impressos. As figuras deverão ser exclusivamente monocromáticas pontinhos etc). Evite os padrões de cinza porque eles dificultam a visualização quando impressos. As figuras deverão ser exclusivamente monocromáticas. Não usar negrito nas figuras. Os números decimais apresentados no interior das tabelas e figuras devem conter vírgula, e não ponto.

Citações no texto

As citações de autores no texto são em letras minúsculas, seguidas do ano de publicação. Quando houver dois autores, usar & (e comercial) e, no caso de três ou mais autores, citar apenas o sobrenome do primeiro, seguido de et al

Comunicação pessoal (ABNT-NBR 10520).

Não fazem parte da lista de referências, sendo colocadas apenas em nota de rodapé. Coloca-se o sobrenome do autor seguido da expressão "comunicação pessoal", a data da comunicação, o nome, estado e país da Instituição à qual o autor é vinculado.

Literatura Citada

Baseia-se na Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 6023).

Devem ser redigidas em página separada e ordenadas alfabeticamente pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es). Digitá-las em espaço simples, alinhamento justificado e recuo até a terceira letra a partir da segunda linha da referência. Para formatá-las, siga as seguintes instruções: No menu FORMATAR, escolha a opção PARÁGRAFO... RECUO ESPECIAL, opção DESLOCAMENTO... 0,6 cm. Em obras com dois e três autores,

mencionam-se os autores separados por ponto-e-vírgula e, naquelas com mais de três autores, os três primeiros vêm seguidos de et al. As iniciais dos autores não podem conter espaços. O termo et al. não deve ser italizado nem precedido de vírgula. O recurso tipográfico utilizado para destacar o elementotítulo será negrito e, para os nomes científicos, itálico. Indica(m)-se o(s) autor(es) com entrada pelo último sobrenome seguido do(s) prenome(s) abreviado (s), exceto para nomes de origem espanhola, em que entram os dois últimos sobrenomes. No caso de homônimos de cidades, acrescenta-se o nome do estado (ex.: Viçosa, MG; Viçosa, AL; Viçosa, RJ).

Obras de responsabilidade de uma entidade coletiva

A entidade é tida como autora e deve ser escrita por extenso, acompanhada por sua respectiva abreviatura. No texto, é citada somente a abreviatura correspondente. Quando a editora é a mesma instituição responsável pela autoria e já tiver sido mencionada, não é indicada.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 8.0. Viçosa, MG, 2000. 142p.

Livros e capítulos de livro

Os elementos essenciais são: autor(es), título e subtítulo (se houver), seguidos da expressão "In:", e da referência completa como um todo. No final da referência, deve-se informar a paginação. Quando a editora não é identificada, deve-se indicar a expressão *sine nomine*, abreviada, entre colchetes [s.n.]. Quando o editor e local não puderem ser indicados na publicação,

utilizam-se ambas as expressões, abreviadas, e entre colchetes [S.I.: s.n.].

LINDHAL, I.L. Nutrición y alimentación de las cabras. In: CHURCH, D.C. (Ed.) **Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes**. 3.ed. Zaragoza: Acríbia, 1974.p.425-434.

NEWMANN, A.L.; SNAPP, R.R. **Beef cattle**. 7.ed. New York: John Wiley, 1997. 883p.

Teses e dissertações

Deve-se evitar a citação de teses, procurando referenciar sempre os artigos publicados na íntegra em periódicos indexados. Entretanto, caso os artigos ainda não tenham sido publicados, devem-se citar os seguintes elementos: autor, título, ano, página, área de concentração, universidade e local.

CASTRO, F.B. **Avaliação do processo de digestão do bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado em bovinos**. 1989. 123f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

Boletins e relatórios

BOWMAN, V.A. **Palatability of animal, vegetable and blended fats by equine**. (S.L.): Virginia Polytechnic Institute and State University, 1979. p.133-141 (Research division report, 175).

Artigos

O nome do periódico deve ser escrito por extenso. Com vistas à padronização deste tipo de referência, não é necessário citar o local; somente volume, número, intervalo de páginas e ano.

RESTLE, J.; VAZ, R.Z.; ALVES FILHO, D.C. et al. Desempenho de vacas Charolês e Nelore desterneiradas aos três ou sete meses. **Revista Brasileira**

de *Zootecnia*, v.30, n.2, p.499-507, 2001.

Congressos, reuniões, seminários etc

Citar o mínimo de trabalhos publicados em forma de resumo, procurando sempre referenciar os artigos publicados na íntegra em periódicos indexados.

CASACCIA, J.L.; PIRES, C.C.; RESTLE, J. Confinamento de bovinos inteiros ou castrados de diferentes grupos genéticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30., 1993, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p.468.

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA

DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. *Anais...* São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [1999]. (CD-ROM).

Artigo e/ou matéria em meios eletrônicos

Na citação de material bibliográfico obtido via internet, o autor deve procurar sempre usar artigos assinados, sendo

também sua função decidir quais fontes têm realmente credibilidade e confiabilidade. Quando se tratar de obras consultadas *on-line*, são essenciais as informações sobre o endereço eletrônico, apresentado entre os sinais < >, precedido da expressão "Disponível em:" e a data de acesso do documento, precedida da expressão "Acesso em:".

NGUYEN, T.H.N.; NGUYEN, V.H.; NGUYEN, T.N. et al. [2003]. Effect of drenching with cooking oil on performance of local yellow cattle fed rice straw and cassava foliage. **Livestock Research for Rural Development**, v.15, n.7, 2003. Disponível em: <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd15/7/nhan157.htm>> Acesso em: 28/7/2005.

REBOLLAR, P.G.; BLAS, C. [2002]. **Digestión de la soja integral en rumiantes**. Disponível em: <http://www.ussoymeal.org/ruminant_s.pdf> Acesso em: 12/10/2002.

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. [1996]. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPe, 4., 1996, Recife. *Anais eletrônicos...* Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996. Disponível em: <<http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm>> Acesso em: 21/1/1997.