



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

---

**CLEUSA INÊS WEBER**

**EXTRAÇÃO DE FITASE ENDÓGENA DE FARELO DE  
ARROZ INTEGRAL SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE  
INGREDIENTE COM BAIXO TEOR DE ÁCIDO FÍTICO E  
AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO EM DIETAS PARA FRANGOS DE  
CORTE**

---

Londrina  
2012

CLEUSA INÊS WEBER

**EXTRAÇÃO DE FITASE ENDÓGENA DE FARELO DE  
ARROZ INTEGRAL SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE  
INGREDIENTE COM BAIXO TEOR DE ÁCIDO FÍTICO E  
AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO EM DIETAS PARA FRANGOS DE  
CORTE**

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

Orientador: Elza Louko Ida

Londrina  
2012

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

W373e Weber, Cleusa Inês. Extração de fitase endógena de farelo de arroz integral sua aplicação na produção de ingrediente com baixo teor de ácido fítico e avaliação da adição em dietas para frangos de corte / Cleusa Inês Weber. – Londrina, 2012. 103 f. : il.

Orientador: Elza Iouko Ida.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Carne de ave – Qualidade – Teses. 2. Acido fítico – Teses. 3. Farelo de arroz – Teses. 4. Tecnologia de alimentos – Teses. 5. Oxidação lipídica. I. Ida, Elza Iouko. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664.91

CLEUSA INÊS WEBER

**EXTRAÇÃO DE FITASE ENDÓGENA DE FARELO DE ARROZ  
INTEGRAL SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE INGREDIENTE  
COM BAIXO TEOR DE ÁCIDO FÍTICO E AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO  
EM DIETAS PARA FRANGOS DE CORTE**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra Elza louko Ida  
UEL/Londrina-PR

---

Prof.Dr. Jorge Alberto Vieira Costa  
UFRG/Rio Grande-RS

---

Profa.Dra. Alice Eiko Murakami  
UEM/Maringá-PR

---

Profa.Dra. Ana Maria Bridi  
UEL/Londrina-PR

---

Prof.Dr. Raúl Jorge H. Castro-Gómez  
UEL/Londrina-PR

Londrina, 02 de julho de 2012.

Aos meus pais Canisio e Helena que sempre me apoiaram e incentivaram.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Elza Louko Ida, pela orientação valiosa, compreensão, ensinamentos e incentivos.

Ao Prof. Dr. Alexandre Oba, pela colaboração e viabilização do experimento com as aves.

Ao Prof. Dr. Massami Shimokomaki, pela colaboração e auxílio.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade da realização do doutorado.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pelos ensinamentos.

A CAPES/MEC – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa no primeiro ano de Doutorado.

Ao IRGA – Instituto Riograndense do Arroz pela doação do farelo de arroz.

Aos estudantes do grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Alexandre Oba que possibilitaram a condução do experimento na fazenda escola.

À Profa. Dra. Adriana Lourenço Soares pela ajuda e amizade.

Aos amigos e colegas de trabalho Alessandra Machado Lunkes, Alexandre Coelho, Alexandre Alfaro, Andréa Badaró, Fabiane Cislighi, Vânia Burgardt, Ellen Porto, Luciano Lucchetta, João Marchi, Thalita Rauen, que por inúmeras vezes auxiliaram me substituindo as aulas, incentivando nos momentos de desalento para a conclusão do Doutorado.

Aos amigos Luciana Bernd, Thiago Montagner, Denis Marchi, Eduardo Hatada e Fabrício Simões por compartilhar todos os momentos, pela força e momentos de descontração.

À Deus pela força nos momentos de turbulência.

“A força não provém da capacidade física e sim de uma vontade indomável”.

Mahatma Gandhi.



WEBER, Cleusa Inês. **Extração de fitase endógena de farelo de arroz integral sua aplicação na produção de ingrediente com baixo teor de ácido fítico e avaliação da adição em dietas para frangos de corte.** 2012. 103 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi extrair a fitase endógena de farelo de arroz integral e aplicar para produção de um farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico e sua avaliar a adição na dieta de frangos de corte. Para estabelecer as condições ótimas do processo de extração da fitase endógena foi avaliado o pH, temperatura e tempo de extração com cinco níveis de variação, utilizando o delineamento composto central ortogonal. Para obter o farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico foi utilizado o delineamento Box-Behnken. O efeito da adição do farelo de arroz integral e do farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico no desempenho das aves e estabilidade das carnes de frangos foi avaliado. Foram utilizados 260 pintainhos de um dia que foram alimentados por 36 dias com ração comercial. Na fase de terminação, as aves foram divididas em cinco tratamentos: controle comercial, 5% e 10% de farelo de arroz integral e 5% e 10% de farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico. No processo de extração da fitase endógena foi obtido 0,936 UA de fitase/g farelo de arroz integral. Foi produzido um farelo de arroz de baixo teor de ácido fítico, com hidrólise de 84,79% de ácido fítico, a partir da adição de 30 UA de fitase endógena/g de farelo de arroz e incubação a 40°C por 36h. A adição de até 10% de farelo de arroz integral e de farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico na ração dos frangos de corte na fase de terminação, não apresentou efeito significativo em relação ao ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, bem como no pH e atributos de cor de peitos de frangos armazenados 24h *post mortem*. A adição de 5 ou 10% de farelo de arroz integral na dieta de frangos de corte na fase de terminação inibiu a oxidação lipídica e desenvolvimento de aroma de requentado de peitos de frangos armazenados até 90 dias a -18°C. A adição de 5 ou 10% de farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico na dieta de frangos de corte na fase de terminação não inibiu a oxidação lipídica e o desenvolvimento de aroma de requentado de peitos de frangos armazenados a -18°C por 90 dias.

**Palavras – chave:** Aroma de requentado. Atividade de fitase. Conversão alimentar. Oxidação lipídica. Qualidade da carne de frango.

WEBER, Cleusa Inês. **Extraction of endogenous phytase whole rice bran its application in production of ingredient with low phytic acid and evaluation in the addition in diets for broiler chicken.** 2012. 103 p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

### ABSTRACT

The objective of this study was to extract the endogenous phytase from whole rice bran and apply for production of an low phytic acid rice bran and evaluate the addition in broilers chicken diets. To establish the optimum conditions of extraction of endogenous phytase was evaluated pH, temperature and hours of hydrolysis using na orthogonal central composite design. For obtain the low phytic acid rice bran was used a Box-Behnken design. The effect of addition of whole rice bran and low phytic acid rice bran on animal performance and stability of chicken meat was evaluated using 260 day-old chicks that were fed for 36 days with commercial ration. On the termination phase the animals were divided into five treatments: commercial control, 5% and 10% of whole rice bran and 5% and 10% low phytic acid rice bran. Was produced an low phytic acid rice bran with reduction of 84.79% phytic acid from the addition of 30 UAoh endogenous phytase g<sup>-1</sup> of rice bran and incubation at 40 °C for 36 h. The addition of up to 10% of whole rice bran or low phytic acid rice bran in the chickens diet in the finishing phase, had no significant effect in relation to weight gain, feed intake and feed conversion as well as the pH and color attributes of chicken breasts stored 24 h postmortem. The addition of 5 or 10% of whole rice bran in the diet of broilers in the finishing period inhibited lipid oxidation and development of warmed-over flavor in chicken breast stored up to 90 days at -18 °C. The addition of 5 or 10% of low phytic acid rice bran in the chickens diet in the finishing period did not inhibit lipid oxidation and the development of warmed-over flavor in chicken breasts stored at -18 °C for 90 days.

**Key – words:** Warmed-over flavor. Phytase activity c acid. Phytase. Chicken meat quality.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Delineamento Composto Central Ortogonal com as variáveis independentes para o processo de extração da fitase endógena do farelo de arroz integral IRGA 417 .....	32
<b>Tabela 2</b> – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo de extração da fitase endógena do farelo de arroz integral IRGA 417 .....	33
<b>Tabela 3</b> – Delineamento Box-Behnken com as variáveis independentes, para a hidrólise do ácido fítico do farelo de arroz integral IRGA 417 .....	34
<b>Tabela 4</b> – Variáveis independentes e níveis de variação para a hidrólise do ácido fítico do farelo de arroz integral IRGA 417 .....	35
<b>Tabela 5</b> – Composição das dietas fornecidas aos frangos de corte na fase de terminação .....	38

## ARTIGO 1

<b>Table 1</b> – Orthogonal Central Composite Design with independent variables, experimental responses ( $Y_1$ ) and the estimated responses ( $\hat{Y}_1$ ) for the extraction process of endogenous phytase from the IRGA 417 whole rice bran .....	69
<b>Table 2</b> – Box-Behnken design with independent variables, experimental responses ( $Y_2$ ) and estimated responses ( $\hat{Y}_2$ ) for phytic acid hydrolysis of the IRGA 417 whole rice bran .....	70
<b>Table 3</b> – ANOVA for the estimate of the $Y_1$ function-response for the extraction of endogenous phytase from IRGA 417 whole rice bran.....	71
<b>Table 4</b> – ANOVA test for estimating phytic acid hydrolysis in a whole rice bran model.....	71

## ARTIGO 2

<b>Table 1 –</b>	Composition of the diets fed to broiler chickens during the finish period .....	85
<b>Table 2 –</b>	Amount of phytic acid in the broiler chicken diets prepared with whole rice bran (WRB) and low phytic acid whole rice bran (LPA-WRB) .....	86
<b>Table 3 –</b>	The effect of whole rice bran (WRB) and low phytic acid whole rice bran (LPAWRB), which were added to the broiler chicken diet during the finish period, on animal performance.....	86
<b>Table 4 –</b>	The effect of whole rice bran (WRB) and low phytic acid whole rice bran LPA-WRB), which were added to the broiler chicken diet during the finish period, on the pH values and colour attributes of refrigerated breast meat .....	87
<b>Table 5 –</b>	The effect of whole rice bran(WRB) and low phytic acid whole rice bran (LAP-WRB), which were added to the broiler chicken diet during the finish period, on lipid oxidation in breast meat stored for 1 day at 4°C and for 30, 60 or 90 days at -18°C.....	87
<b>Table 6 –</b>	The effect of whole rice bran (WRB) and low phytic acid whole rice bran (LPA-WRB), which were added to the broiler chicken diet during the finish period, on warmed-over flavour in breast meat stored for 1 day at 4°C and for 30, 60 or 90 days at -18°C.....	88

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1 FARELO DE ARROZ .....	17
3.2 CARACTERÍSTICAS DO ÁCIDO FÍTICO .....	18
3.3 APLICAÇÕES E USOS DO ÁCIDO FÍTICO.....	21
3.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE FITASES E APLICAÇÕES .....	24
3.5 OXIDAÇÃO LÍPIDICA EM CARNES .....	26
3.6 ANTIOXIDANTES.....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 MATERIAL .....	31
4.1.1 Matéria-Prima .....	31
4.1.2 Reagentes .....	31
4.2 MÉTODOSANALÍTICOS.....	31
4.2.1 Processo de Extração da Fitase Endógena do Farelo de Arroz Integral .....	31
4.2.2 Obtenção do Farelo de Arroz com Baixo Teor de Ácido Fítico.....	33
4.2.3 Determinação da Atividade da Fitase Endógena do Farelo de Arroz Integral .....	35
4.2.4 Determinação do Teor de Ácido Fítico .....	35
4.2.5 Análise Estatística .....	36
4.2.6 Efeito da Adição do Ingrediente de Farelo de Arroz Integral com Alto e Baixo Teor de Ácido fítico na dieta de frangos de Corte .....	36
4.2.6.1 Aves e preparo das rações.....	36
4.2.6.2 Determinação do ácido fítico nas rações.....	37
4.2.6.3 Avaliação do desempenho das aves .....	37
4.2.7 Efeito do Ingrediente de Farelo de Arroz Sobre a Estabilidade da Carne de Frango .....	39

4.2.7.1 Medidas de cor e pH .....	39
4.2.7.2 Oxidação lipídica .....	39
4.2.7.3 Determinação do aroma de requentado .....	40
4.2.8 Análise Estatística .....	40
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>ARTIGO 1 – OPTIMIZATION OF AN ENDOGENOUS PHYTASE EXTRACTION PROCESS AND THE PRODUCTION OF AN INGREDIENT FROM WHOLE RICE BRAN WITH A LOW PHYTIC ACID LEVEL</b> .....	<b>52</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>54</b>
<b>2 MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>56</b>
2.1 WHOLE RICE BRAN .....	56
2.2 EXTRACTION PROCESS OF ENDOGENOUS PHYTASE FROM RICE BRAN .....	56
2.3 OBTAIN OF A WHOLE RICE BRAN INGREDIENT WITH A LOW PHYTIC ACID LEVEL .....	57
2.4 DETERMINATION OF THE ENDOGENOUS PHYTASE ACTIVITY .....	58
2.5 DETERMINATION OF THE PHYTIC ACID LEVEL .....	58
2.6 STATISTICAL ANALYSIS .....	58
<b>3 RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	<b>59</b>
3.1 OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION PROCESS FOR ENDOGENOUS PHYTASE FROM RICE BRAN .....	59
3.2 PRODUCTION OF THE INGREDIENT FROM WHOLE RICE BRAN WITH A LOW PHYTIC ACID LEVEL .....	60
<b>4 CONCLUSIONS</b> .....	<b>63</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>64</b>

<b>ARTIGO 2 – DIETARY WHOLE RICE BRAN CONTAINING PHYTIC ACID PREVENTS CHICKEN MEAT LIPID OXIDATION WHILE MAINTAINING NORMAL ANIMAL PERFORMANCE.....</b>	<b>74</b>
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>74</b>
<b>2 MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>76</b>
2.1 BROILER CHICKENS AND DIETS.....	76
2.2 LOW PHYTIC ACID WHOLE RICE BRAN .....	76
2.3 PHYTIC ACID DETERMINATION .....	77
2.4 ANIMAL PERFORMANCE.....	77
2.5 EVALUATION OF THE EFFECT OF DIETS CONTAINING PPHYTIC ACID ON MEAT QUALITY .....	77
2.5.1 Colour and pH Measurement.....	77
2.5.2 LIPID OXIDATION MEASUREMENT .....	78
2.5.3 Warmed-Over Flavour Development (WOF) Measurement .....	78
2.6 STATISTICAL ANALYSES .....	78
<b>3 RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>78</b>
3.1 PHYTIC ACID CONTENT IN DIETS AND ANIMAL GROWTH PERFORMANCE .....	78
3.2 EVALUATION OF THE EFFECTS OF PHYTIC ACID – CONTAINING DIETS ON MEAT QUALITY .....	79
<b>4 CONCLUSION .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>82</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO A – Normas para publicação .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO B – Trabalhos apresentados em eventos científicos .....</b>	<b>101</b>

## INTRODUÇÃO

Ácido fítico (ácido hexafosfórico mio-inositol ou 1,2,3,4,5,6 hexafosfato de hidrogênio mio-inositol) ou fitato pode formar complexos insolúveis com o ferro, zinco e cálcio e pode também se ligar a proteínas reduzindo a sua biodisponibilidade ou reduzindo a absorção de alguns minerais por humanos e animais (REDDY, 2002). O mesmo é a maior fonte de armazenamento de fósforo de sementes e de pólen. Cerca de 70-80 % de fósforo presente em vegetais está na forma de fitato (FEBLES et al., 2002; REDDY, 2002; PRAZERES et al., 2004).

Importante potencial antioxidante é atribuído ao ácido fítico, devido a elevada capacidade quelante, que pode tornar insolúveis os minerais como o cálcio, zinco, ferro, manganês. O poder quelante foi considerado como constituinte de efeito antinutricional, embora, alguns estudos sugerem que o efeito antinutricional depende da proporção relativa de fitato e metal e outros íons componentes da dieta (GRAF e EATON, 1990; FEBLES, et al., 2002). Pesquisas recentes têm demonstrado que o ácido fítico teve efeito anticancerígeno em humanos (SHAMSUDDIN e YANG, 1998; VUCENIK et al., 1998; SHAMSUDDIN e VUCENIK, 1999; BODE e DONG, 2000; JENAB e THOMPSON, 2002; VERGHESE et al., 2006; VUCENIK e SHAMSUDDIN, 2006), e na prevenção da oxidação dos alimentos (MINIHANE E RIMBACH, 2002; AHN et al., 2003; AHN et al., 2004; POKORNY et al., 2005). O ácido fítico também se mostrou efetivo na suplementação em aves (SOARES et al., 2004) e suínos (HARBARCH et al., 2006) prevenindo a oxidação lipídica destas carnes. A adição de ácido fítico após o rigor mortis se mostrou efetiva sobre a oxidação lipídica de carnes bovinas e suínas cruas e cozidas (STODOLAK et al., 2007).

No entanto, o ácido fítico presente em plantas e vegetais mantém o fósforo indisponível para utilização de animais monogástricos, devido à sua falta de fitases digestivas (REDDY, 2002). Portanto, mesmo o ácido fítico considerado como um componente indesejável para a dieta, o fornecimento de dietas com altos teores de ácido fítico na fase final e por curto período pode evitar a oxidação lipídica das carnes. Além disso, aves mais velhas apresentam maior atividade de fitase endógena no intestino do animal (SINGH, P.K., 2008).

A fitase ou mio-inositol phosphohydrolase hexafosfato é uma enzima que possui a capacidade para hidrolisar os grupos fosfato do ácido fítico e produzir isômeros diferentes de pentaphosphates inositol, fósforo inositol e inorgânicos.



Devido à especificidade em relação à posição do éster de fosfato a ser hidrolisado primeiro, as fitases são classificadas em 3-fitase e 6-fitase (KONIETZNY e GREINER, 2002). Fitases estão presentes em fontes vegetais, microbianas e em certos tecidos animais. Geralmente, a concentração de fitases endógenas dos cereais não é suficiente para hidrolisar o ácido fítico em rações contendo. A adição de fitase comercial em dietas de animais monogástricos aumenta a utilização de fósforo, aminoácidos, minerais inorgânicos, de energia e melhora a absorção do fósforo fítico presente em dietas ricas em cereais (LOZANO et al., 2011).

O farelo de arroz é um subproduto e representa 8% do arroz integral, é rico em fibra insolúvel e possui uma quantidade considerável de carboidratos, proteínas e lipídios (LACERDA et al., 2010). Devido ao elevado teor de fibra, o farelo é raramente utilizado para consumo humano e animal. No entanto, o farelo de arroz contém cerca de 7,0% de ácido fítico (CANAN et al., 2011, KASIM e EDWARDS, 1998) e do fósforo fítico representa aproximadamente 75,0% do total de fósforo (REDDY, 2002). Seu uso na alimentação de animais é limitado devido ao alto conteúdo de fibras insolúveis e de polissacarídeos não amídicos que reduzem a digestibilidade. Uma estratégia sugerida para não afetar o seu uso foi a inclusão de níveis entre 10 e 20% de farelo de arroz integral na dieta de animais monogástricos (GALLINGER, et al., 2004, SCHOULTEN, et al., 2003). Vários pesquisadores têm buscado adicionar ingredientes alternativos a alimentação para que possam promover ou garantir a qualidade da carne. O uso de farelo de arroz, rico em ácido fítico, pode ser uma alternativa viável, para a alimentação de animais monogástricos. Além de substituir parte do milho, componente que mais onera a ração, o elevado teor de ácido fítico presente pode atuar como um antioxidante sobre a estabilidade lipídica a carne de frango obtida.

## 2 OBJETIVOS

Investigar o efeito das variáveis tempo, temperatura e pH no processo de extração da fitase endógena do farelo de arroz integral.

Investigar o efeito das variáveis tempo, temperatura e teor de fitase endógena de farelo de arroz integral para a produção de farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico.

Investigar o efeito da adição de farelo de arroz integral e farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico em dietas de frangos de corte, na fase de terminação e avaliar o desempenho das aves e a qualidade da carne.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 FARELO DE ARROZ

No beneficiamento do arroz são obtidos vários subprodutos passíveis de agregar valor tecnológico e nutricional. Dentre esses, encontra-se o farelo de arroz, que é o produto proveniente do polimento do arroz descascado para produzir o arroz branco (MORO et al., 2004). Representa cerca de 8% do arroz integral e possui teores variáveis de amido provenientes do endosperma, de resíduos de casca e de fragmentos de grão. É um produto com teor variável de nutrientes, conforme a cultivar, sistema de beneficiamento, grau de polimento do arroz e do tratamento do grão antes beneficiamento (SOARES JÚNIOR et al., 2009).

O farelo de arroz apresenta ótima fonte de carboidratos, fibras, vitaminas, minerais, proteínas e lipídios. As fibras do farelo de arroz possuem boa capacidade de absorção de água e óleo e, por isso, podem contribuir para o desenvolvimento de uma enorme variedade de novos produtos industrializados (SOARES JÚNIOR et al., 2009). Além das vantagens relacionadas ao conteúdo de fibra alimentar no farelo de arroz, este, ao contrário dos farelos de trigo, aveia, cevada e centeio, não possui glúten, podendo, portanto, ser utilizado por pessoas intolerantes a esta proteína (LACERDA et al., 2010). Além disso, o farelo de arroz, também possui baixo índice glicêmico que faz com que os carboidratos sejam absorvidos lentamente, atenuando os picos glicêmicos após as refeições e promovendo maior saciedade (HEISLER et al., 2008).

Na composição do farelo de arroz há também compostos fenólicos que podem atuar como antioxidantes (MORO et al., 2004). O farelo de arroz possui alta concentração de fitinas (9,5 a 14,5%), matéria-prima fundamental para a obtenção de ácido fítico e fitatos (AMATO, 2006). Portanto, o ácido fítico do farelo de arroz pode ser utilizado como aditivo alimentar com função antioxidante (PESTANA et al., 2008). Desta forma, o farelo de arroz apresenta grande potencial para utilização na formulação de alimentos infantis, barras de cereais e outros produtos (HEISLER et al., 2008), embora a textura fibrosa, alto conteúdo de lipídios e 16 liberação de ácidos graxos sejam fatores limitantes que restringem a sua utilização na alimentação humana (ALENCAR e ALVARENGA, 1991).

O aproveitamento dos produtos do beneficiamento do arroz no Brasil ainda é incipiente e pouco diversificado. A casca e o farelo ainda são vistos como sinônimos de poluição ambiental. Nas regiões onde o arroz é altamente consumido, grandes quantidades de farelo são desprezadas (HEISLER et al., 2008; SOARES JÚNIOR et al., 2009). O fator limitante ao uso deste ingrediente nas dietas de animais monogástricos é a presença de fatores antinutricionais, como os polissacarídeos não-amiláceos, componentes não digeríveis por estes animais e que interferem na absorção intestinal dos lipídios (BRUM et al., 1993). A adição de farelo de arroz na alimentação de animais monogástricos, principalmente em aves é sugerida, sem prejuízo ao desempenho em até 20% (BRUM et al., 1993; SCHOULTEN et al., 2003; GALLINGER et al., 2004). No entanto, pesquisas que envolvem a viabilização da utilização do farelo de arroz, na alimentação humana, podem garantir ao consumidor um produto seguro, do ponto de vista nutricional, microbiológico e sensorial, além de auxiliar no planejamento de estratégias de promoção da saúde pública (LACERDA et al., 2010).

### 3.2 CARACTERÍSTICAS DO ÁCIDO FÍTICO

O ácido fítico ou ácido hexafosfórico mio-inositol ou 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexafosfato de hidrogênio mio-inositol (IUPAC – IUB, 1968) está amplamente presente em fontes vegetais e seu teor é elevado em grãos e sementes oleaginosas (FEBLES et al., 2002). O ácido fítico representa a principal forma de armazenamento de fósforo e é acumulado durante a maturação e disponibilizado na germinação da planta (REDDY, 2002; PRAZERES et al., 2004) como função de reserva de fósforo (LOPEZ et al., 2000) e cátions ou proteção contra danos oxidativos durante a dormência ou germinação (KAMAO et al., 2000). O mesmo ainda pode estar presente na forma livre, fitato (sal de cálcio do ácido fítico) ou fitina (sal de cálcio/magnésio do ácido fítico) dependendo do pH e íons metálicos presentes (OTAWAY, et al., 2001).

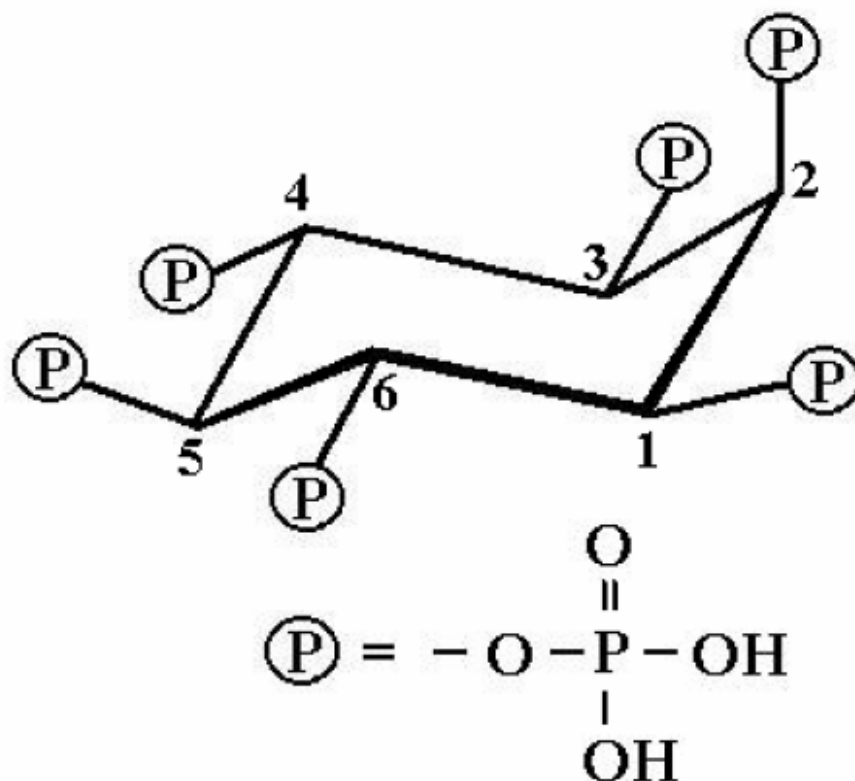
Usualmente é denominado de ácido fítico a forma livre do mio-inositol hexafosfato ou IP6. A forma aniônica do IP6 é denominada de fitatos e está presente nas plantas. O termo fitina refere-se especialmente aos complexos do IP6 com potássio, magnésio e cálcio e pode ligar-se a proteínas e amidos (ANGEL et al., 2002; SELLE e RAVINDRAN, 2007). Na forma livre o ácido fítico pode existir como

fitato (sal de cálcio do ácido fítico) ou fitina (sal de cálcio/magnésio do ácido fítico) dependendo do pH e íons metálicos presentes. A completa hidrólise do ácido fítico ou fitato produz inositol e fosfatos inorgânicos. Os fosfatos de inositol encontrados em grãos contêm ao redor de 90 % do inositol na forma hexafosfórica, correspondendo os 10 % restantes a somatória dos penta, tetra e trifosfatos (QUIRRENBACH, 2007). A estrutura química do ácido fítico foi proposta por Anderson (1914) citado por Erdman (1979). Blank et al. (1971) utilizaram análises cristalográficas de raio X e destacaram a estrutura do ácido fítico como éster hexaortofosfato de mio-inositol com grupos fosfatos C1, 3, 4, 5 e 6 na posição axial e C2 na posição equatorial. Costello et al. (1976) empregaram ressonância nuclear magnética e propuseram a conformação de cadeira do mio-inositol hexafosforilado em soluções (Figura 1).

O ácido fítico é uma molécula carregada negativamente em ampla faixa de pH e possui 12 prótons substituíveis (TSAO et al., 1997), é inerte e estável na forma sólida e pode ser estocado por muitos anos em solução aquosa, neutra, ou em solução alcalina a 5 °C pode ser conservado por vários meses sem se decompor. As seis ligações éster fosfóricas apresentam alta energia potencial. A liberação de 50 % do fósforo requer hidrólise ácida com HCl 5 N a 100 °C por 6 h em solução de pH 12 (GRAF e EATON, 1990). Estudos *in vitro* indicaram que o mio-inositol hexafosfato (IP6) e seus derivados, o IP5, IP4 e IP3, ligam-se a íons metálicos em pH similar ao pH do duodeno. A capacidade de ligação do inositol fosfato aos íons metálicos é dependente do número de grupos fosfatos desprotonados da molécula (PERSON et al.; 1977).

A degradação do ácido fítico ocorre durante o processamento do alimento e também no trato gastrointestinal. Esta degradação é de grande importância nutricional, pois a ligação do ácido fítico com os minerais diminui, aumentando a solubilidade quando os grupos fosfatos são removidos do anel inositol e como consequência há o aumento da biodisponibilidade dos minerais (SANDBERG, 2002). O conteúdo de ácido fítico pode ser reduzido por processos como maceração, germinação (AGOSTINI et al., 2010), fermentação (BEAL e MEHTA, 1985) ou outros processos. O cozimento também pode ativar a fitase endógena e hidrolisar o ácido fítico (BULLOCK et al., 1993).

**Figura 1** – Estrutura do ácido fítico em solução (COSTELLO et al., 1976)



O ácido fítico está presente em vários grãos como centeio (HARLAND E OBERLEAS, 1987), trigo, aveia, milho (KASIM e EDWARDS, 1998) e arroz (JOUNG et al., 2004). O mesmo ocorre de forma simultânea com seus sais e normalmente não se faz distinção entre as suas formas. O teor é maior nas camadas externas do grão (aproximadamente 88 %), estando associado principalmente à camada de aleurona. Devido a isto, o polimento resulta em redução significativa na concentração, sendo que o arroz branco polido apresenta 0,065 % de ácido fítico, comparando a 0,78 % no arroz integral (WALTER et al., 2008). No arroz, este composto está distribuído em seus diferentes componentes, com 80 % concentrado no aleurona e pericarpo, 7,6 % no germe e 1,2 % no endosperma (O'DELL et al., 1972). Nas diversas espécies vegetais 90 % do ácido fítico está localizado na camada aleurônica e o restante 10 % no embrião (QUIRRENBACH, 2007). O farelo de arroz é constituído de pericarpo, aleurona e germe, apresentando elevado teor de ácido fítico que varia de 5,94 a 7,00 % (KASIM e EDWARDS, 1998; CANAN et al., 2011).

O ácido fítico possui ação quelante de minerais como cobre, cálcio, magnésio, zinco e ferro. A maior parte dos complexos formados com o ácido fítico é insolúvel, tornando-os indisponíveis para a absorção em condições fisiológicas normais (SATHE e REDDY, 2002). A natureza iônica do ácido fítico permite que o mesmo possa se ligar diretamente com grupos de proteínas carregados positivamente ou indiretamente com grupos carregados negativamente, quando mediado por um mineral com carga positiva, como o cálcio, por exemplo. Os complexos minerais formados, proteína-fitato e fitato-mineral-proteína, são insolúveis que dificulta a hidrólise durante a digestão e conseqüentemente diminuindo a digestibilidade e biodisponibilidade da proteína (SATHE e REDDY, 2002). A solubilidade do ácido fítico é apontada como dependente do pH e proporção da taxa molar de minerais e do ácido. O fitato também é capaz de se combinar com o amido por meio de ligações de pontes de hidrogênio com o grupo fosfato, resultando no decréscimo de sua solubilidade e biodisponibilidade (SATHE e REDDY, 2002).

O efeito de redução na biodisponibilidade de minerais em dietas ricas em ácido fítico foi observado pela formação de complexos fitato-mineral ou proteína-mineral-fitato que são altamente insolúveis. Quando os complexos formados incluem proteínas, ocorre uma redução na biodisponibilidade de proteínas ou redução da atividade de enzimas. Os principais fatores que determinam a complexação de fitato-mineral são o pH, tamanho e valência do mineral, concentração e proporção de fitato e mineral e também o meio ou a matriz alimentar (WEAVER e KANNAN, 2002).

O poder quelante dos fitatos aumenta com o aumento do número atômico do mineral. Já a estabilidade do complexo fitato-mineral formado apresenta a seguinte ordem:  $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Ca^{2+}$ . Portanto, o zinco é o mineral mais afetado (WEAVER e KANNAN, 2002).

### 3.3 APLICAÇÕES E USOS DO ÁCIDO FÍTICO

O ácido fítico tem sido considerado como um fator antinutricional devido à interação com minerais que reduzem a biodisponibilidade no organismo. Dentre estes estudos, diversas pesquisas avaliaram a biodisponibilidade de zinco em alimentos e verificaram que o ácido fítico possui ação negativa sobre o zinco e

na presença de cálcio ocorreu a formação de um complexo insolúvel cálcio-ácido fítico-zinco (ZHOU E ERDMAN, 1995; ADEYEYE et al.; 2000, MA et al., 2005; FRENDLUND et al., 2006). Esta característica está relacionada á dietas compostas basicamente de sementes, grãos e vegetais (LOTT et al., 2002).

Entretanto, o ácido fítico tem apresentado efeitos benéficos em indivíduos que se alimentam com grande quantidade de carne vermelha, pois reduz a biodisponibilidade de ferro, e este, presente em grande quantidade em carnes, pode estar associado a fatores que desencadeiam diversos tipos de câncer (WEINBERG, 1994).

O mecanismo de ação ácido fítico como anticancerígeno possivelmente está associada a inibição da alteração genética ou pela sua propriedade antioxidante (FOX e EBERL, 2002). O efeito inibidor do ácido fítico foi confirmado por meio de ensaios com ratos sobre os vários tipos de câncer, como de mama (SHAMSUDDIN e VUCENIK, 1999), fígado (VUCENIK et al., 1998), próstata (SHAMSUDDIN e YANG, 1998), sarcoma (VUCENIK et al., 1998), pele (BODE e DONG, 2000) e cólon (JENAB e THOMPSON, 2002; VERGHESE et al., 2006). Porém, este mecanismo de ação não foi totalmente esclarecido (JENAB e THOMPSON, 2002), devido a baixa incidência de câncer, principalmente, de próstata e mama em homens e mulheres japoneses, respectivamente, que foi associada ao grande consumo de alimentos ricos em fibras e conseqüentemente ácido fítico (ZHOU e ERDMAN, 1995). FOX e EBERL (2002) concluíram que a capacidade quelante do ferro, magnésio e zinco inibiu a reações oxidativas, restringindo o dano ao DNA e limitando o crescimento de tumores e de células cancerígenas.

Os alimentos ricos em ácido fítico apresentam efeito hipocolesterolêmico, e ainda efeito sobre tratamento das diabetes (JENAB e THOMPSON, 2002; LEE et al., 2006). O efeito ocorre devido a inibição da digestão do amido, ligações do amido por pontes de hidrogênio, ligação com proteínas ou inibição da digestão devido a ligação com a amilase ou cofatores enzimáticos como o  $\text{Ca}^{++}$  (JENAB e THOMPSON, 2002).

Em humanos, o ácido fítico apresenta efeito inibidor na absorção de cálcio (RIMBACH et al., 1995), porém alguns pesquisadores não verificaram o mesmo efeito em sistemas modelos utilizando ratos. A reação entre o ácido fítico e o



cálcio provoca a formação de complexos de fitato pouco solúveis para as fitase. Uma alimentação rica em cálcio pode causar a calcificação nos rins. Em experimento realizado com ratas foi observado que a ingestão de alimentos ricos em ácido fítico preveniu a formação de cristais de cálcio e consequentes problemas renais (GRASES et al., 2000).

O ácido fítico é tem sido investigado como antioxidante em alimentos devido a sua capacidade quelante (, MINIHANE E RIMBACH, 2002; AHN et al., 2003; AHN et al., 2004; POKORNY et al., 2005). A capacidade antioxidante está associada com a habilidade do fitato quelar os minerais, principalmente o ferro. A formação de radical hidroxil mediada pelo ferro é inibida, pois o ferro ligado ao fitato torna-o cataliticamente inativo (GRAF e EATON, 1985). Assim, os materiais biológicos altamente sensíveis ao oxigênio são preservados pela reação de Fenton (GRAF et al., 1987). O ácido fítico altera o potencial redox do ferro mantendo-o na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e neste estado é relativamente inerte. O ferro na forma ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) é mais reativo e produz oxirradicais e peróxidos de lipídios (, GRAF et al., 1987; EMPSON et al., 1991; FILGEIRAS et al. 2009).

A atividade antioxidante do ácido fítico em carnes tem sido comprovada. A adição de 0,75 mmol/L de ácido fítico em carne de frango ocasionou menor mudança oxidativa desencadeada pelo ferro e consequentemente menos peroxidação lipídica (EMPSON et al. 1991). Comparando o ácido fítico com o ascorbato, BHT e EDTA em carne homogeneizada, Lee e Hendricks (1995) verificaram que o ácido fítico foi mais efetivo para a peroxidação lipídica, pois possivelmente maior quantidade de ferro foi oxidado formando quelatos que são cataliticamente inativos. Avaliando o potencial antioxidante do ácido fítico em relação ao pirofosfato de sódio e tripolifosfato de sódio, a ação destes antioxidantes foi 22 similar em carnes cruas armazenadas a 2 °C por um dia. Porém, em carnes cozidas reestruturadas o ácido fítico foi mais efetivo (LEE et al., 1998).

O potencial antioxidante de 5 mM de ácido fítico adicionado a carnes suínas e bovinas cruas e cozidas cruas foi comprovado, sendo que a formação de metamioglobina foi inibida em carne crua e a inibição da oxidação lipídica foi maior nas carnes cozidas (STODOLAK, et al., 2007). Ao avaliar as carnes de frango adicionados de ácido fítico armazenadas por 5 dias a 6 °C provenientes de aves receberam dietas suplementadas com vitamina E, foi constatado que ocorreu 95 %

inibição de desenvolvimento de aroma de requeijado. Os resultados indicaram possível sinergismo entre o ácido fítico que atuou na fase de propagação e a vitamina E que foi efetiva na fase inicial da peroxidação lipídica (SOARES et al., 2004).

A adição de fontes ricas em ácido fítico em dietas de animais monogástricos apresenta potencial antioxidante endógeno nas carnes obtidas. A utilização de gérmen de milho desengordurado nas dietas de suínos na fase de terminação inibiu a oxidação lipídica nas carnes congeladas por 30 dias, sendo que o desempenho animal não foi afetado (HARBACH et al., 2007). A adição de farelo de gérmen de milho desengordurado em dietas de suínos exerceu influência positiva sobre a estabilidade lipídica do lombo e da lingüiça tipo frescal, agindo como um antioxidante endógeno (PACHECO, 2010).

#### 3.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE FITASES E APLICAÇÕES

As fitases (mioinositol-hexafosfato fosfohidrolase) são fosfatases que possuem capacidade de hidrolisar grupos fosfatos do ácido fítico (KIES et al., 2001, KONIETZNY, et al., 2002). Apresentam especificidades diferentes para hidrolisar os grupos de fosfato do fitato, resultando em diferentes isômeros de inositol penta-fosfatos, inositol e fósforo inorgânico. Existem duas classes de fitases, a 3-fitase e 6-fitase devido a sua especificidade em relação à posição do primeiro fosfoéster a ser hidrolisado. A 3-fitase remove inicialmente um grupo ortofosfato da posição C3, enquanto a 6-fitase realiza a remoção na posição C6 da molécula de mioinositol hexafosfato. A maioria das 3-fitases são de origem microbiana com exceção da fitase da soja, e a 6-fitase normalmente encontra-se nas plantas com exceção da fitase obtida da *Escherichia coli* (PANDEY et al., 2001; KONIETZNY e GREINER, 2002; SELLE e RAVINDRAN, 2006;).

A reação de desfosforilação realizada pela fitase converte o ácido fítico em ácido fosfórico, inositol livre, e/ou compostos intermediários incluindo ésteres de inositol mono-, bi-, tri-, tetra, e penta-fosfato (IP1-IP5) dependendo do grau de desfosforilação. A sequência da reação de degradação do ácido fítico é: IP6 → IP5 → IP4 → IP3 → IP2 → IP1 → inositol (DASGUPTA et al., 1996; KONIETZNY e GREINER, 2002).

A atividade enzimática da fitase é determinada utilizando sais de ácido fítico e permite distinguir fitase de outras fosfatases ácidas, que são incapazes de degradar o fitato. No entanto, a especificidade do substrato para fitase pode variar devido a diferenças nas características moleculares de enzimas purificadas de diferentes fontes (WYSS et al., 1999). Para determinar a atividade da fitase é mensurada a quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado pela ação da enzima. Uma unidade de atividade da enzima pode ser definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um  $\mu\text{mol}$  de Pi por minuto de reação nas condições de pH, temperatura e concentração de fitato em que foram realizados os testes, sendo que não existe uma condição padrão para medida da atividade de fitase, o que dificulta a comparação da eficácia de fitases de diferentes fontes (SELLE e RAVINDRAN, 2006).

O método de determinação da atividade da fitase é utiliza a hidrólise do fosfato inorgânico e reação de cor medida por espectofotometria. As determinações colorimétricas baseiam-se principalmente na redução de um complexo fosfomolibdato por sulfato ferroso ou ácido ascórbico produzindo um complexo com molibdênio de coloração azul (ENGELEN, et al., 1994). Outro método utilizado é o do ácido ascórbico de Fiske e Subbarow (1925), com adaptações para determinação da atividade de fitase (HEINONEN e LAHTI, 1981; SEGUEILHA et al., 1992; LAMBRECHTS et al., 1993 e 1992; BINDU et al., 1998; BAE et al., 1999; CASEY e WALSH, 2004; VATS e BANERJEE, 2006; SINGH e SATYANARAYANA, 2006).

As fitases obtidas de grãos apresentam maior atividade quando estão associadas com a aleurona e em menor extensão com o endosperma e escutelo. As fitases de cereais apresentam atividades variadsa em relação ao tipo de processamento do cereal, sendo que a maior atividade foi descrita nas fitases obtidas do centeio e a menor atividade no trigo, aveia e milho. As atividades da fitase pode apresentar variação conforme variedades e estação do ano (EKLUND-JONSSON et al., 2006), e aumenta consideravelmente com a germinação (AGOSTINI, et al., 2010) porém, com grandes diferenças entre os diferentes cereais, podendo sua atividade ser aumentada de 4,5, 2,5 e 9,0 vezes na trigo, centeio e aveia, respectivamente (BARTNIK e SZAFRANSKA, 1987). A ativação da fitase endógena de cereais reduz substancialmente o conteúdo de fitato.

A maioria das fitases isoladas é ativa dentro da faixa de pH 4,5 – 6,0. As fitases podem ser classificadas de acordo com o pH ótimo de atividade, podendo agir em pH em torno de 5,0 (ácidas) ou ainda em torno de 8,0 (alcalinas). A estabilidade de enzimas de plantas decresce drasticamente em valor de pH abaixo de 4 ou maior do que 7,5, enquanto que a maioria das fitases de origem microbiana conserva a atividade a valor de pH abaixo de 3,0 e acima de 8,0 (KONIETZNY e GREINER, 2002). Essa grande diferença em seus valores de pH ótimo pode ser parcialmente ou totalmente refletida na variação da estrutura molecular ou especificidade da enzima dependendo da fonte (POINTILLART, 1997).

As fitases geralmente apresentam massa molecular entre 40 e 100 kDa e temperatura ótima de atividade na faixa de 45 – 60°C (PANDEY et al., 2001). A maioria das enzimas de plantas é inativada irreversivelmente em temperatura superior a 70°C, enquanto que as microbianas retêm atividade significativa após períodos prolongados de incubação (KONIETZNY e GREINER, 2002). As fitases isoladas de fungos são relatadas como resistentes a altas temperaturas (SEGUEILHA et al., 1992).

A adição de fitase à rações ricas em ácido fítico pode aumentar a digestibilidade dos minerais (POINTILLART, 1997; FIREMAN e FIREMAN, 1998), melhorar o desempenho dos animais alimentados, devido a disponibilidade de fósforo em níveis adequados. As fitases também podem melhorar a utilização de outros nutrientes para aumentar a maior disponibilidade de minerais e melhorar utilização de proteínas, aminoácidos com o aumento de energia nos animais. Segundo LEI e PORRES (2003), a utilização da enzima pode reduzir a excreção total de fósforo entre 30 a 50 %.

### 3.5 OXIDAÇÃO LÍPIDICA EM CARNES

A carne de frango é a carne mais consumida no Brasil, totalizando em 2011, 47,40kg *per capita* (UBABEF, 2012), sendo, portanto, classificada como alimento saudável, de alto valor nutritivo (VENTURINI et al., 2007). Porém, é um alimento altamente susceptível a oxidação lipídica em função do elevado teor de ácidos graxos insaturados na sua composição (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2009).

Os lipídios são importantes componentes dos produtos cárneos, conferindo características sensoriais desejáveis. Contudo, são facilmente oxidáveis,

levando a rancificação com produção de substâncias indesejáveis e compromete a validade e qualidade do produto final (OLIVO et al., 2006). Os lipídios de produtos cárneo são constituídos de uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e outras substâncias lipossolúveis. Desses constituintes, muitos são oxidáveis em diferentes graus, contudo os ácidos graxos insaturados são os constituintes mais susceptíveis ao processo oxidativo (IGENE et al., 1980).

A oxidação lipídica pode ser acelerada pelo processamento da carne e também na estocagem, corte e cozimento, os quais rompem as membranas celulares do músculo, facilitando a interação dos ácidos graxos insaturados com substâncias pró-oxidantes (PADILHA, 2007). A presença de hemoglobina, mioglobina, citocromo C, ferro não heme e metais de transição aceleram a oxidação lipídica, e conseqüentemente é um fator limitante na qualidade e aceitabilidade de carnes e produtos cárneos (MORRISSEY et al., 1998; HUR et al., 2007; ARAÚJO, 2008). O ferro e os demais metais de transição presentes na composição podem reagir com radicais livres formando o radical hidroxil (OH•), altamente reativo. Esse radical provoca danos em proteínas, ácidos nucléicos e em outras biomoléculas e retira o hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados (GRAF et al., 1987).

Assim, a oxidação desses componentes, é uma das causas primárias da deterioração da cor, textura e sabor da carne fresca, congelada ou cozida (LIU et al., 1995). O processo de rancidez desencadeia substâncias com efeito potencialmente citotóxico, carcinogênico e mutagênico como o malonaldeído e óxidos de colesterol, além da perda do valor nutricional devido à destruição de vitaminas e ácidos graxos essenciais (GRAY et al., 1996; MORRISSEY et al., 1998). Outros produtos da oxidação lipídica que também podem ser originados são as cetonas, aldeídos, alcoóis, hidrocarbonetos e ácidos, os quais são responsáveis pelo odor e sabor característico de ranço (OLIVO et al., 2006). Os lipídios podem ser oxidados de diferentes formas, em função do meio e dos agentes catalisadores, os mecanismos mais conhecidos são a oxidação por enzimas, fotoxidação e autooxidação (St. ANGELO, 1996).

A oxidação por enzimas ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases, as quais atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada. Os produtos iniciais

consistem de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, que podem envolver em diferentes reações degradativas (PERSON et al., 1977).

O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação ultravioleta em presença de clorofila, mioglobina, riboflavina e outros que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ), gerando o estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ). O oxigênio singlete reage diretamente com as ligações duplas formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, alcoóis e hidrocarbonetos (FERNANDEZ et al., 1997, ARAUJO, 2008).

Na oxidação em alimentos o mecanismo é a autoxidação, está associada à reação de oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. A reação inicial ocorre quando o átomo de hidrogênio é removido do grupo metileno do ácido graxo insaturado, formando radical livre (St. ANGELO, 1996). Durante a propagação, os radicais livres formados na etapa de iniciação são convertidos em outros radicais, formando o radical peroxil, que são produtos primários da oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) (PERSON et al., 1977). Na etapa de terminação, ocorre a interrupção das reações devido à redução de ácidos graxos insaturados no sistema, fazendo com que os radicais livres liguem-se entre si formando compostos estáveis (IGENE e PEARSON, 1979). Esses compostos formados são os produtos secundários de oxidação, obtidos por rearranjo e cisão dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis), cuja natureza e proporção dependem de diversos fatores (GRAF e EATON, 1990).

O fenômeno oxidativo atinge principalmente os ácidos graxos polinsaturados, que são componentes da estrutura da membrana de tecidos biológicos como a carne, com possibilidade efetiva de alterar a qualidade do produto final quanto ao sabor. Em razão da crescente preocupação dos consumidores em exigir uma dieta saudável, é importante que ocorra a inibição da rancidez oxidativa. Os processos empregados durante a elaboração dos produtos cárneos associados ao elevado teor de ácidos graxos insaturados e a presença de mioglobina tornam as carnes um alimento propício à ocorrência da rancidez (GRAY et al., 1996).

A estabilidade das carnes e derivados é um fator limitante na cadeia produtiva de todos envolvidos, incluindo produtores, indústrias, distribuidores e

consumidores. Inibir a oxidação da carne é uma alternativa para garantir atributos como sabor, cor, textura e valor nutritivo. A estabilidade oxidativa da carne depende do equilíbrio entre antioxidante e composição dos substratos de oxidação, incluindo ácidos graxos polinsaturados, colesterol, proteínas e pigmentos (MORRISSEY *et al.*, 1998).

Medidas de controle para a minimização da oxidação lipídica devem ser sempre aplicáveis, como a remoção do oxigênio, inativação das enzimas, proteção contra a luz e íons metálicos (BRUM, 2009) ou adição de antioxidantes. A interação entre antioxidantes pode contribuir na redução dos ácidos graxos. A oxidação causada pelo ozônio em produtos cárneos foi inibida através do uso antioxidantes (CHIATTONE, 2010).

Para minimizar a oxidação lipídica de carnes, uma alternativa é a suplementação das rações animais com substâncias antioxidantes que podem proteger os músculos desta reação. Diversos cereais possuem em sua composição componentes com propriedades antioxidantes. Dentre estes antioxidantes destaca-se o ácido fítico que encontra-se naturalmente presente nos vegetais (MINIHANE E RIMBACH, 2002, AHN *et al.*, 2003; AHN *et al.*, 2004; POKORNY *et al.*, 2005).

### 3.6 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são um conjunto de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais, outros compostos vegetais e ainda enzimas que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres (MESSIAS, 2009). Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*, EUA), os antioxidantes são substâncias empregadas para preservar alimentos, pois retardam a deterioração, rancidez ou descoloração devido a oxidação. O efeito antioxidante consiste em inativar os radicais livres, absorver oxigênio e quelar íons metálicos (St. ANGELO, 1996; ARAÚJO, 2008). A geração de radicais livres produz danos aos ácidos graxos insaturados devido à formação dos radicais peróxidos e o oxigênio singleto. A atividade antioxidante consiste em evitar a propagação dos radicais peróxidos evitando continuidade da reação de oxidação (COHEN *et al.*, 2000).

Os antioxidantes são comumente usados para inibir, prevenir ou retardar a deterioração pela oxidação, podendo atuar na redução dos radicais livres (antioxidante primário) ou por um mecanismo que não envolve a redução direta dos

radicais livres (antioxidante secundário). Os antioxidantes primários, como os compostos fenólicos, são consumidos durante a fase de iniciação. Os antioxidantes secundários atuam por uma variedade de mecanismos incluindo a ligação com íons metálicos, a redução de oxigênio, a conversão de hidroperóxidos a espécies não radicais, a absorção de radiação ultravioleta ou a desativação do oxigênio singlete (POKORNY et al., 2005).

Os antioxidantes são encontrados naturalmente nos alimentos ou são adicionadas intencionalmente para retardar a oxidação e manter suas características sensoriais. Os antioxidantes naturais, presentes em frutas e vegetais, mostram evidências que podem atuar em benefício da saúde, com a atenuação de doenças cardiovasculares e a prevenção do câncer (HUR, et al., 2007). Além disso, podem ser mais efetivos no controle da oxidação lipídica nos alimentos. Nos alimentos, os antioxidantes naturais têm capacidade de funcionar como inibidores de radicais livres, como quelantes ou sequestrantes do oxigênio singlete, como agentes redutores e como desativadores de metais pró-oxidantes (POKORNY et al., 2005). Portanto, atualmente, tem se dado maior atenção para o uso de antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos, visto que estes estão muitas vezes relacionados a efeitos adversos à saúde (HUR, et al., 2007). Os aspectos toxicológicos dos antioxidantes têm sido discutido com controversos sobre a segurança dos aditivos de alimentos. Assim, a procura por antioxidantes naturais foi impulsionado na década de 80 diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de BHT (hidroxi butil tolueno), BHA e TBHQ (t-butilhidroquinona) sobre o peso do fígado e pela proliferação do retículo endoplasmático. Como consequência, ênfase foi dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, como alternativas para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos (CAMPOS, 1996).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Matéria-Prima

Foi utilizado como matéria-prima o farelo de arroz integral variedade IRGA 417, safra (2008/2009) cultivada no município de Santo Antonio da Patrulha-RS, fornecida pelo Instituto Riograndense de Arroz (IRGA). Este farelo de arroz integral com elevado teor de ácido fítico foi mantido a  $-5^{\circ}\text{C}$  até a utilização.

Foram utilizadas 260 aves da linhagem Cobb que foram confinadas e abatidas na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. Os peitos de frango foram utilizadas para análise.

#### 4.1.2 Reagentes

Foi utilizado como padrão o ácido fítico de arroz com pureza  $> 90\%$  (P0109 -Sigma-Aldrich, St. Louis) e os demais reagentes foram de grau analítico de diferentes procedências.

### 4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 4.2.1 Processo de Extração da Fitase Endógena do Farelo de Arroz Integral

A fitase endógena foi obtida do farelo de arroz integral por meio da extração em  $\text{CaCl}_2$  2% na proporção de 1:10 (peso:volume), conforme descrição de Lolas e Markakis (1877) e aplicando o delineamento composto central ortogonal. As variáveis independentes investigadas foram pH (X1), temperatura em  $^{\circ}\text{C}$  (X2), tempo em min. (X3). A Tabela 1 apresenta a matriz do delineamento com dois blocos. A Tabela 2 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis de variação. Os ensaios foram conduzidos aleatoriamente em duplicata, dentro de cada bloco. Conforme o delineamento, a extração da fitase endógena de cada ensaio foi realizada em incubadora tipo *shaker* com rotação de 1,78 x g. O material foi centrifugado a 9000 x g por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  e assim obtido o extrato contendo a fitase

endógena bruta. A função resposta investigada foi  $Y_1 =$  unidade de atividade de fitase  $g^{-1}$  farelo de arroz integral.

**Tabela 1** – Delineamento Composto Central Ortogonal com as variáveis independentes para o processo de extração da fitase endógena do farelo de arroz integral.

Ensaio	Blocos	Variáveis independentes		
		pH ( $x_1$ )	°C ( $x_2$ )	min. ( $x_3$ )
1	1	-1 (4,5)	-1 (6)	-1 (30)
2	1	-1 (4,5)	0 (10)	1 (90)
3	1	-1 (4,5)	1 (14)	0 (60)
4	1	0 (5,0)	-1 (6)	1 (90)
5	1	0 (5,0)	0 (10)	0 (60)
6	1	0 (5,0)	0 (10)	0 (60)
7	1	0 (5,0)	1 (14)	-1 (30)
8	1	1 (5,5)	-1 (6)	0 (60)
9	1	1 (5,5)	0 (10)	-1 (30)
10	1	1 (5,5)	1 (14)	1 (90)
11	2	-1,763(4,12)	0 (10)	0 (60)
12	2	1,763(5,88)	0 (10)	0 (60)
13	2	0 (5,0)	-1,763 (2,9)	0 (60)
14	2	0 (5,0)	1,763(17,1)	0 (60)
15	2	0 (5,0)	0 (10)	-1,763(7,2)
16	2	0 (5,0)	0 (10)	1,763(112,9)

Foi utilizado o programa STATISTICA 7.0 para análise da regressão conforme o modelo da equação 1.

$$Y_1 = \beta_0 + \beta_j + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + e$$

Equação 1

Onde:

$Y_1$  = função-resposta expressa como UA de fitase  $g^{-1}$  farelo de arroz integral;  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  = variáveis codificadas;  $\beta$  = coeficiente estimado para cada termo;  $\beta_j$  = coeficiente estimado do bloco para o modelo de superfície de resposta;  $e$  = resíduo.

A partir do modelo proposto foi construída a superfície de resposta e obtidas as condições ótimas de extração da fitase endógena. Para validar o modelo proposto, foi realizados ensaios em triplicata nas condições ótimas e comparado com a resposta estimada pelo modelo.

**Tabela 2** – Variáveis independentes e níveis de variação para o processo de extração da fitase endógena do farelo de arroz integral.

<b>Variáveis independentes</b>	<b>- 1,763</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+ 1</b>	<b>+ 1,763</b>
pH( $X_1$ )	-4,12	4,5	5,0	5,5	5,8
temperatura, °C ( $X_2$ )	-2,9	6	10	14	17,1
tempo, min ( $X_3$ )	7,2	30	60	90	112,9

#### 4.2.2 Obtenção do Farelo de Arroz com Baixo Teor de Ácido Fítico

Para a obtenção do farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico foi aplicado o delineamento Box-Behnken para hidrólise do ácido fítico. Para a hidrólise as variáveis independentes investigadas foram tempo em min ( $X_4$ ), temperatura de incubação em °C ( $X_5$ ) e adição de UA de atividade de fitase / g de farelo de arroz integral ( $X_6$ ). A Tabela 3 apresenta a matriz do delineamento e a Tabela 4 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis de variação. Os ensaios foram conduzidos aleatoriamente em duplicata.

Conforme o delineamento, a hidrólise do farelo de arroz integral de cada ensaio foi realizada em incubadora tipo shaker com rotação de 180rpm em tampão acetato 0,6M em pH 5,3. O material foi secado em estufa a 60°C por 48h e triturados em moinho de facas (30mesh). A função resposta investigada foi  $Y_2$  = teor de ácido fítico residual expresso em  $\mu g$  de ácido fítico  $g^{-1}$  farelo de arroz integral.

Foi utilizado o programa STATISTICA 7.0 para análise da regressão conforme modelo da equação 2.

$$Y_2 = \beta_0 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_4 X_4^2 + \beta_5 X_5^2 + \beta_6 X_6^2 + \beta_{45} X_4 X_5 + \beta_{46} X_4 X_6 + \beta_{56} X_5 X_6 + e$$

(Equação 2)

Onde:

$Y_2$  = função-resposta expressa ( $\mu\text{g}$  de ácido fítico residual / g farelo de arroz integral);  $X_4$ ,  $X_5$  e  $X_6$  (variáveis codificadas);  $\beta$  (coeficientes estimado para o modelo de superfície de resposta); e (resíduo).

**Tabela 3** – Delineamento Box-Behnken com as variáveis independentes, para a hidrólise do ácido fítico do farelo de arroz integral.

Ensaio	Variáveis independentes		
	h $X_4$	$^{\circ}\text{C}$ $X_5$	UA* $X_6$
1	-1 (12)	-1 (40)	0 (18)
2	1 (36)	-1 (40)	0 (18)
3	-1 (12)	1 (50)	0 (18)
4	1 (36)	1 (50)	0 (18)
5	-1 (12)	0 (45)	-1 (6)
6	1 (36)	0 (45)	-1 (6)
7	-1 (12)	0 (45)	1 (30)
8	1 (36)	0 (45)	1 (30)
9	0 (24)	-1 (40)	-1 (6)
10	0 (24)	1 (50)	-1 (6)
11	0 (24)	-1 (40)	1 (30)
12	0 (24)	1 (50)	1 (30)
13	0 (24)	0 (45)	0 (18)

\*atividade de fitase / g de farelo de arroz integral

**Tabela 4** – Variáveis independentes e níveis de variação para a hidrólise do ácido fítico do farelo de arroz integral.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	+ 1
h (X <sub>4</sub> )	12	24	36
°C (X <sub>5</sub> )	40	45	50
UA* (X <sub>6</sub> )	6	18	30

\*atividade de fitase / g de farelo de arroz integral

Após examinar a superfície de resposta e obtidas as condições ótimas experimentais de hidrólise do ácido fítico do farelo de arroz integral, o modelo proposto foi validado realizando ensaios em triplicata.

#### 4.2.3 Determinação da Atividade da Fitase Endógena do Farelo de Arroz Integral

A atividade da fitase endógena no extrato bruto foi determinada seguindo a metodologia descrita por Lolas e Markakis (1977). Neste procedimento foram utilizados 850 µL de tampão acetato 0,6 M pH 5,3, 150 µL de fitato de sódio de arroz 8 mM pH 5,3 (P0109 -Sigma-Aldrich) e 200 µL de extrato contendo a fitase endógena bruta. A mistura foi incubada por 30 min em banho-maria a 50°C. Para interromper a reação, foram adicionados 300µL de ácido tricloroacético 2,1 M. O material foi centrifugado a 200 rpm por 10 min. A determinação do fósforo inorgânico (Pi) foi realizada a partir do sobrenadante conforme o método do molibdato de amônio modificado por Heinonen e Lahti (1981). Uma unidade internacional (1UA) de atividade da fitases foi definida como produção de 1 µmoL de Pi/min nas condições do ensaio. O nível de atividade da fitase (UA / g) foi definido como a relação entre a atividade da enzima e quantidade em g de amostra.

#### 4.2.4 Determinação do Teor de Ácido Fítico

O teor de ácido fítico residual do de farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico foi quantificado conforme metodologia descrita por Latta e Eskin (1980) e reação entre o cloreto férrico e ácido sulfosalicílico. Foi utilizado a resina

Dowex-AGX-4 conforme descrito por Ellis e Morris (1986). O teor de ácido fítico foi expresso como  $\mu\text{g}$  de ácido fítico residual  $\text{g}^{-1}$  de farelo de arroz integral.

#### 4.2.5 Análise Estatística

A análise de regressão e análise de variância (ANOVA) foi realizada com o programa STATISTICA versão 7.0 (Statsoft, 2004). O teste t de Student foi utilizado para determinar as diferenças entre as médias, e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e considerados significativamente diferentes quando  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2.6 Efeito da Adição do Ingrediente de Farelo de Arroz Integral com Alto e Baixo Teor de Ácido Fítico na Dieta de Frangos de Corte

##### 4.2.6.1 Aves e preparo das rações

Foram utilizados 260 pintainhos machos de um dia da linhagem Cobb que foram alimentados com dieta comercial até 36 dias. Na fase de terminação, as aves foram divididas aleatoriamente em cinco tratamentos ( $n=52$ ) com quatro repetições com 13 aves por repetição, sendo que as dietas compreenderam: controle comercial, FAI5 -adição de 5% farelo de arroz integral, FAI10-adição de 10% farelo de arroz integral, FBAF5 -adição de 5% farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico e FBAF10-adição de 10% farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico. O peso médio das 13 aves de cada repetição foi de  $2,181 \text{ kg} \pm 0,955$ . Todas as rações preparadas foram isoproteicas e isoenergética. As formulações foram preparadas de acordo com a demanda nutricional específica para esta fase conforme descrito na Tabela 5 (Rostagno et al., 2005). Água e ração foram oferecidas *ad libitum*.

Foram retirados quatro frangos de cada repetição, sendo que foram escolhidas aves que apresentavam peso médio que foi de  $2,626 \text{ kg} \pm 0,719$ . O abate foi realizado na fazenda-escola da Universidade Estadual de Londrina utilizando técnicas de abate comercial com insensibilização elétrica, sangria, escaldagem, evisceração, toalette finale resfriamento em imersão com H<sub>2</sub>O e gelo.

#### 4.2.6.2 Determinação do ácido fítico nas rações

O teor ácido fítico das rações foi quantificado conforme descrito no item 4.2.4.

#### 4.2.6.3 Avaliação do desempenho das aves

As aves e as sobras de ração foram pesadas aos 36 e 42 dias de criação. Foi avaliado o ganho de peso, o consumo de ração, conversão alimentar na fase de terminação.

**Tabela 5 –** Composição das dietas fornecidas aos frangos de corte na fase de terminação.

Ingredientes	Controle	FAI5	FAI10	FBAF5	FBAF10
Milho	69,44	63,94	58,44	64,27	59,01
Soja	25,52	24,93	24,33	24,86	24,22
Farelo de arroz integral	0	5,00	10,00	0	0
Farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico	0	0	0	5,00	10,00
Óleo de soja	2,44	3,48	4,53	3,38	4,34
Calcário	0,64	0,68	0,72	0,95	1,19
Sal	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
Fosfato	0,88	0,81	0,74	0,38	0
DL- methionina	0,14	0,16	0,19	0,16	0,19
L- lysina	0,12	0,16	0,19	0,16	0,19
L- threonina	0	0,02	0,04	0,02	0,04
Premix*	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Calculada</b>					
Energia metabolizável (kcal/kg)	3,150	3,150	3,150	3,150	3,150
Proteína bruta (%)	17,500	17,500	17,500	17,500	17,500
Metionina digestível (%)	0,515	0,527	0,540	0,528	0,540
Met. + cyst. digestível (%)	0,651	0,651	0,651	0,651	0,651
Lisina digestível (%)	0,892	0,892	0,892	0,892	0,892
Treonina digestível (%)	0,588	0,580	0,580	0,580	0,580
Triptofano digestível (%)	0,187	0,180	0,174	0,180	0,174
Cálcio (%)	0,566	0,566	0,566	0,566	0,566
Sódio (%)	0,185	0,185	0,185	0,185	0,185
Fósforo disponível (%)	0,264	0,264	0,284	0,264	0,264

Dietas consistiram de: controle comercial, FAI5 -adição de 5% farelo de arroz integral com alto teor de ácido fítico, FAI10-adição de 10% farelo de arroz integral com alto teor de ácido fítico, FBAF5 adição de 5% farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico e FBAF10-adição de 10% farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico. \* vit. A 1000,000 UI g<sup>-1</sup>, vit. D3 200,000 UI g<sup>-1</sup>, vit. K3 180,050 mg kg<sup>-1</sup>, vit. B1 149,858 mg kg<sup>-1</sup>, vit. B2 500,000 mg kg<sup>-1</sup>, vit. B6 249,975 mg kg<sup>-1</sup>, vit. B12 1250,000 mcg kg<sup>-1</sup>, vit. E 3500,000 UI, pantotenato de cálcio 1200,167 mg kg<sup>-1</sup>, niacina 70,000 mg kg<sup>-1</sup>, ácido fólico 70,000 mg kg<sup>-1</sup>, biotina 7,000 mg kg<sup>-1</sup>, colina 45000,000 mg kg<sup>-1</sup>, metionina 300000,125 mg kg<sup>-1</sup>, zinco 12500,000 mg kg<sup>-1</sup>, ferro 12500,000 mg kg<sup>-1</sup>, cobre 3000,000 mg kg<sup>-1</sup>, manganésio 15000,000 mg kg<sup>-1</sup>, iodo 250,067 mg kg<sup>-1</sup>, selênio 56,250 mg kg<sup>-1</sup>, cobalto 50,000 mg kg<sup>-1</sup>, antioxidante 1000,000 mg kg<sup>-1</sup>.



O consumo de ácido fítico pelas aves foi estimado considerando o consumo de ração e quantidade de ácido fítico presente em cada ração no período entre 36 e 42 dias.

#### 4.2.7 Efeito do Ingrediente de Farelo de Arroz Sobre a Estabilidade da Carne de Frango

O efeito das dietas FAI5, FAI10, FBAF5 e FBAF10 sobre a estabilidade da carne de frango foi avaliada nos peitos de frango 24h *postmortem* sob refrigeração e 30, 60 e 90 dias de armazenamento a -18°C.

##### 4.2.7.1 Medidas de cor e pH

O pH foi determinado por meio da incisão de eletrodo em peito de frango utilizando potenciômetro de contato (Modelo 205 – Testo). Após 24h *post mortem* avaliadas 20 amostras em triplicata conforme descrito por Olivo et al., (2001).

Para a determinação da cor foi utilizado colorímetro (Minolta – CR400) co iluminante D65 e ângulo de 10°. Os valores L\*, a\* e b\* foram expressos conforme o sistema de cor CIELAB. A medida foi realizada na superfície ventral sem pele dos peitos de frangos 24h *post mortem*. Os valores de cor foram medidos em seis locais diferentes da mesma amostra de cada tratamento (n=20) conforme Olivo et al., (2001).

##### 4.2.7.2 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica foi determinada por meio da metodologia descrita por Tarladgis et al. (1964) e modificado por Crackel et al. (1988), que consistiu em determinar espectrofotometricamente a formação do complexo de dois mols de ácido tiobarbitúrico (TBA) com um mol de malonaldeído e outras substâncias que reagiram com o TBA, que resultou na formação de compostos de coloração vermelha. Para a quantificação em triplicata foram utilizadas 10g de peito de frango 24h *postmortem* sob refrigeração e de amostras de 30, 60 e 90 dias de armazenamento a -18°C. Estas amostras foram submetidas a hidrólise com ácido 38 clorídrico 4N. O destilado

obtido foi submetido à reação de cor com o TBA e posterior leitura em espectrofotômetro a 530nm. A curva padrão foi elaborada com solução padrão de 1,1,3,3 Tetraetoxipropano.

#### 4.2.7.3 Determinação do aroma de requentado

O aroma de requentado ou warmed-over flavor (WOF) foi determinado com 10 gramas de peito de frango 24 h *post mortem* sob refrigeração e de amostras de 30, 60 e 90 dias de armazenamento a -18°C. As amostras foram embaladas a vácuo e cozidas em banho-maria por 35 min. a  $85 \pm 5$  °C, até temperatura interna de  $75 \pm 5$  °C. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração por 48 h, com posterior reaquecimento por 15min a  $85 \pm 5$  °C segundo Igene e Pearson (1979). A determinação prosseguiu seguindo a metodologia descrita por Tarladgis et al. (1964) modificada por Crackel et al. (1988). O WOF foi determinado a partir do teor de TBARs (mg de malonaldeído.kg<sup>-1</sup> de amostra) que foi quantificado conforme descrito no item 4.2.7.2.

#### 4.2.8 Análise Estatística

Para o tratamento das aves foi utilizado o delineamento completamente casualizado envolvendo cinco tratamentos e quatro repetições por tratamento considerando-se o peso médio das aves. Após o abate, a amostra de músculo *pectoralis major* foi dividida em parcelas subdivididas e foram codificadas numericamente com dois dígitos aleatórios. A análise estatística foi realizada utilizando o programa STATISTICA versão 7.0 (STATSOFT, 2004). O teste de Tukey foi utilizado para comparar as diferenças entre as médias dos tratamentos ( $p \leq 0.05$ ).

## REFERÊNCIAS

ADEYEYE, E.I.; AROGUNDADE, L.A.; AKINTAYO, E.T., AISIDA, O.A.; ALAO, P.A. Calcium, zinc and phytate interrelationships in some foods of major consumption in Nigeria. **Food Chemistry**. v.71, n. 4, p. 435-441, 2000.

AGOSTINI, Juliana da Silva; NOGUEIRA, Rosicler Balduino; IDA, Elza louko. Lowering phytic acid content by enhancement during sunflower germination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.4, 975-980, 2010.

AHN, Hyun-Joo; KIM, Jae-Hyun; JO, Cheorun; KIM, Mi-Jung; BYUN, Myung-Woo. Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.88, n.2, p. 173-178, 2004.

AHN, Hyun-Joo; KIM, Jae-Hyun; JO, Cheorun; KIM, Mi-Jung; BYUN, Myung-Woo. Irradiation effects on free radical scavenging and antioxidant activity of phytic acid. **Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology**, v.68, n.7, p. 2221-2224, 2003.

ALENCAR, Maria de Lourdes C. B. Brandão de; ALVARENGA, Moema Gonçalves de. Farelo de arroz (I): composição química e seu potencial como alimento. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.34, n.1, p. 95-9 108, 1991.

AMATO, Gilberto W. **Farelo do Arroz: uma nova visão**. Porto Alegre: Centro de Excelência do arroz -IRGA, 2006.

ANGEL, R.; TAMIM, N.M.; APPLEGATE, 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, Júlio Maria A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 4.ed. Viçosa, MG: UFV, 2008.

BAE, H.D., YANKE L.J., CHENG, K.J., SELINGER L.B. A novel staining method for detecting phytase activity. **Journal of Microbiological Methods**. v.39, 17-22, 1999.

BARTNIK, Maria; SZAFRANSKA, Isabela. Changes in phytate content and phytase activity during the germination of some cereals. **Journal of Cereal Science**, v.5, n.1, p. 23-28, 1987.

BEAL, L.; MEHTA, T. Zinc and phytate distribution in peas. Influence of heat treatment, germination, pH, substrate and phosphorus on pea phytate and phytase. **Journal of Food Science**, v.50, p.96-100, 1985.

BINDU, S., SOMASHEKAR, D., JOSEPH, R. A comparative study on permeabilization treatment for in situ determination of phytase of *Rhodotorala gracilis*. **Letters in Applied Microbiology**. v.27, 336-340, 1998.

BLANK, G. E.; PLETCHER, J.; SAX, M. The structure of myo-inositol hexaphosphate dodecasodium salt octatriacontahydrate: a single crystal X-ray analysis. **Biochemistry Biophysical Community**, v.44, p.319-325, 1971.

BODE, Ann M; DONG, Zigang. Signal transduction pathways: targets for chemoprevention of skin cancer. **The Lancet Oncology**, v.1, p.181–188, 2000.

BRUM, Eduardo B. de. **Antioxidante Natural de Marcela (Achyrocline satureioides) e de Erva Mate (Ilex paraguariensis) na elaboração de Linguiça Toscana**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BRUM, Paulo A. R.; ALBINO, Luiz F. T.; GOMES, Marília F. M.; TOSCAN, Adriana Berti; PIENIZ, Luiz C. Uso do farelo de arroz integral em dietas para frango de corte. Comunicado Técnico 201. **Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves**. p.1-2, 1993.

BULLOCK, K.D.; BERTRAND, J.K.; BENYSHEK, L.L. Genetic and environmental parameters for mature weight and other growth measures in Polled Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v.71, n.7, p.1737-1741, 1993.

CAMPOS, M. A. P. Perspectivas do uso de aditivos em alimentos: os antioxidantes. **Revista Nacional da Carne**, n. 227, jan. 1996.

CANAN, Cristiane; CRUZ, Felipe Tsuruta Lisboa; DELAROZA, Fernanda; CASAGRANDE, Rubia; SARMENTO, Cleonice Pereira Mendes; SHIMOKOMAKI, Massami; IDA, Elza louko. Studies on the extraction and purification of phytic acid from rice bran. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, n.7, 1057–1063, 2011.

CASEY, Anne; WALSH, Gary. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. **Journal of Biotechnology**, v.110, n.3, 313-322, 2004.

CHIATTONE, Priscila V. **Ácido ascórbico, eritorbato e mistura comercial na redução da oxidação de hambúrguer bovino processado com água ozonizada**. Tese (Doutorado Ciência e Tecnologia Agroindustrial) -Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

COHEN, M., ROBINSON, R.S., BHAGAVAN, H. Antioxidants in dietary lipids. In: CHOW, C.K. **Fatty acids in foods and their health implications**. New York: Marcel Dekker, 2000.

COSTELLO, A. J. ; GLONEK, T. ; MYRES, T. C. <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. **Carbohydrate Research**, v.46, n.2, p.159-171, 1976.

CRACKEL, R.L., GRAY, J.I., BOOREN, A.M., PEARSON, A.M., BUCKELY, D.J. Effect of antioxidants on lipid stability in restructured beef steaks. **Journal of Food Science**, v.53, n.2. p. 656, 1988.

DASGUPTA, A., TAKAHASHI, K., CUTLER, M. AND TANABE, K. K. O. Linked glycosylation modifies CD44 adhesion to hyaluronate in colon carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.227, 110-117, 1996.

EKLUND-JONSSON, C., SANDBERG, A.S., ALMINGER, M. Reduction of phytate content while preserving mineral content during whole grain cereal tempe fermentation. **Journal of Cereal Science**. v.44, 154-160, 2006.

ELLIS, R., MORRIS, E. R. Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion exchange chromatography. **Cereal Chemistry**, v.63, 58-59, 1986.

EMPSON, Katherine L., LABUZA, Theodore P., GRAF, Ernst. Phytic acid as a food antioxidant. **Journal of Food Science**, v.56, n.2, p.560-563, 1991.

ENGELEN, A. J., F. C. VAN DER HEEFT, P. H. G. RANDSDORP, AND E. L. C. SMIT. Simple and rapid determination of phytase activity. **The Journal of AOAC International**. v.77, p. 760–764, 1994.

ERDMAN, J. W. Oilseed phytates: Nutricional Implications. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.56, p.736-741, 1979.

ERDMAN, J. W. Oilseed phytates: Nutricional Implications. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.56, p.736-741, 1979.

FEBLES, C.I.; ARIAS, A. & HARDISSON, A. Phytic acid level in wheat flours. **Journal of Cereal Science**, v.36, n.1, p. 19-23, 2002.

FERNANDEZ, J., J.A. PEREZ-ALVAREZ AND J.A. FERNANDEZ-LOPEZ. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, v.59, p. 345-353, 1997.

FILGUEIRAS, C.T., CASAGRANDE, R., SOARES, A.L., SHIMOKOMAKI, M., IDA,

E.I. Evaluation of the antioxidant activity of phytic acid from corn bran. **Química Nova**, v. 32(7), 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.

FISKE, C. H., AND Y.SUBBAROW. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**. v.66, p. 375, 1925.

FOX, C. H.; EBERL, M. Phytic acid (IP6), novel broad spectrum anti-neoplastic agent: a systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 10, p.229–234, 2002.

FREDLUND, K.; ISAKSSON, M.; HULTHEN, L. R.; ALMGREN, A.; SANDBERG, A. S. Absorption of zinc and retention of calcium: dose-dependent inhibition by phytate. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v.20, n.1, p49-57, 2006.

GALLINGER, C.I.; SUÁREZ, D.M.; IRAZUSTA, A. Effects of rice bran inclusion on performance and bone mineralization in broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, v.13, 183-190, 2004.

GRAF, E., EATON, J.W. Antioxidant function of phytic acid. **Free Radical Biology e Medicine**, v.8, p.61-69,1990.

GRAF, E., EATON, J.W. Dietary suppression of colonic cancer: fiber or phytate? **Cancer**, Philadelphia, v.56, n.15, p.717-718, 1985.

GRAF, E.; EMPSON, K. L.; EATON, J. Phytic acid: a natural antioxidant. **Journal of Biological Chemistry**. v.262, n.24, p.11647-11650, 1987.

GRASES, F.; MARCHI, J.; PRIETO, R.; SIMONET, B.; COSTA-BAUZA, A.; GARCIA-RAJA, A.; CONTE, A. Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people. Dietary effects on phytate excretion Scan. **Journal of Urology and Nephrology**, v.34, n.3, p. 162-164, 2000.

GRAY, J. I., GOMAA, E. A., & BUCKLEY, D. J.. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v.43, S111–S123, 1996.

HARBACH, A. P.; COSTA, M. C. R.; SOARES, A. L.; BRIDI, A. M.; SHIMOKOMAKI, M.; SILVA, C. A.; IDA, E. I. Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1630-1633, 2007.

HARLAND, B.F., OBERLEAS, D. Phytate in foods. **World Review of Nutrition and Dietetics**. v.52, p. 235-259, 1987.

HEINONEN, J. K.; LAHTI, R. J. A new convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry**, New York, v.113, n.2, p.313-317, 1981.

HEISLER, G.E. R.; ANTÔNIO, G.; MOURA, R.S.; MENDONÇA, C.R. B.; GRANADA, G. Viabilidade da substituição da farinha de trigo pela farinha de arroz na merenda escolar. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.3, p. 299-306, 2008.

HUR, S. J.; PARK, G. B.; JOO, S. T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. **Food Control**, v.18, n.8, p.939-947, 2007.

IGENE, J.O.; PEARSON,A.M. Role of phospholipids and triglycerides in warmedover flavor development in meat model systems. **Journal of Food Science**. v.44, p. 1285, 1979.

IGENE, J.O.; PEARSON,A.M; DUGAN JR, L.R.; PRICE, J.F. Role of tryglycerides and phospholipids on development of rancidity in model meat systems during frozen storage. **Food Chemistry**, v.5, p.263-276, 1980.

JENAB, M.; THOMPSON, L. U. Role of phitic acid in cancer and other Diseases. In: REDDY, N. R.; SATHE, S. K. (Ed.) **Food Phytates**, Florida: CRC Press, 2002, p.25-51.

JOUNG H, NAM G, YOON S, LEE J, SHIM JE, PAIK HY. Bioavailable zinc intake of Korean adults in relation to the phytate content of Korean foods. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.17, 713–724, 2004.

KAMAO, M.; TSUGAWA, N.; NAKAGAWA, K.; KAWAMOTO, Y.; OKANO, T.; FUKUI, K.; TAKAMATSU, K.; KUWATA, G. & IMAI, M. Absorption of calcium, magnesium, phosphorus, iron and zinc in growing male rats fed diets containing either phytate – free soybean protein or soybean protein isolate or casein. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.46, 34-41, 2000.

KASIM, A. B.; EDWARDS JR, H. The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.76, 1-9, 1998.

KIES, A.K.; VAN HEMERT, K.H.F.; SAUER, W.C. Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilisation. **World's Poultry Science Journal**, v.57, p.110-126, 2001.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytase – degrading enzymes (phytases). **Journal Food Science Technology**, v.37, n.7, 791-812, 2002.

LACERDA, D. B. C. L.; SOARES JÚNIOR, M.. S.; BASSINELLO, P. Z.; CASTRO M. V. L.; SILVA-LOBA, V. L.; CAMPOS, M. R. H. Quality of raw, extruded and parboiled rice bran. **Pesquisa Agropecuária tropical**, v.40, n.4, 521-530, 2010.

LAMBRECHTS C.; BOZE H., MOULIN G.; GALZY P. Utilization of phytate by some yeasts. **Biotechnology Letters**, v.14, 61-66, 1992.

LAMBRECHTS C.; BOZE H.; SEGUEILHA L.; MOULIN G.; GALZY P. Influence of culture conditions on the biosynthesis of *Schwanniomyces castelli* phytase. **Biotechnology Letters**. v.15, 399-404, 1993.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid method for phytate determination. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.28, n.6, p.313-315, 1980.

LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G.; CONFORTH, D. P. Antioxidant effects on carnosine and phytic acid in a model beef system. **Journal of Food Science**, v.63, 394–398, 1998.

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

LEE, S.; PARK, H.; CHUN, H.; CHO, S.; CHO, S.; LILLEHOJ, H. S. **Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice**. Nutrition Research, n.26, p. 474– 479, 2006.

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

LIU, Q.; LANARI, C.; SCHAEFER, D.M. A review of dietary vitamin e supplementation for improvement of beef quality. **Journal of Animal Science**. v.73, p. 3131-3140, 1995.

LOLAS, G. M.; MARKAKIS, P. The phytase of navy beans. (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Food Science**. v.42, n.4, 1094-1106, 1977.

LOPEZ, H.W.; VALLERY, F.; VERNY, M.A.L.; COUDRAY, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Dietary phytic acid and wheat bran enhance mucosal phytase activity in rat small intestine. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.130, p. 2020-2025 Supplement, 2000.

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

MA, X.F.; YU, J.G.; KENNEDY, J.F. Studies on the properties of natural fibers-reinforced thermoplastic starch composites. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v.62, n.1, p.19-24, 2005.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais da família lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.10, n.2, p. 96-103, 2007.

MESSIAS, K. L. S. Os antioxidantes. **Foods Ingredients Brasil**, n.6, p.16, 2009.  
MINIHANE, A. M.; RIMBACH, G. Iron absorption and the iron binding and antioxidant properties of phytic acid. **International Journal of Food Science and Technology**, v.37, n.7, p. 741-748, 2002.

MORO, J. D.; ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C. S. M. Composição centesimal e ação antioxidante do farelo de arroz e seus benefícios a saúde. **Disciplinarum Scientia, Série: Ciências da Saúde**, v.4, n.1, p. 33 – 44, Santa Maria, 2004.

MORRISEY, P.A., SHEEHY, P.J.A., GALVIN, K.; KERRY, J. P., BUCKLEY, D. L., Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p. 73 – 86, 1998.

OATWAY, L.; VASANTHAN, T.; HELM, J.H. Phytic acid. **Food Reviews International**. v.20, n.17, p.419-431. 2001.

O'DELL, B.L.; DEBOLAND, A.R.; KOIRTYOHANN, S.R. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.20, p. 718-721, 1972.

OLIVO, R.; SOARES, A.L.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. , Dietary Vitamin E inhibits Poultry PSE and improves meat functional properties. **Journal Food Biochemistry**. v. 25, p. 271-283, 2001.

OLIVO, Rubison. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Criciúma, SC: Ed. do autor, 2006.

PACHECO, Graziela D. **Efeito do ácido fítico dietético e da enzima fitase em suínos na fase de terminação e ação do ácido fítico sobre a integridade epitelial das células IPEC 1**. 127 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

PADILHA, Ana D. G. **Antioxidante natural de erva mate na conservação da carne de frango *in vivo***. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.



- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEÓN, J. A.; NIGAM, P. Production of organic acids by solid-state fermentation. In: **Solid-state fermentation in biotechnology -fundamentals and applications**. New Delhi : Asiatech Publishers. p. 113-126, 2001.
- PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F.; TERÁN, L. C. DE; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v.98, p.742–748, 2006.
- PEARSON, A. M.; LOVE, J. D. AND SHORTLAND, F. B. "Warmed-over" flavor in meat, poultry, and fish. **Advances in food research**, v.23, p. 1-74, 1977.
- PESTANA, V. R.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C. Farelo de arroz: características, benefícios à saúde a aplicações. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.26, n.1, p. 29-40, , 2008.
- POINTILLART, A. Importância dos fitatos e das fitases na alimentação dos suínos. **A Hora Veterinária**, n.95, p.66-72, jan./fev, 1997.
- POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidantes de los alimentos**. Editora Acribia, Zaragoza, Espanha, 2005.
- PRAZERES, J.N.; FERREIRA, C. V.; Aoyama, H. Acid phosphatase activities during the germination of Glycine max seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p. 15-20, 2004.
- QUIRRENBACH, H. R. **Determinação das constantes de estabilidade, síntese e caracterização dos complexos de ácido fítico com os íons de Fe (II) e Fe (III)**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação Strictu Senso, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.
- REDDY, N. R. Occurrence, Distribution, Content, and Dietary Intake of Phytate. In: REDDY, N. R.; SATHE, S. K. (Ed.) **Food Phytates**, Florida: CRC Press, p.25-51, 2002.
- RIMBACH, G.; BRANDT, K.; MOST, E.; PALLAUF, J., Effect of phytic acid and microbial phytase on Cd accumulation, Zn status, and apparent absorption of Ca, P, Mg, Fe, Zn, Cu, and Mn in growing rats. **Animal Nutrition and Metabolism**. v.39, p.361, 1995.
- ROSTAGNO, H. S.; TEIXEIRA, A.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; DE OLIVEIRA, R. F. M.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. J. P.; TOLEDO BARRETO, S. L., **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. UFV, 2005. 141 p.
- SANDBERG, A. S. *In vitro* and *in vivo* degradation of phytate. In: **Food Phytates**. REDDY, N. R.; SATHE. S. K. CRC Press, New York, 2002.
- SATHE, S. K.; REDDY, N. R. Introduction. . In: **Food Phytates**. REDDY, N. R.; SATHE. S. K. CRC Press, New York, 2002.

- SCHOULTEN, N. A.; TEIXEIRA, A. S.; RODRIGUES, P. B.; FREITAS, R. T. F. DE; CONTE, A. J.; SILVA, H. O. Performance of broiler chickens fed with diet containing rice bran and enzymes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.6, p. 1380-1387, 2003.
- SEGUEILHA, L.; LAMBRECHTS, C.; BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P.; Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.74, p. 7–11, 1992.
- SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.135, p.1-41, 2006.
- SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.135, n.1-2, p.1-41, 2007.
- SHAMSUDDIN, A. M.; YANG, G. Y. Inositol hexaphosphate inhibits growth and induces differentiation of PC-3 human prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v.16, p.1975–1979, 1998.
- SHAMSUDDIN, A.M.; VUCENIK, I. Mammary tumor inhibition by IP6: a review. **Anticancer Research**, v.19(5A), p. 3671–3674, 1999.
- SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Phytase production by thermophilic mold *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation and its application in dephytinization of sesame oil cake. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.133, n.3, p. 239-250, 2006.
- SINGH, P.K. Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. **World's Poultry Science Journal**, n.64, 2008.
- SOARES JÚNIOR, Manoel Soares; BASSINELLO, Priscila Zaczuk; CALIARI, Márcio; GEBIN, Pedro Francisco Cavalcante; JUNQUEIRA, Thais de Lima; GOMES, Vinícius Almeida; LACERDA, Diracy Bethânia Cavalcante Lemos . Qualidade de pães com farelo de arroz torrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p. 636-641, Campinas, 2009.
- SOARES JÚNIOR, Manoel Soares; BASSINELLO, Priscila Zaczuk; LACERDA, Diracy Bethânia Cavalcante Lemos; KOAKUZU, Selma Nakamoto; GEBIN, Pedro Francisco Cavalcante; JUNQUEIRA, Thais de Lima; GOMES, Vinícius Almeida. Características físicas e tecnológicas de pães elaborados com farelo de arroz torrado. **Ciências Agrárias**, v.29, n.4, p. 815-828, Londrina, 2008.
- SOARES, A.L.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Synergism between dietary vitamin E and exogenous phytic acid in prevention of warmed-over flavor development in chicken breast meat, *Pectoralis major*, M. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.1, p. 57-62, 2004.
- St ANGELO, A.J. Lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.3, p.175-224, 1996.
- STATSOFT, Inc. (2004). **STATISTICA**: data analysis software system. Version 7.0.

STODOLAK, B.; STARZYŃSKA, A.; CZYSCZOŃ, M.; ŻYŁA, K. The effect of phytic acid on oxidative stability of raw and cooked meat. **Food Chemistry**, n.101, p.1041-1045, 2007.

TARLADGIS, B.G.; PEARSON, A. M.; DUGAN, L. R. Chemistry of the 2thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods – II Formation of the TBA – Malonaldehyde complex without acid-heat treatment. **Journal Science and Food Agriculture**, v.15, p. 602, 1964.

TSAO, G.T.; ZHENG, Y.; LU, J.; GONG, C. S.; DAVISON, B. H.; FINKELSTEIN, M.; WYMAN, C. E. **Adsorption of heavy metal ions by immobilized phytic acid**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 63-65, p. 731-741, 1997.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura; Relatório Anual Ubabef 2010/2011. Disponível em:  
<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. Catalytic characterization of phytase (myoinositolhexakisphosphate phosphohydrolase) from *Aspergillus niger* van Tieghem: Glycosylation pattern, kinetics and molecular properties. **Enzyme Microbial Technology**, v.39, p. 596–600, 2006.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características da Carne de Frango**. Boletim Técnico, 2007. Disponível em:  
[http://www.agais.com/telomc/b01307\\_caracteristicas\\_carnefrango.pdf](http://www.agais.com/telomc/b01307_caracteristicas_carnefrango.pdf). Acesso em: 30 abril 2012.

VERGHESE, M; RAO, D.R.; CHAWAN, C.B.; WALKER, L.TSHACKELFORD, L. Anticarcinogenic effect of phytic acid (IP6): apoptosis as a possible mechanism of action. **LWT Food Science and Technology**, v.39, p.1093-1098, 2006.

VUCENIK, I.; ZHANG, Z. S.; SHAMSUDDIN, A. M. IP6 in treatment of liver cancer. II. Intra-tumoral injection of IP6 regresses pre-existing human liver cancer xenotransplanted in nude mice. **Anticancer Res**, v.18(6A), p.4091–4096, 1998.

WALTER, Melissa; MARCHEZAN, Enio; AVILA, Luis A. de. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v.38, n.4, p.1184-1192, Santa Maria, 2008.

WEAVER, C.M., KANNAN, S., Phytate and mineral bioavailability. In: Reddy, N.R., Sathé, S.K. (Eds.), **Food Phytates**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 25–51. 2002.

WEINBERG, E. D. Association of iron with colorectal cancer. **BioMetals**, v.7, p.211-216, 1994.

WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; RÉMY, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT G.; LEHMANN, M.; VAN LOON, A.P.G.M. Biochemical characterization of fungal phytases (Myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p. 367-373, 1999.

ZHOU, J.R.; ERDMAN, J.W. Jr. Phytic acid in health and disease. Critical reviews in **Food Science and Nutrition**, v.35, n.6, p. 495-508, 1995.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos estão redigidos na forma de 2 artigos científicos, conforme segue. Durante o Doutorado foram apresentados alguns trabalhos em eventos científicos que constam no Anexo.

**ARTIGO 1**

**OPTIMIZATION OF AN ENDOGENOUS PHYTASE EXTRACTION PROCESS AND  
THE PRODUCTION OF AN INGREDIENT FROM WHOLE RICE BRAN WITH A  
LOW PHYTIC ACID LEVEL**

## OPTIMIZATION OF AN ENDOGENOUS PHYTASE EXTRACTION PROCESS AND THE PRODUCTION OF AN INGREDIENT FROM WHOLE RICE BRAN WITH A LOW PHYTIC ACID LEVEL

**Submetido ao Food Chemistry e as normas para publicação estão no Anexo.**  
**Optimization of an endogenous phytase extraction process and the production of an ingredient from whole rice bran with a low phytic acid level.**

Cleusa. I. Weber<sup>1</sup>, Alexandre Oba<sup>2</sup>, Adriana L. Soares<sup>a</sup>, Massami Shimokomaki<sup>3,4</sup>,  
Elza I. Ida<sup>a,\*</sup>

This study was carried in the laboratories from the Department of Food Science and Technology on the Londrina State University.

### ABSTRACT

The objective of this study was to optimize the extraction of endogenous phytase and to produce from whole rice bran an ingredient with a low phytic acid level for use in food or animal feed. To establish the best conditions for the extraction process, an orthogonal central composite design was applied. Endogenous phytase was used with the application of a Box-Behnken design to produce an ingredient with a low acid level. The maximum extraction of endogenous phytase from whole rice bran was obtained with conditions of pH 4.12, 17.1°C and 112.9 min. A whole rice bran ingredient with 84.79% hydrolysis of phytic acid was produced after the addition of 30 UA of endogenous phytase g<sup>-1</sup> of whole rice bran, using a 1:10 ratio (weight: volume; whole rice bran: 0.6 M sodium acetate buffer and pH 5.3) at 40°C for 36 hours of hydrolysis.

**Key – words:** Endogenous phytase. Phytic acid. Rice bran. Extraction optimization. Response surface methodology.

---

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, Londrina State University C.P.: 6001; 86051-970; Londrina, PR, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Animal Science, Londrina State University C.P.: 6001; 86051-970; Londrina, PR, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Veterinary Preventive Medicine; Londrina State University C.P.: 6001; 86051-970; Londrina, PR, Brazil.

<sup>4</sup> Federal Technologic University of Parana, Pioneiros, 86036-370 -Londrina -PR –Brazil.

\* Corresponding author: Fax: +55 43 3371-4080 Email address: elida@uel.br.

## 1 INTRODUCTION

Phytic acid (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate) or phytate can form insoluble complexes with important metals such as iron, zinc and calcium and also binds to proteins, reducing their bioavailability or making absorption difficult for humans and animals in particular minerals (Reddy, 2002). Phytic acid inhibits some enzymes activity, such as pepsin, trypsin and  $\alpha$ -amylase (Sebastian, Touchburn & Chavez, 1998), with a consequential reduction of the solubility and digestibility of substrates and the formation of insoluble complexes. Thus, phytic acid was considered for many years to be an anti-nutritional compound (Schelemmer, Frolich, Prieto, & Grases, 2009). However, by exhibiting an elevated chelating capacity for polyvalent metal ions, phytic acid may act as an effective antioxidant. These beneficial effects of phytic acid were shown in the prevention of diabetes (Lee, Park, Chun, Cho, Cho, & Lillehoj, 2006), kidney stones (Saw, Chow, Rao, & Kavanagh, 2007) and cancer (Vucenik & Shamsuddin, 2006) and as an antioxidant in foods (Soares, Olivo, Shimokomaki, & Ida, 2004; Harbach, Costa, Soares, & Bridi, 2007; Filgueiras, Casagrande, Soares, Shimokomaki, & Ida, 2009).

Furthermore, phytic acid is the greatest phosphorus storage source for seeds and pollen. In cereals, legumes or oilseeds, 70 to 80% of the phosphorus is in phytate form in the seeds. However, in this form, the phosphorus is unavailable to monogastric animals due to their lack of digestive phytases (Reddy, 2002). Thus, phytic acid is considered an undesirable component for the diet of monogastric animals, and therefore, commercial phytases are widely used in the production of animal feeds to reduce phytic acid levels (Nair, Laflamme, & Duvnjak, 1991).

Phytase or myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase (EC 3.1.3.8) is an enzyme that possesses the capacity to hydrolyze the phosphate groups of phytic acid and produce different isomers of inositol pentaphosphates, inositol and inorganic phosphorus. Due to its specificity in relation to the position of the first phosphoester to be hydrolyzed, both 3-phytase and 6-phytase exist (Konietzny & Greiner, 2002). Phytases are present in plant sources, microbes and in certain animal tissues. Phytases from cereal grains can be extracted under various temperature and pH conditions and are stable at 55°C. The optimum conditions for phytase activity and the hydrolysis of phytate present in the cereal concern the accessibility between the enzyme and the substrate and the thermal difference



between the phytase present in the cereal grain and the extracted endogenous phytase (Bergman, Autio, & Sandberg, 2000). In the germination process, the phytase activity from grains increases considerably and reduces the phytate level (Agostini, Nogueira, & Ida, 2010). Other types of procedures can also be used to reduce or remove phytates, such as chemical or physical processing, genetic manipulation of plants and enzymatic or non-enzymatic hydrolysis (Phillippy & Wyatt, 2001).

The addition of phytase to animal feed and the consequential hydrolysis of phytic acid can increase the availability of inorganic phosphorus and other minerals, and it also prevents the pollution of rivers or running water. The addition of phytase increases the use of phosphorus, amino acids and energy and can represent a significant savings in the final cost of the feed production. Generally, the phytases that are naturally present in cereals are not sufficient to hydrolyze the endogenous phytic acid of feeds containing these cereals. The addition of commercial phytase in feeds rich in phytic acid improves the zootechnical performance in monogastric animals (Lozano et al., 2011).

Rice bran is a by-product of rice processing, representing 8% of rice in the husk, with high levels of insoluble fiber and considerable levels of carbohydrates, proteins and lipids. It has low commercial value and it can be used as an abundant raw material for oil extraction or the production of animal feed and fertilizer. Due to its high fiber content, the bran is rarely used in human consumption. However, rice bran contains approximately 7% phytic acid (Kasim & Edwards, 1998; Canan et al., 2011), which compromises its nutritional value, and the phytic phosphorus represents approximately 75.0% of the total phosphorus (Reddy, 2002).

Therefore, the aim of this study was to optimize the extraction of endogenous phytase from rice bran by applying an orthogonal central composition design and to produce a functional ingredient from whole rice bran with a low level of phytic acid for food or animal feed with a Box-Behnken design.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1 WHOLE RICE BRAN

It was used a whole rice bran IRGA 417 cultivar harvested in the 2008/2009 and cultivated in the region of Santo Antonio da Patrulha-RS, Brazil. The bran was kept in a refrigerated chamber at  $-5^{\circ}\text{C}$ . Phytic acid from rice (P0109, Sigma-Aldrich) was taken as the standard, and all of the other reagents were analytical grade.

### 2.2 EXTRACTION PROCESS OF ENDOGENOUS PHYTASE FROM RICE BRAN

An orthogonal central composite design was applied according to the mathematical model (Equation 1). The following independent variables were investigated: X1 (pH), X2 (temperature in  $^{\circ}\text{C}$ ) and X3 (time in minutes) at five variation levels, totaling 16 assays. To complete assays of the endogenous phytase extraction process, a 1:10 whole rice bran proportion was maintained (weight: volume) in a 2%  $\text{CaCl}_2$  solution according to Lolas & Markakis (1977). The X1 variable was equal to the pH of the  $\text{CaCl}_2$  solution and adjusted with an acetic acid solution. The extraction was completed with agitation in a shaker incubator with rotation at  $1.78 \times g$  and application of the X2 variable (temperature in  $^{\circ}\text{C}$ ) and X3 (extraction time in minutes) according to the experimental design (Table 1). Subsequently, the material was centrifuged at  $9000 \times g$  for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , and the crude phytase extract was obtained. The assays were conducted randomly in duplicate within each block. The phytase activity of the crude extract was determined as a function-response (Y1) expressed as endogenous phytase  $\text{UA g}^{-1}$  of whole rice bran. For regression analysis and attainment of the surface response model, the software STATISTICA 7.0 model was used (Statsoft, 2004).

$$Y1 = \beta_0 + \beta_j + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + e$$

(Equation 1)

Where:

Y1= function-response; x1, x2 and x3= codified variables;  $\beta$  = estimated coefficient for each term;  $\beta_j$ = estimated block coefficient for the surface response model; e= residual.

After examining the surface response and the optimal experimental conditions obtained, the proposed model was validated by performing the assays in triplicate.

### 2.3 OBTAIN OF A WHOLE RICE BRAN INGREDIENT WITH A LOW PHYTIC ACID LEVEL

From the optimum conditions for the extraction process of endogenous phytase from whole rice bran, a quantity of crude phytase extract was prepared to obtain an ingredient with low phytic acid level. Thus, to produce the ingredient, the hydrolysis of phytic acid from the whole rice bran was optimized with the application of the Box-Behnken design, following the mathematical model (Equation 2) with 12 assays and a repetition of the center point. The assays in duplicate were completed randomly and utilized the 1:10 proportion (weight: volume) of whole rice bran: 0.6 M, pH 5.3 sodium acetate buffer, agitated on a shaker incubator with rotation at 1.5 x g. In this incubation, the following variables were investigated: X4 (time in minutes), X5 (incubation temperature in °C) and X6 (addition of phytase UA g<sup>-1</sup> of whole rice bran). Table 2 shows the experimental design matrix with variation levels, obtained response (Y2 = µg of residual phytic acid g<sup>-1</sup> of whole rice bran) for the dependent variable and estimated response (Ŷ2). For analysis of the regression and attainment of the surface response model, STATISTICA 7.0 software was used (Statsoft, 2004).

$$Y2 = \beta_0 + \beta_4 x_4 + \beta_5 x_5 + \beta_6 x_6 + \beta_4^2 x_4^2 + \beta_5^2 x_5^2 + \beta_6^2 x_6^2 + \beta_{45} x_4 x_5 + \beta_{46} x_4 x_6 + \beta_{56} x_5 x_6 + e$$

(Equation 2)

Where:

Y2= response-function; x4, x5 and x6 = codified variables; β= coefficients estimated for the surface response model; e= residual.

After examining the response surface and the optimal experimental conditions of the ingredient with a low phytic acid level, the proposed model was validated by completing the assays in triplicate.

## 2.4 DETERMINATION OF THE ENDOGENOUS PHYTASE ACTIVITY

The methodology proposed by Lolas & Markakis (1977) was applied. In this procedure, 850  $\mu\text{L}$  of 0.6 M pH 5.3 sodium acetate buffer; 150  $\mu\text{L}$  of 8 mM pH 5.3 sodium phytate (P0109, Sigma-Aldrich), pH 5.3 and 200  $\mu\text{L}$  crude phytase extract were utilized and incubated for 30 min at 50°C, followed by centrifugation at 5.80 x g for 10 min. The inorganic phosphorus level ( $\text{P}_i$ ) was determined in the supernatant using a modified ammonium molybdate method from Heinonen & Lahti (1981). It was defined that one international unit of activity (1UA) of phytase produced 1  $\mu\text{mol}$  of  $\text{P}_i$   $\text{min}^{-1}$  under the assay conditions. The phytase activity ( $\text{UA g}^{-1}$ ) was defined as the relationship between the enzyme's activity unit and the amount of whole rice bran.

## 2.5 DETERMINATION OF THE PHYTIC ACID LEVEL

The methodology described by Latta & Eskin (1980) was used based on the reaction between ferric chloride and sulfosalicylic acid and using Dowex-AGX-4 resin as described by Ellis & Morris (1986). The phytic acid level was expressed as  $\mu\text{g}$  of phytic acid  $\text{g}^{-1}$  of whole rice bran.

## 2.6 STATISTICAL ANALYSIS

The regression analysis and analysis of variance (ANOVA) were completed with STATISTICA software version 7.0 (Statsoft, 2004). Student's t-test was used to determine the differences between the averages, and the results were expressed as average  $\pm$  standard deviation and were considered significantly different when  $p \leq 0.05$ .

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION PROCESS FOR ENDOGENOUS PHYTASE FROM RICE BRAN

The effects of the variables on the obtained results and the response estimated by the model ( $\hat{Y}_1$ ) for the extraction process of endogenous phytase from IRGA 417 whole rice bran are shown in Tables 1 and 3. All of the dependent variables had significant effects on the regression coefficients except for the linear interaction between X1 (pH) and X3 (extraction in minutes) that were incorporated to the residuals. The mathematical model was significant between blocks 1 and 2 (Table 3) and the best conditions for the extraction process of endogenous phytase were obtained in block 2. However, the model's lack of fit was also significant, but the average square of the pure error was low (0.002482); therefore, we recommended caution in using this model. The fact that the lack of fit was significant should not be considered relevant when the average square of the pure error is low (Box & Draper, 1987); therefore, the total residuals from the model are decomposed in pure error and lack of fit (Neto, Scarminio, & Bruns, 2003). The total determination coefficient ( $R^2$ ) of 0.896 indicates that 89.64% of the experimental results adequately adjust to the proposed model (Equation 3).

$$Y_1 = 0.0356 + 0.7168x_1 + 0.0074x_1^2 + 0.0544x_1^2 + 0.0216x_2 + 0.0350x_2^2 + 0.0053x_3 + 0.0352x_3^2 - 0.0352x_1x_2 + 0.0278x_2x_3 \quad (\text{Equation 3}).$$

From the  $Y_1$  function-response (expressed as UA of extracted endogenous phytase  $g^{-1}$  of whole rice bran) and the proposed model, it was possible to construct the response surface (Figure 1) and to evaluate the X1 (pH) and X2 (extraction temperature, °C) variables. In the conditions studied, the maximum endogenous phytase extraction from the whole rice bran was  $\hat{Y}_1 = 0.936 \pm 0.019$  UA of phytase  $g^{-1}$  of whole rice bran, which occurred when the pH (X1) was 5.0, the temperature (X2) was 17.1°C and the time (X3) was 60 min, corresponding to assay 14 (Table 1). Considering the orthogonality of the results, the maximum endogenous phytase extraction from rice bran was estimated with  $\hat{Y}_1 = 1.360$  UA of phytase  $g^{-1}$  of whole rice bran under the following extraction process conditions: (X1) pH of 4.12,

(X2) at 17.1°C and (X3) 112.9 min. Among the cereals, rye showed greatest activity with 6.92 UA g<sup>-1</sup>, followed by triticale with 4.82 UA g<sup>-1</sup>, wheat with 3.08 U g<sup>-1</sup>, barley with 1.83 UA g<sup>-1</sup>, rice with 0.19 UA g<sup>-1</sup> (Egli, Davidsson, Juillerat, Barclay, & Hurrell, 2002) and sunflower with 0.08 UA g<sup>-1</sup> (Agostini et al., 2010). However, the endogenous phytases from cereals exhibit different extraction conditions and specific activities. In rice bran (Hayakawa, Toma, & Igaue, 1989) and barley (Greiner & Konietzny, 2006), phytase was extracted at a temperature between 40°C and 50°C and a pH between 4.5 and 6.0 with acetate buffer. The extraction process and processing conditions of endogenous phytase from different grains present distinct characteristics (Greiner, et al., 2006).

The optimum conditions of the process in which the maximum endogenous phytase extraction occurred ( $\hat{Y}1 = 1.360$  UA g<sup>-1</sup> of whole rice bran; (X1) pH 4.12, (X2) at 17.1°C and (X3) at 112.9 min) were experimentally reproduced in triplicate, and the response obtained was  $Y1 = 1.290 \pm 0.070$  UA of phytase g<sup>-1</sup> of whole rice bran. The relative error was 5.14% in relation to the estimated response by the model, and the comparison between the averages of the obtained and estimated results did not show a significant difference by Student's t-test ( $p \leq 0.05$ ). Therefore, it confirms that the proposed model is valid and adequately describes the optimization of the extraction process of endogenous phytase from whole rice bran.

### 3.2 PRODUCTION OF THE INGREDIENT FROM WHOLE RICE BRAN WITH A LOW PHYTIC ACID LEVEL

The bran from whole rice is a residue generated by the traditional processing of rice on a large scale and possesses elevated levels of phytic acid compared to traditional whole rice (Kasim & Edwards, 1998). The average phytic acid level of IRGA 417 whole rice bran was  $72.40 \pm 2.13$  µg g<sup>-1</sup>, which is similar to the levels described by Canan et al. (2011). The effects of the variables on the obtained (Y2) and estimated ( $\hat{Y}2$ ) response-function from the model of phytic acid hydrolysis of IRGA 417 whole rice bran and the production of ingredients are shown in Tables 2 and 4. The regression coefficients of all of the dependent variables exhibited significant effects. However, the variables X5 (°C of hydrolysis) and X 6 (UA of

phytase g<sup>-1</sup> of whole rice bran) linear and the interaction between X4 (hydrolysis in h) linear and X5 (°C of hydrolysis) quadratic, X4 (hydrolysis in h) linear and X6 (UA of phytase g<sup>-1</sup> of whole rice bran) linear, X4 (hydrolysis in h) quadratic and X6 (UA of phytase g<sup>-1</sup> of whole rice bran) linear did not have a significant effect on the response-function (Y2) expressed as µg of residual phytic acid g<sup>-1</sup> of whole rice bran, and they were therefore incorporated into the residuals. The total determination coefficient (R<sup>2</sup>) of 0.95916 indicates that 95.91% of the experimental results adequately adjust to the proposed model (Equation 4).

$$\hat{Y}_2 = 71.8351 - 6.1663x_4 - 13.3355x_4^2 - 10.5065x_5^2 - 32.8676x_6^2 - 14.8234 x_4.x_5 + 12.7755x_4^2 .x_5 - 7.8565 x_5.x_6 \quad (\text{Equation 4})$$

From the function response (Y2) and the proposed model, it was possible to construct a response surface (Figure 2) and evaluate the variables X4 (hydrolysis in h) and X6 (UA of phytase g<sup>-1</sup> of whole rice bran). The maximum hydrolysis of phytic acid from the rice bran was 84.79%, which occurred when the hydrolysis was performed for 36 h (X4) with incubation at 40°C (X5) and using 30 UA of endogenous phytase g<sup>-1</sup> of whole rice bran (X6). The hydrolysis of 80% of the phytic acid from hydrated rice bran at pH 5.1 and at 55°C for 24 h, with the addition of endogenous phytase, was found by Tangendjaja, Buckle, & Wooton (1981). The hydrolysis of phytic acid at pH 3.5 was more effective in brown rice and rice bran than at a fixed pH of 5.3 (Liang, Han, Nout, & Hamer, 2009). The best phytase activation conditions for the hydrolysis of phytate from green barley grains occurred at pH 5.2 and 47°C (Lüers & Silbereisen, 1927). However, the addition of fungal phytase in an acid media hydrolyzed 92% of the phytic acid in rice bran (Liang et al. 2009), and according to Konietzny & Greiner (2002), the optimal pH of activity for this enzyme was between 2.5 and 5.0 with an optimum temperature of 58°C. Nevertheless, it was found that the differences between the optimum conditions for phytase activity and the optimum conditions for phytase hydrolysis in cereal lie in the accessibility and the thermal difference of the enzyme and substrate (Bergman, et al., 2000).

The proposed model was validated through the completion of the assays in triplicate under the same process conditions in which the maximum phytic acid hydrolysis occurred, which is  $\hat{Y}_2 = 10.43 \mu\text{g phytic acid g}^{-1}$  of rice bran with X4=

36 h of hydrolysis, X5 = 40°C of incubation and X6 = 30 UA of phytase g<sup>-1</sup> of whole rice bran. The response from the assay (Y2 = 11.02 ± 0.90 µg of phytic acid g<sup>-1</sup> of rice bran) was compared with the estimated value ( $\hat{Y}_2$ ), and Student's t-test (p≤0.05) showed no significant difference between the averages and the relative error of 5.65%. Therefore, these results confirm the validity of the proposed model and indicate that the obtained data were adequately adjusted to explain the phytic acid hydrolysis process of whole rice bran, thus producing a functional ingredient with a low phytic acid level that could be utilized for food or animal feed production.



## 4 CONCLUSIONS

From an orthogonal central composite design, it was possible to optimize the extraction process of endogenous phytase from rice bran with 0.936 UA of phytase g<sup>-1</sup> of whole rice bran. Using the Box-Behnken design, it was possible to produce an ingredient from whole rice bran with 84.79% hydrolysis of phytic acid and 1:10 proportion conditions (whole rice bran: 0.6 M sodium acetate buffer) at pH 5.3 with the addition of 30 UA endogenous phytase g<sup>-1</sup> of whole rice bran and incubation at 40°C for 36 h.

## Acknowledgements

The authors gratefully the IRGA-Rio Grande Rice institute for the kind donation of whole rice bran. EII and MS are CNPq Research Fellows.

## REFERENCES

- Agostini, J.S., Nogueira, R.B. & Ida, E.I. (2010). Lowering phytic acid content by enhancement during sunflower germination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.4, 975-980.
- Bergman, E., Autio, K. & Sandberg, A. (2000). Optimal conditions for phytate degradation, estimation of phytase activity, and localization of phytate in barley (cv. Blenheim). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.48, n.10, p. 4647-4655.
- Box, G.E.P. & Draper, N.E. (1987). **Empirical model building and response surfaces**. (3th ed.) New York: John Wiley and Sons, 669 p.
- Canan, C., Cruz, F. T., Delarozza, F., Casagrande, R. Sarmiento, C. P. M., Shimokomaki, M. & Ida, E. I. (2011). Studies on the extraction and purification of phytic acid from rice bran. **Journal of food Composition and Analysis**, v.24, n.7, 1057-1063.
- Egli, I., Davidsson, L., Juillerat, M.A., Barclay, D., & Hurrell, R. F. (2002). The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding. **Journal of Food Science**, v.67, n.9, 3484-3488.
- Ellis, R., & Morris, E. R. (1986). Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion exchange chromatography. **Cereal Chemistry**, v.63, p. 58-59.
- Filgueiras, C.T., Casagrande, R., Soares, A.L., Shimokomaki, M., & Ida, E.I. (2009). Evaluation of the antioxidant activity of phytic acid from corn bran. **Quimica Nova**, v.32, n.7, 1787-1791.
- Greiner, R., Konietzny, U. (2006). Phytases for food application. **Food Technology Biotechnology**, v.44, n.2, p. 15–140.
- Harbach, A. P., Costa, M. C. R., Soares, A. L., Bridi, A. M., Shimokomaki, M., Silva, C. A., & Ida, E. I. (2007). Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**, v.100, n.4, 1630-1633.
- Hayakawa, T., Toma, Y., & Igaue, I. (1989). Purification and characterization of acid phosphatases with or without phytase activity from rice bran. **Agricultural Biological Chemistry**, v.53, n.6, 1475-1483.
- Heinonen, J. K., & Lahti, R. J. (1981) A new convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry**, v.113, n.2, 313-317.
- Kasim, A. B., & Edwards JR, H. (1998). The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.76, n.1, 1-9.

Konietzny, U., & Greiner, R. (2002). Molecular and catalytic properties of phytase – degrading enzymes (phytases). **Journal Food Science Technology**, v.37, n.7, 791 – 812.

Latta, M., & Eskin, M. (1980). A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, p.1313-1315.

Lee, S. H., Park, H. J., Chun, H. K., Cho, S. Y., Cho, S. M., & Lillehoj, H. S. (2006). Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. **Nutrition Research**, v.26, n.9, 474-479.

Liang, J., Han, B.Z., Nout, M.J.R., & Hamer, R.J. (2009). Effect of soaking and phytase treatment on phytic acid, calcium, iron and zinc in rice fractions. **Food Chemistry**, v.115, n.3, p. 789-794.

Lolas, G. M., & Markakis, P. (1977). The phytase of navy beans. (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Food Science**, v.42, n.4, 1094-1106.

Lozano, A.P., Pacheco, G.D., Silva, C.A, Bridi, A.M., Silva, R.A.M., Vinokurovas, S.L., Dalto, D.B., Tarsitano, M.A., & Agostini, P.S. (2010). Phytase levels in swine feed in the termination phase. **Archivos de Zootecnia**. v.60, n.232, 839-850.

Lüers, H., & Silbereisen, K. (1927). Ueber die Phytase des Malzes. **Woch Brau.**, v.44, p. 263 – 273.

Nair, V.C., Laflamme, J., & Duvnjak, Z. (1991). Production of phytase by *Aspergillus ficcum* and reduction of phytic acid content in canola meal. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v.54, n.3, 355-365.

Neto, B.B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. (2003). **How to do experiments – Studies and Development in Science and in Industry**. Editora da Unicamp (2th ed.), Campinas – SP, 299 p.

Phillippy, B.Q., & Wyatt, C.J. (2001). Degradation of phytate in foods by phytases in fruit and vegetable extracts. **Journal of Food Science**, v.66, n.4, 535-539.

Reddy, N. R. (2002). Occurrence, Distribution, Content, and Dietary Intake of Phytate. In: *Food Phytates*. Reddy, N. R.; & Sathe, S. K. (2002). CRC Press, New York.

Saw, N.K., Chow, K., Rao, P.N., & Kavanagh, J.P. (2007). Effects of inositol hexaphosphate (Phytate) on calcium binding, calcium oxalate crystallization and in vitro stone growth. **The Journal of Urology**, v.177, n.6, 2366-2370.

Schelemmer, U., Frolich, W., Prieto, R.M., & Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.53, n.2, S330 – S375.

Sebastian, S., Touchburn, S.P., & Chavez, E. R. (1991). Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. **Words Poultry Science**, London, v.54, 27-47.

Soares, A.L., Olivo, R., Shimokomaki, M., & Ida, E.I. (2004). Synergism between dietary vitamin E and exogenous phytic acid in prevention of warmed-over flavor development in chicken breast meat, Pectoralis major, **M. Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.1, 57-62.

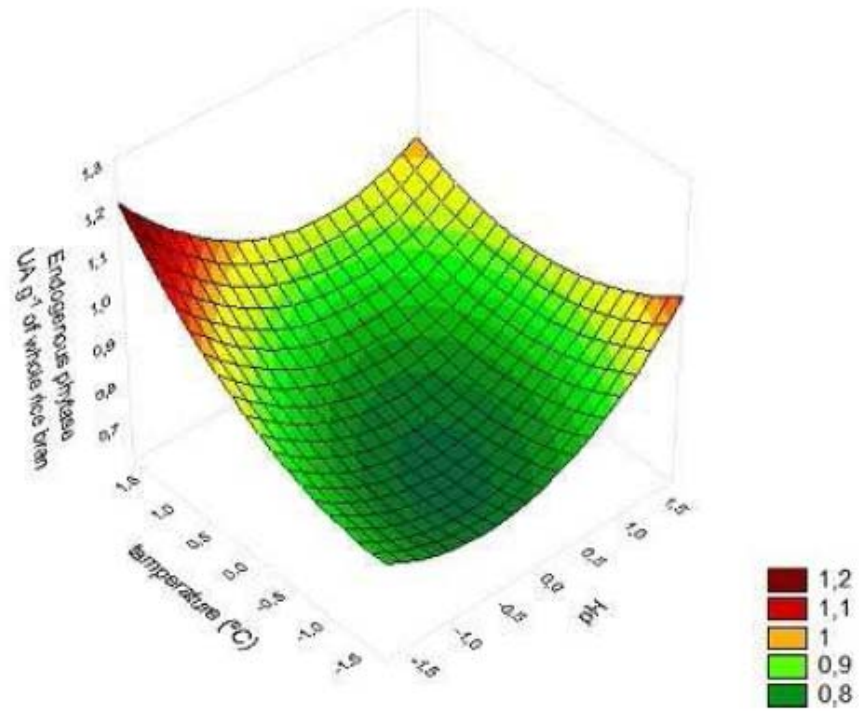
Statsoft. Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software), version 7. Tulsa, Oklahoma, USA.

Tangendjaja, K., Buckle, A., & Wooton, M. (1981), Dephosphorylation of phytic acid in rice bran. **Journal of Food Science**, v.46, 1021-1024.

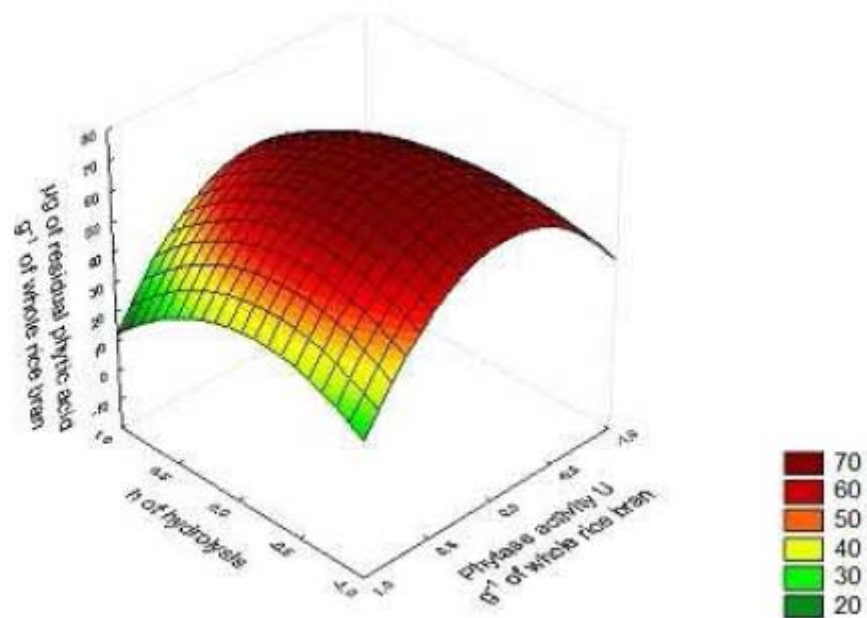
Vucenik, I., Shamsuddin, A. M. (2006). Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. **Nutrition and Cancer**, v.55, 109-125.

## Figure captions

**Figure 1** – Response surface for the Y1 response-function for the extraction of endogenous phytase from whole rice bran as a function of X1 (pH). X2 varies ( $^{\circ}\text{C}$ ) with the X3 variable fixed at 112.9 min.



**Figure 2** – Response surface of the Y2 -response function of the phytic acid hydrolysis process of whole rice bran as a function of the X4 (hours of hydrolysis) and X6 variables (phytase activity U g<sup>-1</sup> of whole rice bran) with the X5 variable fixed at 40°C.



**Table 1** – Orthogonal Central Composite Design with independent variables, experimental responses ( $Y_1$ ) and the estimated responses ( $\hat{Y}_1$ ) for the extraction process of endogenous phytase from the IRGA 417 whole rice bran.

Assays	Blocks	Independent Variables			Endogenous phytase UA g <sup>-1</sup> of whole rice bran	
		x <sub>1</sub> pH	x <sub>2</sub> temperature (°C)	x <sub>3</sub> time in minutes	Y <sub>1</sub> *	$\hat{Y}_1$ **
1	1	-1 (4.5)	-1 (6)	-1 (30)	0.776±0.001	0.759
2	1	-1 (4.5)	0 (10)	1 (90)	0.743±0.024	0.778
3	1	-1 (4.5)	1 (14)	0 (60)	0.799±0.005	0.820
4	1	0 (5.0)	-1 (6)	1 (90)	0.737±0.008	0.710
5	1	0 (5.0)	0 (10)	0 (60)	0.679±0.023	0.681
6	1	0 (5.0)	0 (10)	0 (60)	0.682±0.006	0.681
7	1	0 (5.0)	1 (14)	-1 (30)	0.715±0.006	0.743
8	1	1 (5.5)	-1 (6)	0 (60)	0.812±0.006	0.792
9	1	1 (5.5)	0 (10)	-1 (30)	0.818±0.004	0.783
10	1	1 (5.5)	1 (14)	1 (90)	0.811±0.014	0.828
11	2	-1.763(4.12)	0 (10)	0 (60)	0.931±0.006	0.909
12	2	1.763(5.88)	0 (10)	0 (60)	0.912±0.002	0.935
13	2	0 (5.0)	-1.763 (2.9)	0 (60)	0.786±0.008	0.823
14	2	0 (5.0)	1.763(17.1)	0 (60)	0.936±0.019	0.899
15	2	0 (5.0)	0 (10)	-1.763(7.2)	0.847±0.019	0.862
16	2	0 (5.0)	0 (10)	1.763(112.9)	0.894±0.002	0.881

\* (means ± standard deviation) (n=2). \*\* Estimated response.

**Table 2** – Box-Behnken design with independent variables, experimental responses ( $Y_2$ ) and estimated responses ( $\hat{Y}_2$ ) for phytic acid hydrolysis of the IRGA 417 whole rice bran.

Assays	Independent Variables			$\mu\text{g}$ of residual phytic acid $\text{g}^{-1}$ of whole rice bran	
	$x_4$ (h of hydrolysis)	$x_5$ ( $^{\circ}\text{C}$ of hydrolysis)	$x_6$ (Phytase activity $\text{U g}^{-1}$ of whole rice bran)	$Y_2^*$	$\hat{Y}_2^{**}$
1	-1 (12)	-1 (40)	0 (18)	23.55 $\pm$ 4.24	23.5 5
2	1 (36)	-1 (40)	0 (18)	37.45 $\pm$ 9.92	37.4 5
3	-1 (12)	1 (50)	0 (18)	83.17 $\pm$ 0.45	83.1 8
4	1 (36)	1 (50)	0 (18)	42.79 $\pm$ 4.41	42.7 8
5	-1 (12)	0 (45)	-1 (6)	37.89 $\pm$ 8.38	37.8 9
6	1 (36)	0 (45)	-1 (6)	21.52 $\pm$ 11.82	21.5 1
7	-1 (12)	0 (45)	1 (30)	20.70 $\pm$ 10.82	20.7 1
8	1 (36)	0 (45)	1 (30)	12.41 $\pm$ 2.81	12.4 1
9	0 (24)	-1 (40)	-1 (6)	14.85 $\pm$ 8.26	14.8 4
10	0 (24)	1 (50)	-1 (6)	29.99 $\pm$ 15.69	29.9 9
11	0(24)	-1 (40)	1 (30)	32.64 $\pm$ 0.44	32.6 4
12	0 (24)	1 (50)	1 (30)	21.36 $\pm$ 2.38	21.3 6
13	0 (24)	0 (45)	0 (18)	71.83 $\pm$ 10.19	71.8 3

\*(means  $\pm$  standard deviation) (n=2). \*\* Estimated responses.



**Table 3** – ANOVA for the estimate of the Y1 function-response for the extraction of endogenous phytase from IRGA 417 whole rice bran.

Dependent Variable	DF <sup>1</sup>	SQ <sup>2</sup>	F
Block	1	0.021231	0.000000*
(X1) pH (L)	1	0.001350	0.007380*
(X1) pH (Q)	1	0.037522	0.000000*
(X2) temperature (L)	1	0.011446	0.000000*
(X2) temperature (Q)	1	0.015481	0.000000*
(X3) time (L)	1	0.000683	0.045121*
(X3) time (Q)	1	0.018424	0.000000*
(X1)L x( X2)L	1	0.005967	0.000007*
(X1)L x( X3)L	1	0.000248	0.209959
(X2)L x( X3)L	1	0.003722	0.000099*
Lack of Fit	4	0.019077	0.000000*
Pure Error	17	0.002482	
Total	31	0.208582	

% explained variation( $R^2$ ) = 89.64 <sup>1</sup>= Degrees of freedom; <sup>2</sup>= sum of squares; \*  $p \leq 0.05$ .

**Table 4** – ANOVA test for estimating phytic acid hydrolysis in a whole rice bran model.

Dependent Variable	F <sup>1</sup>	SQ <sup>2</sup>	F
(X <sub>4</sub> ) time (L)	1	457.58	13.1471*
(X <sub>4</sub> ) time (Q)	1	1138.14	32.7010*
		5	
(X <sub>5</sub> ) temperature (L)	1	1658.21	47.6433*
(X <sub>5</sub> ) temperature (Q)	1	706.47	20.2981*
(X <sub>6</sub> )enzyme concentration (L)	1	341.08	9.7998*
(X <sub>6</sub> )enzyme concentration (Q)	1	6913.79	198.6459*
(X <sub>4</sub> )L x( X <sub>5</sub> )L	1	1757.86	50.5064*
(X <sub>4</sub> )L x( X <sub>5</sub> )Q	1	2.52	0.0724
(X <sub>4</sub> )Q x( X <sub>5</sub> )L	1	652.86	18.7578*
(X <sub>4</sub> )L x( X <sub>6</sub> )L	1	1.84	0.0529
(X <sub>4</sub> )Q x( X <sub>6</sub> )L	1	104.53	3.0032
(X <sub>5</sub> )L x( X <sub>6</sub> )L	1	493.79	14.1876*
Pure error	5	522.07	
Total	7	12782.3	
		7	

% explained variation( $R^2$ ) = 95.91%

<sup>1</sup>= Degrees of Freedom; <sup>2</sup>= sum of squares; \*  $p \leq 0.05$

## HIGHLIGHTS

Experimental design was used to optimize the extraction of endogenous phytase from whole rice bran.

Box-behnken design was used to produce an ingredient from whole rice bran with 84 % less phytic acid.

Maximum extraction of endogenous phytase from whole rice bran was of pH 4.12, 17.1°C and 112.9 min.

Whole rice bran with less phytic acid was produced with addition of endogenous phytase extract.

**ARTIGO 2****DIETARY WHOLE RICE BRAN CONTAINING PHYTIC ACID PREVENTS  
CHICKEN MEAT LIPID OXIDATION WHILE MAINTAINING NORMAL ANIMAL  
PERFORMANCE.**

Cleusa. I. Weber, Alexandre Oba, Adriana L. Soares, Massami Shimokomaki,  
Elza I. Ida

**SERÁ SUBMETIDO AO FOOD CHEMISTRY E AS NORMAS PARA PUBLICAÇÃO  
ESTÃO NO ANEXO.**

## DIETARY WHOLE RICE BRAN CONTAINING PHYTIC ACID PREVENTS CHICKEN MEAT LIPID OXIDATION WHILE MAINTAINING NORMAL ANIMAL PERFORMANCE.

Cleusa. I. Weber<sup>a</sup>, Alexandre Oba<sup>b</sup>, Adriana L. Soares<sup>a</sup>, Massami Shimokomaki<sup>cd</sup>,  
Elza I. Ida<sup>a\*</sup>

This study was carried in the laboratories from the Department of Food Science and Technology on the Londrina State University.

### ABSTRACT

The effects of a dietary whole rice bran (WRB) containing phytic acid and of a dietary low phytic acid whole rice bran (LPA-WRB) on broiler chicken performance parameters on the breast meat (*pectoralis major*) lipid oxidation stability and warmed-over flavour (WOF) development were investigated. One-day-old Cobb broiler chickens (n=260) were fed a commercial diet for 36 days. During the finish period (36<sup>th</sup> to 42<sup>nd</sup> day) the chickens were divided into five treatment groups: a commercial control diet, a 5% or 10% whole rice bran (WRB) diet, and a 5% or 10% whole rice bran with low phytic acid (LPA-WRB) content diet. The animals were sacrificed at an average weight of 2.626 ± 0.719 kg; breast meat samples were analysed for pH, colour attributes and lipid oxidation after 24 h *post mortem* and kept at 4 ± 1°C and during 30, 60 or 90 days at -18°C. Broiler chicken fed diets containing up to 10% WRB or LPA-WRB were not significantly different (p >0.05) in growth performance. There were no significant differences (p > 0.05) in pH and colour attributes in the breast meat stored for 24 h *postmortem*. The addition of 5 or 10% WRB to the broiler chickens' diet inhibited lipid oxidation and the development of warmed-over flavour.

**Key – words:** Phytic acid. Broiler chicken. Warmed-over flavor. Colour attributes. Phytase.

### 1 INTRODUCTION

Rice bran, which is 8% of the whole rice, is a by-product high in insoluble fibre and contains a considerable amount of carbohydrates, proteins and

<sup>a</sup> Department of Food Science and Technology, Londrina State University C.P.: 6001; 86051-970; Londrina, PR, Brazil

<sup>b</sup> Department of Animal Science, Londrina State University C.P.: 6001; 86051-970; Londrina, PR, Brazil

<sup>c</sup> Department of Veterinary Preventive Medicine; Londrina State University C.P.: 6001; 86051-970; Londrina, PR, Brazil

<sup>d</sup> Federal Technologic University of Parana, Pioneiros, 86036-370 -Londrina -PR -Brazil.

\* Corresponding author: Fax: +55 43 3371-4080 Email address: elida@uel.br

lipids (Lacerda, Soares Júnior, Bassinello, Silva-Loba, Campos & Siqueira, 2010). Due to its high fibre content, bran is rarely used in human and animal consumption. Rice bran contains approximately 7.0% phytic acid (Kasim & Edwards, 1998, Canan et al., 2011); phytic phosphorus represents approximately 75.0% of the total phosphorus (Reddy, 2002). Phytic acid (inositol hexaphosphate) is present in cereals and legumes at a concentration of 1–5% on a weight basis (Empson, Theodore & Graf, 1991). In animal nutrition, phytic acid is considered to be an undesirable component in the diet of monogastric animals (Nair, Laflamme & Duvnjak, 1991). The antinutritional effect of phytic acid is caused by the low bioavailability of minerals (Seynaeve, Janssen, Hesta, Van Nevel & De Wilde, 2000). However, its antinutritional effect depends on the relative proportion of phytate to metal ions and other dietary components (Graf & Eaton, 1990; Febles, Arias, Hardisson, Rodriguez-Alvarez & Sierra, 2002). Harbach, et al. (2007) demonstrated that the high phytic acid content in dietary defatted corn germ meal, provided during the terminal phase, did not cause any nutritional hazard and inhibited meat lipid oxidation in pigs.

The strong chelating properties of phytic acid are due to its ability to inhibit the formation of hydroxyl radicals, making the compound an effective antioxidant, and to form chelates with iron ions, making them catalytically inactive (Graf & Eaton, 1990). This effect of phytic acid was proven to be beneficial in the treatment of diabetes (Lee, Park, Chun, Cho, Cho, & Lillehoj, 2006), kidney stones (Saw, Chow, Rao, & Kavanagh, 2007) and cancer (Vucenik & Shamsuddin, 2006) and in the prevention of food oxidation (Soares, Olivo, Shimokomaki & Ida, 2004; Pokorny, Yanishlieva & Gordon, 2005; Harbach et al., 2007; Filgueiras, Casagrande, Soares, Shimokomaki & Ida, 2009).

Phytic acid as an antioxidant in meat products has been described by Lee, Hendricks & Conforth (1998) and Soares et al. (2004); its effect on lipid oxidation inhibition in meat has been confirmed by Lee et al (1998) and Morrissey, Sheehy, Galvin, Kerry, & Buckley (1998). Chicken meat is highly susceptible to lipid oxidation due to its high content of unsaturated fatty acids in its composition (Igene & Pearson 1979). Lipid oxidation leads to deterioration in flavour and to the production of potentially toxic substances, and it is a limiting factor in the stability of stored meat.

Heating meat, followed by low temperature storage, always results in the development of warmed-over flavour (WOF) (Tims & Watts, 1958).

The aims of this study were to investigate the effect of the addition of whole rice bran and low phytic acid whole rice bran to broiler chickens diets, which were provided during the finish period, on animal growth performance and to evaluate the pH, colour attributes and stability of lipid oxidation in chicken breasts.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 BROILER CHICKENS AND DIETS

One-day-old Cobb broiler chickens (n=260), which were purchased from a local commercial hatchery, were fed a commercial diet for 36 days. During the finish period, they were randomly divided into five treatment groups (n=52) with four repetitions (n=13) each: a control commercial diet, a 5% whole rice bran (WRB-5) diet, a 10% whole rice bran (WRB-10) diet, a 5% low phytic acid whole rice bran (LPA-WRB-5) diet and a 10% low phytic acid whole rice bran (LPA-WRB-10) diet. The initial average weight of the broiler chickens was  $2.181 \pm 0.955$  g. All of the prepared diets were isoproteic and isoenergetic, and the feeds were formulated according to the animal nutritional demand specifically related to this particular phase, as described in Table 1 (Rostagno et al. 2005). Broilers were given *ad libitum* access to feed and water. Four chickens of each repetition were slaughtered at an average weight of  $2.626 \pm 0.719$  g using commercially techniques consisting essentially of electrical stunning, slaughtering, scalding, evisceration, final cleaning and chilled in ice water.

### 2.2 LOW PHYTIC ACID WHOLE RICE BRAN

The following ingredients were used in the preparation of the rations: WRB and a WRB with a low phytic acid level (LPA-WRB). The phytic acid contents of WRB and of the LPA-WRB were  $7.24 \text{ g phytic acid } 100 \text{ g}^{-1}$  and  $1.10 \text{ g phytic acid } 100 \text{ g}^{-1}$ , respectively. The preparation of the LPA-WRB diet consisted of mixing the whole rice bran with 0.6 M sodium acetate buffer at pH 5.3 in a 1:10 proportion and adding endogenous phytase at a ratio of 30 UA endogenous phytase per gram of whole rice bran. The mixture was then incubated at 40°C for 36 h. The resulting whole rice bran,

which had 84.79% hydrolysis of phytic acid, constituted the LPA-WRB used in this experiment.

### 2.3 PHYTIC ACID DETERMINATION

Phytic acid was determined in the WRB, the LPA-WRB and other rations according to the methodology described by Latta & Eskin (1980), which is based on the reaction between ferric chloride and sulfosalicylic acid, and using Dowex-AGX-4 resin as described by Ellis and Morris (1986). The phytic acid content was expressed as  $\mu\text{g}$  of phytic acid  $\text{g}^{-1}$  of samples.

### 2.4 ANIMAL PERFORMANCE

Weight gain, feed consumption and feed conversion were measured at the starting and final experimental period. The consumption of phytic acid by the broiler chickens was estimated by measuring the feed consumption during the experimental period and the amount of phytic acid present in each diet.

### 2.5 EVALUATION OF THE EFFECT OF DIETS CONTAINING PPHYTIC ACID ON MEAT QUALITY

The effect of the WRB-5, WRB-10, LPA-WRB-5 and LPA-WRB-10 diets on meat quality was assessed under different storage conditions.

#### 2.5.1 Colour and pH Measurement

The pH was measured by inserting the electrodes of a pH meter system (Mettler–Toledo 345, Milano, Italy) into the breast muscle. Determinations were performed in triplicate on refrigerated samples, 24 h *postmortem* (n=20), from each group as reported by Olivo, Soares, Ida, & Shimokomaki (2001).

Colour was determined by a Colorimeter (Konica Minolta-CR400, Japan), and the values  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  were determined by the CIELAB colour system. This measurement was performed on the posterior surface of the intact skinless breast muscles, which had been refrigerated 24 h *postmortem*. Colour values were

measured for six different sites on the same sample from each group (n=20) (Olivo et al. 2001).

## 2.5.2 LIPID OXIDATION MEASUREMENT

From each group, 20 samples were randomly taken and analysed 1 day *post mortem* at  $4 \pm 1$  °C and at 30, 60 and 90 days *postmortem* at -18°C. Lipid oxidation was measured in duplicate with 10 g of the *pectoralis major m.* according to the technique described by Tarladgis, Pearson & Dugan (1964). The results were expressed as mg of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)  $\text{kg}^{-1}$ .

## 2.5.3. Warmed-Over Flavour Development (WOF) Measurement

*Pectoralis major m.* samples stored for 1 day at  $4 \pm 1$ °C and for 30, 60 and 90 days at -18°C were packed and cooked in a water bath to an internal temperature of 75°C. Subsequently, the packaged samples were stored at  $7 \pm 1$ °C for 48 h. The samples in duplicate were re-heated in a water bath for 15 min at 85°C and cooled to room temperature; the development of WOF was determined according to the method described by Tarladgis et al. (1964).

## 2.6 STATISTICAL ANALYSES

The experiments were performed using a randomised block design involving five treatments and four replications, taking into account the initial weight of the animal.

The statistical analyses were performed using the STATISTICA software package (version 7.0). The effect of the WRB and the LPA-WRB diets was evaluated through a variance analysis. The Tukey test was applied for the comparison of mean values among chicken diet treatments ( $p \leq 0.05$ ).

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 PHYTIC ACID CONTENT IN DIETS AND ANIMAL GROWTH PERFORMANCE



The phytic acid present in the control diet (Table 2) came from the corn and soybean ingredients added to the formulation. The amounts of phytic acid in the WRB-5 and WRB-10 diets were not significantly different; however, the phytic acid amounts in these diets were 271.85% higher than those in the control diet, suggesting that whole rice bran contains a high phytic acid content (approximately 7.24%) (Canan et al 2010). The phytic acid amounts in the LPA-WRB-5, LPA-WRB10 and control diets were not significantly different, but they differed in relation to the WRB-5 and WRB-10 diets. It is noteworthy that the phytic acid hydrolysis in the whole rice bran, in which endogenous phytase showed activity, was efficient in reducing the phytic acid level in the LPA-WRB-5 and LPA-WRB-10 diets. The LPA-WRB diet had a phytic acid reduction of approximately 92% in comparison to the WRB diet.

The broiler chicken feed consumption from the five diets was not significantly different (Table 3). During the finish period, the consumption of phytic acid was 141.885 g and 143.683 g for the WRB-5 and WRB-10 diets, respectively. Phytic acid consumption from the LPA-WRB-5 and LPA-WRB-10 diets was 9.812 g and 9.339 g, respectively.

The broilers chickens assigned to the five treatments showed no significant differences in weight gain, feed consumption and feed conversion parameters (Table 3). Therefore, the WRB diets rich in phytic acid and the LPA-WRB diets low in phytic acid content had no significant effects on the birds' performance. These results indicate that the high phytic acid consumption during the finish period did not affect the chickens growth performance. In finish period, chickens requires smaller amounts of minerals to the development (Rostagno et al. 2005). According to Kasim & Edwards (1998), rice bran is rich in phytic acid, but its use in animal feed is limited because of its high fibre content. One strategy used to incorporate rice bran in animal feed is to use between 10 and 20% of whole rice bran (Schoulten, Teixeira, Rodrigues, Freitas, Conte & Silva, 2003; Gallinger, Suárez, & Irazusta, 2004).

### 3.2 EVALUATION OF THE EFFECTS OF PHYTIC ACID – CONTAINING DIETS ON MEAT QUALITY

The WRB and WRB-LPA diets resulted in no significant difference in the pH and colour attributes ( $L^*$  and  $a^*/b^*$ ) of the breast muscle (Table 4) after 24 h *post mortem* at  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . Perhaps colour differences were not perceived because

colour oxidation began after 24 h of storage. The meat colour is mainly related to the muscle fibres, and to the myoglobin and haemoglobin pigments in the blood. Myoglobin and haemoglobin are associated with iron, which reacts with oxygen to change the meat colour. The free radicals produced during lipid oxidation can affect the pigments in the meat, resulting in pigment oxidation. During storage and light exposure, heme iron is changed, promoting the oxidation of myoglobin, which causes an alteration in meat colour (Mancini & Hunt, 2005). Phytic acid can alter the redox potential of the remaining ferric iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ), which is relatively inert. The iron in the ferrous form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) is more reactive and produces oxy radicals and lipid peroxides (Empson et al. 1991; Filgueiras et al. 2009;).

The lipid oxidation among the samples stored for 1 day at 4°C, which was measured by TBARS were not different (Table 5). However, there was a 54.50%, 40.00% and 33.00% inhibition in lipid oxidation with the addition of 5% or 10% WRB compared to the control diet ( $p \leq 0.05$ ) in samples stored at -18°C for 30, 60 and 90 days, respectively. The LPA-WRB diet did not inhibit lipid oxidation in comparison to the control diet. These results show that phytic acid has an important role in the inhibition of meat lipid oxidation by chelating minerals (Lee et al. 1998; Soares et al. 2004) and by inhibiting hydroxyl radical production, which is mediated by iron (Graf & Eaton 1990). It has been shown that phytic acid is a powerful antioxidant and an economically viable option in the preservation of biological materials that are sensitive to oxygen (Graf & Eaton 1990). This antioxidant inhibits lipid peroxidation in chicken meat (Empson, et al., 1991; Soares et al. 2004), raw pork meat (Harbarch et al. 2007). In cooked meat the effect was more pronounced than in raw and in cooked beef homogenates more than pork (Stodolak, Starzýnska, Czyszczoń, & Zyla, 2007).

The WOF indicates the rapid development of oxidised flavour in cooked meat upon subsequent heating (Watts, 1958). The WOF of breast meat stored for 1 day at 4°C did not differ significantly among the treatments (Table 6). However, the samples from broiler chickens fed LPA-WRB-5 or LPA-WRB-10 had lower WOF values after being stored at -18°C for 30, 60 and 90 days. The addition of 5% or 10% of LPAWRB had similar effects on WOF as the control diet. These results suggest that the presence of phytic acid inhibits the formation of WOF due to the formation of catalytically inactive iron chelates. The  $\text{Fe}^{2+}$  ions catalyse the formation

of WOF in meat; the ions are derived from the crushing and cooking processes, which result in the partial destruction of myoglobin and the release of iron (Pearson, Love, & Shortland, 1977). Because of its ability to chelate divalent ions, particularly iron ions, phytic acid must be more effective in inhibiting WOF than other chelating agents (Filgueiras et al. 2009).

#### **4 CONCLUSION**

The addition of 5 or 10% whole rice bran with high and low phytic acid did not bring about any nutritional hazard in the poultry, during finish period. However, the addition of 5 or 10% whole rice bran with high phytic acid inhibited lipid oxidation and the development of WOF in chicken breasts stored at -18°C for 90 days.

#### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the IRGA-Rio Grande Rice Institute for the kind donation of the whole rice bran. EII and MS are CNPq Research Fellows.

## REFERENCES

- Canan, C., Cruz, F. T., Delaroza, F., Casagrande, R. Sarmiento, C. P. M., Shimokomaki, M. & Ida, E. I. (2011), Studies on the extraction and purification of phytic acid from rice bran. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, n.7, p. 1057–1063.
- Ellis, R., Morris, E. R. (1986). Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion exchange chromatography. **Cereal Chemistry**, v.63, p. 58-59.
- Empson, K.L., Labuza, T.P., Graf, E. (1991). Phytic acid as a food antioxidant. **Journal of Food Science**, v.56, n.2, 560-563.
- Febles, C.I.; Arias, A. & Hardisson, A. (2002), Phytic acid level in wheat flours. **Journal of Cereal Science**, v.36, n.1, 19-23.
- Filgueiras, C.T., Casagrande, R., Soares, A.L., Shimokomaki, M., & Ida, E.I. (2009). Evaluation of the antioxidant activity of phytic acid from corn bran. **Química Nova**, v.32, n.7, 1787-1791.
- Gallinger, C.I.; Suárez, D.M. & Irazusta, A. (2004). Effects of rice bran inclusion on performance and bone mineralization in broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, v.13, p. 183-190.
- Graf, E., Eaton, J.W. (1990). Antioxidant function of phytic acid. **Free Radical Biology e Medicine**, v.8, 61-69.
- Harbach, A. P.; Costa, M. C. R.; Soares, A. L.; Bridi, A. M.; Shimokomaki, M.; Silva, C. A. & Ida, E. I.(2007), Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**, v.100, 1630-1633.
- Igene, J.O. & Pearson, M.A. (1979). Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. **Journal of Food Science**. v.44, 1285.
- Kasim, A. B. & Edwards JR, H.(1998), The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.76, 1-9.
- Lacerda, D. B. C. L.; Soares Júnior, M. S.; Bassinello, P. Z.; Castro M. V. L.; Silva-Loba, V. L.; Campos, M. R. H. & Siqueira, (2010), Quality of raw, extruded and parboiled rice bran. **Pesquisa Agropecuária tropical**, v.40, n.4, 521-530.
- Latta, M. & Eskin, M. (1980). A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, p. 1313-1315.
- Lee, B. J., Hendricks, D. G., & Conforth, D. P. (1998). Antioxidant effects on carnosine and phytic acid in a model beef system. **Journal of Food Science**, n.63, p. 394–398.

Lee, S. H., Park, H. J., Chun, H. K., Cho, S. Y., Cho, S. M. & Lillehoj, H. S. (2006). Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. **Nutrition Research**, n.26, p. 474-479.

Mancini, R.A. & Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. **Meat Science**, n.71, p. 100-121.

Morrissey, P. A., Sheehy, P. J. A., Galvin, K., Kerry, J., & Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p. S73–S86.

Nair, V.C., Laflamme, J., & Duvnjak, Z. (1991) Production of phytase by *Aspergillus ficcum* and reduction of phytic acid content in canola meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.54, p. 355-365.

Olivo, R., Soares, A.L, Ida, E. I. & Shimokomaki, M. (2001), Dietary Vitamin E inhibits Poultry PSE and improves meat functional properties. **Journal Food Biochemistry**. n.25, p.271-283.

Pearson, A. M.; Love, J. D. & Shortland, F. B. (1977). “Warmed-over” flavor in meat, poultry, and fish. **Advances in food research**, v.23, p. 1-74.

Pokorny, J.; Yanishlieva, N. & Gordon, M. (2005), **Antioxidantes de los alimentos**. Editora Acibria, Zaragoza, Espanha.

Reddy, N. R. (2002), Ocurrence, Distribution, Content, and Dietary Intake of Phytate. In: Food Phytates. REDDY, N. R.; SATHE. S. K. CRC Press, New York.

Rostagno, H. S.; Teixeira, A.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; De Oliveira, R. F. M.; Lopes, D. C.; Ferreira, A. J. P. & Toledo Barreto, S. L., (2005). **Brazilian Tables for Poultry and Swine: composition of feedstuffs and nutritional requirements**. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, MG, Brazil

Saw, N. K., Chow, K., Rao, P. N. & Kavanagh, J. P. (2007). Effects of inositol hexaphosphate (Phytate) on calcium binding, calcium oxalate crystallization and in vitro stone growth. **The Journal of Urology**, v.177, p. 2366-2370.

Schoulten, N. A.; Teixeira, A. S.; Rodrigues, P. B.; Freitas, R. T. F. DE; Conte, A. J. & Silva, H. O., (2003). Performance of broiler chickens fed with diet containing rice bran and enzymes. **Ciencia e Agrotecnologia**, v.27, n.6, p. 1380-1387.

Seynaeve, M. & De Wilde, R., 1995: **Possibilities to reduce the P-excretion in pig production by lowering the P-supply in the feed**. In: (eds), Proc. 9th Forum for Applied Biotechnology, Ghent. 2267–2270.

Soares, A.L.; Olivo, R.; Shimokomaki, M. & Ida, E.I. (2004), Synergism between dietary vitamin E and exogenous phytic acid in prevention of warmed-over flavor development in chicken breast meat, *Pectoralis major*, M. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.1, 57-62.

Stodolak, B.; Starzýnska, A.; Czyszczoń, M. & Zyla, K. (2007). The effect of phytic acid on oxidative stability of raw and cooked meat. **Food Chemistry**, v.101, p. 1041-1045.

Tarladgis, B.G.; Pearson, A. M. & Dugan, L. R. (1964). Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods – II Formation of the TBA – Malonaldehyde complex without acid-heat treatment. **Journal Science and Food Agriculture**, v.15, p. 602.

Tims, M. J. & Watts, B. M. (1958), Protection of cooked meats with phosphates. **Food Technology**, v.12, p. 240-243.

Vucenik, I. & Shamsuddin, A. M. (2006). Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. **Nutrition and Cancer**, v.55, p. 109-125.

**Table 1** – Composition of the diets fed to broiler chickens during the finish period

Ingredients	Control	WRB-5	WRB-10	LPA-WRB-5	LPA-WRB-10
Corn	69.44	63.94	58.44	64.27	59.01
Soybean	25.52	24.93	24.33	24.86	24.22
Whole rice bran	0	5.00	10.00	0	0
Low phytic acid rice bran	0	0	0	5.00	10.00
Soybean oil	2.44	3.48	4.53	3.38	4.34
Limestone	0.64	0.68	0.72	0.95	1.19
Salt	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
Phosphate	0.88	0.81	0.74	0.38	0
DL- methionine	0.14	0.16	0.19	0.16	0.19
L- lysine	0.12	0.16	0.19	0.16	0.19
L- threonine	0	0.02	0.04	0.02	0.04
Premix*	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Calculated					
Metabolizable energy (kcal kg <sup>-1</sup> )	3.150	3.150	3.150	3.150	3.150
Crude protein (%)	17.500	17.500	17.500	17.500	17.500
Methionine (%)	0.515	0.527	0.540	0.528	0.540
Meth. + cystine(%)	0.651	0.651	0.651	0.651	0.651
Digestible lysine (%)	0.892	0.892	0.892	0.892	0.892
Threonine (%)	0.588	0.580	0.580	0.580	0.580
Triptofano digestivel (%)	0.187	0.180	0.174	0.180	0.174
Calcium (%)	0.566	0.566	0.566	0.566	0.566
Sodium (%)	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185
Available phosphorus (%)	0.264	0.264	0.284	0.264	0.264

Diets consisted of WRB-5 = 5% whole rice bran; WRB-10 = 10% whole rice bran; LPA-WRB5 = 5% whole rice bran ingredient with low phytic acid content; LPA-WRB-10 = 10% whole rice bran ingredient with low phytic acid content. \* vit. A 1000,000 UI g<sup>-1</sup>, vit. D3 200,000 UI g<sup>-1</sup>, vit. K3 180,050 mg kg<sup>-1</sup>, vit. B1 149,858 mg kg<sup>-1</sup>, vit. B2 500,000 mg kg<sup>-1</sup>, vit. B6 249,975 mg kg<sup>-1</sup>, vit. B12 1250,000 mcg kg<sup>-1</sup>, vit. E 3500,000 UI, calcium pantothenate 1200,167 mg kg<sup>-1</sup>, niacin 70,000 mg kg<sup>-1</sup>, folic acid 70,000 mg kg<sup>-1</sup>, biotin 7,000 mg kg<sup>-1</sup>, colin 45000,000 mg kg<sup>-1</sup>, methionine 300000,125 mg kg<sup>-1</sup>, zinc 12500,000 mg kg<sup>-1</sup>, iron 12500,000 mg kg<sup>-1</sup>, copper 3000,000 mg kg<sup>-1</sup>, manganese 15000,000 mg kg<sup>-1</sup>, iodine 250,067 mg kg<sup>-1</sup>, selenium 56,250 mg kg<sup>-1</sup>, cobalt 50,000 mg kg<sup>-1</sup>, antioxidants 1000,000 mg kg<sup>-1</sup>.

**Table 2** – Amount of phytic acid in the broiler chicken diets prepared with whole rice bran (WRB) and low phytic acid whole rice bran (LPA-WRB).

Diets	Amount of phytic acid wet basis (g 100 g <sup>-1</sup> )
Control	4.172 <sup>b</sup> ± 0.306
WRB-5	14.174 <sup>a</sup> ± 3.406
WRB-10	16.853 <sup>a</sup> ± 0.803
LPA-WRB-5	1.153 <sup>b</sup> ± 0.017
LPA-WRB-10	1.224 <sup>b</sup> ± 0.009

<sup>a-b</sup> Mean values with different letters are significantly different (Tukey test,  $p \leq 0.05$ ).

**Table 3** – The effect of whole rice bran (WRB) and low phytic acid whole rice bran (LPAWRB), which were added to the broiler chicken diet during the finish period, on animal performance.

Treatments	Weight gain (g)	Feed consumption (g)	Feed conversion
Control	402.56 <sup>a</sup> ± 41.51	813.85 <sup>a</sup> ± 31.65	2.033 <sup>a</sup> ± 0.171
WRB-5	501.28 <sup>a</sup> ± 98.68	1001.03 <sup>a</sup> ± 150.47	2.031 <sup>a</sup> ± 0.351
WRB-10	497.95 <sup>a</sup> ± 80.83	852.56 <sup>a</sup> ± 66.85	1.729 <sup>a</sup> ± 0.162
LPA-WRB-5	497.95 <sup>a</sup> ± 80.83	851.79 <sup>a</sup> ± 60.53	1.805 <sup>a</sup> ± 0.113
LPA-WRB-10	369.23 <sup>a</sup> ± 59.36	763.85 <sup>a</sup> ± 98.69	2.082 <sup>a</sup> ± 0.203

<sup>a</sup> Mean values with different letters on the same column are significantly different (Tukey test,  $p \leq 0.05$ ).



**Table 4** – The effect of whole rice bran (WRB) and low phytic acid whole rice bran (LPA-WRB), which were added to the broiler chicken diet during the finish period, on the pH values and colour attributes of refrigerated breast meat.

Treatments	pH	L*	a*/b*
Control	5.78 <sup>a</sup> ±0.104	53.746 <sup>a</sup> ±4.601	0.171 <sup>a</sup> ±0.094
WRB-5	5.80 <sup>a</sup> ±0.119	52.914 <sup>a</sup> ±3.843	0.219 <sup>a</sup> ±0.096
WRB-10	5.81 <sup>a</sup> ±0.148	52.578 <sup>a</sup> ±4.329	0.224 <sup>a</sup> ±0.097
LPA-WRB-5	5.85 <sup>a</sup> ±0.171	53.502 <sup>a</sup> ±4.254	0.228 <sup>a</sup> ±0.122
LPA-WRB-10	5.82 <sup>a</sup> ±0.169	52.520 <sup>a</sup> ±3.244	0.199 <sup>a</sup> ±0.125

<sup>a-b</sup> Mean values with different letters on the same column are significantly different (Tukey test,  $p \leq 0.05$ ).

**Table 5** – The effect of whole rice bran (WRB) and low phytic acid whole rice bran (LPA-WRB), which were added to the broiler chicken diet during the finish period, on lipid oxidation in breast meat stored for 1 day at 4°C and for 30, 60 or 90 days at -18°C.

Treatments	Lipid oxidation (mg of TBARS kg <sup>-1</sup> of sample)			
	1 day	30 days	60 days	90 days
Control	0.830 <sup>a</sup> ±0.076	2.193 <sup>b</sup> ±0.592	2.083 <sup>b</sup> ±0.316	2.324 <sup>b</sup> ±0.285
WRB-5	0.656 <sup>a</sup> ±0.100	0.848 <sup>a</sup> ±0.064	1.208 <sup>a</sup> ±0.346	1.531 <sup>a</sup> ±0.089
WRB-10	0.785 <sup>a</sup> ±0.182	1.111 <sup>a</sup> ±0.404	1.287 <sup>a</sup> ±0.221	1.540 <sup>a</sup> ±0.243
LPA-WRB-5	0.791 <sup>a</sup> ±0.142	1.794 <sup>b</sup> ±0.091	1.720 <sup>b</sup> ±0.093	1.994 <sup>b</sup> ±0.153
LPA-WRB-10	0.691 <sup>a</sup> ±0.093	2.604 <sup>b</sup> ±0.556	1.809 <sup>b</sup> ±0.198	2.059 <sup>b</sup> ±0.381

<sup>a-b</sup> Mean values with different letters on the same column are significantly different (Tukey test,  $p \leq 0.05$ ).

**Table 6** – The effect of whole rice bran (WRB) and low phytic acid whole rice bran (LPA-WRB), which were added to the broiler chicken diet during the finish period, on warmed-over flavour in breast meat stored for 1 day at 4°C and for 30, 60 or 90 days at -18°C.

Treatments	Warmed-over flavour (mg of TBARS kg <sup>-1</sup> of sample)			
	1 day	30 days	60 days	90 days
Control	10.766 <sup>a</sup> ±3.414	10.221 <sup>b</sup> ±1.587 <sup>b</sup>	14.836 <sup>b</sup> ±2.932	22.428 <sup>b</sup> ±2.220
WRB-5	8.167 <sup>a</sup> ±1.975	9.406 <sup>a,b</sup> ±1.117	14.790 <sup>b</sup> ±2.663	15.152 <sup>a</sup> ±1.741
WRB-10	9.559 <sup>a</sup> ±2.552	6.860 <sup>a</sup> ±0.862	10.807 <sup>a</sup> ±0.301	15.025 <sup>a</sup> ±2.001
LPA-WRB-5	8.859 <sup>a</sup> ±2.779	11.142 <sup>b</sup> ±1.847	13.651 <sup>b</sup> ±1.446	19.810 <sup>b</sup> ±5.264
LPA-WRB-10	10.420 <sup>a</sup> ±2.761	14.688 <sup>c</sup> ±4.353	19.009 <sup>c</sup> ±1.026	21.892 <sup>b</sup> ±2.852

<sup>a-b</sup> Mean values with different letters on the same column are significantly different (Tukey test,  $p \leq 0.05$ ).

## HIGHLIGHTS

Whole rice bran in chicken diets inhibits lipid oxidation and warmed-over flavour breast meat.

Whole rice bran and low phytic acid rice bran dietary not affect colour attributes in breast meat.

Whole rice bran and low phytic acid rice bran dietary not affect chicken performance.

## 6 CONCLUSÃO

A partir do delineamento composto central ortogonal foi realizado o processo de extração da fitase endógena com obtenção de 0,936 UA de fitase g<sup>-1</sup> farelo de arroz integral.

Utilizando o delineamento Box-Behnken com adição de 30 UA de fitase endógena / g de farelo de arroz e incubação a 40 °C por 36 h foi produzido um ingrediente de farelo de arroz integral com redução de 84,79 % de ácido fítico.

A adição de até 10 % dos ingredientes de farelo de arroz integral com alto ou baixo teor de ácido fítico na ração dos frangos corte na fase de terminação, não apresentou efeito significativo em relação ao ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, bem como no pH e atributos de cor de peitos de frangos armazenados 24h *post mortem*.

A adição de 5 ou 10 % do ingrediente de farelo de arroz integral com alto teor de ácido fítico na dieta de frangos de corte na fase de terminação inibiu a oxidação lipídica e desenvolvimento de aroma de requentado de peitos de frangos armazenados até 90 dias a -18 °C.

A adição de 5 ou 10 % do ingrediente de farelo de arroz com baixo teor de ácido fítico na dieta de frangos de corte na fase de terminação não inibiu a oxidação lipídica e o desenvolvimento de aroma de requentado de peitos de frangos armazenados a -18 °C por 90 dias.

## **ANEXOS**

## **ANEXO A – Normas para publicação**

### **Food Chemistry**

#### **Guide for Authors**

##### **Types of paper**

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews. 1. Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations). 2. Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations). 3. Rapid communications - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor. 4. Short communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication. 5. Viewpoints - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope. 6. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest. 7. Book reviews.

##### **Page charges**

This journal has no page charges.

##### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and

<http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive

2010/63/EU for animal experiments

[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm).

### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue*: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the

widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open Access**

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and

submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre-and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

### **Referees**

Authors are required to submit, with the manuscript, the names, addresses and email addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

### **Review Policy**

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is

- 1) on a topic outside the scope of the Journal;
- 2) lacking technical merit;
- 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance;
- 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or
- 5) is poorly written.



### Use of wordprocessing software

**General:** Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

### Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

### Subdivision -numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the email address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 150 words.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

### **Database linking**

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below. Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the following format: **Database ID: xxxx** Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- ASTM: ASTM Standards Database (ASTM ID: G63)
- CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: A1631510)
- GenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- GEO: Gene Expression Omnibus (GEO ID: GSE27196; GEO ID: GPL5366; GEO ID: GSM9853)
- MI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)

- MINT: Molecular INTeractions database (MINT ID: 6166710)
- NCBI Taxonomy: NCBI Taxonomy Browser (NCBI Taxonomy ID: 48184)
- NCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- PDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- TAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- UniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

## **Artwork**

### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text -Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### References

#### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can

be included in the reference list. Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL [http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea\\_04\\_07.pdf](http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf). Accessed 14.02.11.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. No more than 30 references should be cited in your manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

**Reference style Text:** Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK. Details concerning this referencing style can also be found at <http://linguistics.byu.edu/faculty/henrichsen/apa/apa01.html>. **List:** references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

**Examples:**

Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59. Reference to a book: Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4). Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

**Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions

please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
  - Full postal address
  - Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
  - All figure captions
  - All tables (including title, description, footnotes)
  - Further considerations
  - Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
  - References are in the correct format for this journal
  - All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
  - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
  - Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
  - If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes
- For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

#### **Additional information**

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full. Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

## ANEXO B – Trabalhos apresentados em eventos científicos

WEBER, Cleusa Ines, OBA, Alexandre, SOARES, Adriana Lourenço, SHIMOKOMAKI, Massami, IDA, Elza louko, Otimização da extração da fitase endógena e da hidrólise do ácido fítico do farelo de arroz integral In: **XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2010, Salvador – Bahia.

### OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DA FITASE ENDÓGENA E DA HIDRÓLISE DO ÁCIDO FÍTICO DO FARELO DE ARROZ INTEGRAL

O ácido fítico (AF) está distribuído de diferentes formas nos grãos de muitos cereais, leguminosas, oleaginosas, amêndoas e está associado com alguns componentes específicos ou partes da semente. No beneficiamento tradicional do arroz, são gerados em torno de 10% de farelo, e este resíduo apresenta boa fonte de energia, sendo uma alternativa na produção de rações. O farelo de arroz integral (FAI) possui alto teor de AF, sendo, portanto considerado como fator indesejável produção animal, dificultando assim sua ampla utilização em rações. Contudo, o AF apresenta importante função antioxidante em alimentos e materiais biológicos sensíveis ao oxigênio. Esta investigação buscou estabelecer as melhores condições para a extração da fitase endógena (FE) do farelo de arroz, e ainda estabelecer as melhores condições para a hidrólise do AF presente no FAI utilizando a FI extraída para posterior produção de ração de aves. A otimização da extração da fitase foi realizada por meio de planejamento experimental <sup>3-6</sup>, e as variáveis estudadas foram, pH (4,5, 5,0 e 5,5), temperatura (4, 14 e 24°C) e tempo (30, 60 e 90min). Para obtenção das melhores condições de hidrólise do AF foi utilizado o planejamento Box-Behnken com três variáveis, tempo (12, 24 e 36h) temperatura (40, 45 e 50°C) e concentração de Fitase (6, 18 e 30 mmol/g). A extração e obtenção da FE foi realizada em meio de CaCl<sub>2</sub> 2%, e a atividade da FE foi determinada e expressos em m mol/g. A hidrólise do AF no FAI foi realizada em tampão acetato pH 5,3, e a determinação do teor do AF residual nas amostras hidrolisadas foi realizada por meio de cromatografia de troca iônica seguido de espectrofotometria e os resultados expressos em mg de AF/g de amostra. Para a extração da FE, às variáveis tempo e temperatura não apresentaram diferenças, e o pH 4,5 ( $p \leq 0,05$ ) apresentou melhor efeito. Para a extração da FE as melhores condições foram, pH 4,5, tempo de 60 min e temperatura de 14°C. Em relação à hidrólise do AF da FAI foi verificado que a temperatura influenciou no teor da enzima adicionada e na interação entre o tempo e temperatura ( $p \leq 0,05$ ). Assim sendo, a máxima hidrólise do AF presente no FAI foi de 85% na temperatura de 40°C, tempo de 36h e 30mmol/g de FE. Estes resultados serão úteis para aplicação na ração de aves e investigação da ação do AF na carne de frango.

**Palavras – chave:** Fitase endógena de arroz. Farelo de arroz integral. Ácido fítico.

WEBER, Cleusa Ines, IDA, Elza louko, OBA, A., SOARES, Adriana Lourenço, SHIMOKOMAKI, Massami. Dietary whole rice bran containing phytic acid prevents

chicken meat lipid oxidation In: **16th World Congress of Food Science and Technology – IUFoST**, 2012, Foz do Iguaçu -Paraná. Aceito para apresentação.

**Dietary whole rice bran containing phytic acid prevents chicken meat lipid oxidation**

**Cleusa I. Weber<sup>1</sup>, Alexandre Oba<sup>2</sup>, Adriana L. Soares<sup>1</sup>, Massami Shimokomaki<sup>3,4</sup>, Elza I. Ida<sup>1</sup>**

Phytic acid has a high chelating ability for polyvalent metal ions and has effective antioxidant effect in foods systems. Rice bran contains about 7.0% of phytic acid and therefore has great antioxidant potential. The aim of this work was to investigate the effect of dietary of whole rice bran (WRB) and rice bran lower phytic acid contents (LRB) on chicken meat quality. The broilers diet (n=260) were divided into five treatments: Control treatment (CT), diet with addition of 5% WRB (WRB5), 10% WRB (WRB10), 5% LRB (LRB 5) and with 10% LRB (LRB 10). The broilers received this diet at the termination phase (7 days before slaughtering). 24h post mortem breast meat (*Pectoralis major*) samples were analyzed for color (L\*, a\*, b\*) and pH. Lipid oxidation and warmed-over flavor (WOF) measured by thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS) were evaluated after 1 day in samples stored at 4°C and 30, 60 and 90 days at -18°C. Tukey test was used to determine significant difference. Color attributes and pH did not differ significantly ( $p \leq 0.05$ ) among treatments. There was no difference for lipid oxidation among treatments at 4°C samples. However the rancidity was inhibited about 60%, 42% and 33% with WRB5 and 49%, 38% and 33% with WBR10 in comparison to the CT ( $p \leq 0.05$ ) in samples stored at -18°C for 30, 60 and 90 days, respectively. The WOF was lower in samples of WRB10 in comparison to the other treatments ( $p \leq 0.05$ ). In conclusion, the dietary containing WRB prevents lipid oxidation and WOF in poultry meat.

---

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, Londrina State University C.P.: 6001; 86051-970; Londrina, PR, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Animal Science, Londrina State University C.P.: 6001; 86051-970; Londrina, PR, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Veterinary Preventive Medicine; Londrina State University C.P.: 6001; 86051-970; Londrina, PR, Brazil.

<sup>4</sup> Federal Technologic University of Parana, Pioneiros, 86036-370 -Londrina – PR –Brazil.





## LETTER OF ACCEPTANCE

### CONGRATULATIONS !!!

We are pleased to inform you that your abstract entitled "Dietary whole rice bran containing phytic acid prevents chicken meat lipid oxidation " by Weber, Cleusa Inês; Massami Shimokomaki; Adriana Lourenço Soares; Alexandre Oba; Ida, Elza Iouko.

submitted to the 16th World Congress of Food Science and Technology - IUFoST - "*Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology*" was **ACCEPTED** for presentation. You will be informed of the presentation form (oral or poster) by May 31, 2012.

We are looking forward to seeing you soon.

Sincerely,

*Delia B. Rodriguez-Amaya*

Prof. Dr. Delia B. Rodriguez-Amaya

Scientific Committee Chair

Check our website [www.iufost.org.br](http://www.iufost.org.br) for the date of presentation of your paper after May 31, 2012.