UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Detanificação e desfitinização de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor*) por tanase e fitase e estudo biológico

PATRÍCIA FERNANDA SCHONS
Química de Alimentos

Profª. Drª. GABRIELA ALVES MACÊDO
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas - SP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Schons, Patrícia Fernanda
Sch65d Detanificação e desfitinização de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor*) por tanase e fitase e estudo biológico / Patrícia Fernanda Schons . -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Gabriela Alves Macedo
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Sorgo. 2. Taninos. 3. Fitato. 4. Tanase. 5. Fitase. I. Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Sorghum gruels (*Sorghum bicolor*) detanification and defitinization with
tannase and phytase and biological study
Palavras-chave em inglês (Keywords): *Sorghum*, Tannins, Phytate, Tannase, Phytase
Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos
Banca examinadora: Gabriela Alves Macedo
Mário Roberto Maróstica Júnior
Vânia Battestin
Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

_____

Profª. Drª. Gabriela Alves Macedo
Orientadora

_____

Profª. Drª. Sonia Couri
EMBRAPA

_____

Drª. Vânia Battestin
UNITAU

_____

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior
FEA/UNICAMP

_____

Profª. Drª. Alessandra Gambero
USF

Aos meus magníficos pais Valdir e Rosane Schons e

Minha amada irmã Ângela.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Gabriela Alves Macedo pela oportunidade, apoio e amizade durante essa jornada.

Aos amigos e colegas do laboratório de Bioquímica de Alimentos Márcio, Joelise, Danielle, Eloísa, Haroldo, Fabiano, Marcela, Janai, Juliana, Daniela, Paula, Viviane, Ana Luiza, Junior, Evandro, Pricila, Gisele, Priscila Hoffmann, Bia, Valdeci, Tatiana, Dora, Gaby, Luciana Fleuri, Vânia e Carolina Bedani pelo apoio e em especial à Edi Franciele por, além do companheirismo ter me ajudado no ensaio biológico.

Aos meus pais, Valdir e Rosane, por me apoiarem sempre, me incentivarem a alcançar meus objetivos, me permitir continuar sonhando e pelo amor.

À minha irmã Ângela e meu cunhado José pelas palavras de apoio e incentivo.

Ao auxílio das alunas de iniciação científica Marcela Oliveira e Nádia Leitão.

Ao Felipe pelo apoio incondicional em momentos difíceis e pelo carinho.

Às minhas colegas de república Dani gaúcha, Renata, Dani bio e Natália, que tornaram a vida em Campinas mais agradável, pela amizade, pelos ótimos momentos que passamos juntas, risadas, comidinhas, cervejinhas.

Aos amigos de longa data Marcio Schmiele, Milene, Leandra, Rita, Meg, Marcelo, Carla - Alemoa, Aline, Renatinha, Neli, Janete, Monaliza, Juline, Siumar, Jonas.

Ao Laboratório de Análise de Alimentos pelo auxílio nos ensaios. À Faculdade de Engenharia Agrícola e ao Laboratório de Cereais da FEA pelo auxílio na moagem e peneiragem do sorgo.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição da FEA pelo auxílio no experimento biológico, ao pessoal do Laboratório de Nutrição Experimental em especial ao Prof. Célio.

À técnica Susana, do Laboratório de Ensaios Biológicos da FEA pela inestimável ajuda e pelos momentos divertidos.

Aos professores e amigos da Universidade Federal de Pelotas pelo conhecimento, incentivo e amizade, especialmente às Professoras Rosane e Mirian.

À todos os funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho

À banca examinadora pela contribuição dada para o aprimoramento do trabalho

À empresa Polinutri, especialmente Sr. Ludovico pelo fornecimento de sorgo.

À Fapesp pela bolsa de estudo concedida.

À Deus por me conduzir, me dando força nos momentos que mais necessito.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS IV
ÍNDICE DE TABELAS V
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS VII
RESUMO VIII
SUMMARY IX
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
2.1 Sorgo 4
2.2 Compostos fenólicos 7
2.2.1 Taninos 11
2.3 Fitatos 22
2.4 Aplicação de enzimas na alimentação animal 25
2.4.1 Tanase 25
2.4.2 Fitase 27
2.5 Diminuição de fatores antinutricionais em cereais 31
2.6 Estudos *in vivo* utilizando enzimas e fermentação na melhoria da digestibilidade de cereais 34
3 OBJETIVOS 37
3.1 Geral 37
3.2Específicos 37
4 METODOLOGIAS 38
4.1 Produção de tanase 38
4.1.1 Pré-inóculo 39
4.1.2 Meio de fermentação 39
4.1.3 Extração 39

4.2 Determinação de atividade enzimática no extrato liofilizado bruto produzido por *Paecilomyces variotti* e fitase comercial 40
4.2.1 Determinação da atividade de tanase 41
4.2.2 Determinação da atividade de protease 41
4.2.3 Determinação da atividade de lipase 42
4.2.4 Determinação da atividade de carboximetilcelulase 42
4.2.5 Determinação da atividade de polimetilgalacturonase 43
4.2.6 Determinação da atividade de fitase 43
4.3 Proteína total no extrato liofilizado bruto produzido por *Paecilomyces variotti* e fitase comercial 44
4.4 Caracterização química dos grãos de sorgo 45
4.4.1 Composição centesimal 45
4.4.2 Compostos fenólicos 45
4.4.2.1 Otimização da metodologia de extração 45
4.4.2.2 Fenóis totais 46
4.4.2.3 Taninos hidrolisáveis 46
4.4.2.4 Taninos condensados 47
4.4.3 Determinação de fósforo inorgânico 47
4.5 Tratamento dos grãos de sorgo com *Paecilomyces variotti,* tanase e fitase 48
4.5.1 Preparo dos grãos de sorgo 48
4.6 Cinética do tratamento enzimático de grãos de sorgo 49
4.7 Otimização do tratamento dos grãos de sorgo com tanase e fitase utilizando desenho experimental 49
4.7.1 Otimização do tratamento da farinha de sorgo utilizando planejamento fatorial fracionado 50
4.7.2 Otimização do tratamento da farinha de sorgo empregando delineamento composto central rotacional (DCCR) 51
4.8 Ensaio biológico 52
4.8.1 Animais 52

4.8.2 Dietas experimentais 52
4.8.3 Métodos biológicos 54
4.8.4 Determinações nas fezes e urina 54
4.8.5 Determinações bioquímicas no plasma 55
4.8.6 Determinação de cinzas no fêmur 55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 56
5.1 Atividade enzimática, proteína total e atividade específica do extrato enzimático bruto produzido por *Paecilomyces variotti* 56
5.2 Otimização da metodologia de extração dos compostos fenólicos 58
5.3 Caracterização química dos grãos de sorgo vassoura 60
5.3.1 Composição centesimal 60
5.4 Tratamento dos grãos de sorgo com *Paecilomyces variotti,* tanase e fitase 63
5.6 Otimização do tratamento enzimático do sorgo 71
5.6.1 Delineamento fatorial fracionado 71
5.6.2 Delineamento compostos central rotacional 73
5.7 Ensaio biológico 77
5.7.1 Dietas 77
6 CONCLUSÕES 87
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90
9 ANEXOS 112
9.1 Permissão para o ensaio biológico 112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de *Sorghum bicolor* L. moench. 4
Figura 2. Esquema resumido da biossíntese de metabólitos secundários em plantas e sua relação com os metabólitos primários. 8
Figura 3. Estrutura genérica da maioria dos flavonóides. 10
Figura 4. Estrutura dos flavonóides encontrados em menor concentração nas plantas..... 11
Figura 5. Possível forma pela qual taninos se complexam a proteínas. 13
Figura 6. Ácido tânico e suas ligações 14
Figura 7. Estrutura de galotaninos (A), ácido gálico-galoil (B) e digálico-digaloil (C)..... 15
Figura 8. Estrutura de elagitaninos e do ácido hexahidroxidifênico (B). 15
Figura 9. Esquema das principais rotas metabólicas e enzimas envolvidas na biossíntese de taninos hidrolisáveis, ácido sináptico, hidroxicinamatos e ácido 5-caféico. 16
Figura 10. Rota bioquímica para a biossíntese de ácido protocatechuico e ácido gálico em plantas e microrganismos 17
Figura 11. Biossíntese de enzimática do ácido gálico (1) ao 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose (3). 1-galoilglicose; (9) 1,6-digaloilglicose; (10) 1,2,6-trigaloilglicose; (11) 1,2,3,6-tetragaloilglicose..... 18
Figura 12. Fórmulas estruturais de flavan-3-ol (taninos condensados)..... 19
Figura 13. Origem bioquímica da estrutura básica dos flavonóides. 20
Figura 14. Esquema da rota bioquímica e enzimas envolvidas na produção de taninos condensados..... 21
Figura 15. Estrutura molecular do ácido fítico. 23
Figura 16. Hidrólise do ácido tânico 26
Figura 17. Ação da fitase em myo-inositol hexafosfato com liberação de myo-inositol livre e fosfato inorgânico 28
Figura 18. Microscopia para identificação do fungo *Paecilomyces vaiortti.* 32
Figura 19. Tratamentos aplicados à farinha de sorgo cozida. Pv = *Paecilomyces variotti;* E-enzimas tanase e fitase..... 48
Figura 20. Tratamento da farinha de sorgo com tanase e fitase. 53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos compostos polifenólicos segundo a cadeia carbônica..... 9
Tabela 2. Decomposição de taninos por microrganismos 33
Tabela 3. Planejamento fracionado $2^{(4-1)}$ aplicado aos grãos de sorgo 50
Tabela 4. Variáveis utilizadas na otimização do tratamento dos grãos de sorgo com seus respectivos níveis..... 51
Tabela 5. Medida da atividade de tanase, protease, lipase, carboximetilcelulase, polimetilgalacturonase e fitase, proteína total e suas atividades específicas em extrato bruto obtido fermentação por *Paecilomyces variotti* 56
Tabela 6. Extração de taninos com metanol e metanol com 1% de HCl em diferentes tempos, quantificados pelo método de Vanilina..... 59
Tabela 7 Composição centesimal, compostos fenólicos e fósforo de grãos de sorgo tipo vassoura 60
Tabela 8. Efeito do tratamento enzimático e fermentativo em farinha de sorgo no teor de fenóis totais, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico 63
Tabela 9. Planejamento fracionado (2^{4-1}) no tratamento de sorgo através de tanase e fitase71
Tabela 10. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase, concentração de tanase e porcentagem de sorgo na resposta taninos hidrolisáveis 72
Tabela 11. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase, concentração de tanase e porcentagem de sorgo na resposta taninos condensados 72
Tabela 12. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase, concentração de tanase e porcentagem de sorgo no fósforo inorgânico 72
Tabela 13. Determinação de taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico após tratamento dos grãos de sorgo através de DCCR 2^3 74
Tabela 14. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase e tanase nos taninos hidrolisáveis ($p< 0,1$)..... 75
Tabela 15. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase e tanase nos taninos condensados ($p< 0,1$)..... 75
Tabela 16. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase e tanase no fósforo inorgânico ($p< 0,1$) 76

Tabela 17. Composição centesimal das matérias primas e das rações formuladas. 78
Tabela 18. Composição das dietas para o ensaio biológico 78
Tabela 19. Ingestão total, digestibilidade aparente da proteína e fósforo, excreta diária de fósforo pelos animais 79
Tabela 20 Determinações bioquímicas no plasma dos animais em estudo 83
Tabela 21. Concentração de minerais cálcio, fósforo e ferro no plasma e cinzas no fêmur dos animais em estudo 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

TC – taninos condensados

TH – taninos hidrolisáveis

Pi – fósforo inorgânico

FT - fenóis totais

BSA - Bovine serum albumin solution (albumina de soro bovino)

PDA - Potato Dextrose Agar

SC – sorgo cru

ST – sorgo tratado

CA – caseína

Pv – *Paecilomyces variotti*

E – enzimas tanase e fitase

RESUMO

Este trabalho visou avaliar o efeito do fungo *Paecilomyces variotti* e das enzimas fitase e tanase sobre fatores antinutricionais, taninos e fitatos presentes no sorgo tipo vassoura. A enzima tanase produzida pelo fungo *Paecilomyces variotti* apresentou atividade enzimática de 626U/g, além desta enzima, estavam presentes no extrato enzimático, com menor atividade protease, carboximetilcelulase, polimetilgalacturonase e fitase. A fitase empregada foi comercial (NATUPHOS – BASF) e apresentou atividade de 660U/g. O sorgo utilizado neste estudo possui 13,6% de proteína, 4,2% de lipídeos, 1,7% de cinzas e 80,5% de carboidratos, elevada concentração de compostos fenólicos, especialmente taninos condensados e 226mg/100g de sorgo de fósforo inorgânico. O sorgo foi preparado e tratado com *Paecilomyces variotti,* tanase e fitase em diferentes combinações. As respostas diminuição de tanino e aumento de fósforo foram avaliados, os melhores resultados foram obtidos quando a farinha de sorgo foi tratada com tanase e fitase durante 5 dias. Por meio de planejamento experimental foi feito estudo do tratamento de sorgo com as enzimas fitase e tanase, o qual indicou a relação entre sorgo:água, como sendo a variável mais significativa para o processo. O processamento (maceração e fervura) e adição das enzimas foram efetivos na redução de taninos e aumento de fósforo, quando comparamos estes resultados com o sorgo cru, porém, as diferentes concentrações das enzimas não tiveram efeito sobre os parâmetros avaliados. Baseado nos resultados expostos, o sorgo para a elaboração das dietas foi tratado com a concentração inferior de enzimas estudada (100U/Kg). O estudo *in vivo* mostrou que a dieta elaborada com sorgo tratado enzimaticamente foi efetivo na melhoria da digestibilidade aparente de fósforo, na diminuição da excreção de fósforo, resultaram em melhores índice bioquímico para glicose e colesterol, apresentaram uma menor atividade de enzimas hepáticas aspartato aminotrasnferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), comparando com sorgo cru. No entanto, não teve efeito significativo na melhoria do ganho de peso, da digestibilidade aparente de proteína, na concentração de fósforo, ferro e cálcio plasmático, bem como na concentração de mineral contido no fêmur.

SUMMARY

This work aimed assess the fungus *Paecilomyces variotti* and enzymes phytase, tannase effects on the antinutritional factors, tannins and phytates present in sorghum. The tannase produced by the fungus *Paecilomyces variotti* has enzymatic activity of 626U/g, in addition this enzyme were present in the enzymatic extract protease, in less activity protease, carboxymetilcellulase, polymetilgalacturonase and phytase. The phytase used is commercially (NATUPHOS – BASF) and has activity of 660U/g. The sorghum utilized in this study has 13.6% protein, 4.2% of lipids, 1.7% ash and 80.5% carbohydrate, high concentration of phenolic, mainly condensed tannins and inorganic phosphorus 226mg/100g sorghum. The sorghum was prepared and treated by using *Paecilomyces variotti*, tannase and phytase in different combinations. The decrease in the tannins and increase in the phosphorus were evaluated, the best results were obtained when sorghum flour was treated with tannase and phytase for 5 days. Through experimental design were made a study about sorghum treated by the enzymes tannase and phytase, which indicated the relationship between sorghum:water, as the most significant variable in the process. The processing (soaking and boiling) and addition of enzymes were effective in reducing tannin and increase phosphorus, when comparing these results with the raw sorghum, however, different concentrations of the enzymes had no effect on the parameters evaluated. Based on the results above, the sorghum for the preparation of the diets were treated with lower concentration of enzymes studied (100U/Kg). The *in vivo* assay showed that the diet prepared using sorghum treated enzimaticaly was effective in improving digestibility of phosphorus, reducing the phosphorus excretion, resulting in better biochemical index for glucose and cholesterol, showed a lower activity of liver enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanin aminotransferase (ALT), compared with raw sorghum. However, it had no significant effects in improve weight, the apparent digestibility of protein, and the concentration of phosphorus, iron and calcium in the plasma and mineral content in the femur.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa uma posição privilegiada quando se considera a produção agrícola e agropecuária, indicando capacidade para ser o maio fornecedor mundial de alimentos. Atualmente é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários. É o primeiro produtor e exportador de café, açúcar, álcool e sucos de frutas. Além disso, lidera o ranking das vendas externas de soja, carne bovina e de frango, tabaco, couro e calçados de couro. O agronegócio brasileiro é responsável por 33% do PIB, 42% das exportações totais e 37% dos empregos, sendo a principal fonte de renda para a economia brasileira (MAPA, 2007).

A Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB publicou estudo da previsão para a safra brasileira de grãos (algodão, amendoim, arroz, feijão, girassol, mamona, milho, soja, sorgo, aveia, centeio, cevada, triticale e trigo) para 2009, esta está estimada em 135,3 milhões de toneladas, 6,1%, ou 8,8 milhões de toneladas inferior à obtida na safra 2007/08, que foi de 144,1 milhões de toneladas (CONAB, 2009).

A alimentação animal é um importante elo da agroindústria brasileira, o setor consome cerca de 65% da produção nacional de milho e 45% da oferta de farelo de soja, além de movimentar a indústria química para o fornecimento de insumos, como, vitaminas, aminoácidos, enzimas e microingredientes. A agropecuária auxilia, também no desenvolvimento tecnológico voltado à produção de proteína animal, destinada à alimentação humana, pois está na base da produção de carnes (frango, suíno e bovino), ovos e leite (BUTOLO, 2002).

Para manter este mercado faz-se necessário a produção de grãos, sendo que, atualmente, os mais empregados são triguilho, trigo, farelo de arroz, milho, soja e farelo de soja. Percebe-se que é pequena a diversidade de grãos empregados na alimentação animal, o que induz a preços elevados destes produtos. Portanto, seria interessante empregar culturas diversificadas e alternativas a estas.

A cultura do sorgo, no Brasil, que era inexpressiva até 1970, cresceu significativamente desde então. Na safra de 1999/2000, a produção alcançou mais de um milhão de toneladas e esse número coloca o Brasil entre os dez maiores produtores mundiais. No mundo, o sorgo se caracteriza por ser o quinto cereal mais cultivado, com uma produção total de mais de 60 milhões de toneladas FAO (1999), que representa cerca de 10% da produção de milho. Em termos de economia, o custo de produção do sorgo é, em média, 20% menor do que o do milho, enquanto que seu valor biológico alcança pelo menos 95% em relação a esse cereal (FIALHO *et al.,* 2002). A produção de sorgo, safra 2008/2009 está estimada em uma área de 818,8 mil hectares, com produtividade de 2250 Kg/ha e uma produção total de 1842 mil toneladas de grão (CONAB, 2009). Nosso país é um potencial produtor de sorgo, pois esta cultura apresenta características que se adequam as condições de solo e clima.

O sorgo representa uma alternativa importante para auxiliar o abastecimento do mercado de grãos e, por suas características nutricionais, tem sido pesquisado como ingrediente energético alternativo ao milho. Geralmente apresenta preço inferior, sendo ainda mais vantajoso seu cultivo em regiões de solos arenosos e clima seco, onde apresenta melhor rendimento de nutriente por unidade de área (SCHEUERMANN, 1998).

O sorgo possui teor elevado de taninos, que diminuem os prejuízos causados pelos pássaros à cultura, devido ao sabor adstringente, mas, por outro lado, torna as rações menos palatáveis e nutritivas, interferindo no metabolismo dos carboidratos e proteínas (FIALHO e BARBOSA, 1997).

O sorgo é empregado principalmente, para alimentar animais, pois, sabe-se que este possui fatores antinutricionais, como taninos e fitatos, os quais possuem habilidade de se complexar com proteínas e minerais, respectivamente, e como conseqüência implicam na diminuição do ganho de peso dos animais cuja ração seja rica em sorgo. Uma possível alternativa para melhorar a biodisponibilidade dos nutrientes do sorgo, é a aplicação de enzimas hidrolíticas. Outra alternativa é o melhoramento genético das sementes (FIIALH *et al.,* 2002).

Na literatura, podemos encontrar muitos trabalhos que estudam a aplicação de enzimas hidrolíticas de modo geral (lipases, amilases, proteases, glucanases e fitases) diretamente nas rações. Contudo, os resultados obtidos são controversos, alguns autores relatam que as enzimas melhoram o ganho de peso, características bioquímicas, absorção de proteínas e minerais e outros constatam que estas não tem efeito nenhum nos parâmetros estudados, ou ainda que as enzimas diminuíram o ganho energético, absorção de proteínas, fósforo e minerais.

O objetivo deste trabalho foi diminuir fatores antinutricionais, como taninos e fitatos em sorgo de alta tanagem por meio da aplicação de *Paecilomyces variotti,* enzimas tanase e fitase e verificar o efeito *in vivo.*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) pertence à família Graminácea/Poaceae, (Figura 1), quinto cereal mais produzido no mundo, sendo precedido pelo trigo, arroz, milho e cevada. A produção de sorgo na América do Norte e do Sul, Europa e Austrália, destina-se principalmente à alimentação animal, ao passo que na Ásia, África, Rússia, China e América Central, o grão é importante como alimento humano (BUTOLO, 2002).

Figura 1. Planta de *Sorghum bicolor* L. moench (DENDY, 1995).

No Brasil o sorgo produzido é todo destinado à alimentação animal, principalmente, avicultura e suinocultura. Bovinos, eqüinos e pequenos animais também são consumidores,

mas em menor proporção. A silagem de sorgo e o pastejo são igualmente utilizados para rebanhos de corte e de leite. O sindicato nacional das indústrias de rações (SINDIRAÇÕES) tem perspectiva de que o mercado de rações cresça 4% em 2009 e represente 63 milhões de toneladas (REVISTA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2003).

O sorgo, especialmente após tratamento para diminuir fatores antinutricionais, pode ser uma alternativa aos cereais que compõem as rações animais, que teriam usos mais nobres em alimentação humana. Além disso, este cereal tem potencial para substituir parte do milho utilizado na produção de ração sem perdas significativas em termos nutricionais e qualitativos destas rações, além de ganhos em termos de redução de custos (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2007).

Em função do sorgo não apresentar uma proteção para as suas sementes, como, por exemplo, a palha do milho ou as glumas do trigo e da cevada, a planta de sorgo produz compostos fenólicos, que servem como uma defesa química contra pássaros, patógenos e outros competidores (BUTOLO, 2002).

Atualmente, existe uma tendência de considerar o sorgo com ou sem tanino e não mais com alto, médio e baixo tanino (KEMM e BRAND, 1996), uma vez que o tanino é um caráter controlado por dois pares de genes dominantes. O sorgo apresenta um teor de proteína em torno de 8 a 9%, geralmente um pouco superior ao milho; entretanto, a proteína e amido presentes no endosperma do grão de sorgo se complexam aos taninos, diminuindo a digestibilidade relativa dos nutrientes nesse cereal (SCHEUERMANN, 1998).

Os compostos fenólicos são metabólicos secundários, ou seja, não participam de vias metabólicas responsáveis pelo crescimento e reprodução, sendo assim, sua natureza e concentração variam enormemente. Podem ser classificados em três grupos, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. Os ácidos fenólicos e flavonóides não têm efeito adverso na qualidade nutricional, porém, podem causar cor indesejável quando processados em condições alcalinas e diminuir a palatabilidade das rações (MAGALHÃES e DURÃES, 2003). Dietas contendo taninos estão associadas a diminuição da ingesta, ganho de peso,

eficiência alimentar e digestibilidade de proteínas em experimentos animais (CHUNG *et al.,* 1998). Sob o ponto de vista agronômico, as principais vantagens do tanino para a planta são, resistência a pássaros, aos fungos causadores da podridão no grão antes da colheita, redução na germinação de grãos na panícula e resistência a insetos (AERTS *et al.,* 1999; BUTOLO, 2002).

Toda planta de sorgo possui aproximadamente os mesmos níveis de proteína, amido, lipídios etc., porém vários compostos fenólicos podem ocorrer ou não, e entre esses compostos destaca-se o tanino condensado, que tem ação antinutricional principalmente para os animais monogástricos (MAGALHÃES e DURÃES, 2003).

O sorgo vem sendo objeto de muitos estudos por conter fatores antinutricionais como taninos e fitatos (myo-inositol-hexakisfosfato), os quais possuem capacidade de complexar proteínas e minerais, respectivamente. Estes compostos conseqüentemente diminuem o valor nutricional do sorgo.

Okoh *et al.,* (1982) investigaram o potencial de 16 cultivares de sorgo da Nigéria na alimentação de aves e encontraram maiores teores de proteína comparados com o milho. Contudo, concluíram que a eficiência na utilização desta proteína depende do balanço de aminoácidos e das concentrações de taninos das variedades.

A utilização de enzimas exógenas surgiu como alternativa para aumentar o valor nutritivo de ingredientes alimentares que possuem baixos coeficientes de digestibilidade devido a compostos não hidrolisáveis pelas próprias enzimas, chamados de fatores antinutricionais (FURLAN *et al.,* 1997). O setor de enzimas para rações ainda é novo no Brasil e a previsão é que a produção e comércio cresçam cada vez mais.

O termo “fator antinutricional” tem sido usado para descrever compostos ou classes de compostos presentes numa extensa variedade de alimentos de origem vegetal, que quando consumidos, reduzem o seu valor nutritivo, interferindo na digestibilidade, absorção ou utilização de nutrientes e, se ingeridos em altas concentrações, podem acarretar em efeitos danosos à saúde (SGARBIERI, 1987; GRIFFITHS *et al.,* 1998).

Segundo Chubb (1982) os antinutricionais podem ser classificados em relação ao tipo de nutriente que eles afetam, como também pelo tipo de resposta produzida, em três grupos: 1) Substâncias que prejudicam a digestibilidade ou a utilização de proteínas, representados pelos inibidores de enzimas digestivas, como, as lectinas, saponinas e taninos; 2) Substâncias que reduzem ou interferem na solubilidade e utilização de elemento minerais, tais como ácido fítico, ácido oxálico, glicosinolatos e gossipol; 3) Substâncias que inativam ou aumentam o requerimento de certas vitaminas, são as antivitaminas lipossolúveis A, D, E e K e antivitaminas hidrossolúveis, tiamina, ácido nicotínico, piridoxina e cianocobalamina.

A diminuição de fatores antinutricionais é estudada através de diferentes processamentos, maceração, germinação, cozimento, fermentação, aplicação de enzimas (TOWO, *et al.* 2006; MATUSCHEK, *et al.* 2001; MAHGOUB e ELHAG, 1998).

2.2 Compostos fenólicos

As plantas sintetizam uma vasta gama de compostos orgânicos que são tradicionalmente classificados como compostos primários e secundários. Metabólitos primários são compostos que possuem funções essenciais no organismo como, fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento, por exemplo, fitoesteróis, nucleotídeos, lipídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos. Outros fitoquímicos, a maioria dos quais são acumulados extensivamente em algumas espécies, são referidos como metabólitos secundários. Nas plantas os compostos secundários exercem função de proteção contra herbívoros e infecções microbianas, proteção contra raios UV (CROZIER *et al.,* 2006), na Figura 2 estão representadas resumidamente as principais vias para a biossíntese de metabólitos secundários.

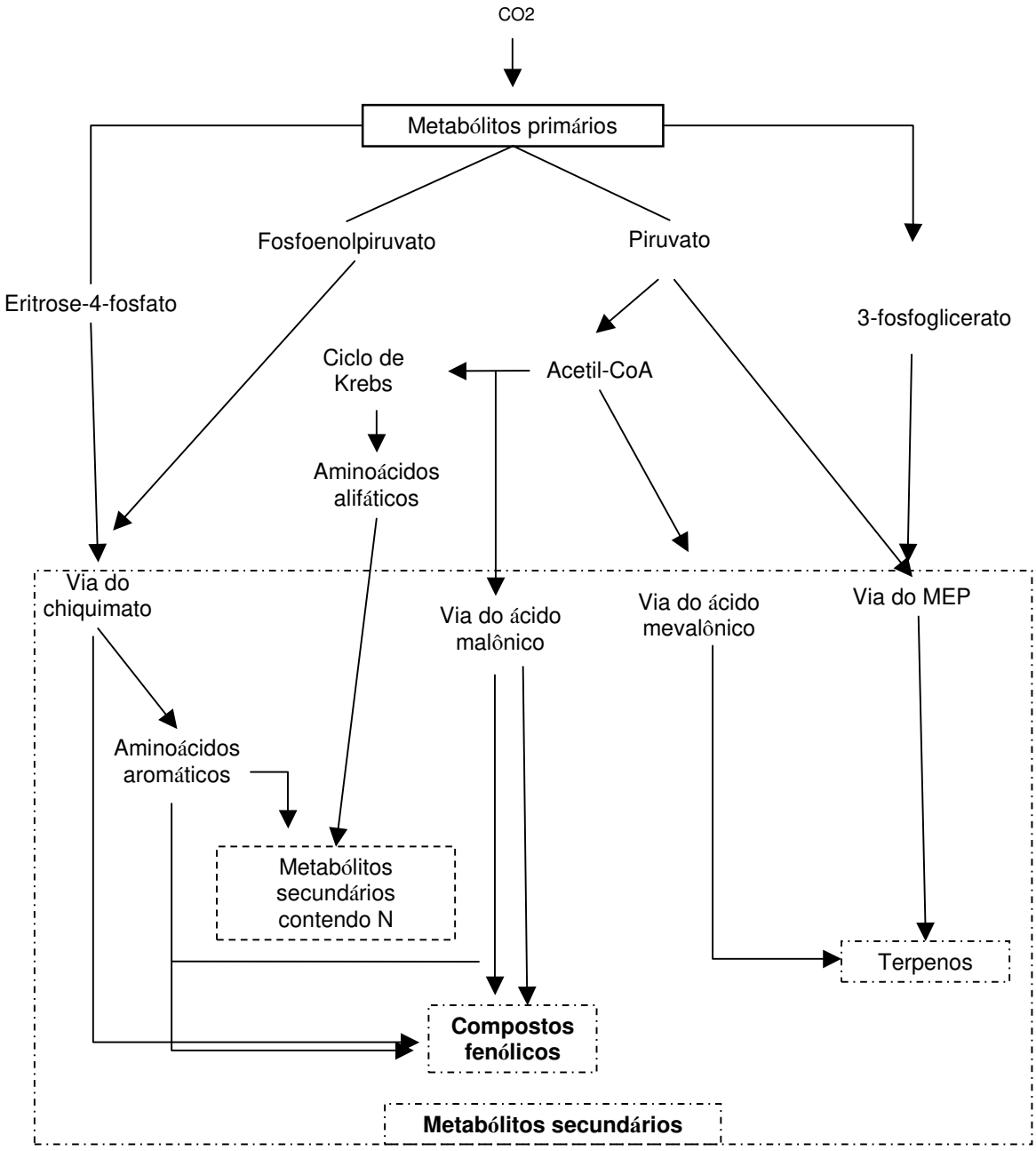

Figura 2. Esquema resumido da biossíntese de metabólitos secundários em plantas e sua relação com os metabólitos primários (TAIZ e ZEIGER, 2002).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários e podem ser definidos como compostos que possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilas e/ou seus derivados funcionais como ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros. Essa definição também engloba a classe dos flavonóides. A Tabela 1 apresenta uma das classificações mais comuns das principais classes de polifenóis. Essa classificação é baseada na cadeia de carbonos principal que constitui o composto polifenólico.

Tabela 1. Classificação dos compostos polifenólicos segundo a cadeia carbônica

Estrutura	Classe Polifenólica
C6 (anel benzênico)	Fenóis
C6-C1	Ácidos hidroxibenzóicos
C6-C2	Acetofenonas e Ácidos fenilacéticos
C6-C3	Ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Benzofenonas e Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos e Antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides: flavanonas, flavonóis, antocianidinas, flavanóis, flavonas e isoflavonas
(C6-C3-C6)2	Biflavonóides
(C6-C1)n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6)n	Taninos condensados ou Proantocianidinas

Fonte: CROZIER *et al.,* (2006).

Polifenóis podem ser classificados em dois grandes grupos, flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides são os fenólicos mais abundantes no reino vegetal, constituídos por 15 carbonos, com dois anéis aromáticos ligados por três carbonos, como mostra a Figura 3. As principais subclasses dos flavonóides são as flavonas, flavanóis, flavan-3-ol,

isoflavonas, flavanonas e antocianidinas. Outros grupos flavonóides que são encontrados na dieta, porém em menor quantidade são dihidroflavanols, flavan-3,4-diols, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas e auronas, conforme mostra a Figura 4.

Os principais não flavanóides presente nas dietas são os ácido fenólicos, o mais importante é o ácido gálico, sendo este o precursor de tanino hidrolisável, hidroxicinamatos e estilbenos. Neste trabalho serão focados os grupos flavan-3-ol e ácidos fenólicos, pois estes são os precursores de taninos condensados e hidrolisáveis, respectivamente.

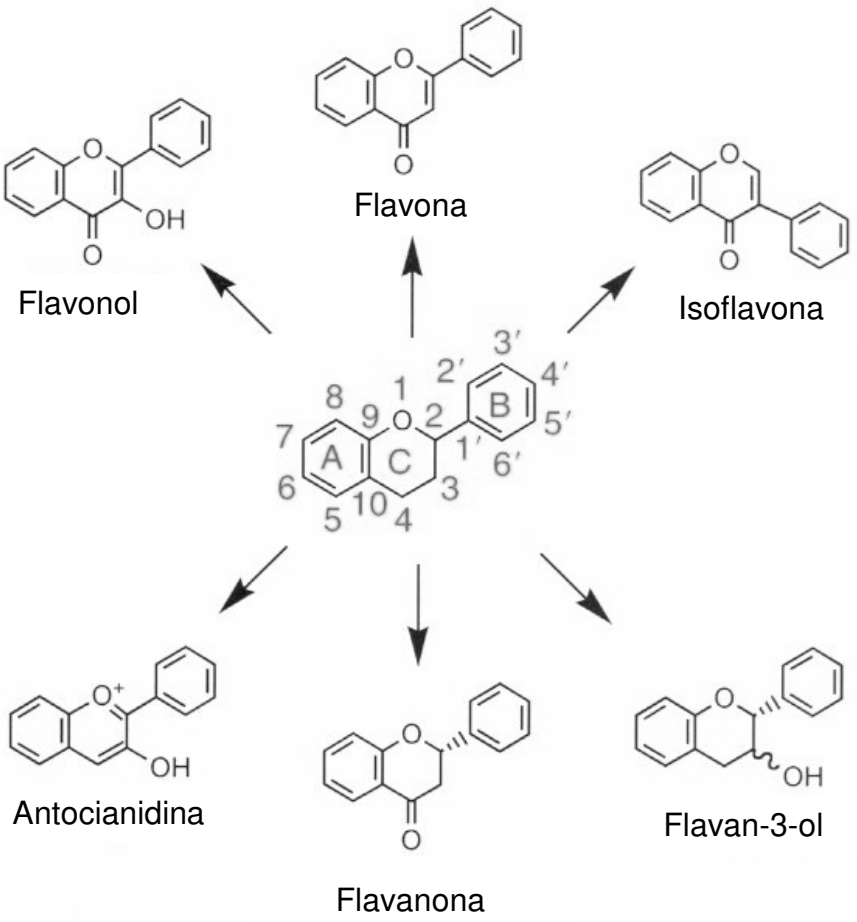

Figura 3. Estrutura genérica da maioria dos flavonóides (CROZIER *et al.,* 2006).

Polifenóis podem ser classificados em dois grandes grupos, flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides são os fenólicos mais abundantes no reino vegetal, constituídos por 15 carbonos, com dois anéis aromáticos ligados por três carbonos, como mostra a Figura 3. As principais subclasses dos flavonóides são as flavonas, flavanóis, flavan-3-ol, isoflavonas, flavanonas e antocianidinas. Outros grupos flavonóides que são encontrados na dieta, porém em menor quantidade são dihidroflavanols, flavan-3,4-diols, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas e auronas, conforme mostra a Figura 4.

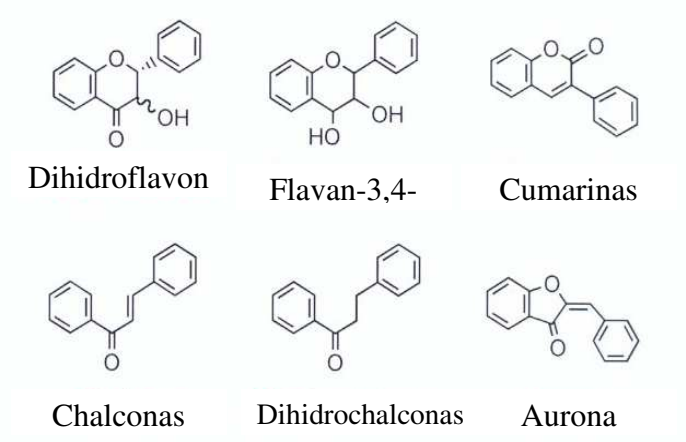

Figura 4. Estrutura dos flavonóides encontrados em menor concentração nas plantas (CROZIER *et al.,* 2006).

2.2.1 Taninos

O termo tanino é antigo e foi dado devido a capacidade destes compostos de se ligarem com proteínas presentes na pele de animais, transformando-as em couro (curtimento ou "tanning") (FILHO, 2004).

Taninos são definidos quimicamente como polímeros fenólicos solúveis em água, exceto aqueles de elevado peso molecular. Possuem como principais características habilidade de complexar proteínas, combinar-se com celulose e pectina para formar

complexos insolúveis, acarretando em alterações na fermentação ruminal e diminuição no valor nutricional (HASLAM, 1966; RODRIGUES e GONÇALVES, 1999; PINTO, 2003).

Acredita-se que a associação do tanino com a proteína e a estabilidade desse complexo se deve principalmente a formação de pontes de hidrogênio, ligações iônicas, ligações covalentes e interações hidrofóbicas entre essas moléculas, sendo dependente do pH do meio, portanto reversível (HASLAM, 1996), entre pH de 3,5 a 7,0 a formação do complexo tanino-proteína é favorecido, em caso de pH superior a 8,0, o complexo tende a ser desfeito rapidamente e, em pH 1,0 a 3,0, cerca de 90% da proteína está na forma livre (LEINMÜLLER *et al.,* 1991).

As principais características das proteínas que influenciam positivamente nessa associação são: alto peso molecular, estrutura mais aberta e flexível, ponto isoelétrico e conteúdo de prolina. Sendo este último, o mais importante, pois a prolina tem características hidrofóbicas e contribui para a conformação mais aberta da molécula de proteína (BUTOLO, 2002). A capacidade de taninos se ligarem com proteínas e formar complexo insolúvel é aumentado com o seu grau de polimerização (AERTS *et al.,* 1999).

O teor e o tipo de tanino variam, não só de um vegetal para outro como também de uma parte para outra do mesmo vegetal, segundo Rodrigues e Gonçalves (1999) o sorgo possui entre 0,6 – 2,61% de taninos. Na Figura 6 está demonstrada uma possível forma dos taninos ligarem-se a proteína.

Segundo Filho (2004) as sementes de sorgo maduras podem apresentar teores de taninos condensados maiores que 5%. Estas são formadas por várias extensões de epicatequinas com um elevado grau de polimerização entre 8 – 9 moléculas de catequina.

Aerts *et al.,* (1999) desenvolveram estudos empregando forragens contendo diferentes concentrações de taninos condensados na alimentação de ovinos e constataram que o efeito das proantocianidinas pode ser positivo ou negativo dependendo da concentração que esta se encontra. Efeitos benéficos no metabolismo de proteína, crescimento de lã, ganho de peso, produção de leite foram verificados quando a forragem

continha entre 2 – 4% de tanino condensado, contudo em concentração de 6 - 12% houve diminuição no consumo da forragem, inibição na digestão das fibras e consequentemente redução da produtividade.

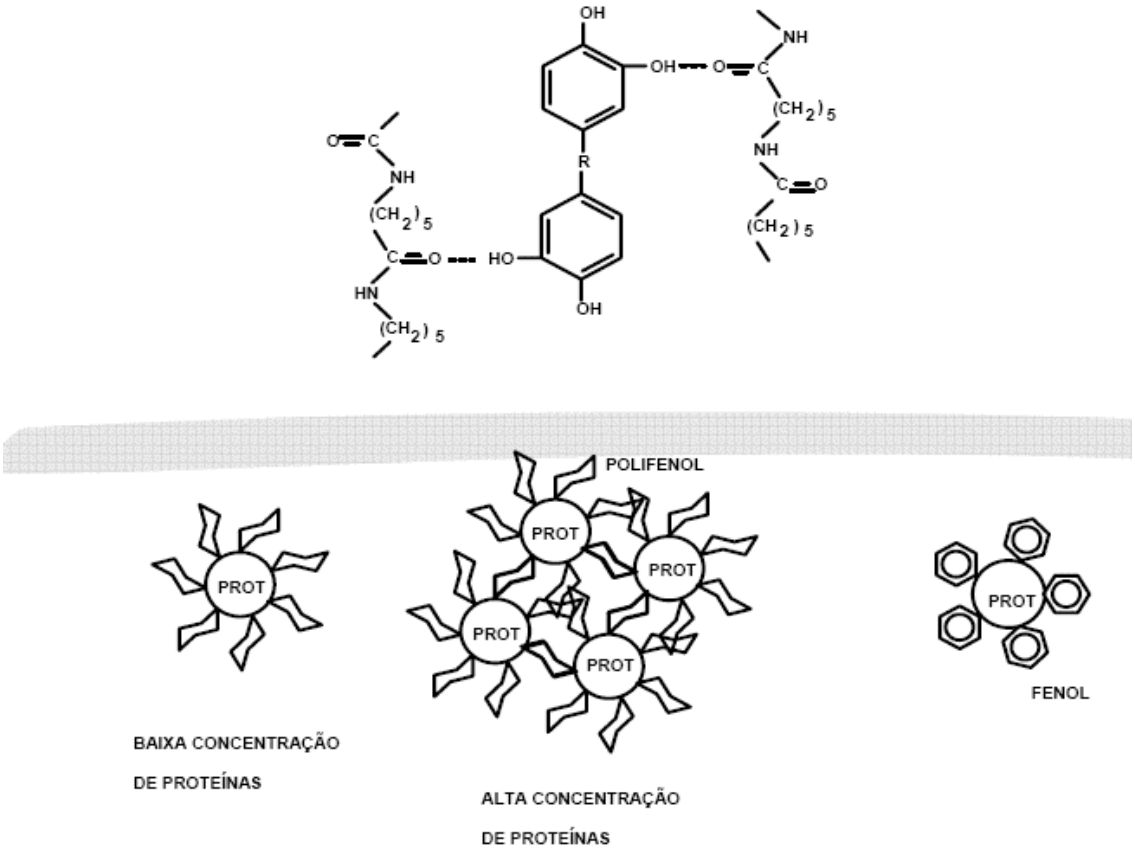

Figura 5. Possível forma pela qual taninos se complexam a proteínas (FARIA, 2005).

Os taninos são classificados em dois grupos principais: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (SALUNKHE *et al.,* 1990; CARNEIRO *et al.,* 2001).

a) Taninos hidrolisáveis: os taninos hidrolisáveis são unidos por ligações esterásicas (ligação éster entre o grupo anel aromático e o resíduo de glicose) e depsidásica (ligação éster entre os anéis aromáticos), sendo prontamente hidrolisados por ácidos, bases e tanase em suas unidades formadoras (Figura 6) (HAGERMAN e BUTLER, 1981). A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é um poliol, usualmente glicose, com seus grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo hexahidroxidifênico (elagitaninos).

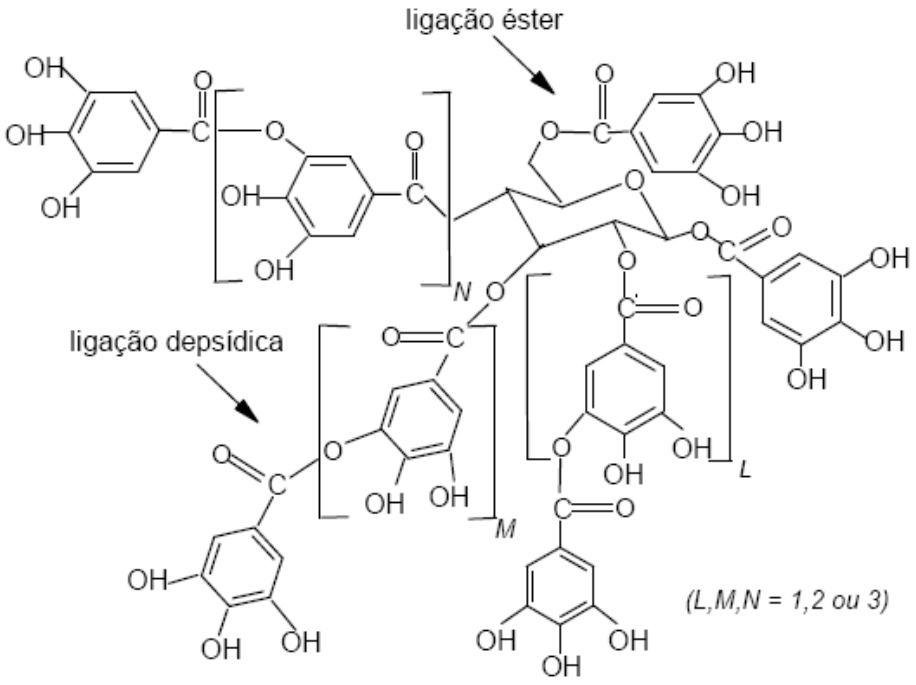

Figura 6. Ácido tânico e suas ligações (NAKAMURA, 2003)

A Figura 7 mostra a estrutura química dos galotaninos e os grupos fenólicos que esterificam o núcleo glicosídico, ácido gálico ou digálico**.** Há grande abundância de ésteres de glicose mono ou di-galoil na natureza que são considerados taninos. Para ser considerado como tanino com capacidade de se ligar e precipitar proteína é necessário que

pelo menos três grupos hidroxil da molécula de glicose estejam esterificados. O mais comum dos galotaninos é o ácido tânico (Figura 6) (PINTO, 2003).

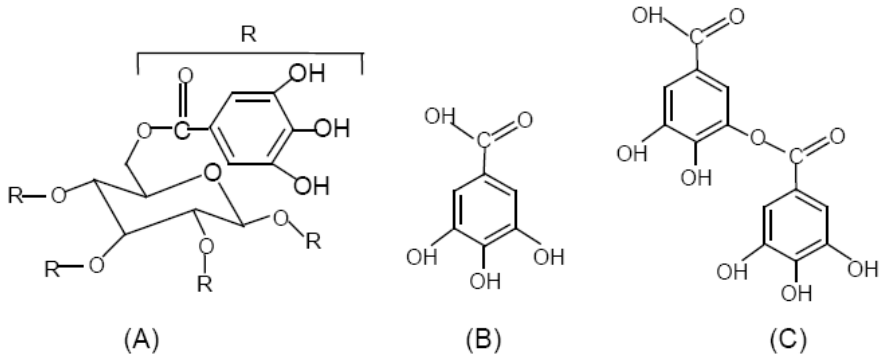

Figura 7. Estrutura de galotaninos (A), ácido gálico-galoil (B) e digálico-digaloil (C) (BHAT, 1998).

A Figura 8 mostra a estrutura molecular de elagitaninos. Nesta classe de taninos, os grupos fenólicos utilizados são moléculas de ácido hexahidroxidifênico.

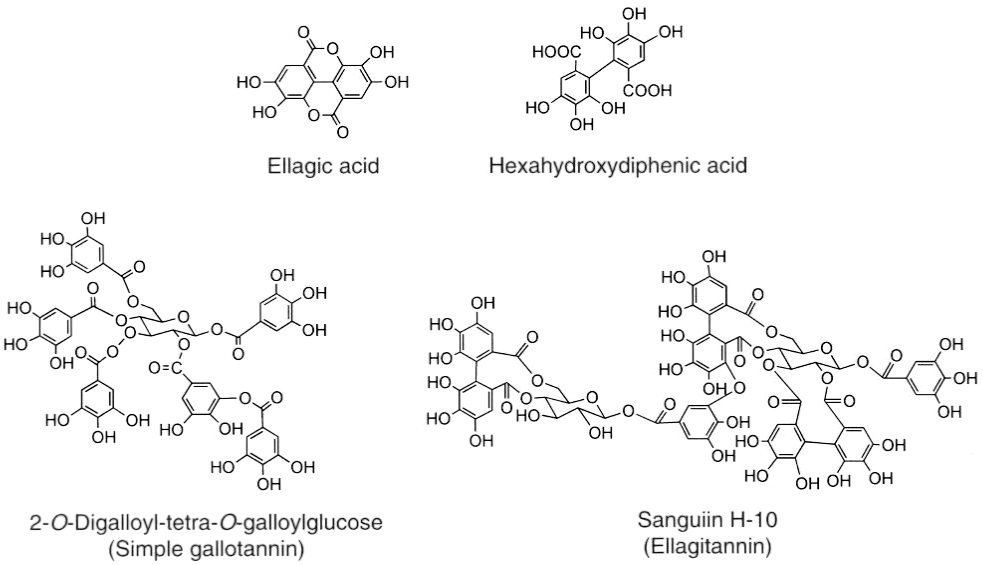

Figura 8. Estrutura de elagitaninos e do ácido hexahidroxidifênico (B) (CROZIER *et al.,* 2006).

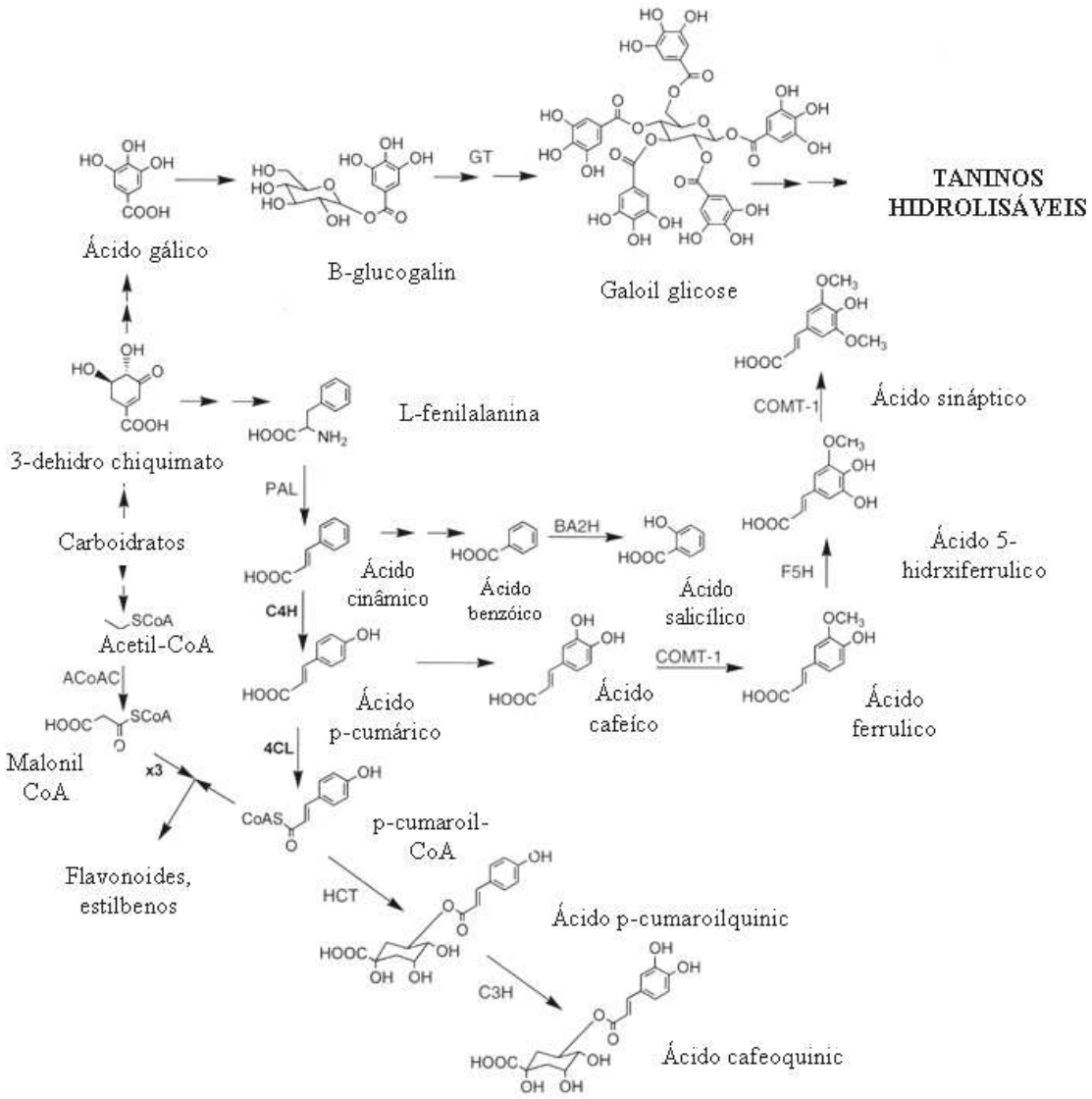

Figura 9. Esquema das principais rotas metabólicas e enzimas envolvidas na biossíntese de taninos hidrolisáveis, ácido sináptico, hidroxicinamatos e ácido 5-caféico. Abreviações das enzimas: PAL – fenilalanina amônia-liase, BA2H – ácido benzóico 2-hidroxilase, C4H – cinamato 4-hidroxilase, COMT-1 – ácido cafeico/5-hidroxiferulico O-metiltransferase, 4CL – p-coumatato:Côa ligase, F5H – ferulico 5-hidroxilase, GT – galoiltransferase, ACoAC – acetilCoA carboxilase (CROZIER *et al.,* 2006).

Os compostos fenólicos são sintetizados a partir da eritrose-4-fosfato, do fosfoenol piruvato e da acetil co-enzima A. As principais vias metabólicas para a formação destes compostos na planta são a via do ácido chiquímico e a do acetato (GETACHEW, 1999), na Figura 9 estão descritas as principais vias metabólicas para a biossíntese de taninos hidrolisáveis, ácido sináptico, hidroxicinamatos e ácido 5-cafeico (CROZIER *et al.,* 2006).

Segundo Luckner (1972) a conversão do ácido chiquímico para ácido protocatechuico e ácido gálico se dá como demonstrado na Figura 10, em plantas (*Rhus typhina, Acer saccharium, Cameilia sinensis* e *Vaccinium vitis-idaea)* e microrganismos (*Phycomyces blakesleeanus*).

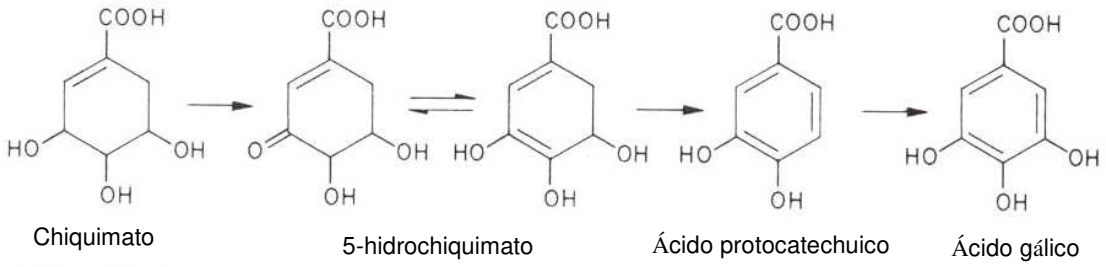

Figura 10. Rota bioquímica para a biossíntese de ácido protocatechuico e ácido gálico em plantas e microrganismos (LUCKNER, 1972).

A esterificação do ácido gálico para formar 1-*O*-galoil-β-D-glicose, o primeiro metabólico da formação de taninos hidrolisáveis foi catalisada pelo extrato enzimático de folhas de carvalho, sendo que UDP-glicose serviu como substrato ativador (GROSS, 1983).

A substituição das hidroxilas da glicose não é feita ao acaso para a formação de pentagaloilglicose, mas sim através de uma sequência de reações (Figura 11). Após a 1-galoilglicose formam-se: 1,6-digaloilglicose (SCHMIDT *et al.,* 1987), 1,2,6-trigaloilglicose (GROSS e DENZEL, 1991), 1,2,3,6-tetragaloilglicose (HAGENAH e GROSS, 1993) e 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose (CAMMANN *et al.,* 1989).

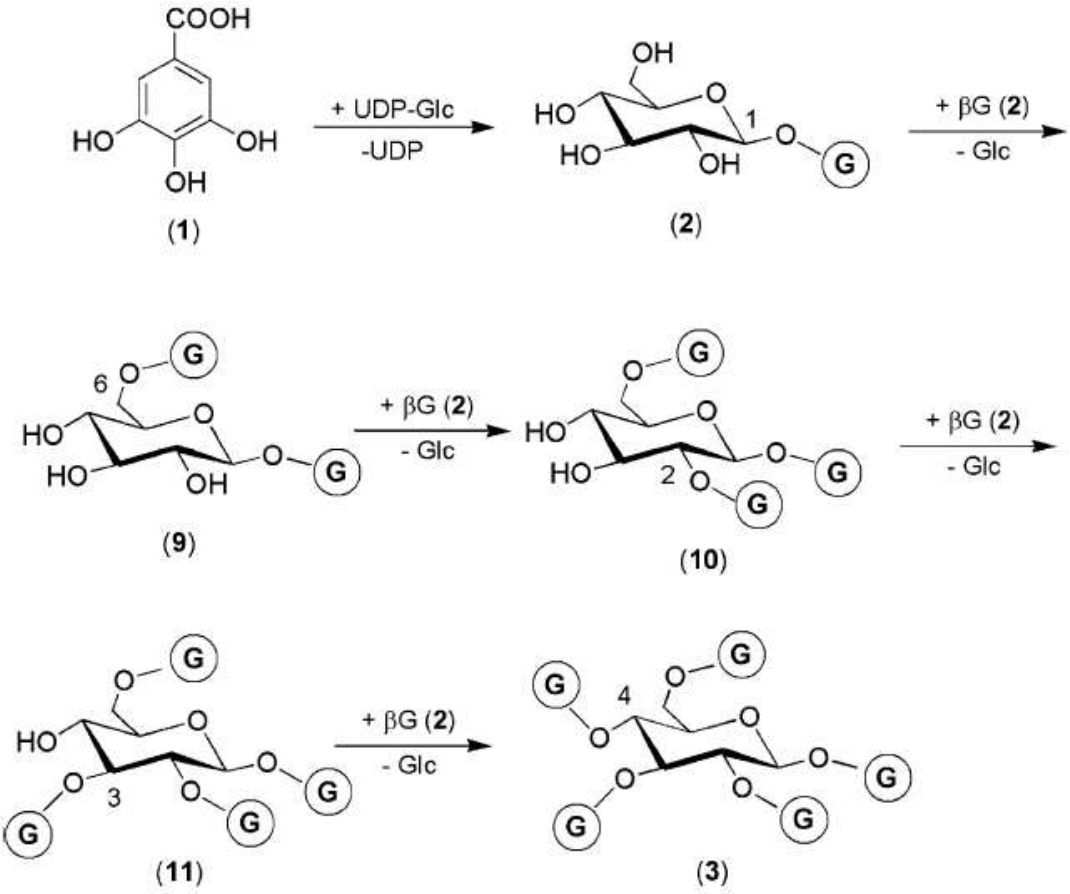

Figura 11. Biossíntese de enzimática do ácido gálico (1) ao 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose (3). 1-galoilglicose; (9) 1,6-digaloilglicose; (10) 1,2,6-trigaloilglicose; (11) 1,2,3,6-tetragaloilglicose (NIEMETZ, GROOS, 2005).

Reinefeld e Ahrens (1971) em Niemetz e Gross (2005), explicaram esta ordem de substituição pela combinação de reatividades distintas de acordo com as variações na natureza química do composto (hidroxilas primárias *versus* hidroxilas secundárias), ativação de compostos próximos e esteroquímica.

b) Taninos condensados: os taninos condensados (TC) ou proantocianidinas são mais vastamente distribuídos no reino vegetal que os taninos hidrolisáveis, estão presentes em grande quantidade nos alimentos normalmente consumidos (DESPHANDE *et al*., 1986; SALUNKHE *et al*., 1990).

Os TC podem conter entre duas a cinqüenta unidades flavanóides. Os flavonóides são a maior classe de polifenóis, são constituídos por dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico. Os taninos condensados possuem estrutura complexa; são resistentes à hidrólise, solúveis em solventes orgânicos (Figura 12). Em razão de suas estruturas químicas, quando os TC não possuírem moléculas de acido gálico ou digálico, ou seja, sem a presença de ligações éster e depsídica, estes não serão susceptíveis a hidrólise pela tanase (PINTO, 2003).

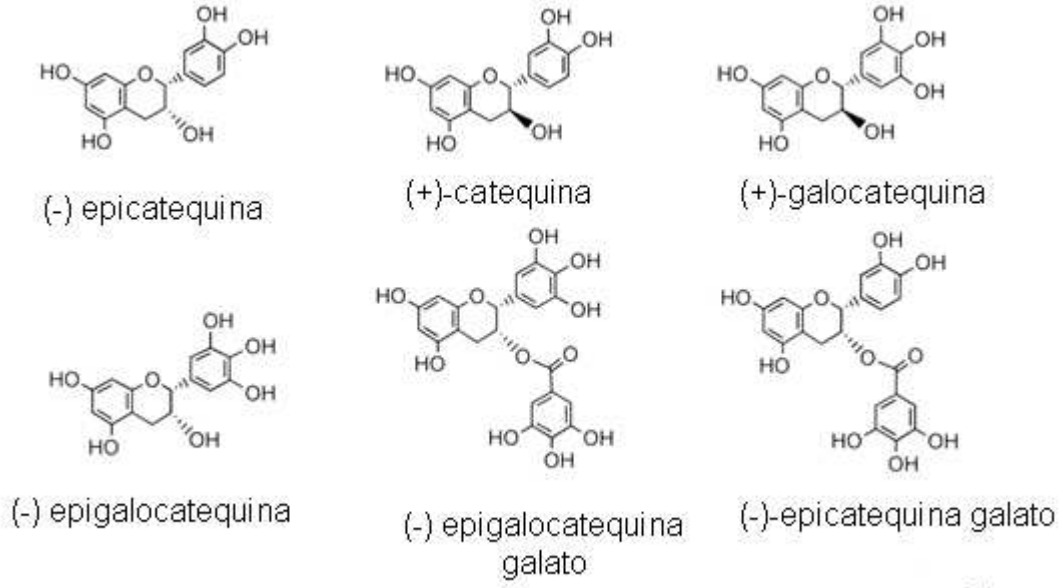

Figura 12. Fórmulas estruturais de flavan-3-ol (taninos condensados) (CROZIER *et al.,* 2006).

Nos vegetais, os taninos condensados estão localizados nos vacúolos celulares nas folhas e na testa das sementes. O metabolismo de flavonóides (taninos condensados) tem origem em duas rotas bioquímicas distintas (Figura 14). O anel benzênico B e os 3 carbonos de ligação constituem uma unidade de fenilpropanol sintetizada a partir de p-cumarina-CoA, os 6 carbonos do anel A são originados da condensação de três unidades de acetato pela via do ácido malônico (Figura 13). A fusão destas duas moléculas ocorre pela

condensação da p-cumarina-CoA com os 3 resíduos do malonil CoA, sendo que cada composto doa dois átomos de carbono, em uma reação catalisada pela chalcona sintase (CHS). O produto desta reação é a chalcona. A próxima etapa é a conversão estereoespecífica da naringenina-chalcona para naringenina, pela chalcona isomerase (CHI). Naringenina é um intermediário central, a partir deste podem ser formadas diferentes classes de flavonóides como, isoflavonas, flavanonas, flavonas, favanols, flavan-3-ol e antocianinas (CROZIER *et al.,* 2006).

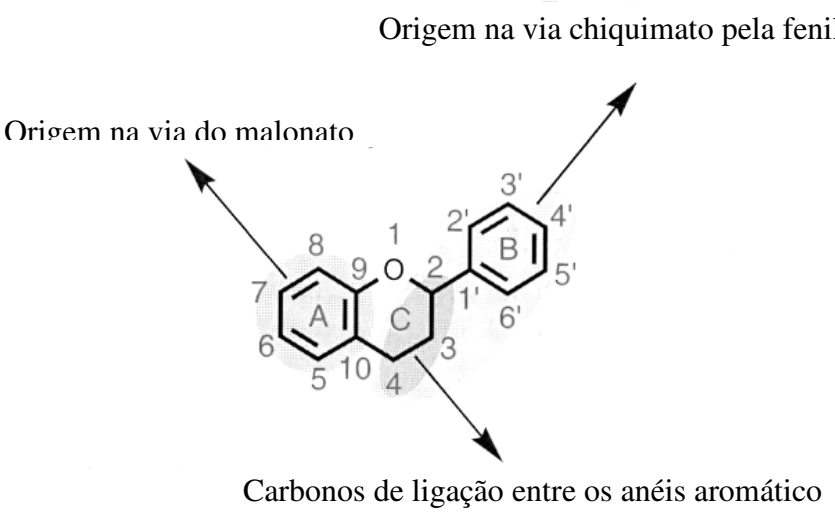

Figura 13. Origem bioquímica da estrutura básica dos flavonóides (CROZIER *et al.,* 2006).

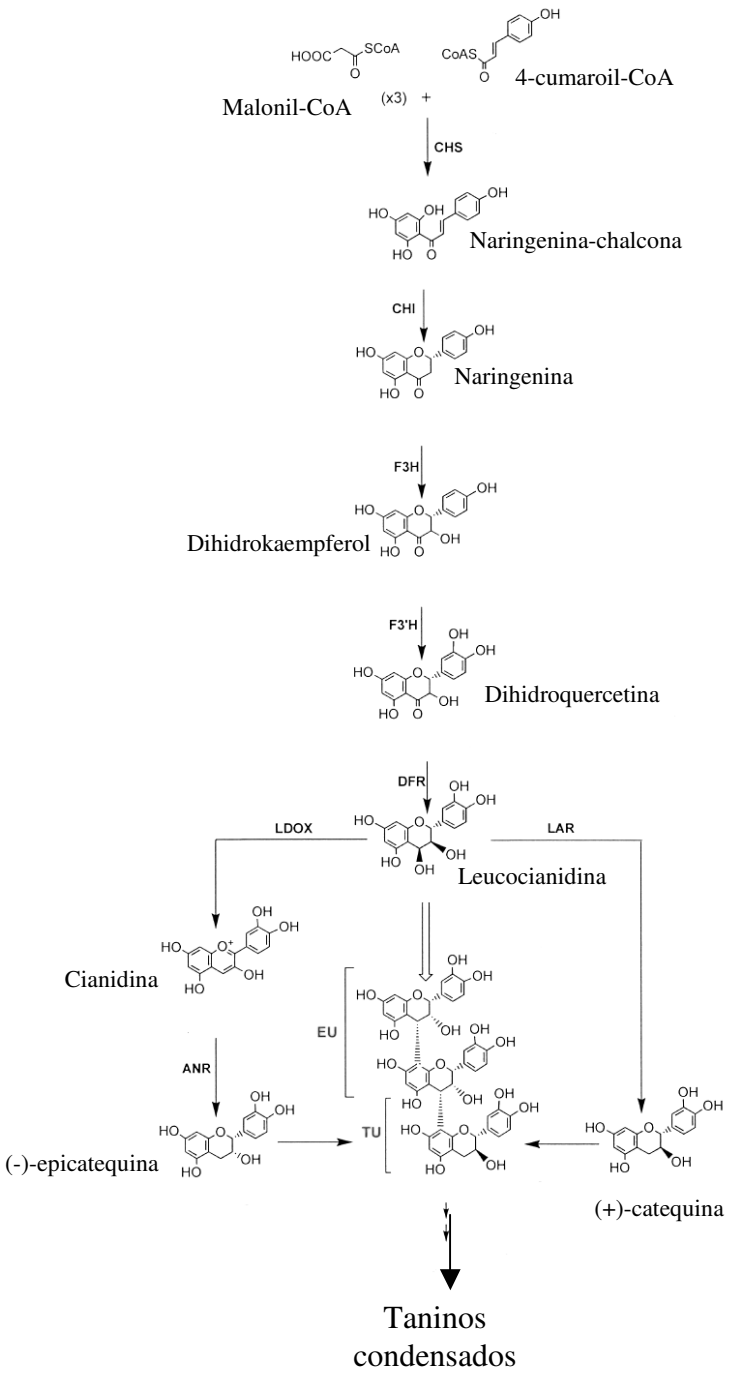

Figura 14. Esquema da rota bioquímica e enzimas envolvidas na produção de taninos condensados. Abreviação das enzimas: chalcona sintetase (CHS); chalcona isomerase (CHI), flavanona 3-hidroxilase (F3H); flavonol 3'-hidroxilase (F3'H), leucoantocianidina 4-redutase (LAR); leuconianidina deoxigenase (LDOX); antocianidina redutase (ANR); unidade de extensão (EU); unidade terminal (TU) (CROZIER *et al.,* 2006).

Brandford e Hsiao (1982) acreditam que a síntese destes compostos está relacionada com fatores limitantes ao desenvolvimento da planta, as taxas de crescimento das plantas são mais sensíveis que as taxas de fotossíntese. Portanto, quando a planta é submetida a algum fator que limite seu crescimento, ela pode sintetizar estes compostos secundários como uma forma de armazenar os produtos da fotossíntese. Esta teoria poderia explicar o motivo que leva as plantas a produzirem maior quantidade de taninos quando há baixa disponibilidade de nutrientes (FILHO, 2004). Barry *et al.,* (1986) verificaram maior concentração de taninos condensados em plantas cultivadas em locais com deficiência de nutrientes.

2.3 Fitatos

Durante o amadurecimento, cereais e sementes de leguminosas acumulam uma quantidade substancial de fitato, em torno de 60 a 80% do total de fósforo (LEI e PORRES, 2003). Este se encontra em concentrações que variam entre 2,5 e 50 mg/g (HARLAND e OBERLAS, 1986). Segundo Dendy (1995) o fósforo ligado ao fitato em grãos de sorgo varia entre 0,17 – 0,38%, representando 80 – 87% do fósforo total deste cereal.

Nos vegetais o ácido fítico é sintetizado a partir de um álcool cíclico (*myo*-inositol) por esterificações dos grupos hidroxilas com grupos fosfatos (RABOY, 1990). Segundo Loewus e Murthy (2000), os precursores da síntese de ácido fítico são a glicose-6-fosfato e/ou *myo*-inositol, pois ambos podem gerar *myo*-inositol-1-P através das enzimas *myo*-inositol-1-P-sintase e *myo*-inositol quinase. A partir do *myo*-inositol-1-P a fosforilação é continuada até a formação de *myo*-inositol-6-P. Biswas *et al.,* (1978) explica a via metabólica da biossíntese de IP6 pela fosforilação sucessiva da molécula de *myo*-inositol na ausência de intermediários parcialmente fosforilados estáveis. Brearlley e Hanke (1996) também propõem fosforilações sucessivas, porém com a presença de intermediários estáveis. Majerus *et al.,* (1988) propõem a presença de fosfoinositídeos intermediários.

Souza (2003) afirma a presença de fosfatos de inositol menores (IP3 e IP5) em diferentes estágios de desenvolvimento de grãos de feijoeiro. Assim, não há consenso sobre a biossíntese de IP6, muito menos de que modo esta é regulada.

Apesar de o fitato servir como fonte principal de energia e fósforo para a germinação de sementes, o fósforo ligado é pouco disponível para animais monogástricos e humanos devido a ausência de fitase no trato digestivo (RABOY *et al.,* 1991). Desta maneira, o fósforo inorgânico, um mineral não-renovável e caro, é acrescentado nas dietas de suínos, peixes e aves para atender suas necessidades nutricionais (VATS e BANERJEE, 2004).

O fósforo do fitato que não é absorvido no trato digestório é excretado, tornando-se um potente poluente ambiental em áreas de agropecuária intensiva, uma vez que esse fósforo se infiltra no solo sendo transportado para os lençóis de água e consequentemente para rios, mares e lagos, causando eutrofização das águas (MALLIN, 2000).

O fitato age como um antinutriente ligando-se a proteínas, aminoácidos e lipídios quelando minerais como cálcio, ferro, zinco e magnésio formando sais insolúveis (HOWSON e DAVIS, 1983). O fitato é uma molécula de poliol ligado a seis grupos fosfato. A estrutura molecular do ácido fítico está apresentada na Figura 15.

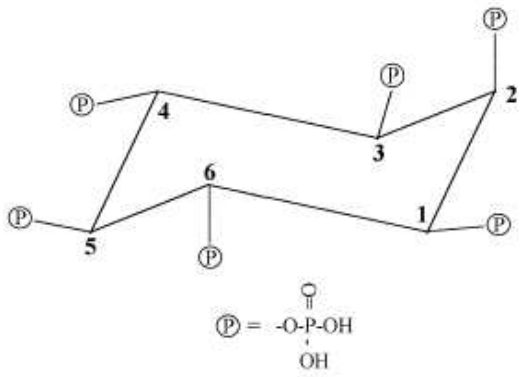

Figura 15. Estrutura molecular do ácido fítico (HOWSON e DAVIS, 1983).

Animais que ingerem grande quantidade de fitato na dieta apresentam sinais de sub-nutrição, perda de peso, crescimento retardado e distúrbios no sistema reprodutor. O fósforo é o segundo mineral mais abundante encontrado no organismo animal, como componente de células, tecidos e órgãos dos seres vivos, o fósforo participa de processos biológicos, bioquímicos e fisiológicos, como na absorção dos carboidratos, na biossíntese de proteínas, na liberação e transporte de energia, na ativação de complexos vitamínicos, no sistema enzimático e como componente dos ácidos nucléicos (DNA e RNA), é necessário para a transmissão genética, absorção e deposição de lipídeos, atua na manutenção da pressão osmótica e no equilíbrio ácido-base (RUNHO *et al.,* 2001; BUTOLO, 2002).

O fósforo representa, aproximadamente, 1% do peso vivo do animal, sendo que 80% está localizado nos ossos e dentes, em combinação com cálcio, sob a forma de hidroxiapatita, que é responsável pela rigidez das estruturas, enquanto que os 20% restantes encontram-se localizados especialmente nas hemácias e tecidos muscular e nervoso (BUTOLO, 2002). Os ossos, além de serem componentes estruturais do corpo, servem como reserva de cálcio e fósforo, podendo ser mobilizados ocasionalmente quando o suprimento destes minerais for inadequado ou insuficiente (MAYNARD *et al.,* 1984).

Uma alternativa à reduzida disponibilidade de fósforo é a adição de enzimas, que podem aumentar o valor nutritivo do alimento, melhorando a digestibilidade das proteínas e a disponibilidade de minerais pela hidrólise do fitato durante a digestão no estômago ou durante o processamento do alimento (KONIETZNY e GREINER, 2002; SANDBERG e ANDLID; 2002).

Em contraste às características antinutricionais o fitato também pode exercer efeitos benéficos, como antioxidante e anticarcinogênico. Esta propriedade é função da mesma característica que lhe confere aspecto de composto antinutricional, a capacidade deste composto de seqüestrar metais, tais como ferro, em excesso no meio, o qual é capaz de gerar radicais livres. Os radicais livres são considerados iniciadores de doenças degenerativas relevantes, tais como doenças cardiovasculares e câncer (URBANO *et al.,* 2000).

2.4 Aplicação de enzimas na alimentação animal

O crescimento da indústria de suínos e aves está exigindo dos pesquisadores, meios para melhorar a eficiência da utilização dos nutrientes, uma das opções é o uso de enzimas. A maior parte dos estudos científicos adicionam complexo enzimático em pó na ração e este só é ativado no trato digestivo quando misturado aos fluidos digestivos e sob a temperatura do organismo (ROTTER, 1990). Esta forma de aplicação exige que as enzimas resistam ao baixo pH e às enzimas proteolíticas do trato digestivo. Sendo assim, o tratamento enzimático de grãos anterior à sua ingestão pode melhorar a ação das enzimas digestivas (REVISTA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2003) e aumentar a eficiência da conversão alimentar, em alguns casos.

Segundo Inborr e Meulen (1993), a adição de enzimas é uma prática muito comum na Europa principalmente na forma de carboidrase, fitase, celulase, xilanase, β-glucanase e queratinase.

O fornecimento de enzimas aos animais geralmente é feito quando uma determinada dieta apresenta uma variada quantidade de fatores antinutricionais ou em rações para animais que estejam passando por estresse (desmame, vacinação, castração, desconforto térmico), pois tal situação debilita a produção de enzimas endógenas (FERKET, 1996). As enzimas empregadas neste estudo foram a tanase e fitase.

2.4.1 Tanase

Tanino acil hidrolase (TAH) (E.C: 3.1.1.20) é uma enzima que hidrolisa ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis produzindo glicose e ácido gálico (BANERJEE *et*

al., 2001). Tanase é uma enzima extracelular, induzível, produzida na presença de ácido tânico por fungos, bactérias e leveduras (AGUILAR *et al.,* 1999). A Figura 16 ilustra a reação de hidrólise do ácido tânico.

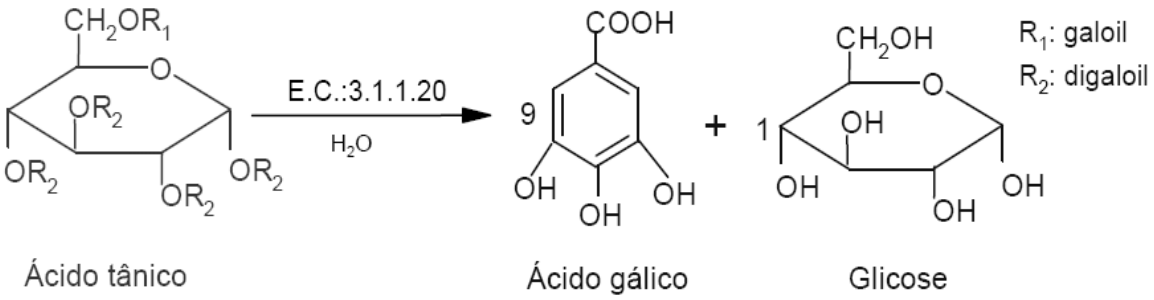

Figura 16. Hidrólise do ácido tânico (AGUILAR e GUTIÉRREZ-SANCHEZ, 2001).

A produção da tanase empregada neste estudo foi otimizada por Battestin e Macedo (2007a) e caracterizada por Battestin *et al.,* (2007b, c), sendo que esta apresenta pH estável na faixa de 4 – 7,5, com pH ótimo a 6,5, temperatura de estabilidade entre 20 e 70ºC, ótima a 70ºC, ponto isoelétrico de 4,0 – 4,5 e peso molecular entre 180kDa e 300kDa, é inibida por Cu^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+} e Mg^{2+}, inativada pela ação de o-fenantrolina, EDTA, 2-mercaptoetanol, tioglicolato de sódio, sulfatos e cloretos de magnésio e cálcio. Estas propriedades dependem fortemente das condições de cultura e também da linhagem utilizada na produção (AGUILAR e GUTIÉRREZ-SANCHEZ, 2001).

A fonte mais importante de obtenção de tanase é microbiana, uma vez que as enzimas produzidas desta forma são mais estáveis. Podem ser obtidas em altas concentrações e com propriedades específicas de acordo com a espécie de microrganismo isolado (BANERJEE e KAR, 2000; BATTESTIN *et al*., 2004).

Segundo Graminha *et al.,* (2008), Hölker e Lenz (2005) a fermentação semi-sólida, com baixa atividade de água, influencia os aspectos fisiológicos dos microrganismos como, crescimento vegetativo, esporulação e germinação dos esporos, e estes aspectos melhoram a produção e a atividade das enzimas.

A utilização da tanase pode ser efetuada de duas formas, por contato direto dos extratos enzimáticos com o material a ser tratado, hidrolisando-se os polifenóis e evitando polimerização indesejada; ou pelo cultivo de linhagens de fungos produtores de tanase em substratos ricos em taninos, os quais são degradados a compostos simples, caracterizados pela sua semelhante forma de não se polimerizar ou não formar complexo com as proteínas presentes nos materiais brutos (AGUILAR e GUTIÉRREZ-SANCHEZ, 2001).

Battestin *et al.,* (2007d) estudaram a aplicação de tanase de *Paecilomyces variotti* em chás, neste os autores analisaram a capacidade da enzima em hidrolisar epigalocatequina galato em epicatequina e ácido gálico e a atividade antioxidante destes compostos. Os autores verificaram uma ótima ação da enzima na hidrólise de galato de epigalocatequina extraído de chá verde comercial e em tanino comercial purificado e constataram que a atividade antioxidante é maior após a hidrólise enzimática.

2.4.2 Fitase

A hidrólise do ácido fítico é um processo metabólico muito importante em muitos sistemas biológicos, que se acredita ser principalmente afetada pela fitase. Fitase ou myo-inositol-hexakifosfato fosfohidrolase é uma monoester fosfatase específica que pode ser distinta quanto à posição de ataque na molécula de ácido fítico. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada e União Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB), duas categorias de fitases são reconhecidas conforme a posição onde a hidrólise do fitato é iniciada: 3-fitase (EC 3.1.3.8) que inicia removendo um grupo ortofosfato da posição C3, enquanto a 6-fitase (EC 3.1.3.26) realiza a remoção na posição C6 da molécula de myo-inositol hexafosfato (PANDEY *et al*,, 2001; KONIETZNY e GREINER, 2002; SELLE e RAVINDRAN, 2006), sendo que a 3-fitase é principalmente de origem microbiana e 6-fitase é derivada de plantas.

A reação de desfosforilação realizada pela fitase está ilustrada na Figura 17, na qual o fitato é hidrolisado liberando ácido fosfórico, inositol livre, e/ou compostos intermediários incluindo ésteres de inositol mono-, bis-, tris-, tetrakis, e pentakisfosfato (IP_1-IP_5) dependendo do grau de desfosforilação, juntamente com a liberação de minerais que possam estar quelados (LEI e PORRES, 2003).

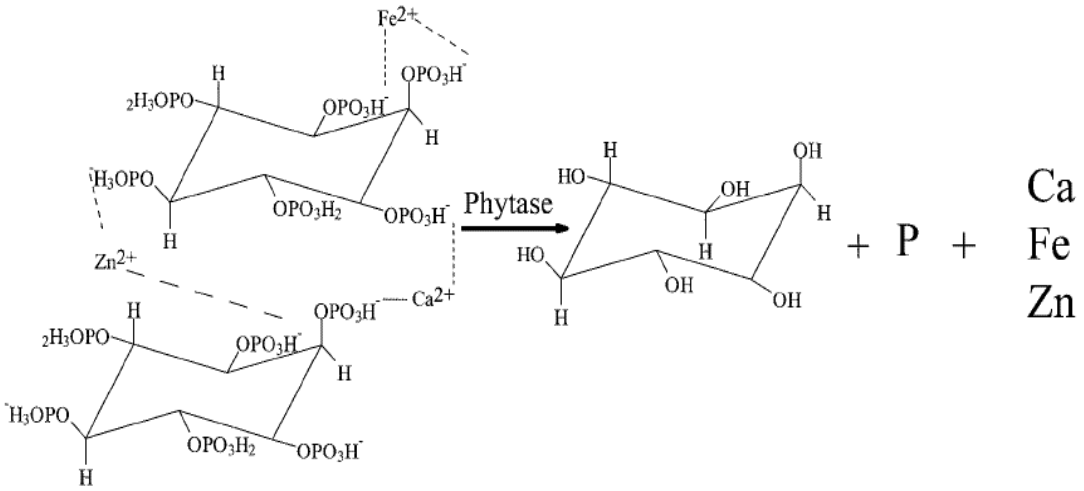

Figura 17. Ação da fitase em myo-inositol hexafosfato com liberação de myo-inositol livre e fosfato inorgânico (LEI e PORRES, 2003).

Nos animais, a fitase existe nos eritrócitos e plasma de várias espécies de vertebrados e no intestino delgado de ruminantes. Vários microorganismos, incluindo bactérias, leveduras e muitas espécies de fungos também produzem fitase (KONIETZNY e GREINER, 2002).

A enzima presente em plantas não resiste ao tratamento térmico e é menos estável às condições fisiológicas do trato gastrointestinal, já a de microorganismos (bactérias, fungos e leveduras) resiste a altas temperaturas, dependendo do microorganismo produtor e da linhagem (SANDBERG e ANDLID, 2002).

A primeira fitase comercial produzida por *Aspergillus niger* com capacidade de liberar fósforo ligado ao fitato e reduzir sua excreção foi introduzida no mercado em 1991 (ENGELEN *et al.,* 1994; SELLE e RAVINDRAN*,* 2006), conhecida como Natuphos, produzida e comercializada pela empresa BASF. Segundo Engelen *et al.,* (1994), Natuphos mostra uma ótima atividade nas condições presentes no trato digestivo de frangos e porcos e pode manter 75% da atividade em temperaturas inferiores à 75 °C por 15 minutos (CAO *et al.,* 2007).

Diversos estudos demonstraram a ação positiva da fitase aplicada em rações, estes relatam a capacidade que esta enzima possui em diminuir fitato e aumentar a absorção de minerais como, fósforo, cálcio, ferro, magnésio e zinco. Towo *et al.,* (2006) constataram que o conteúdo de fitato em sorgo foi significativamente reduzido (39%) com fermentação através de culturas starters de *Streptococcus lactis, Lactobacillus* sp. e *Cândida krusei*. Contudo, a maior redução (88%) foi obtida com adição de fitase de trigo antes do processo fermentativo. Consequentemente à redução de fitato, os autores obtiveram um aumento de 3,1% no teor de ferro biodisponível.

Simons *et al.,* (1990) estudaram o efeito do tratamento de uma dieta contendo como fonte protéica soja, milho, sorgo e girassol representando 35, 28, 20 e 8 % respectivamente, com fitase produzida por *Aspergillus ficumm* para frangos. Foi constatado que os frangos alimentados com a dieta tratada com fitase resultou em melhor digestibilidade de fósforo e cálcio e menor concentração de fósforo na excreta.

Poulsen *et al.,* (2007) avaliaram o efeito de fitases produzidas por distintos microrganismos na digestibilidade de fósforo *in vivo*. A digestibilidade de fósforo para a dieta controle foi de 43% e foi aumentada para 55, 61 e 66% após a adição de 250, 500 e 750 U/Kg de fitase de *Aspergillus niger* e 54 e 60% pela adição de 375 e 750 U/Kg de fitase de *Peniophora lycii,* respectivamente.

A ação combinada de xilanase, amilase, protease e fitase foi efetiva no aumento da digestibilidade de nitrogênio, lipídeos, aminoácidos, energia, cálcio e fósforo em dietas baseadas em milho e soja para frangos de corte (COWIESON *et al.,* 2006).

Teixeira *et al.,* (2005) verificaram a ação de complexo enzimático composto por protease, amilase e celulase em dietas com sua base protéica em milho, farelo de soja e soro de leite para suínos e constataram que não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre as dietas quanto ao ganho de peso, ganho de peso médio, consumo médio diário e conversão alimentar dos leitões, com ou sem adição de enzimas. Os autores justificaram o resultado devido ao uso inadequado da enzima e/ou concentração serem impróprias.

Gonçalves *et al.,* (2005) estudaram a digestibilidade aparente dos minerais Mg, Ca, Fe, Cu, Zn e Mn em dieta elaboradas com diferentes fontes energéticas e protéicas e suplementadas com diferentes concentrações de fitase para Tilápia-do-Nilo. Os autores verificaram que a fitase aumentou a digestiblidade aparente de Mn, Cu, Zn e Mg, porém para Ca e Fe a digestibilidade aparente foi negativa. Os autores relatam não ser possível indicar o nível ideal de suplementação da enzima, pois, este está diretamente relacionado ao tipo de alimento.

Porres *et al.,* (2008) verificaram o efeito da adição de fitase (NATUPHOS – BASF) em dieta a base de tremoço na absorção de Mn, Fe, Zn e K em ratos e verificaram que a adição de fitase diminuiu a absorção destes minerais. Os autores justificam essa diminuição de minerais devido ao incremento de fosfato após a ação da fitase sobre o ácido fítico, devido à habilidade do fosfato de ligar-se a cátions divalentes formando complexos insolúveis.

2.5 Diminuição de fatores antinutricionais em cereais

Mahgoub e Elahag (1998) verificaram o efeito de diversos processos, como descascamento, maceração, malteação, alta temperatura e fermentação sobre fitato em grãos de sorgo (Sudanese). Os cinco tratamentos aplicados reduziram o conteúdo de fitato, contudo, os mais efetivos foram aqueles empregando enzimas (malteação e fermentação) frente aos tratamentos físicos (descascamento, maceração e cozimento). Os autores sugerem que a diminuição de fitatos com o cozimento é devido a uma ativação da enzima durante o aquecimento e sua ação até que esta seja desnaturada.

Matuscheck *et al.,* (2001) estudaram o efeito do cozimento, maceração e germinação em grãos de sorgo frente aos compostos fenólicos totais, taninos hidrolisáveis e condensados. Os autores verificaram que os três tratamentos aplicados diminuíram os referidos compostos, sendo que o mais efetivo foi a germinação, a qual reduziu em média 50% os compostos analisados. O mesmo estudo foi procedido para fitato, o qual teve a maior redução após a germinação (17,8%). O ferro biodisponível foi diminuído após o cozimento, maceração e germinação em 37, 37 e 63%, respectivamente.

Sorgo com alto e baixo teor de tanino, macerados ou não foram submetidos à fermentação com culturas *starters* (*Streptococcus lactis, Lactobacillus* sp. e *Candida krusei),* adição de farinha de sorgo germinada e fitase a 30ºC até redução do pH à 3,8 (entre 16 e 24 horas). Foi verificado no sorgo com baixo teor de tanino uma redução de fitato > 90% e aumento no ferro biodisponível de 4 para 50% quando os grãos foram submetidos a maceração e posterior fermentação e adição de fitase (SVANBERG *et al*., 1993). Os autores acreditam que o aumento da biodisponibilidade de ferro *in vitro* é devido a ação de fitase exógena adicionada e/ou ativação de fitase endógena durante a fermentação, sobre o fitato contido no cereal.

O fungo *Pecilomyces variotti* empregado neste estudo foi selecionado em estudo anterior (MACEDO *et al.,* 2005b) como produtor da enzima tanase. O microrganismo foi

identificado nos laboratórios da Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello e UNESP. Conforme relatório emitido a microscopia do *Pecilomyces variotti* em água e azul de lactofenol revela conidióforos verticilados, levemente rugosos, com a presença de fiálides alongadas. Conídios hialinos, elipsoidais, lisos, de variados tamanhos, em geral de 3,5-6,0 x 2,5-4,0µm (Figura 18).

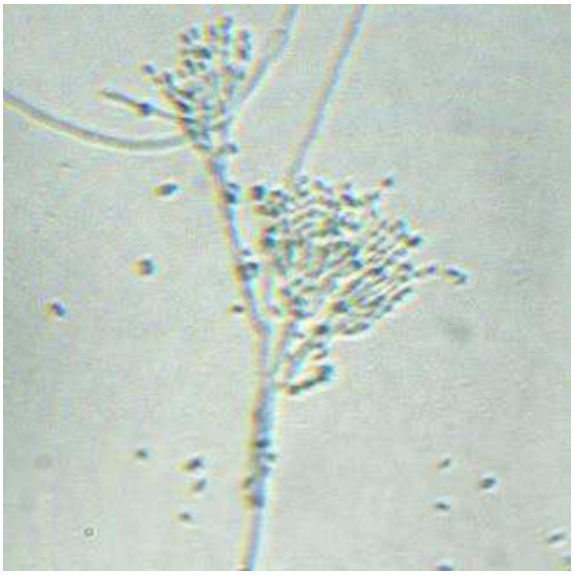

Figura 18. Microscopia para identificação do fungo *Paecilomyces vaiortti.*

Vários estudos aplicando fermentação em sorgo resultaram no aumento do conteúdo e melhora na digestibilidade da proteína (HASSAN e EL TINAY, 1995; CORREIA *et al.,* 2005), melhora na composição de aminoácidos essenciais, tornou o amido mais digestível (KAZANAS e FIELDS, 1981), reduziu o teor de taninos e fitatos (HASSAN e EL TINAY, 1995; TOWO *et al.,* 2006; NELSON *et al.,* 1995; VAN DIEPENINGEN *et al.,* 2004; ANTONY e CHANDRA, 1998; REDDY e PIERSON, 1994) e aumentou a concentração de vitaminas (EL TINAY *et al.,* 1979).

Degradação de compostos como taninos e fitato através da fermentação são importantes para melhorar a digestibilidade protéica, a disponibilidade e absorção de ferro e

zinco (NÄVERT e CEDERBALD, 1985; MOELJOPAWIRO *et al*., 1987; BRUNE *et al*., 1992; TOWO *et al.,* 2006; BERGQVIST *et al*., 2005).

Em geral, taninos são moléculas muito resistentes ao ataque microbiano devido a sua complexa estrutura. Taninos condensados são mais resistentes do que taninos hidrolisáveis e são tóxicos para a maioria dos microrganismos, na Tabela 2 estão descritos diversos microrganismos e sua capacidade de degradar diferentes substratos (SINGH e STAPLETON, 2002).

Tabela 2. Decomposição de taninos por microrganismos

	Decomposição (%)			
Microrganismos	**Taninos hidrolisáveis**	**Elagitanino**	**Catequina**	**Taninos condensados**
Achromobacter sp.	74	13	N	N
Streptomyces sp.	18	20	N	N
Aspergillus flavus	84	N	69	N
A. fumigatus	80	N	50	N
A. niger	100	10	100	N
Penicillium citrinum	90	43	93	N
P. frequentants	81	10	N	N
P. janthinellum	74	N	75	N
P. purporugenum	83	23	N	
P. thomii	74	30	50	N
Fusarium sp.	96	N	100	N

FONTE: SINGH e STAPLETON (2002).

A fermentação láctica resultou em decréscimo no conteúdo de fitato (SVANBERG *et al.,* 1993; ELKHALIFA *et al.,* 2005), taninos (ELKHALIFA *et al.,* 2005) e compostos fenólicos (HASSAN e EL TINAY, 1995) em sorgo.

Correia *et al.,* (2005) verificaram o aumento de aminoácidos livre e de proteína total, bem como a redução de açúcares, amido e proteína solúvel após fermentação de sorgo com *Lactobacillus fermentum* a 37ºC durante 5 dias.

2.6 Estudos *in vivo* utilizando enzimas e fermentação na melhoria da digestibilidade de cereais

Diversos estudos relatam o uso de enzimas na alimentação animal, os parâmetros estudados nestes tratamentos geralmente são: ganho de peso, incorporação de minerais nos ossos e plasma, diminuição na excreção de nutrientes, digestibilidade aparente e verdadeira (ALMEIDA *et al.,* 2007; VAHJEN *et al.,* 2005; BEDFORD, 1995; BARBOSA et al., 1992; GOMES et al., 1992).

Santos *et al.,* (2006) verificaram a ação de xilanase, amilase e protease (300, 400 e 4000 U/Kg, respectivamente) em frangos na fase inicial de crescimento (1 – 21 dias) e na fase final de crescimento (21 – 42 dias) utilizando dietas formuladas com 0, 50 e 100% de sorgo, adicionadas ou não de enzima. Os parâmetros avaliados foram consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar. Os autores verificaram que a substituição de milho pelo sorgo resultou em dados bem similares quanto ao ganho de peso, consumo de grãos e conversão alimentar. O mesmo foi constatado com as dietas adicionadas ou não de complexo enzimático. Contudo após 42 dias de crescimento o rendimento de carcaça dos animais que receberam dieta adicionada de enzimas foi estatisticamente ($p<0,05$) inferior daqueles que não receberam complexo enzimático.

Porres *et al.,*(2003) estudaram o efeito do tratamento térmico de lentilha em experimento com ratos em crescimento. Foi verificado que o tratamento térmico diminui inibidor de tripsina, fitato e taninos em 76, 8 e 12%, respectivamente, contudo esta diminuição nos fatores antinutricionais não foi eficiente na melhoria da digestibilidade da proteína e de cálcio. Cromwell *et al.,* (1993), ao estudarem níveis crescentes de enzima fitase (250, 500 e 1000 UF/g), observaram melhorias lineares no ganho diário de peso e na resistência à quebra dos ossos de suínos.

A adição do fósforo inorgânico nas rações de suíno pode ser reduzida ou completamente eliminada pelo uso de 1200 UF/g de fitase na ração, de acordo com os resultados de ganho diário de peso, eficiência alimentar, atividade da fosfatase alcalina no plasma e concentração de cálcio. Também foi constatada redução de até 50% na excreção do fósforo fecal (LEI *et al.,* 1993).

Fialho *et al.,* (2002) estudaram a substituição de milho por sorgo sem tanino (0,8% pelo método Azul da Prússia) em 0, 33, 66 e 100% para suínos. Os autores concluíram que o milho pode ser substituído em 100% pelo sorgo, pois, não foi verificada diferença estatística ($p<0,1$) quanto a retenção de nitrogênio, coeficiente de digestibilidade da proteína bruta, energia digestível e energia metabolizável, e com $p<0,05$ para os resultados de consumo médio diário de ração, ganho de peso, médio diário e conversão alimentar.

Guggenbuhl *et al.,* (2007) estudaram a adição de diferentes fitases microbianas em diferentes concentrações, fitase de *Escherichia coli*, 250 e 500 U/Kg (quantum Q1 e Q2), *Aspergillus niger* 500 U/Kg (Natuphos) e *Penicillium lycii* 750 U/Kg (Ronozyme P) na digestiblidade de fósforo e cálcio em dietas para suíno baseadas em soja e cevada. Os autores constataram que as diferentes fitases adicionadas nas dietas aumentaram a digestibilidade de fósforo em 13,8, 18,6, 18,3 e 17,9%, para Q1, Q2, Natuphos e Ronozyme P, respectivamente. A excreta de fósforo e cálcio diminuiu em média 30 e 16%, respectivamente, comparando com os resultados obtidos para o grupo controle que não teve adição de fósforo na dieta. Dentre as diferentes fontes e concentrações da enzima os resultados foram bem similares quanto a digestibilidade aparente e excreção de fósforo e

cálcio, exceto para a fitase Quantum na concentração de 250 U/Kg que ficou abaixo das demais.

O ferro é vital para todas as células e está incluído no grupo heme de citocromos, peroxidases, catalases, mioglobina e hemoglobina. Em outras proteínas, pode ser encontrado na forma sulfúrea (Fe-S), como na ribonucleotídeo redutase, aconitase e desidrogenase succínica. Por outro lado, o ferro pode lesar diferentes tecidos por catalisar a reação que converte peróxidos de oxigênio em íons radicais livres, que destroem a membrana celular, proteínas e o DNA (BOWLUS, 2003; HENTZE *et al.,* 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o efeito do fungo *Paecilomyces variotti,* das enzimas tanase e fitase na diminuição de fatores antinutricionais, taninos e fitatos em sorgo tipo vassoura e verificar o efeito nutricional *in vivo*.

3.2 Específicos

- Caracterizar quimicamente os grãos de sorgo quanto à composição centesimal, compostos fenólicos e fósforo inorgânico;

- Otimizar a metodologia de extração de fenóis totais e taninos de sorgo;

- Estudar a aplicação de tanase, fitase e fermentação com o fungo *Paecilomyces variotti* na concentração dos compostos antinutricionais, taninos e fitatos;

- Selecionar e otimizar o melhor tratamento do sorgo na concentração dos compostos antinutricionais, taninos e fitatos;

- Verificar o efeito do tratamento do sorgo em modelo animal, com ratos Wistar, por meio da determinação da digestibilidade aparente de proteína e fósforo, parâmetros bioquímicos, alteração em enzimas hepáticas, absorção de minerais e excreção de fósforo.

4 METODOLOGIAS

A enzima tanase empregada neste estudo foi produzida no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP por meio de fermentação sólida com o fungo *Paecilomyces variotti.* A fitase empregada é comercial e foi produzida pela empresa BASF empregando *Aspergillus niger*

O sorgo empregado é do tipo vassoura, produzido em Maringá – Paraná, gentilmente doado pela empresa Polinutri.

As determinações colorimétricas foram feitas utilizando espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 640). A centrífuga empregada foi da marca BECKMAN modelo J2-21. O agitador orbital empregado foi da marca Edison. A estufa usada foi da marca FANEM. Liofilizador L101 da marca LIOTOP. A otimização do tratamento de sorgo com tanase e fitase foi feito em banho termostatizado marca FISATOM. A centrifugação do sangue dos ratos foi feita em centrífuga Excelsa modelo 206 (FANEM)

4.1 Produção de tanase

A produção da enzima tanase foi feita conforme estudo realizado anteriormente por Battestin e Macedo (2007a), através de fermentação sólida, utilizando o fungo *Paecilomyces variotti,* selecionado por Macedo *et al.,* (2005b) dentre 500 linhagens fúngicas pertencentes ao laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, como melhor produtor da enzima tanase. Deve-se salientar que a enzima tanase produzida pelo fungo *Paecilomyces variotti* já foi submetida aos testes de toxicidade aguda realizados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas de Campinas. A análise realizada foi Toxicidade aguda – via oral

permitindo o estudo desta enzima em rações animais. A produção de tanase foi feita como descrito abaixo.

4.1.1 Pré-inóculo

O microrganismo *Paecilomyces variotti* foi mantido em meio ágar batata – PDA, sob refrigeração a 7ºC. A linhagem foi cultivada em meio PDA contendo 0,2% (peso/volume) de ácido tânico (Tanal B - Prozyn), incubados a 30ºC por 72 horas.

4.1.2 Meio de fermentação

Em frasco Erlenmeyer de 500mL adicionou-se 20g de farelo de trigo, 20mL de água destilada, 10% de ácido tânico (Tanal B - Prozyn) e 1,2% de nitrato de amônio. O meio de cultivo foi esterilizado a 121ºC por 15 minutos. Ao atingir a temperatura ambiente, inoculou-se com suspensão de esporos de 1,6 X 10^7 esporos/mL (os esporos foram removidos adicionando-se 2,5 mL de água e rapados com auxílio de uma alça de inoculação). A contagem dos esporos foi feita em Câmera de Neubauer. Os Erlenmeyers foram incubados em estufa a 30ºC por 120 horas.

4.1.3 Extração

Após a fermentação procedeu-se à extração das enzimas adicionando 160mL de tampão acetato 0,02M - pH 5,0 em cada frasco Erlenmeyer. Em seguida agitou-se a 200rpm em agitador orbital (EDISON) durante 1 hora. Filtrou-se o extrato em gase e centrifugou-se a 9630 X *g* por 30 minutos a 4ºC. Recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se sulfato de amônio a concentração final de 80% de saturação (561g/L). Manteve-se o extrato refrigerado por 12 horas, centrifugou-se novamente a 9630x*g* por 30 minutos a 4ºC.

Procedeu-se diálise por 48 horas em água destilada a fim de remover o excesso de sulfato de amônio. O extrato bruto obtido foi congelado a -18°C e liofilizado em liofilizador L101 – LIOTOP durante 24 horas. A enzima liofilizada foi mantida sob congelamento a – 18ºC até ser utilizada nos experimentos.

4.2 Determinação de atividade enzimática no extrato liofilizado bruto produzido por *Paecilomyces variotti* e fitase comercial

As medidas de atividade enzimática descritas a seguir foram realizadas com solução enzimática contendo 1mg da enzima liofilizada em 1mL de água destilada, após a dissolução da enzima esta permaneceu em repouso por 10 minutos para obter uma solução homogênea.

A calibração do espectrofotômetro foi feita com o "branco", constituído pelos reagentes usados na determinação, exceto a solução enzimática, que foi substituída por água destilada na mesma proporção. No tubo "controle" foi feita a reação com enzima submetida a tratamento térmico (10 minutos em ebulição). A absorbância final foi obtida da seguinte equação:

$$Abs = Abs_{controle} - Abs_{teste}$$

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade em µmol do substrato (específico para cada enzima) hidrolisado durante 1 minuto de reação por 1g da enzima liofilizada.

4.2.1 Determinação da atividade de tanase

A medida da atividade da enzima tanase foi feita empregando a metodologia descrita por Mondal *et al.,* (2001) com modificações. Adicionou-se 0,3mL de substrato (solução de ácido tânico (MERCK) 0,7% (p/v) em tampão acetato pH 5,5 - 0,2M), 0,5mL de solução enzimática, incubado a 60°C por 10 minutos. Paralisou-se a reação pela adição de 3mL de solução de albumina de soro bovino (Biográs) na concentração de 1mg/mL (essa solução foi preparada em tampão acetato 0,2M - pH 5,0 contendo 0,17M de cloreto de sódio), em seguida centrifugou-se a 1320x*g* por 15 minutos a 4ºC. O precipitado contendo o ácido tânico que a enzima não hidrolisou foi ressuspenso em 3mL de solução dodecil sulfato de sódio (SDS)-trietanolamina (SDS 1% (p/v) adicionado de 5% (v/v) de trietanolamina em água destilada) acrescido de 1mL de solução de $FeCl_3$ (0,01M de $FeCl_3$ em 0,01M de ácido clorídrico). Adicionou-se 20mL de água destilada e após 15 minutos de repouso procedeu-se a medida da absorbância a 530nm em espectrofotômetro. A atividade enzimática foi calculada através de uma curva de calibração de ácido tânico (MERCK). O $FeCl_3$ reage com os compostos fenólicos do tanino por atração nucleofílica e forma uma coloração marrom, dependendo da intensidade da coloração formada é necessário fazer diluição em água.

4.2.2 Determinação da atividade de protease

Proteínas são polímeros de alto peso molecular formados por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, a ação enzimática de proteases resulta em polipetidíos, peptídios e aminoácidos livres (MACEDO *et al.,* 2005b; RAO *et al.,* 1998) o que facilita a digestão e diminui a quantidade de nitrogênio excretada (FIREMAN e FIREMAN, 1998). A medida de atividade de protease, foi feita tranferindo-se volumetricamente 5mL de solução de caseína (1,2g de caseína em 100mL de NaOH 0,05N, agitou-se até completa dissolução). O pH foi ajustado para 6,0 (com ácido fosfórico 0,1M). Os tubos de ensaio que foram incubados em banho-maria a 35ºC por 10 minutos para equilibrar a temperatura,

adicionou-se 1mL da solução enzimática, incubou-se por exatamente 10 minutos A reação foi paralisada adicionando 5mL de ácido tricloroacético 5%, após 20 minutos de repouso em banho de gelo a amostra foi filtrada em papel Whatman n° 42. Pipetou-se 1ml do filtrado em tubo de ensaio, adicionou-se 3mL de solução de NaOH 1N e 0,5mL de reagente Folin-Ciocalteau diluído (1:2), a absorbância foi medida a 660nm (MACEDO *et al.,* 2005a). A quantificação foi feita por meio de curva padrão de tirosina (MERCK).

4.2.3 Determinação da atividade de lipase

A atividade de lipase foi medida em um sistema composto por 5mL de emulsão de óleo de oliva extra virgem e goma arábica 7% na proporção de 25% de óleo para 75% de goma; 2mL de tampão fosfato 0,1M - pH 7,0 e 1mL de solução enzimática. O sistema foi incubado a 40°C por 30 minutos em banho termostatizado com agitação de 130rpm. A reação foi paralisada com a adição de 15mL de solução acetona:etanol (1:1 v:v) e os ácidos graxos liberados titulados com solução de NaOH 0,05N usando fenolftaleína como indicador (MACEDO *et al.,* 2005a). Quantificação procedida com curva padrão de ácido oléico (VETEC).

4.2.4 Determinação da atividade de carboximetilcelulase

Celulases hidrolisam celulose, que é o polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza, sua estrutura é linear, formada por diversas cadeias de glicose unidas por ligações β-(1,4), o produto de sua hidrólise são compostos de cadeia menor, mono e dissacarídeos. Pipetou-se 4mL da solução de substrato (0,5% carboximetilcelulose em tampão citrato fosfato 0,05M - pH 5,0) em tubos de ensaio, estes foram incubados em banho-maria a 40ºC por 10 minutos para homogeneizar a temperatura, adicionou-se 1mL de solução enzimática, seguiu-se a incubação por mais 20 minutos. Para paralisar a reação os tubos foram imersos em banho de gelo. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método de Somogyi-

Nelson (1945). A atividade foi calculada empregando-se curva padrão de glicose (SYNTH).

4.2.5 Determinação da atividade de polimetilgalacturonase

O ácido péctico é um polímero ramificado, cuja cadeia principal é constituída por resíduos de ácido D-galacturônico, parcialmente esterificados com grupos metila, polimerizados através de ligações glicosídicas α-1,4 (FENNEMA, 1993), o produto da hidrólise enzimática por poligalacturonase pode ser o ácido mono ou digalacturônico. Incubou-se 0,5mL do extrato enzimático e 0,5mL de solução de pectina cítrica 0,1% em tampão citrato fosfato 0,1M - pH 5,5 a 40ºC por 20 minutos. A reação foi interrompida pela inativação enzimática em banho em ebulição por 10 minutos (RIZZATTO, 1999). A quantificação foi feita por curva de calibração com glicose (SYNTH). Através do método de Somogyi-Nelson (1945) determinou-se açucares redutores.

4.2.6 Determinação da atividade de fitase

O ácido fítico é um poliol ligado a diversos grupos fosfatos (até 6), na reação de desfosforilação o ácido fítico é hidrolisado liberando ácido fosfórico, inositol livre, e/ou compostos intermediários incluindo, juntamente com a liberação de compostos que possam estar quelados como, minerais, proteína e carboidratos (LEI e PORRES, 2003). A medida de atividade de fitase foi procedida empregando o substrato fitato de sódio, conforme metodologia proposta por Shimizu (1992). O substrato é composto por 0,6mL de solução 2M de fitato de sódio em tampão Tris-HCl pH 7,0 - 0,1M suplementado com 2mM de $CaCl_2$, acrescidos de 150µL solução enzimática. Esta mistura foi incubada em tubo de ensaio por 30 minutos em banho sob aquecimento a 37^{o}C. Após o tempo de reação esta foi paralisada pela adição de 750µL de solução ácido tricloroacético 5% (TCA). À mistura de reação adicionou-se 1,5mL do reagente de cor composto por 4 volumes de molibdato de

amônio 1,5% em solução de H_2SO_4 5,5% e 1 volume de solução de sulfato ferroso 2,7%. O fosfato inorgânico liberado foi determinado fotometricamente a 700nm (SHIMIZU, 1992). A quantificação foi feita com curva de calibração com K_2HPO_4 (fosfato de potássio dibásico - ECIBRA).

4.3 Proteína total no extrato liofilizado bruto produzido por *Paecilomyces variotti* e fitase comercial

Determinou-se a concentração de proteína contida no extrato enzimático bruto liofilizado produzido por *Paecilomyces variotti* e na fitase comercial empregando solução enzimática de 1mg/mL em água destilada.

O reagente de Bradford foi composto por 100mg de Azul de Coomasie G-250, diluídos em 50mL de etanol 95%, adicionados de 100mL de ácido fosfórico 85%. Diluiu-se até 1L com água destilada em balão volumétrico, após homogeneizado o reagente foi filtrado em papel de filtro Whatman número 1.

As proteínas totais foram determinadas de acordo com Bradford (1976), empregando 50µL da solução enzimática e 2,5mL do reagente de Bradford, após 5 minutos de reação a temperatura ambiente determinou-se espectofotométricamente a 595nm. A curva padrão foi elaborada com albumina de soro bovino (BIOGRÁS) dissolvida em solução de NaCl 0,15M. Proteína total do extrato enzimático foi expressa em mg de proteína/g de enzima.

4.4 Caracterização química dos grãos de sorgo

Os grãos de sorgo do tipo Vassoura, oriundo de Maringá – Paraná, foram recebidos no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UNICAMP, lavados em água corrente, secos em estufa a 50ºC durante 4 horas, triturados em moinho de facas, peneirados com peneira de mesh 20 (0,4mm) e armazenados em freezer a – 18ºC. Estes grãos moídos foram utilizados nos experimentos descritos.

4.4.1 Composição centesimal

Os grãos de sorgo foram caracterizados, em triplicata, com relação aos seguintes parâmetros físico-químicos: umidade, em estufa a 105ºC, proteínas pelo método de Kjeldahl empregando fator de conversão de 6,25 e cinzas por incineração em mufla a 550ºC de acordo com Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1992) e os lipídeos totais foram determinados segundo Bligh e Dyer (1959). O teor de carboidratos foi calculado por diferença, subtraindo-se de 100 a soma daqueles parâmetros.

4.4.2 Compostos fenólicos

4.4.2.1 Otimização da metodologia de extração

Verificou-se a eficiência da extração de compostos fenólicos empregando-se 200mg de sorgo triturado e 10mL de metanol PA (ECIBRA) e metanol PA acidificado com 1% de HCl, em agitador orbital modelo G2 (EDISON) a 200rpm, 25ºC, a extração foi procedida durante 10, 20, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos. O extrato bruto obtido foi centrifugado a 1320x*g* a 5ºC durante 15 minutos. A quantificação dos compostos extraídos foi feita pela

determinação de taninos condensados através do método de Vanilina (PRICE *et al*., 1978), descrito no item 4.4.2.4.

4.4.2.2 Fenóis totais

Fenóis totais foram determinados pelo método de Follin-Ciocaulteau (SINGLETON e ROSSI, 1965). O princípio deste método é baseado na redução do ácido fosfomolíbdico e fosfotúngstico pelas hidroxilas dos fenóis produzindo uma coloração azul, quantificada por espectrofotômetro a 760nm.

A análise foi realizada pela adição de 1ml do reagente de Follin-Ciocaulteau em frasco Erlenmeyer de 50mL. Adicionou-se 10mL de água destilada e 1mL do extrato de sorgo obtido como citado em 4.4.2.1. Após 3 minutos de repouso adicionou-se 8mL de carbonato de sódio 7,5%. Após 2 horas mediu-se a absorbância a 760nm em espectrofotômetro. O branco foi composto por todos os constituintes citados acima, com exceção do extrato de sorgo. Resultados expressos em mg de ácido gálico/100 g de sorgo, por meio de curva padrão de ácido gálico (SIGMA).

4.4.2.3 Taninos hidrolisáveis

Taninos hidrolisáveis foram determinados empregando o reagente sulfato férrico de amônio conforme Brune *et al*., (1991). A um tubo de ensaio adicionou-se 2mL do extrato de sorgo obtido, 8mL de FAS-reagente (89% tampão acetato 0,1M - pH 4,4, 10% solução de goma arábica 1% e 1% solução de sulfato férrico de amônio (5% de sulfato férrico de amônio em HCl 1)). Após 15 minutos de reação mediu-se a absorbância em 578nm. A quantificação foi feita por meio de curva padrão de ácido tânico (MERCK), expresso em mg de ácido tânico/100g de sorgo.

4.4.2.4 Taninos condensados

Os taninos condensados foram determinados pelo método de Vanilina (PRICE *et al*., 1978). Esta metodologia é específica para flavonóides e dihidroxichalconas que possuem ligação simples na posição 2 e 3 e uma hidroxila livre no anel B. A vanilina é protonada em uma solução ácida, resultando em um carbocátion eletrofílico fraco, o qual reage com o anel aromático nas posições 6 ou 8, este composto é desidratado imediatamente formando um composto vermelho (SUN *et al.,* 1998).

Adicionou-se 1mL do extrato de sorgo a tubo de ensaio e 5mL de solução de vanilina (volumes iguais das soluções de 1% de vanilina em metanol e 8% de HCl em metanol) de um em um minuto. Após 20 minutos, mediu-se a absorbância em espectrofotômetro a 500nm. O cálculo foi efetuado por meio de curva padrão com catequina (SIGMA) e expresso em mg catequina/100 g de sorgo.

4.4.3 Determinação de fósforo inorgânico

A extração de fósforo inorgânico foi feita com 500mg de sorgo triturado solubilizada em 10mL de solução HCl 0,5M por 2 horas sob agitação em agitador orbital modelo G2 (EDISON) a 200rpm à temperatura ambiente (cerca de 25ºC). Após a extração este meio foi centrifugado a 1320x*g* a 5ºC durante 15 minutos (TOWO *et al.,* 2006). O extrato obtido foi empregado na determinação de fósforo inorgânico. Adicionou-se 0,5mL do extrato e 1,5mL de uma solução constituída por 4 partes de 1,5% de molibdato de amônio em solução de ácido sulfúrico 5,5% e 1 parte de sulfato ferroso 2,7% (SHIMIZU, 1992). O fosfato inorgânico liberado foi determinado fotometricamente a 700nm. A quantificação foi feita por meio de curva de calibração com K_2HPO_4 (ECIBRA) e expresso em mg/100 g de sorgo.

4.5 Tratamento dos grãos de sorgo com *Paecilomyces variotti,* tanase e fitase

4.5.1 Preparo dos grãos de sorgo

O sorgo triturado foi denominado farinha de sorgo. À farinha de sorgo adicionou-se água na proporção 1:6 (sorgo:água), esta mistura foi levada à ebulição por 3 minutos (CORREIA *et al.,* 2005). Em frasco Erlenmeyer de 50mL adicionou-se 10g da farinha de sorgo cozida, os tratamentos foram feitos com enzima tanase (945U/Kg de farinha de sorgo) e fitase (2640U/Kg de farinha de sorgo) e adição de 1,5mL de suspensão de esporos do fungo *Paecilomyes variotti* (suspensão contendo 1,6 x 10^7 esporos/mL).

Os tratamentos aplicados foram feitos de três formas distintas: A) processo combinado, no qual o sorgo foi tratado simultaneamente por *Paecilomyces variotti*, tanase e fitase; B) processo separado, onde a fermentação e o tratamento enzimático foram feitos separadamente, primeiro tratamento enzimático e posteriormente fermentação, nomeado B e C, respectivamente. Os frascos Erlenmeyers foram colocados em estufa a 30ºC, cada ensaio foi feito durante 5 e 10 dias, na Figura 19 encontra-se um fluxograma com os tratamentos propostos.

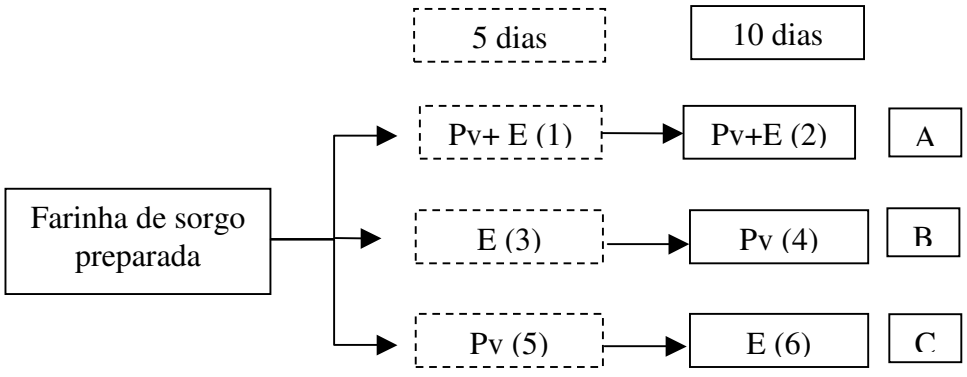

Figura 19. Tratamentos aplicados à farinha de sorgo cozida. Pv = *Paecilomyces variotti;* E = enzima tanase e fitase.

Após o tratamento da farinha de sorgo pelos diferentes métodos procedeu-se a extração e determinou-se fenóis totais, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico, como descrito no item 4.4.2.

4.6 Cinética do tratamento enzimático de grãos de sorgo

O estudo foi procedido em tubos de ensaio com dimensões de 175 x 18mm, adicionou-se 1g de farinha de sorgo (< 20 mesh), 2mL de água destilada, tanase e fitase, 630 e 660U/Kg de farinha de sorgo, respectivamente. Transcorridas 0,5, 1, 2, 6 e 24 horas os tubos foram colocados em banho em ebulição a fim de inativar as enzimas e a farinha de sorgo tratada foi seca a 90ºC durante 3 horas. Determinou-se taninos hidrolisáveis e fósforo inorgânico como descrito nos itens 4.4.2.3 e 4.4.3, respectivamente. A fim de verificar o efeito do processamento físico sobre estes compostos foi feito ensaio "controle" da mesma forma que os demais, porém sem adição das enzimas.

4.7 Otimização do tratamento dos grãos de sorgo com tanase e fitase utilizando desenho experimental

A otimização do tratamento da farinha de sorgo pelas enzimas tanase e fitase foi feito através da ferramenta de planejamento experimental. Esta é de grande valia quando se deseja otimizar um processo, pois, permite verificar as variáveis significativas, condições ótimas do processo e por meio da análise de variância pode-se constatar se o modelo matemático proposto é adequado, em caso positivo, pode-se obter as superfícies de resposta e curvas de contorno (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

4.7.1 Otimização do tratamento da farinha de sorgo utilizando planejamento fatorial fracionado

Elaborou-se um delineamento fatorial fracionado $2^{(4-1)}$ (RODRIGUES e IEMMA, 2005) no qual as variáveis em estudo foram temperatura, concentração de fitase, concentração de tanase e porcentagem de sorgo, a porcentagem de sorgo foi calculada levando em consideração volume final de 6mL. Os níveis empregados estão demonstrados na Tabela 3. O tratamento foi feito em tubos de ensaio de 175 x 18mm, no qual o meio foi mantido durante 24 horas, sob agitação magnética com velocidade 8 em banho termostatizado marca FISATOM. Após o tratamento, os tubos foram colocados durante 10 minutos em água em ebulição para inativar as enzimas presentes e seca a 90ºC durante 3 horas. Posteriormente esta massa seca foi submetida à extração e quantificação de taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico. Os resultados foram submetidos a análise estatística utilizando o software Statistica 8.0, no qual foram avaliados os efeitos das variáveis em estudo, empregando significância de ($p<0,1$).

Tabela 3. Planejamento fracionado $2^{(4-1)}$ aplicado aos grãos de sorgo

Variáveis	**Níveis**		
	-1	**0**	**1**
Temperatura (ºC)	37	40	43
Fitase (U/Kg)	110	385	660
Tanase (U/Kg)	10	30	50
Sorgo (%)	15	32,5	50

4.7.2 Otimização do tratamento da farinha de sorgo empregando delineamento composto central rotacional (DCCR)

Através do planejamento fracionado citado acima, a variável porcentagem de sorgo foi fixada no nível inferior, 15%. Procedeu-se o mesmo ensaio como descrito no item acima (4.7.1). As variáveis temperatura, concentração de fitase e concentração de tanase foram estudadas empregando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3, com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, para estimar o erro experimental (RODRIGUES e IEMMA, 2005), Tabela 4. O Teste-F foi empregado para determinar as variáveis significativas para o processo ($p<0,1$), os dados foram analisados utilizando o software STATISTICA®, 8.0.

Tabela 4. Variáveis utilizadas na otimização do tratamento dos grãos de sorgo com seus respectivos níveis

Variáveis	**Níveis**				
	- 1,68	**-1**	**0**	**1**	**1,68**
Temperatura ºC	30	36	40	46	50
Fitase (U/Kg)	100	280	550	820	1000
Tanase (U/Kg)	100	280	550	820	1000

As determinações foram efetuadas na farinha de sorgo tratada, na farinha de sorgo sem tratamento enzimático e no ensaio controle (sem adição de enzimas) para que estes dados sirvam como parâmetro de controle do processo.

4.8 Ensaio biológico

O experimento biológico foi feito no Laboratório de Ensaio Biológicos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – LEB/FEA/UNICAMP, após este ser aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (CEEA/IB/UNICAMP) e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sob protocolo nº 1623-1 (Anexo 1).

4.8.1 Animais

Para o ensaio biológico, foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar, livres de patógenos específicos (SPF), recém desmamados, com 21 dias de idade, oriundos do Centro de Bioterismo da Unicamp – CEMIB. Os animais foram mantidos em temperatura controlada a 23 ± 2^{o}C, umidade relativa entre 50 – 60%, com períodos alternados de claro e escuro de 12 horas. Os animais foram pesados e os grupos selecionados tomando-se um animal de menor peso e um animal de maior peso até completar 3 grupos com 10 ratos cada, o peso médio inicial dos animais foi de 56,31g ± 6,96. O fornecimento de ração e água em todo o ensaio foi *ad libitum.*

4.8.2 Dietas experimentais

As dietas foram elaboradas de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition (AIN- 93G) (REEVES *et al.,* 1993), com exceção ao teor de proteína, que foi de 12% (GOENA *et al.,* 1989). Para a elaboração das dietas, as matérias primas (caseína, sorgo cru e sorgo tratado) foram caracterizadas quanto a composição centesimal como descrito no item 4.4.1, a fim de corrigir a concentração dos nutrientes destes na dieta. Os três grupos foram divididos como demonstrado abaixo:

- Grupo controle (CO): dieta elaborada com proteína de caseína como padrão e elaborada conforme AIN- 93 (REEVES *et al.,* 1993).

- Grupo sorgo cru (SC): dieta elaborada conforme a AIN-93, contudo nesta a fonte protéica foi o sorgo cru triturado e peneirado (< 20 mesh).

- Grupo sorgo tratado (ST): dieta formulada segundo AIN-93 sendo, a fonte protéica sorgo tratado enzimaticamente. A farinha de sorgo (6%) foi colocada em becker de plástico de 4 litros, adicionou-se água, 100U/Kg da enzima tanase e 100U/Kg de fitase. O processo foi conduzido em um banho termostatizado a 34ºC, com agitação por meio de Turrax (QUIMIS) na velocidade 9 (Figura 20). Após 24 horas a reação foi paralisada com banho em ebulição, posteriormente o sorgo foi seco em estufa a 80ºC durante 8 horas e homogeneizado.

Figura 20. Tratamento da farinha de sorgo com tanase e fitase.

4.8.3 Métodos biológicos

Primeiramente os animais foram submetidos a 3 dias de adaptação com as respectivas dietas e água. O experimento teve duração de 28 dias, sendo que do 10º ao 17º dia foi realizado o balanço nitrogenado, em gaiola metabólica, onde foram coletadas as fezes e a urina, ambos foram armazenados congelados até o momento das análises. No recipiente empregado para a coleta da urina adicionou-se 2ml de ácido clorídrico 20%, para inibir a proliferação de fungos. Após coletada a urina foi filtrada em lá de vidro para remover resíduos da dieta. A urina e fezes foram armazenados a – 18ºC até o momento das determinações. As fezes foram secas em estufa a 65ºC durante 12 horas e trituradas.

O controle de peso, ingesta, troca de água e limpeza das gaiolas foi feito três vezes por semana Após os 28 dias de dieta os animais foram mortos, primeiramente estes permaneceram 12 horas em jejum, recebendo somente água. Os animais foram sedados com halotano para a coleta de sangue via canal lacrimal e o sacrifício foi feito por deslocamento cervical.

4.8.4 Determinações nas fezes e urina

Determinou-se nas fezes e na urina nitrogênio total (AOAC, 1992) e fósforo inorgânico, descrito no item 4.4.3. Estes dados foram empregados para determinar a digestibilidade aparente (DA) de proteína e fósforo, como demonstrado abaixo, conforme metodologia descrita por Sgarbieri (1987).

$$DA = \frac{Ni\ (balanço) - Ne\ (balanço)}{Ni\ (balanço)} \times 100$$

DA = digestibilidade aparente.

Ni = quantidade do nutriente ingerido no balanço metabólico.

Ne = quantidade do nutriente excretado no balanço metabólico.

4.8.5 Determinações bioquímicas no plasma

O sangue foi coletado em tubos plásticos sem anticoagulante, centrifugado em centrífuga Excelsa modelo 206 (FANEM), a 300x*g*, por 15 minutos a temperatura ambiente. O soro foi separado, coletado em tubos ependorf e mantido refrigerado. No soro determinou-se as concentações de glicose, colesterol, triacilglicerol, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), uréia, fósforo empregando kits específicos da marca LABORLAB®, cálcio e ferro sérico foram determinados com kits de reação da marca Bioclin, seguindo os protocolos especificados pelas empresas.

4.8.6 Determinação de cinzas no fêmur

Os fêmures (esquerdo e direito) foram coletados, pesados, acondicionados em embalagem plástica e mantidos sob congelamento (-18ºC) até o momento da análise. Para a determinação de cinzas totais os fêmures foram secos em estufa a 105ºC durante 12 horas e incinerados a 550ºC até obtenção de cinzas claras (AOAC 1992).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade enzimática, proteína total e atividade específica do extrato enzimático bruto produzido por *Paecilomyces variotti*

No complexo enzimático produzido conforme descrito no item 4.1 foi determinada a atividade de tanase e de outras enzimas como, protease, lipase, carboximetilcelulase, polimetilgalacturonase e fitase, pois se sabe da capacidade dos fungos em produzir diversas enzimas extra celulares (DREW e DEMAIN, 1977).

Foi empregada também a fitase comercial (NATUPHOS – BASF) na qual determinou-se apenas a atividade de fitase, frente ao substrato fitato de sódio.

A medida da atividade enzimática para o preparado bruto de *Paecilomyces variotti,* (aferida segundo metodologias citadas no item 4.2), o conteúdo de proteína total (item 4.3) e a atividade específica encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Medida da atividade de tanase, protease, lipase, carboximetilcelulase, polimetilgalacturonase e fitase, proteína total e suas atividades específicas em extrato bruto obtido fermentação por *Paecilomyces variotti*

Enzimas	Atividade (U/g)	Proteínas totais (mg/g)	Atividade específica (U/mg)
Tanase	626,2		1,89
Protease	3,06		0,01
Lipase	-	331	0,00
Carboximetilcelulase	187,2		0,57
Polimetilgalacturonase	151,6		0,46
Fitase	19,6		0,06

1U de atividade enzimática foi definida como a quantidade em µmol do substrato (específico para cada enzima) hidrolisado durante 1 minuto de reação por 1g da enzima liofilizada.
- não foi contatada atividade enzimática.

Na Tabela 5 observa-se uma elevada atividade para a tanase, como era de se esperar uma vez que a composição do meio foi elaborada com adição do indutor ácido tânico. De acordo com Bajpai e Patil (1997), Lekha e Lonsane (1997), Pinto (2003), Macedo *et al.,* (2005b), Aguilar *et al*., (1999); Battestin e Macedo, (2007a) o ácido tânico desempenha o papel de fonte de carbono para o microrganismo, bem como de indutor da síntese endógena da enzima.

Em estudo realizado por Mondal *et al.,* (2001) quando se utilizou *Bacillus cereus* KBR9 para a produção da tanase adicionando de 10g/L de ácido tânico ao meio de fermentação submersa, obteve-se valores para a atividade enzimática de 0,22U/mL. Em experimento realizado por Pinto (2003) no qual não se adicionou ácido tânico ao meio de fermentação, não foi observada atividade de tanase.

Sharma *et al.,* (2008) estudaram a produção de tanase por meio da fermentação submersa em meio Czapek's com adição de 2,4% de ácido tânico por *Penicillium variable* IARI 2031 durante 72 horas a 150rpm e obtiveram atividade de 33U/mL. Seth e Chand (2000) obtiveram produção máxima de 771U/g de célula de *Aspergillus niger,* obtida por filtração e lavagem com tampão citrato.

No extrato bruto obtido por *Paecilomyces variotti* verificou-se, além da atividade de tanase, atividade das seguintes enzimas, carboximetilcelulase (187U/g), polimetilgalacturonase (152U/g), fitase (20U/g) e protease (3U/g). Este dado é muito interessante, uma vez que a adição de enzimas na ração animal geralmente é feita utilizando mistura de enzimas, desta forma, diversos nutrientes que não são digeridos ou então, que são dificilmente digeridos pelas enzimas do trato digestivo, podem ser metabolizados, melhorando o valor energético deste alimento. Vale lembrar que as atividades das enzimas, exceto tanase, são inferiores a 1U/mg de proteína, relativamente baixas. Em síntese, pode-se dizer que essa mistura enzimática produzida pode ser útil na melhoria da digestibilidade de alimentos.

O pó bruto de *Paecilomyces variotti* não apresentou atividade de lipase no meio produzido ou esta encontra-se em uma concentração inferior àquela detectada pelo método empregado.

A fitase comercial NATUPHOS possui atividade de 660,3U/g de enzima e atividade específica de 4,7U/mg de proteína, nas condições do teste.

Na literatura há diversos estudos desenvolvidos com o intuito de melhorar a digestibilidade de ração animal empregando mistura enzimática e os resultados são controversos. A quantidade de enzima que deve ser aplicada na ração animal para se obter o melhor resultado depende da dieta, da espécie e da idade do animal, além disso, alguns estudos demonstraram que concentrações mais elevadas de enzima podem ser menos efetivas comparando com concentrações menores desta (BEAUCHEMIN *et al.,* 2003, GRAMINHA *et al.,* 2008).

Diversos estudos estão focados na diminuição de fitatos, sem observar o metabolismo deste composto, se o fósforo liberado é metabolizado e se não é metabolizado o que está acontecendo no organismo do animal. Geralmente os parâmetros medidos são: ganho de peso, incorporação de minerais nos ossos e plasma, diminuição na excreção de nutrientes, digestibilidade aparente e verdadeira.

5.2 Otimização da metodologia de extração dos compostos fenólicos

A metodologia para extração dos compostos fenólicos foi estudada, pois na literatura não há um consenso entre os autores. Os solventes mais utilizados são metanol, metanol acidificado com ácido clorídrico, acetona, soluções de acetona, metanol, clorofórmio e água, entre outros. Outro parâmetro importante é o tempo de extração, na

literatura varia entre 20 minutos até 25 horas (TOWO *et al.,* 2006; FREITAS *et al.,* 2003; KAYODÉ *et al.,* 2007a; PRICE *et al*., 1978).

No presente estudo empregou-se metanol e metanol acidificado com 1% de HCl, sob agitação de 150rpm, a 25ºC. A quantificação dos compostos extraídos foi medida após 10, 20, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos do início da extração. A quantificação foi feita pela determinação de taninos condensados através do método de vanilina (PRICE *et al*., 1978), os resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Extração de taninos com metanol e metanol com 1% de HCl em diferentes tempos, quantificados pelo método de Vanilina

Tempo (minutos)	Metanol	Metanol/HCl
10	$383,25 \pm 0,61^{c}$	$380,01 \pm 0,56^{c}$
20	$498,80 \pm 0,84^{c}$	$585,60 \pm 0,73^{c}$
30	$381,67 \pm 0,72^{c}$	$516,65 \pm 0,95^{c}$
60	$518,00 \pm 0,82^{c}$	$822,33 \pm 0,87^{bc}$
120	$1189,88 \pm 0,91^{ab}$	$1358,09 \pm 0,62^{ab}$
180	$1221,03 \pm 0,88^{ab}$	$1221,03 \pm 0,94^{ab}$
240	$1470,22 \pm 0,86^{a}$	$1146,27 \pm 0,39^{ab}$

Resposta com letras iguais na mesma coluna e linha significa que não há diferença estatística pelo teste Tukey ($p<0,05$). Resultados expresso em mg/100g de farinha de sorgo, seguidos pelo desvio padrão.

Analisando os resultados da Tabela 6 percebe-se que não há diferença significativa ($p<0,05$) após 120 minutos de extração empregando tanto o metanol como o metanol acidificado. Assim, o solvente empregado no estudo foi metanol e o tempo de extração de 120 minutos para as determinações de compostos fenólicos.

5.3 Caracterização química dos grãos de sorgo vassoura

5.3.1 Composição centesimal

Os grão de sorgo do tipo vassoura foram preparados como descrito no item 4.4 e submetidos a determinação da composição centesimal (umidade, proteína, lipídeos, cinzas e carboidratos), determinação de compostos fenólicos totais, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico, as determinações foram feitas em triplicata, os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 Composição centesimal, compostos fenólicos e fósforo de grãos de sorgo tipo vassoura

Composição centesimal[1]			
Proteína (%)	**Lipídeos (%)**	**Cinzas (%)**	**Carboidratos* (%)**
13,64 ± 0,92	4,17 ± 0,36	1,70 ± 0,02	80,50
Compostos fenólicos e fósforo **			
Fenóis totais	**Taninos Hidrolisáveis**	**Taninos condensados**	**Fósforo inorgânico**
809,25 ± 0,98	90,01 ± 1,76	6730,43 ± 2,46	226,86 ± 1,59

Resultados obtidos em triplicata seguidos pelo desvio padrão.
[1] Composição centesimal expressa em base seca.
* Calculado por diferença (carboidratos = 100% - umidade – proteína – lipídeos – cinzas).
** Dados expressos em mg/100g de sorgo.

Os componentes majoritários do sorgo divergem muito devido a variedade, umidade do solo e condições climáticas, sendo que a concentração de proteína é o nutriente que apresenta maior variação. A composição do sorgo é semelhante ao milho (*Zea mays).* O

sorgo é constituído por aproximadamente 11% de proteína, 3,2% de lipídeos, 2,7% de fibras totais, 1,8% de cinzas e 70% de carboidratos (DENDY, 1995).

Diferentes variedades de sorgo oriundas do Texas foram estudadas em relação a sua composição centesimal, neste estudo a umidade das cinco variedades analisadas variou entre 12 – 13,4%, proteína 9,8 – 14,3%, lipídeos 2,7 – 3,5%, cinzas 1,3 – 1,8%, fibras 1,4 – 2,6% e carboidratos 67,6 – 73,4%. Quanto aos ácidos graxos, estudos anteriores verificaram que os mais abundantes são oléico e linoléico, representando 30,5 – 41,3% e 33,2 – 49,7%, respectivamente (NEUCERE e SUMRELL, 1980). O sorgo possui entre 79 e 84,5% de ácidos graxos insaturados, similar ao milho que possui 86% de ácidos graxos insaturados (VIEIRA *et al.,* 2005).

Nawal *et al.,* (2009) determinaram a composição centesimal de sorgo da cultivar Karamaka (Sudão), este possui 6% de umidade, 10,4% de proteína, 3,47% de lipídeos, 1,55% de cinzas e 2,36% de fibras.

Carboidratos representam a maior parte da constituição de sorgo e o amido representa 60 – 80% destes. O amido do sorgo contém de 70-80% de amilopectina e 20-30% de amilose. A digestibilidade do amido é diminuída em sorgo que contém tanino. Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados com animais de laboratório empregando rações formuladas com sorgo constataram que as proteínas do sorgo possuem, geralmente, menor digestibilidade em relação àquelas de outros cereais (DENDY, 1995).

A composição dos grãos de sorgo vassoura quanto aos compostos fenólicos indica que este está próximo aos valores contatados em outros estudos quanto ao fenóis totais e taninos hidrolisáveis, porém a concentração de taninos condensados está acima da média. Esta elevada concentração de taninos condensados nesta variedade de sorgo, tipo vassoura, provavelmente está relacionada com a rusticidade e resistência à pragas desta planta.

Towo *et al.,* (2006) quantificaram taninos hidrolisáveis e condensados em grãos de sorgo, verificaram a presença de 6,1 e 13,9mg/g de sorgo, respectivamente. Matuscheck *et al.,* (2001) constataram a presença de 11,9 e 9,93mg/g de sorgo para taninos hidrolisáveis e

condensados, respectivamente. Neucere e Sumrell (1980) verificaram presença de 480mg/g para taninos condensados em grãos de sorgo.

Estudo feito por Radhakrishnan e Sivaprasad (1980) com 198 amostras distintas de sorgo cultivadas na Índia, analisou a variação na concentração de taninos condensados entre variedades distintas e entre as mesmas variedades cultivadas em locais diferentes. Os autores constataram que há uma diferença muito grande na concentração destes compostos, sendo que a concentração de taninos condensados variou de 10 – 2056mg/100 g de sorgo, contudo somente 5% das variedades continham mais de 400mg/100 g de sorgo. Este estudo constatou que a concentração de compostos fenólicos na planta não é uma característica constante na mesma variedade, mas sim que esta é influenciada pela fertilidade do solo e condições climáticas.

Percebe-se que os dados encontrados na literatura diferem quanto à concentração de compostos fenólicos em grãos de sorgo, este é um resultado esperado, uma vez que, o sorgo estudado é oriundo de diferentes regiões, são cultivares diferentes e produzidas em condições edafoclimáticas distintas. Além destas considerações é importante lembrar que as metodologias empregadas na determinação de compostos fenólicos e taninos são muito variáveis, há diversas formas de extração do composto de interesse, distintas metodologias e além destes não há um consenso quanto ao emprego do padrão para a elaboração de curva de calibração. Portanto, a comparação de diferentes trabalhos deve ser vista com bastante cautela, uma vez que, este pode representar somente um valor relativo.

5.4 Tratamento dos grãos de sorgo com *Paecilomyces variotti,* tanase e fitase

Após o preparo da farinha de sorgo (lavagem, secagem, trituração, peneiragem, cozimento) como descrito no item 4.5.1, a farinha preparada foi submetida a diferentes tratamentos, como descrito anteriormente (Figura 19), os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

A concentração dos compostos fenólicos e fósforo inorgânico na farinha de sorgo empregada neste estudo (Tabela 8) é diferente daqueles demonstrados na Tabela 7 em função do emprego de amostras de lotes distintos, pois, para o ensaio biológico foi necessário a aquisição de uma quantidade grande de grãos de sorgo (aproximadamente 8Kg), que foi recebida separadamente. Contudo, é importante salientar que a composição demonstrada na Tabela 7 representa a composição do sorgo que foi empregado nos demais experimentos, inclusive no ensaio biológico.

Tabela 8. Efeito do tratamento enzimático e fermentativo em farinha de sorgo no teor de fenóis totais, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico

Tratamentos**	FT*	TH*	TC*	Pi*
Farinha de sorgo	111,08 ± 9,31 ^{a}	63,89 ± 10,02 ^{a}	139,95 ±2,46 ^{ab}	125,02 ± 5,59^{d}
Tratamento A				
Pv + E (1)	57,66 ± 0,06 ^{cde}	4,50 ± 0,05 ^{b}	147,6 ± 0,15 ^{a}	212,52 ± 1,04^{b}
Pv + E (2)	77,28 ± 3,49 ^{bc}	6,66 ± 4,16 ^{b}	9,54 ± 2,73 ^{c}	265,81 ±3,58 ^{a}
Tratamento B				
E (3)	57,18 ±9,51 ^{ce}	8,33 ± 1,21 ^{b}	19,4 ± 5,98 ^{c}	227,38 ± 7,16^{b}
E + Pv (4)	77,22 ± 11,49 ^{bd}	3,18 ± 0,04 ^{b}	7,52 ± 10,63 ^{c}	259,4 ± 4,02^{a}
Tratamento C				
PV (5)	37,7 ± 4,52 ^{e}	4,57 ±0,51 ^{b}	98,62 ± 10,43 ^{ab}	29,48 ± 6,28 ^{e}
Pv + E (6)	88,83 ± 6,33 ^{ab}	4,73 ± 0,56 ^{b}	84,43 ± 11,97 ^{b}	148,95 ± 1,65^{c}

Respostas com letras iguais na mesma coluna significam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,1). Pv- *Paecilomyces variotti;* E – enzimas tanase e fitase.
* Resultados expressos em mg/100 g de farinha de sorgo.
**A descrição dos tratamentos está na Figura 19; FT: fenóis totais; TH: taninos hidrolisáveis; TC: taninos condensados; Pi = fósforo inorgânico.

Os dados demonstrados na Tabela 8 encontram-se com desvios padrões elevados, provavelmente, isto seja, em função da dificuldade em obter amostra homogênea para a extração dos compostos de interesse. Analisando a Tabela 8 verifica-se que a concentração de fenóis totais (FT) é diminuída significativamente ($p<0,1$) nos tratamentos A, B e no tratamento C por 5 dias. Observa-se que os tratamentos com duração de 5 dias foram mais efetivos na diminuição de FT do que àqueles feitos durante 10 dias. Esta maior concentração de FT possivelmente está relacionada com os diferentes compostos formados durante os tratamentos de 10 dias, uma vez que, o método para determinação de FT com o reagente de Folli-Ciocaulteau é sensível aos compostos que tenham capacidade de reduzi-lo como, proteínas. Portanto, não pode-se afirmar que a concentração de FT constada nos tratamentos sejam exclusivamente de compostos fenólicos.

Os ensaios 1, 3 e 5 apresentaram as menores concentrações de FT, a redução foi de 48, 48,5 e 66%, respectivamente. Tanto os tratamentos feitos empregando *Paecilomyces variotti* como aquele somente com tanase e fitase foram efetivos na redução de FT.

Os taninos hidrolisáveis (TH) foram degradados extensivamente em todos os tratamentos propostos e estes não diferem estatisticamente ($p<0,1$) entre si. A redução média de TH foi de 91,7% em relação ao sorgo sem tratamento. TH podem ser facilmente hidrolisados tanto por métodos físicos, químicos e biológicos, pois, estes compostos são bastante instáveis. Sendo assim, não é possível ter certeza se a diminuição de TH foi devido à tanase ou ao tratamento físico (maceração e aquecimento).

Rakic *et al.,* (2007) avaliaram o efeito do tratamento térmico sobre compostos fenólicos e capacidade antioxidante de carvalho (*Quercus* spp.). Os autores constataram que o tratamento térmico (200ºC por 10 minutos) mudou o conteúdo e a composição dos compostos fenólicos, sendo que, fenóis totais (pelo método de Follin-Ciocaulteau) e taninos (método de precipitação com polivinil pirrolidona) foram diminuídos com o tratamento térmico, já o ácido gálico foi aumentado. O que, segundo os autores, ocorreu devido à capacidade que o tratamento térmico possui em hidrolisar taninos hidrolisáveis, causando aumento na concentração de ácido gálico e consequente aumento na atividade antioxidante.

Cultivar de sorgo (Karamaka), com alto teor de tanino (2,7% pelo método de Vanilina), foi tratada com água destilada, 0,05, 0,10 e 0,20% de NaOH por 8 horas submetido ou não à ebulição por 20 minutos, a fim de, diminuir a concentração de tanino. Os autores constataram elevada instabilidade de taninos, pois, até mesmo o tratamento com água e água em ebulição reduziram a concentração de taninos em 35 e 46%, respectivamente. A diminuição de tanino mais efetiva foi com o tratamento 0,20% de NaOH por 8 horas e fervura, a redução representou 82% (ALI *et al.,* 2009).

Taninos condensados foram hidrolisados com menor intensidade, somente os ensaios 2, 3 e 4 resultaram em diminuição significativa, representando 93,2, 86 e 95%. Os resultados obtidos nos ensaios 1, 5 e 6 não diferiram do sorgo que não passou por tratamento ($p<0,1$).

A diminuição de TH e TC verificadas neste estudo são semelhantes aos dados reportados por Brune *et al.,* (1989); Towo *et al.,* (2003). A diminuição dos compostos fenólicos durante a fermentação também pode estar relacionada com a produção microbiana de ácidos orgânicos no meio como constatado por Chen *et al*., (2001). Towo *et al.,* (2006) estudaram o tratamento de grãos de sorgo através de fermentação natural e aplicação das enzimas polifenoloxidase e fitase e verificaram redução de 62% para FT, 72% para TH e 81,3% para TC.

Kayodé *et al.,* (2007b) verificaram o efeito do processamento de sorgo na elaboração de uma bebida (*Dibou)* sobre fitatos, compostos fenólicos e solubilidade de ferro e zinco *in vitro*. Foi constatado que a diminuição de fitatos ocorreu principalmente na etapa de limpeza, já os compostos fenólicos foram diminuídos entre 38 – 65% na etapa de cozimento, contudo a diminuição de fenólicos resultou na diminuição drástica no ferro e zinco.

TC no tratamento 1 não diferem ($p<0,1$) do sorgo cru, já o tratamento 2 (durante 10 dias) é diferente estatisticamente e a diminuição foi de 93%. Possivelmente essa diminuição acentuada nos TC após 10 dias de fermentação seja devido ao metabolismo do

Paecilomyces variotti, após um período de adaptação ao meio (fase lag), além de uma possível melhora na interface enzima-substrato após a ação das enzimas endógenas e exógenas. A ação de enzimas sintetizadas pelo microrganismo pode resultar na diminuição de taninos. Alguns estudos relatam a degradação aeróbica de taninos condensados, ácidos fenólicos e seus intermediários através de *Penicillium* spp. (PATEL *et al.,* 1990), *Aspergillus* spp. e *Chaetomium cupreum* (WILLIAM *et al.,* 1986).

Microrganismos estão sendo estudados quanto a sua aplicação na biodegradação de taninos, possivelmente o fungo empregado, *Paecilomyces variotti* tenha ação similar à aqueles resportados por Rodríguez *et al.,* (2008) que estudaram a ação de tanase intra celular de *Lactobacillus plantarum* em meio reacional contendo ácido tânico comercial, incubados a 37ºC durante 20 horas. A rota bioquímica da hidrólise do ácido tânico com tanase de *Lactobacillus plantarum* e, possivelmente, galato descarboxilase (OSAWA *et al.,* 2000), foi a seguinte: ácido tânico → ácido gálico e glicose → ácido gálico é descarboxilado à pirogalol.

Kumar *et al.,* (1999) selecionaram uma bactéria capaz de degradar ácido tânico, *Citrobacter freundii,* estudaram a produção da tanase em meio contendo 1% de ácido tânico a 30ºC e verificaram o maior pico de atividade da enzima (1,87U/mL) após 6 horas de fermentação. A rota bioquímica da degradação do ácido tânico pela *Citrobacter freundii* foi a seguinte: ácido tânico → glicose e ácido gálico → pirogalol → ácido 2-hidroxymuconico → piruvato. Os autores relacionaram a biodegradação do ácido tânico por *Citrobacter freundii* com as enzimas tanase, ácido gálico descarboxilase e pirogalol 1,2-dioxigenase.

Microrganismos possuem capacidade maior de degradar taninos com estruturas mais simples, de menor peso molecular como taninos hidrolisáveis, comparando com os taninos condensados. Taninos são tóxicos para a maioria dos microrganismos (BHAT *et al.,* 1998) em função das suas habilidades em inibir enzimas, indisponibilizar substratos e agir sobre a membrana microbiana (SCALBERT, 1991).

A enzima tanase age especificamente nas ligações éster e depsídica, presentes principalmente em taninos hidrolisáveis, originando compostos com estruturas mais simples, como, ácido gálico, digálico, catequina e glicose, que podem ser metabolisados por microrganismos com maior facilidade. Contudo, a tanase não age sobre TC, a menos que estes estejam esterificados com ácido gálico ou digálico como epigalocatequina galato, epigalocatequina, epicatequina galato (BATESTTIN *et al.,* 2007d). Sendo assim, a diminuição dos compostos fenólicos verificada no tratamento 3, possivelmente está relacionada ao crescimento de microrganismos presentes naturalmente na farinha de sorgo empregada, visto que o sorgo utilizado não passou por processo de autoclavagem, somente fervura durante 3 minutos.

O sorgo cru possui 125mg de Pi por 100g de sorgo, esta concentração foi aumentada significativamente em quase todos os ensaios (1,2,3,4 e 6), esse aumento no Pi representou 70, 113, 82, 108 e 19%, respectivamente. Sendo que os resultados para os ensaios 2 e 4 foram os maiores e estes são iguais estatisticamente ($p<0,1$). Provavelmente este aumento no Pi é devida exclusivamente à ação da enzima fitase adicionada.

Diversos estudos demonstram a ação de fitase exógena na diminuição de fitato, liberando penta, tetra, tri, di, monoinositol e fósforo inorgânico (HURRELL *et al*., 2003; MATUSCHEK *et al*., 2001; SANDBERG e SVANBERG, 1991; TÜRK e SANDBERG, 1992; TOWO *et al.,* 2006).

Towo *et al.,* (2006) constataram redução de fitato de 88% e consequente aumento de 3,1% na biodisponibilidade de ferro após tratamento de sorgo com fermentação natural e enzimas polifenoloxidase e fitase.

A farinha de sorgo adicionada de *Paecilomyces variotti* (ensaio 5) resultou em uma acentuada redução de fósforo inorgânico no meio que representou 76%. Provavelmente o fungo utilizou o Pi contido e liberado no meio para o seu crescimento. Alguns estudos relatam a capacidade de bactéria láticas em hidrolisar fitato quando este é a única fonte de fósforo no meio (SHIRAI *et al.,* 1995; LOPEZ *et al.,* 2000).

Kayodé *et al.,* (2007a) atribuíram a diminuição de fitato à fermentação com bactérias láticas e leveduras, as quais possivelmente sintetizaram fitase e assim hidrolisaram fitato à Pi, o qual foi usado no crescimento destes microrganismos (ANDLID *et al.,* 2004; KEROVUO e TYNKKYNEN, 2000).

Dentre os tratamentos propostos A, B e C constata-se que os melhores resultados, diminuição de taninos e aumento de Pi deu-se no tratamento A (com 10 dias) e B tanto com ação da enzima durante 5 dias como com a ação da enzima e *Paecilomyces variotti* durate 10 dias. Comparando o tratamento B com o C pode-se dizer que a ordem do tratamento (*P. variotti* X enzimas) exerce influência nos parâmetros avaliados, especialmente o *P. variotti* na concentração final de Pi.

Após os tratamentos iniciais feitos na farinha de sorgo objetivou-se selecionar àquele que resultou na maior diminuição compostos fenólicos (FT, TH e TC) e aumento de Pi, a fim de otimizar este processo e usar o sorgo tratado em um estudo *in vivo* para verificar a real efetividade do tratamento enzimático. Analisando os tratamentos aplicados (Tabela 8) em relação aos compostos fenólicos e Pi, constata-se que os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 2, 3 e 4, pois, estes resultaram na melhor combinação quanto à redução de taninos e aumento de Pi.

Porém, vale salientar que o *Paecilomyces variotti* utiliza o fósforo do meio para o seu crescimento, além disto este fungo foi selecionado recentemente e ainda não foi submetido a análise de toxicidade aguda *in vivo* e não é considerado GRAS (Generally Recognized as Safe). Segundo Graminha *et al.,* (2008) a produção de micotoxinas pode ser um fator limitante quando for empregado microrganismo que não é considerado GRAS. Portanto, o tratamento selecionado para dar continuidade ao estudo foi àquele com as enzimas tanase e fitase, tratamento 3.

5.5 Cinética do tratamento de sorgo com tanase e fitase sobre taninos hidrolisáveis e fósforo inorgânico

A cinética da ação das enzimas tanase e fitase na farinha de sorgo foi estudada a fim de estabelecer o tempo da reação que melhor satisfaça o objetivo de diminuir taninos e aumentar o fósforo no meio. A reação foi feita em tubos de ensaio com dimensões de 175 x 18mm, adicionou-se 1g de farinha de sorgo (< 20 mesh), 2mL de água, tanase e fitase, 630 e 660U/Kg de farinha de sorgo, respectivamente. Após 0,5, 1, 2, 6 e 24 horas foram feitas as determinações de taninos hidrolisáveis e fósforo inorgânico, na Figura 21 pode-se visualizar o comportamento destes compostos com o tempo.

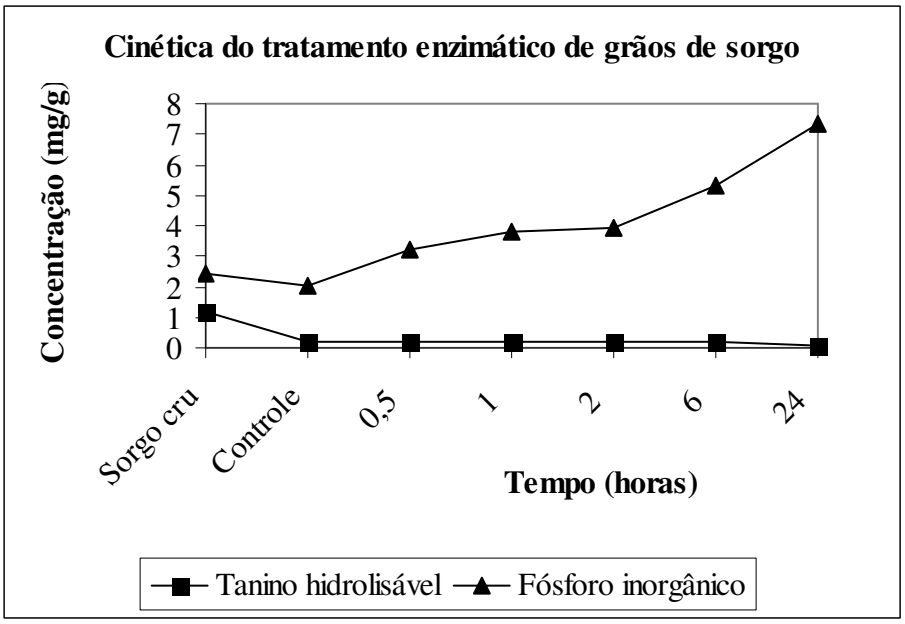

Figura 21. Cinética do tratamento com tanase e fitase sobre taninos hidrolisáveis e fósforo em sorgo vassoura.

Pela Figura 21 observa-se que os taninos hidrolisáveis contidos no sorgo cru foram praticamente eliminados no ensaio controle (no qual a farinha de sorgo passou pelo mesmo tratamento dos demais, sem adição das enzimas) e que nos ensaios feitos com a adição das

enzimas a concentração de taninos sofreu pouca alteração, o que indica que o processamento (maceração e fervura) tem grande efeito sobre taninos hidrolisáveis, já a tanase adicionada teve pouco, ou nenhum efeito sobre estes compostos. Segundo Mahmood *et al.,* (2006) a diminuição de taninos pode estar relacionada com a interação destes com água adicionada, devido a modificações na molécula deste composto de forma que este não seja quantificado pelo método empregado. Kayodé *et al.,* (2007b) afirmam que a diminuição de compostos fenólicos sob aquecimento pode ser em função de reações dos grupos hidroxila, formação de complexos com os nutrientes como, proteínas e minerais, ou ainda a polimerização desse componentes diminuindo os fenólicos que podem ser quantificados.

Rodríguez *et al.,* (2007) verificaram a autodegradação de taninos e concluíram que estes são altamente reativos e instáveis sobre diversas condições de incubação. Barbiker (1991) demonstrou que o tratamento de sorgo com NaOH 0,05 M, durante 24 horas a 30ºC reduziu tanino em 84%.

Quanto ao fósforo inorgânico percebe-se que este é aumentado lentamente até 2 horas de reação e após esse tempo seu aumento é acentuado e sua maior concentração é obtida no tempo máximo estudado de 24 horas.

O aumento na liberação de fósforo após 2 horas de reação provavelmente está relacionado com a hidratação do meio, o que possivelmente torne este mais propício para a ação da fitase. Além da fitase adicionada pode haver ativação de enzimas endógenas do sorgo, uma vez que este cereal não passou por tratamento de inativação enzimática. Sendo assim, as reações serão conduzidas durante 24 horas e posteriormente paralisadas em banho em ebulição durante 10 minutos.

5.6 Otimização do tratamento enzimático do sorgo

A otimização do tratamento de sorgo com enzimas foi estudado por meio de um planejamento fracionado que permitiu verificar as variáveis significativas do processo e posterior estudo com planejamento completo, descritos a seguir.

5.6.1 Delineamento fatorial fracionado

Por meio de um delineamento fatorial fracionado (2^{4-1}) verificou-se o efeito das variáveis temperatura, concentração de fitase, concentração de tanase e porcentagem de sorgo (volume final de 6 mL) nas respostas taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico, na Tabela 9 pode-se observar os resultados. A composição de fenólicos no sorgo sem tratamento e no ensaio controle (ensaio feito sem a adição das enzimas) constam na tabela para facilitar a comparação dos ensaios e o entendimento do processo.

Tabela 9. Planejamento fracionado (2^{4-1}) no tratamento de sorgo através de tanase e fitase

Ensaios	Temperatura	Fitase	Tanase	% sorgo	TH*	TC*	Pi*
Sorgo cru					90,01	6730,43	226,86
Controle					8,83	129,30	320,75
1	-1 (37)	-1 (110)	-1 (10)	-1 (15)	8,43	136,23	833,33
2	1 (43)	-1 (110)	-1 (10)	1 (50)	8,23	270,00	558,11
3	-1 (37)	1 (660)	-1 (10)	1 (50)	12,34	221,66	565,27
4	1 (43)	1 (660)	-1 (10)	-1 (15)	5,17	124,39	904,75
5	-1 (37)	-1 (110)	1 (50)	1 (50)	14,17	293,44	519,75
6	1 (43)	-1 (110)	1 (50)	-1 (15)	5,43	109,20	912,50
7	-1 (37)	1 (660)	1 (50)	-1 (15)	9,41	167,49	851,17
8	1 (43)	1 (660)	1 (50)	1 (50)	9,80	291,44	560,07
9	0 (40)	0 (385)	0 (30)	0 (32,5)	4,50	167,86	818,49
10	0 (40)	0 (385)	0 (30)	0 (32,5)	4,71	144,68	778,35
11	0 (40)	0 (385)	0 (30)	0 (32,5)	4,07	111,26	787,71

TH: taninos hidrolisáveis; TC: taninos condensados; Pi: fósforo inorgânico.
* Resultados expressos em mg/100g de sorgo.

Através do software Statistica 8.0 foi avaliado o efeito que estas variáveis exerceram sobre as respostas taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico. Nas Tabelas 10, 11 e 12 estão demonstrados os efeitos e através do p-valor pode-se identificar as variáveis significativas para o processo, empregou-se confiança de 90%.

Tabela 10. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase, concentração de tanase e porcentagem de sorgo na resposta taninos hidrolisáveis

	Efeito	**Erro padrão**	**T(6)**	**p-valor**
Média	**7,84**	**0,10**	**79,72**	**0,00**
Temperatura	**-3,93**	**0,23**	**-17,04**	**0,00**
Fitase	0,12	0,23	0,50	0,67
Tanase	**1,16**	**0,23**	**5,03**	**0,04**
% sorgo	**4,03**	**0,23**	**17,45**	**0,00**

R^2 = 57 %

Tabela 11. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase, concentração de tanase e porcentagem de sorgo na resposta taninos condensados

	Efeito	**Erro padrão**	**T(6)**	**p-valor**
Média	**185,24**	**8,58**	**21,59**	**0,00**
Temperatura	-5,95	20,12	-0,30	0,80
Fitase	-0,97	20,12	-0,05	0,97
Tanase	27,32	20,12	1,36	0,31
% sorgo	**134,81**	**20,12**	**6,70**	**0,02**

R^2 = 75 %

Tabela 12. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase, concentração de tanase e porcentagem de sorgo no fósforo inorgânico

	Efeito	**Erro padrão**	**T(6)**	**p-valor**
Média	**735,41**	**6,33**	**116,14**	**0,00**
Temperatura	41,48	14,85	2,79	0,11
Fitase	14,39	14,85	0,97	0,43
Tanase	-4,49	14,85	-0,30	0,79
% sorgo	**-324,64**	**14,85**	**-21,86**	**0,00**

R^2 = 92 %

Analisando as Tabelas 10, 11 e 12 pode-se constatar, que a variável concentração de sorgo foi significativa para as três respostas em estudo, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico. Quando a concentração de sorgo passou do nível inferior (15%) para o superior (50%) o efeito sobre as respostas foi negativo, ou seja, a diminuição de taninos foi menos efetiva e o incremento de fósforo no meio foi menor. Sendo assim, para os próximos estudos a variável porcentagem de sorgo no meio foi fixada em 15%.

O ensaio controle mostra que o efeito físico, maceração e fervura exercem efeito muito importante na diminuição de taninos hidrolisáveis e condensados, obtendo-se valores similares àqueles constatados pela adição das enzimas.

Através da variação explicada pelo modelo (R^2) percebe-se que para taninos hidrolisáveis este coeficiente ficou abaixo do considerado aceitável, de forma a considerar o processo sob controle. Portanto não se pode obter conclusões baseada nestes dados.

A variável temperatura não teve efeito significativo ($p<0,1$) sobre o processo, contudo quando esta passou de 37 para 43ºC a diminuição de taninos foi acentuada e o aumento de fósforo no meio foi favorecido. As variáveis temperatura e concentração das enzimas foram estudadas em um planejamento completo, empregando faixas de concentração maiores.

5.6.2 Delineamento compostos central rotacional

Após o delineamento fatorial fracionado a concentração de sorgo no meio foi fixada em 15% e as variáveis temperatura, concentração de fitase e concentração de tanase foram estudadas através de um planejamento compostos central rotacional (DCCR). As respostas avaliadas foram taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico, os resultados estão demonstrados na Tabela 13. A composição de fenólicos no sorgo sem

tratamento e no ensaio controle (ensaio feito sem a adição das enzimas) constam na Tabela para facilitar a comparação dos ensaios e o entendimento do processo.

Tabela 13. Determinação de taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico após tratamento dos grãos de sorgo através de DCCR 2^3

Experimentos	Temperatura	Fitase	Tanase	TH	TC	Pi
Sorgo cru				90,01	6730,43	226,86
Controle				8,83	129,30	320,75
1	-1 (34)	-1 (280)	-1 (280)	7,19	93,23	868,28
2	1 (46)	-1 (280)	-1 (280)	8,67	178,97	856,81
3	-1 (34)	1 (820)	-1 (280)	6,58	95,02	974,52
4	1 (46)	1 (820)	-1 (280)	8,76	147,83	950,94
5	-1 (34)	-1 (280)	1 (820)	8,33	109,73	954,05
6	1 (46)	-1 (280)	1 (820)	8,87	179,52	1077,39
7	-1 (34)	1 (820)	1 (820)	7,56	113,27	972,48
8	1 (46)	1 (820)	1 (820)	8,58	162,40	1179,68
9	-1,68 (30)	0 (550)	0 (550)	11,21	198,88	856,70
10	1,68 (50)	0 (550)	0 (550)	10,39	164,78	884,35
11	0 (40)	-1,68 (100)	0 (550)	9,76	177,71	950,85
12	0 (40)	1,68 (1000)	0 (550)	16,45	675,17	896,56
13	0 (40)	0 (550)	-1,68 (100)	14,31	477,12	903,79
14	0 (40)	0 (550)	1,68 (1000)	7,24	159,62	851,94
15	0 (40)	0 (550)	0 (550)	8,72	143,60	1084,67
16	0 (40)	0 (550)	0 (550)	9,09	147,31	1049,82
17	0 (40)	0 (550)	0 (550)	8,76	107,71	817,21
18	0 (40)	0 (550)	0 (550)	8,08	200,00	900,00

TH: taninos hidrolisáveis; TC: taninos condensados; Pi: fósforo inorgânico.
* Resultados expressos em mg/100g de sorgo.

Nas Tabelas 14, 15 e 16 pode-se observar os efeitos que os parâmetros exerceram nas respostas taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico.

Tabela 14. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase e tanase nos taninos hidrolisáveis (p< 0,1)

	Efeito	Erro puro	t(3)	p-valor
Média	**8,84**	**0,21**	**42,09**	**0,00**
Temperatura (L)	**0,56**	**0,23**	**2,45**	**0,09**
Temperatura (Q)	-0,08	0,24	-0,33	0,76
Tanase (L)	**1,42**	**0,23**	**6,22**	**0,01**
Tanase (Q)	**1,55**	**0,24**	**6,55**	**0,01**
Fitase (L)	**-1,43**	**0,23**	**-6,27**	**0,01**
Fitase (Q)	-0,09	0,24	-0,40	0,72
Interação temperatura (L) e tanase (L)	0,29	0,30	0,99	0,40
Interação temperatura (L) e fitase (L)	-0,53	0,30	-1,77	0,18
Interação tanase (L) e fitase (L)	-0,13	0,30	-0,45	0,68

R^2 = 23%

Tabela 15. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase e tanase nos taninos condensados (p< 0,1)

	Efeito	Erro puro	T(3)	p-valor
Média	**158,54**	**18,98**	**8,35**	**0,00**
Temperatura (L)	29,31	20,57	1,42	0,25
Temperatura (Q)	**-56,73**	**21,38**	**-2,65**	**0,08**
Tanase (L)	**116,23**	**20,57**	**5,65**	**0,01**
Tanse (Q)	**116,23**	**21,38**	**5,44**	**0,01**
Fitase (L)	**-70,89**	**20,57**	**-3,45**	**0,04**
Fitase (Q)	39,82	21,38	1,86	0,16
Interação temperatura (L) e tanase (L)	-13,40	26,88	-0,50	0,65
Interação temperatura (L) e fitase (L)	-4,91	26,88	-0,18	0,87
Interação tanase (L) e fitase (L)	3,94	26,88	0,15	0,89

R^2 = 37%

Tabela 16. Efeitos das variáveis temperatura, concentração de fitase e tanase no fósforo inorgânico (p< 0,1)

	Efeito	Erro puro	t(3)	p-valor
Média	**1028,92**	**20,64**	**49,84**	**0,00**
Temperatura (L)	50,08	22,38	2,24	0,11
Temperatura (Q)	**-73,22**	**23,25**	**-3,15**	**0,05**
Tanase (L)	33,65	22,38	1,50	0,23
Tanse (Q)	-35,62	23,25	-1,53	0,22
Fitase (L)	**65,29**	**22,38**	**2,92**	**0,06**
Fitase (Q)	**-68,03**	**23,25**	**-2,93**	**0,06**
Interação temperatura (L) e tanase (L)	17,93	29,24	0,61	0,58
Interação temperatura (L) e fitase (L)	**91,40**	**29,24**	**3,13**	**0,05**
Interação tanase (L) e fitase (L)	-19,91	29,24	-0,68	0,54

R^2 = 50 %

Para os três parâmetros avaliados, TH, TC e Pi o coeficiente de correlação ou variação explicada pelo modelo (R^2) foi de 23, 37 e 50%, valores abaixo do aceitável (em torno de 75%), para afirmar com segurança que as variáveis em estudo realmente exerceram este efeito sobe os parâmetros estudados. Como o R^2 foi abaixo do aceitável o coeficientes de regressão e análise de variância não puderam ser obtidos. Provavelmente outros parâmetros que não estão sendo controlados estão influenciando a concentração de taninos e fósforo no meio, como demonstra os dados obtidos para o ensaio controle, no qual o tratamento físico (maceração e fervura) tiveram o mesmo efeito que a adição de tanase, na concentração de taninos. Estudos anteriores relataram a diminuição de taninos por meio da hidratação (MAHMOOD *et al.,* 2006), fervura (RAKIC *et al.,* 2007; XU e CHANG, 2008), malteação (MAHGOUB e ELHAG, 1998) e o processo de secagem (FRONTELA *et al.,* 2008).

Quando compara-se a composição de taninos e Pi no sorgo após tratamento e no sorgo cru percebe-se que, o tratamento foi efetivo na redução dos taninos hidrolisáveis e condensados, sendo que esta redução variou de 82 – 92 e 90 - 98%, respectivamente. O fósforo inorgânico teve aumento bem significativo em todos os ensaios do planejamento, este aumento foi de 260 à 420%. Contudo, as diferentes concentrações das enzimas tanase

e fitase, não tiveram efeito na diminuição de taninos hidrolisáveis e taninos condensados e no aumento do fósforo inorgânico, isso significa que, tanto na menor como na maior concentração das enzimas estudadas as respostas foram similares.

Baseando-se nos dados obtidos o tratamento da ração para o ensaio *in vivo* será feito empregando-se a menor concentração das enzimas estudada (100U/Kg de farinha de sorgo).

5.7 Ensaio biológico

5.7.1 Dietas

Na Tabela 17 encontra-se a composição centesimal das matérias primas caseína, sorgo e sorgo tratado e das dietas elaboradas com as respectivas fontes energéticas. As dietas foram elaboradas conforme o American Intitute of Nutrition (AIN 93(G)) (REEVES *et al.,* 1993), na Tabela 18 estão demonstradas as dietas formuladas. Nas dietas sorgo cru (SC) e sorgo tratado (ST) a fonte protéica foi a farinha de sorgo, estas dietas não foram adicionadas de mix mineral, pois, a absorção de minerais da dieta foi avaliada.

Na Tabela 19 encontram-se os resultados da ingestão total, digestibilidade aparente de proteína e fósforo e a excreção diária de fósforo pelos animais.

Tabela 17. Composição centesimal das matérias primas e das rações formuladas.

Alimento	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
Matéria prima				
Caseína	84,24 ± 1,4	2,83 ± 0,19	1,98 ± 1,66	10,41 ± 0,01
Sorgo	12,33 ± 0,92	3,77 ± 0,36	1,54 ± 0,02	9,6 ± 0,09
Sorgo tratado	12,29 ± 0,79	5,01 ± 2,29	1,33 ± 0,28	0,65 ± 0,39
Dietas				
CA	12,58 ± 0,06	7,51 ± 0,52	2,49 ± 0,05	7,9 ± 0,09
SC	11,44 ± 0,41	6,88 ± 0,64	1,62 ± 0,08	10,12 ± 0,35
ST	12,49 ± 0,20	6,48 ± 0,58	1,57 ± 1,42	7,03 ± 0,16

*As determinações foram feitas em triplicata e estão seguidas do respectivo desvio padrão. CA - dieta caseína; SC – dieta sorgo cru; ST – dieta sorgo tratado.

Tabela 18. Composição das dietas para o ensaio biológico

Ingredientes (g/Kg)	*Ração caseína*	*Ração sorgo*	*Ração sorgo tratado*
Sorgo	-	951,3	-
Sorgo tratado	-	-	963,4
Caseína	120	-	-
Amido	477	-	-
Dextrose	132	-	-
Sacarose	100	-	-
Lipídeos	70	33,2	21,1
Fibra	50	-	-
Mix mineral	35	-	-
Mix vitamínico	10	10	10
L-cistina	3	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Tercbutilhidroquinona	0,014	0,014	0,014

- este ingrediente não fez parte da dieta.

* mix mineral (g/Kg): carbonato de cálcio (357), fosfato de potássio monobásico (196), citrato de potássio (70,78), cloreto de sódio (74), sulfato de potássio (46,6), óxido de magnésio (24), citrato férrico (6,06), carbonato de zinco (1,65), carbonato de magnésio (0,63), carbonato cúprico (0,30), iodeto de potássio (0,01), selenato de potássio (0,01), molibdato de amônio (0,0079), meta silicato de sódio (1,45), sulfato de cromo e potássio (0,275), Cloreto de lítio (0,017), ácido bórico (0,08), fluoreto de sódio (0,06), carbonato de níquel (0,03), vanádio de amônio (0,0066) e sacarose (221).

** mix vitamínico (g/Kg): ácido nicotínico (3), ácido pantotênico (1,6), piridoxina (0,7), tiamina (0,6), riboflavina (0,6), ácido fólico (0,2), biotina (0,02), cianocobalamina – 0,1% em manitol (2,5), vitamina E – 500 U/g (15), vitamina A – 500000 U/g (0,8), vitamina D_3 – 400000 U/g (0,25), vitamina K (0,075) e sacarose (974,655).

Tabela 19. Ingestão total, digestibilidade aparente da proteína e fósforo, excreta diária de fósforo pelos animais

Grupos	Ingestão total	DA proteína (%)	DA fósforo (%)	Excreta diária de P (mg)
CA	358,76 ± 13,35 [a]	94,26 ± 1,23[a]	83,06 ± 4,52[a]	17,83 ± 5,27[b]
SC	180,91 ± 21,99 [b]	36,40 ± 10,42[b]	-65,11 ± 16,27[b]	28,92 ± 6,93[a]
ST	182,29 ± 15,67 [b]	42,49 ± 15,66[b]	77,90 ± 10,55[a]	8,12 ± 3,08[c]

Resultados obtidos da média dos 10 animais seguido pelo desvio padrão. Resultados na mesma coluna seguidos de letras distintas indicam diferença estatística ($p<0,1$) pelo teste Tukey.
DA: digestibilidade aparente; P: fósforo.

Os animais alimentados com as dietas compostas por sorgo cru (SC) e sorgo tratado (ST) enzimaticamente tiveram uma ingestão pequena, 181 e 182g, respectivamente, comparando com a dieta à base de caseína (CA) 359g. A pequena ingesta dos animais dos grupos SC e ST não forneceu energia suficiente para que houvesse crescimento destes animais, somente a manutenção do seu peso. Baixa ingestão de dietas baseadas em legumes estão associadas a presença de compostos como α-galactosídeos e taninos que não possuem boa palatabilidade, deficiência de aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas, causando desequilíbrios nutricionais (PORRES *et al.,* 2002). Outra hipótese é a falta de minerais, pois, as dietas não foram adicionadas de mix mineral. Os minerais são muito importantes no funcionamento do nosso organismo como, na bomba de sódio e potássio, transporte de oxigênio, catabolismo dos nutrientes (CHAMPE *et al.,* 2006).

Silva *et al.,* (2007) verificaram o efeito da adição de fitase (Natuphos – BASF) em diferentes concentrações 0, 400, 800, 1200 FTU/kg, em dieta à base de milho, farelo de soja e farelo de arroz desengordurado (FAD), e suplementadas com vitaminas e minerais para suínos em fase de crescimento. Os autores contataram que a adição de fitase a ração não teve efeito significativo no aumento de peso e no aumento da ingesta. O mesmo ocorreu para a determinação de cinzas no osso metacarpo destes animais.

A digestibilidade aparente de proteína bruta nos animais que receberam dieta ST foi maior do que a observada para o grupo alimentado com sorgo cru, porém, não há diferença estatística ($p<0,1$). Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados com animais de laboratório

empregando rações formuladas com sorgo constataram que as proteínas do sorgo possuem, geralmente, menor digestibilidade àquelas de outros cereais (DENDY, 1995). Urbano *et al* (2007b) verificaram aumento na ingestão diária, no ganho de peso e no quoeficiente de eficiência protéica (PER) após tratamento de ervilhas com a enzima tanase.

Dietas elaboradas com sorgo de alto e baixo tanino, 1,3 e 3,5%, respectivamente foram analisadas *in vivo* com ratos. Foi constatado que os animais que receberam dieta com alto teor de tanino resultaram em menor ganho de peso, menor conversão alimentar e diminuição na digestibilidade aparente de proteína e menor absorção de cálcio. A relação entre o peso do fígado e peso dos ratos alimentados com dieta contendo alto teor de tanino foi superior àqueles que consumiram dieta com baixo teor de tanino, o que indica que estes compostos podem ser tóxicos, os autores sugerem que exista um limite, acima do qual taninos tornam-se tóxicos (EL-MAMARY *et al.,* 2001).

Mahmood *et al.,* (2008) estudaram o efeito do tratamento químico com água, com ácido acético e carbonato de sódio em sementes de *Shorea robusta* nos taninos e inibidor de tripsina na dieta de frangos. Taninos foram reduzidos em 68, 83 e 51% após o tratamento com água destilada (pH 5,3), ácido acético (0,67M) e carbonato de sódio (0,67M), respectivamente, por 12 horas 37ºC. Inibidor de tripsina teve redução média de 80 - 84%. O ensaio biológico com frangos mostrou que o tratamento das sementes com água e carbonato de sódio resultaram em maior atividade de enzimas digestivas, maior ingestão e uma melhora na conversão alimentar.

A digestibilidade aparente de fósforo para o grupo ST foi de 77% e não difere estatisticamente ($p<0,1$) do grupo CA (83%), que teve a dieta enriquecida com fosfato de potássio monobásico (0,68%) conforme AIN-93(G) (REEVES *et al.,* 1993). Pode-se dizer que a farinha de sorgo tratada previamente com tanase e fitase resultou em uma absorção de fósforo similar a uma dieta enriquecida com fosfato mineral. Guggenbuhl *et al.,* (2007) obtiveram digestibilidade aparente média de fósforo de 46% em dietas para suínos enriquecidas com fitase.

Esta diferença na digestibilidade aparente de fósforo entre os experimentos pode estar relacionada com a forma de aplicação das enzimas, em nosso estudo o sorgo passou por um tratamento prévio à elaboração da dieta. No estudo de Guggenbuhl *et al.,* (2007), como na grande maioria dos outros, a fitase foi adicionada à ração somente no momento em que esta foi disponibilizada para os animais, portanto, agiu somente quando chegou no trato gastrointestinal, o que pode dificultar seu desempenho devido as condições adversas como, pH baixo, baixa concentração de água, não estar nas condições ótima de temperatura, contato com outras enzimas como, proteases. Sendo assim, sugere-se o tratamento do alimento previamente a sua ingestão, uma boa alternativa pode ser o tratamento da dieta nas próprias indústrias que elaboram alimentos para animais, antes mesmo deste chegar ao produtor rural.

Moreira e*t al.,* (2003) verificaram o efeito da adição de fitase em ração para suínos na digestibilidade e excreção de fósforo, os autores constataram que a adição de fitase à dieta pode substituir o fósforo adicionado, pois não encontraram diferença significativa ($p<0,5$) comparando a dieta controle (adicionada de fosfato bicálcico) com a dieta sem fósforo adicionada de fitase.

O sorgo cru apresentou uma digestibilidade aparente de fósforo negativa (-65%), isso quer dizer que o animal excretou uma quantidade maior de fósforo do que aquela ingerida. Provavelmente este aumento na excreção de fósforo esteja relacionado com a hidrólise do fitato, liberando fósforo no meio, e em função de baixa absorção este foi excretado, indicando digestibilidade negativa. Segundo Taylor (1974), a passagem do fósforo pela parede intestinal é dependente da presença de sódio, como as dietas SC e ST não foram adicionadas de mix mineral, é provável que a falta destes minerais tenha interferido na absorção de fósforo.

Gonçalves *et al.,* (2005) constataram digestibilidade negativa para o mineral zinco em dietas controle (sem adição de fitase) para peixes, elaboradas com sorgo, farelo de arroz, farelo de soja extrusado e glúten de milho de -390, -106, -21 e -98%, respectivamente. Os autores sugerem que parte deste mineral é mobilizada das reservas

orgânicas e/ou água. Miranda (2000) verificou valores negativos para a digestibilidade de fósforo quando utilizou ração purificada para peixes. Urbano *et al.,* (2007a) estudaram a digestibilidade aparente de ferro em ervilha crua, germinada e germinada e adicionada de fitase, ficou constatado digestibilidade aparente de ferro de 2,9, 7,6 e 37,7%. Os autores sugerem que esta baixa absorção de ferro seja devido a presença de inibidores como, fitato, tanino, oxaloacetato ou compostos capazes de se ligarem a minerais, ou ainda devido a perdas endógenas de ferro do trato gastrointestinal causadas pela dieta a base de lentilha.

Comparando a excreta diária de P entre os grupos percebe-se que os resultados diferem estatisticamente ($p<0,1$) e que a excreção de P decresceu na seguinte ordem SC > CA > ST. Este dado confirma o efeito positivo das enzimas na diminuição da excreta de fósforo.

Esse resultado é importante do ponto de vista ambiental, uma vez que, comprovada a efetividade das enzimas em hidrolisar fitato liberando P e a sua digestibilidade, pode-se diminuir ou até mesmo suprimir a adição de fósforo oriundo de minérios nas dietas animais.

Porres *et al.,* (2008) observaram maior excreção de P após aplicar fitase a uma dieta à base de tremoço para ratos. A excreção diária de P para o grupo controle (dieta a base de caseína), tremoço cru e tremoço adicionado de fitase foi de 11, 10,6 e 14,4 (mg/dia), respectivamente.

Na Tabela 20 estão descritos os resultados para as determinações bioquímicas, glicose, colesterol, triacilglicerol, aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e uréia. A Tabela 21 demonstra os resultados obtidos para os minerais cálcio, fósforo e ferro no soro e cinzas no fêmur.

Tabela 20 Determinações bioquímicas no plasma dos animais em estudo

Grupos	Glicose*	Colesterol*	Triacilglicerol*	AST (U/L)	ALT (U/L)	Uréia*
CA	$41,92 \pm 11,42^{a}$	$34,65 \pm 6,49^{c}$	$100,36 \pm 14,21^{a}$	$61,11 \pm 12,12^{c}$	$41,54 \pm 14,48^{b}$	$35,5 \pm 5,67^{a}$
SC	$18,68 \pm 5,57^{c}$	$101,13 \pm 15,93^{a}$	$45,46 \pm 3,35^{b}$	$134,62 \pm 10,00^{a}$	$67,75 \pm 14,05^{a}$	$31,5 \pm 4,66^{a}$
ST	$24,23 \pm 6,52^{b}$	$67,63 \pm 2,10^{b}$	$47,80 \pm 14,72^{b}$	$79,94 \pm 7,95^{b}$	$53,22 \pm 12,70^{ab}$	$31,6 \pm 7,95^{a}$

Resultados obtidos da média dos 10 animais seguido pelo desvio padrão. Resultados na mesma coluna seguidos de letras distintas indicam diferença estatística ($p<0,1$) pelo teste Tukey.

* Resultados expressos em mg/dL. AST

Tabela 21. Concentração de minerais cálcio, fósforo e ferro no plasma e cinzas no fêmur dos animais em estudo

Grupos	Cálcio*	Fósforo*	Ferro**	Cinzas fêmur (%)
CA	$6,57 \pm 0,87^{a}$	$7,7 \pm 0,83^{a}$	$31,61 \pm 9,24^{b}$	$51,38 \pm 1,34^{a}$
SC	$6,18 \pm 1,14^{ac}$	$7,74 \pm 0,93^{a}$	$67,75 \pm 10,09^{a}$	$30,76 \pm 2,15^{b}$
ST	$5,78 \pm 0,76^{bc}$	$7,19 \pm 0,79^{a}$	$53,22 \pm 12,56^{a}$	$30,07 \pm 1,97^{b}$

Resultados obtidos da média dos 10 animais seguido pelo desvio padrão. Resultados na mesma coluna seguidos de letras distintas indicam diferença estatística ($p<0,1$) pelo teste Tukey.

* Resultados expressos em mg/dL.

** Resultados expressos em µg/dL.

Quanto à glicose, constatou-se que o grupo alimentado com o sorgo tratado enzimaticamente apresentou uma concentração plasmática significativamente ($p<0,1$) maior do que os animais alimentados com sorgo cru e menor que os animais alimentados com dieta caseína. Possivelmente esta maior concentração de glicose plasmática está relacionada com uma maior digestibilidade do nutrientes de uma forma em geral. Conforme Dendy (1995), a digestibilidade do amido é diminuída em sorgo que contém tanino.

O colesterol é significativamente maior ($p<0,1$) para o grupo SC comparando com o grupo ST. As dietas a base de sorgo apresentam valores significativamente maiores do que a dieta padrão, à base de caseína. Este aumento plasmático de colesterol pode ser devido a alterações metabólica na síntese de colesterol no organismo (CHAMPE, 2006), provavelmente este aumento está relacionado com a baixa qualidade da dieta à base de sorgo. Porém, por meio das avaliações feitas neste estudo não é possível afirmar qual a causa deste aumento no colesterol.

Os triacilgliceróis (TAG) não diferiram estatisticamente ($p<0,1$) entre os grupos SC e ST, contudo há uma diminuição de 100% destes comparados com o grupo que recebeu dieta a base de caseína.

Em relação às enzimas hepáticas AST e ALT percebe-se que o grupo SC apresenta uma quantidade estatisticamente ($p<0,1$) maior destas enzimas em relação ao grupo ST, o que provavelmente está relacionado com algum distúrbio hepático causado por compostos antinutricionais contido no sorgo.

Aletor e Fetuga (1984, 1989) afirmaram que o aumento da atividades das enzimas AST e ALT está relacionado com o aumento do catabolismo de aminoácidos. Aning *et al.,* (1998) relataram o aumento progressivo da enzima ALT em dieta elaborada com concentrações progressivas de um subproduto de sorgo malteado para ratos, segundo os autores este aumento na ALT provavelmente está relacionado com o aumento na quantidade de cianeto na dieta.

Adebiyi *et al.,* (2008) elaboraram dietas a base de sorgo tratado com amilase de *Rizophus* sp., sorgo sem tratamento e dieta comercial e alimentaram ratos durante 30 dias. Os autores constataram que o sorgo tratado enzimaticamente resultou em maior ganho de peso dos animais, e melhora nas respostas hematológicas. Contudo, os animais que receberam as dietas contendo sorgo e sorgo tratado com amilase demonstraram alterações no rim e fígado.

Os níveis plasmáticos de uréia foram bem similares, não há diferença estatística ($p<0,1$) para os três grupos avaliados, CA, S e ST, o que demonstra haver um metabolismo similar de proteínas.

A Tabela 21 indica que tanto o sorgo que passou por tratamento enzimático, quanto o cru possuem níveis plasmáticos similares de cálcio, fósforo e ferro, o mesmo ocorre para o teor de cinzas no fêmur. Este resultado está de acordo com estudo feito por Almeida *et al.,* (2007) no qual a adição de fitase (500U/Kg) na dieta de suínos não teve efeito significativo na concentração de ferro sérico, comparando os grupos que tiveram adição de fitase a dieta com o grupo controle (adição de mix mineral e vitamínico).

Em relação ao fósforo plasmático não foi verificada diferença estatística ($p<0,1$) entre os 3 grupos experimentais. Em estudo feito adicionando diferentes níveis de fitase (253, 759, 1265 e 1748 UF/kg de ração) em dieta para suínos na fase de terminação, a concentração de P no plasma não foi afetada significativamente ($p<0,05$) (MOREIRA e*t al.,* 2003).

O ferro plasmático encontra-se em maior quantidade para o grupo alimentado com sorgo cru. Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, Porres *et al.,* (2008) verificaram redução na absorção de minerais (Mn, Fe, K e Zn) e aumento na excreta de fósforo em ratos alimentados com tremoço adicionado de fitase (NATUPHOS - 750 U/Kg de dieta) comparado com dieta a base de tremoço cru. Os autores justificam essa diminuição de minerais devido ao incremento de fosfato após a ação da fitase sobre o ácido

fítico, devido a habilidade que o fosfato possui de ligar-se a cátion divalentes formando complexos insolúveis e a presença de fibras.

Radhakrishnan e Sivaprasad (1980) conduziram um experimento *in vivo,* com o objetivo de verificar a influência que o tanino e o fitato exercem na absorção de ferro. O estudo foi feito com 12 mulheres normais sadias e 13 anêmicas, estas formaram 3 grupos: 1) pessoas normais consumindo dieta com baixo e alto teor de tanino; 2) pessoas anêmicas consumindo dieta com baixo e alto teor de tanino e 3) pessoas anêmicas consumindo dieta com alto e baixo teor de tanino e com concentrações iguais de fitato. Dieta com baixo e alto teor de tanino, 20 e 136 mg/ 100g, respectivamente. Os resultados encontrados demonstram que a quantidade de tanino na dieta só teve ação expressiva no grupo 2, experimento conduzido com pessoas anêmicas, sendo que na dieta com baixo tanino a absorção de ferro foi de 11,49% e com alto tanino foi de 6,29%. Contudo, quando o mesmo experimento foi feito com o ajuste no teor de fitato nas dietas a absorção de ferro foi quase a mesma, 3,95% para dieta com baixo tanino e 3,10% dieta com alto teor de tanino.

A baixa qualidade nutricional de farinha de sorgo está associada com a deficiência de alguns aminoácidos essenciais como, metionina, isoleucina e leucina (NEUCERE, SUMRELL, 1980), baixa biodisponibilidade do amido (DENDY, 1995) e presença de fatores antinutriconais como taninos e fitatos (PRICE *et al.,* 1978).

Pelas determinações efetuadas pode-se dizer que o tratamento do sorgo previamente a formulação da ração melhorou significativamente a digestibilidade de fósforo, diminuiu a excreta fósforo, teve melhores resultados para a glicose, colesterol e enzimas AST e ALT plasmático, comparado com sorgo sem tratamento. Contudo, a digestibilidade aparente de proteína, fósforo, ferro e cálcio plasmático, cinzas no fêmur não foram afetados pelo tratamento enzimático.

6 CONCLUSÕES

O extrato enzimático bruto e liofilizado produzido pelo fungo *Paecilomyces variotti* possui majoritariamente atividade enzimática de tanase 626U/g. Além de tanase constatou-se a presença de outras enzimas, em concentrações inferiores, como protease, carboximetilcelulase, polimetilgalacturonase e fitase.

A otimização da extração dos compostos fenólicos de sorgo indicou o solvente metanol, dentre os solventes testados como melhor extrator após permanecer 2 horas sob agitação a 150 rpm a temperatura ambiente (aproximadamente 25 ºC).

O sorgo empregado neste estudo foi constituído por 13,6% de proteína, 4,2% de lipídeos, 1,7% de cinzas e 80,5% de carboidratos. A constituição de compostos fenólicos demonstrou que este cereal possui 809, 722, 6730 e 226 mg/100 g de sorgo para fenóis totais, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fósforo inorgânico.

A farinha de sorgo foi tratada com *Paecilomyces variotti,* tanase e fitase em distintas combinações. O efeito destes fatores sobre os compostos fenólicos e fósforo foi avaliada e os melhores resultados foram encontrados quando a farinha de sorgo foi tratada com tanase e fitase.

A cinética do tratamento de sorgo com fitase e tanase indicou para fósforo inorgânico melhores resultados após 24 horas, já para taninos hidrolisáveis constatou-se que o processamento (maceração e fervura) similar ao tratamento enzimático, contudo, não foi avaliado as características de funcionalidade após ambos os tratamentos.

A otimização do tratamento de sorgo com as enzimas fitase e tanase resultou em uma diminuição significativa nos taninos hidrolisáveis e condensados e no aumento de Pi. Contudo, para taninos hidrolisáveis contatou-se que o processamento (maceração e fervura) foi efetivo na diminuição de taninos hidrolisáveis e condensados, de modo que no

tratamento com tanase os resultados obtidos foram bem similares. A otimização indicou que a relação entre sorgo:água, foi a variável mais significativa para o processo. As diferentes concentrações das enzimas não resultaram em dados distintos para os parâmetros avaliados, isso significa que, tanto na menor como na maior concentração das enzimas as respostas foram similares. Sendo assim, empregou-se a menor concentração enzimática estudada (100 U/Kg).

O ensaio biológico com ratos Wistar demonstrou que a dieta elaborada com sorgo tratado previamente com tanase e fitase foi efetiva na melhoria da digestibilidade aparente de fósforo, na diminuição da excreção de fósforo, resultaram em melhores índice bioquímico para a glicose e colesterol, apresentaram uma menor atividade de enzimas hepáticas AST e ALT, que estão relacionadas com o metabolismo de proteínas e seu aumento está relacionado com alterações hepáticas. Porém, não teve efeito na digestibilidade aparente de proteína, na concentração plasmática de fósforo, ferro e cálcio e nos minerais contidos no fêmur.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Quanto aos compostos fenólicos estudados sugere-se o emprego de métodos mais específicos como, HPLC acoplado a um detector de massas a fim de identificar e quantificar estes compostos presentes no sorgo cru e após o tratamento.

Estudo mais aprofundado da biodegradação dos taninos pela tanase e através do fungo *Paecilomyces variotti* por meio de cinética de reação poderiam auxiliar no esclarecimento da rota bioquímica da degradação de taninos. Com enfoque especial nos taninos condensados.

Fazer um comparativo entre o tratamento físico e tratamento enzimático na farinha de sorgo quanto as propriedades de funcionalidade como, atividade antioxidante.

Realizar ensaio biológico empregando as enzimas tanase e fitase separadamente e em conjunto a fim de avaliar o efeito das enzimas individualmente e verificar se há sinergismo na ação destas.

Estudar *in vivo* consórcio de sorgo com outros cereais como, soja, milho, cevada, centeio. Também o emprego de outras cultivares de sorgo como, granífero e forrageiro.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBIYI, A.O.; OLAPIDO, I.C.; AYANDELE, A.A.; ADEBIYI, A.P.; ADELOWO, O.O. Biological studies on albino rats fed with *Sorghum bicolor* starch hydrolyzed with α-amilase from *Rhizopus* sp. **African Journal of Biotechnology,** v.7, n.12, p.1999-2005, 2008.

AERTS, R.J.; BARRY, T.N.; McNABB,W.C. Pholyphenols and agriculture: beneficial of proanthocyanidins in forages. **Agriculture Ecosystem and Environment,** v.75, p.1-12, 1999.

AGUILAR, C.N.; AUGUS, C.; GONZÁLEZ, G.V.; FAVELA, E. A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. **Brazilian Archives of Biology and Techonology,** v.42, p.355-361, 1999.

AGUILAR, C.N.; GUTIÉRREZ-SANCHEZ, G. Review: Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science Technology International,** v.7, p.373-382, 2001.

ALETOR, V.A.; FETUGA,B.L. Effect of graded levels of raw lima bean in some liver enzyme activities in the rat. **Nutritional Rep. International,** v.29,n.3, p. 365-370, 1984.

ALETOR, V.A.; FETUGA,B.L. Dietary interactions of lima bean trypsin inhibitors, haemaglutinins and cyanide: I. Effect on growth, performance, nitrogen utilization and physiopathology in growing rats. **Journal Animal Phisiology and Animal Nutrition,** v.60, p. 113-122, 1989.

ALI, N.M.M; EL TINAY, A.H.; ELKHALIFA, A.E.; SALIH, O.A.; YOUSIF, N.E. Effect of alkaline pretreatment amd cooking on protein fractions of a high-tannin sorghum cultivar. **Food Chemitry,** v.114, p.649-651, 2009.

ALMEIDA, R.F.; LOPES, E.L; NUNES, R.C.; MATOS, M.P.C.; SOBESTIANSKY, J.; FIORAVANTI, M.C.S.; OLIVEIRA, A.P.A; RUFINO, L.M. Metabolismo de ferro em suínos recebendo dietas contendo fitase, níveis reduzidos de fósforo inorgânico e sem suplemento mineral e vitamínico. **Ciência Rural,** v.37, p.1097-1103, 2007.

ANDLID, T.A.; VEIDE, J.; SANDBERG, A.S. Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae.* **International Journal of Food Microbiology,** v.97, p.157-169, 2004.

ANING, K.G.; OLOGUN, A.G.; ONIFADE, A.; ALOKAN, J.A.; ADEKOLA, A.I.; ALETOR, V.A. Effect of replacing dried brewer's grain with 'sorghum rootlets' on growth, nutrient utilization and some blood constituents in the rat. **Animal Feed Science and Technology,** v.71, p.185-190, 1998.

ANTONY, U.; CHANDRA, T.S. Antinutrient reduction and enhacement in protein, starch, and mineral availability in fermented flour of finger millet (*Eleusine coracana).* **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.46, p.2578-2582, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC 10.ed. Washington, 1992. 1115 p.

BAJPAI, B.; PATIL, S. Induction of tannin acyl hidrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of *fungi imperfecti*. **Enzyme and Microbial Technology,** v.20, p.612-614, 1997.

BANERJEE, D.; KAR, B. Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology,** v.25, p.29-38, 2000.

BANERJEE, D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. **Journal of Basic Microbiology,** v.41, p.313-318, 2001.

BARBIKER, E.E. Digestibility of sorghum and faba beans cultivars by soaking in alkalies and water. **MSc. Thesis.** University of Khartoum, Faculty of Agriculture, Sudan, 1991.

BARBOSA, H.P.; MORAES, N.; FIALHO, E.T. Efeitos dos níveis de flúor provenientes dos fosfatos de Tapira e monocálcico no desempenho e característica do osso de suínos em crescimento e terminação. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.21, p.839-847, 1992.

BARRY, T.N., MANLEY, T.R., DUNCAN, S.J. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. **British Journal of Nutrition,** v.55, p.123–137, 1986.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A.; KATSUDA, L. M. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e nutrição***,* v.15, p.63-72, 2004.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A. Tannase production by *Paecilomyces variotii.* **Bioressource Technology**, v.98, p.1832-1837, 2007a.

BATTESTIN, V.; PINTO G.A.S.; MACEDO, G.A. Biochemical characterization of tannases from *paecilomyces variotii* and *aspergillus niger*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v.16, p.243-248, 2007b.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Partial purification and biochemical characterization of tannase from a newly isolated strain of Paecilomyces variotii. **Food Biotechnology**, v.21, p.207-216, 2007c.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A.; FREITAS, V.A.P. Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from Paecilomyces variotii. **Food Chemistry**, v.108, p.228-233, 2007d.

BEAUCHEMIN, K.A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D.P.; YANG, W.Z. Use of exogenous fibrolytic to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science,** v.81, p.37-47, 2003.

BEDFORD, M.R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology,** v.53, p.145-155, 1995.

BERGQVIST, S.W.; SANDBERG, A.S.; CARLSSON, N.G.; ANDLID, T. Improvement iron solubility in carrot juice fermented by homo- and hetero-fermentative lactic acid bacteria. **Food Microbiology,** v.22, p.53-61, 2005.

BHAT, K.T.; SINGH, B.; SHARMA, P. O. Microbial degradation of tannins – A current perspective. **Biodegradation,** v.9, p.343-357, 1998.

BISWAS, S.; MAITE, S.B.; CHAKRABARTI, S.; BISWAS, B.B. Purification and characterization of myoinositol hexaphosphate adenosine diphosphtate phosphotransferase from *Phaseolus aureus.* **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v.185, p.557-566, 1978.

BLIGH, E.G; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and** Physiology, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantifications of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitycal Biochemistry***,* v.72, p.248-254, 1976.

BREARLLEY, C.A.; HANKE, D.E. Metabolic evidence for the order of addition of individual phosphate esters to the *myo*-inositol moiety of inositol hexakisphosphate in the duckweed *Spirodela polyrhiza* L. **Biochemical Journal,** v.314, p.227-333, 1996.

BRUNE, M.; ROSSANDER, L.; HALLBERG, L. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. **European Journal of Clinical Nutrition,** v.43, p.547-557, 1989.

BRUNE, M.; HALLBERG, L.; SKANBERG, A. B. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. **Journal of Food Science***,* v.56, p.128–131, 1991.

BRUNE, M.; ROSSANDER-HULTHÉN, L.; HALLBERG, L.; GLEERUP, A.; SANDBERG, A.S. Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphate with different numbers of phosphate groups. **Journal of Nutrition,** v.122, p.442-449, 1992.

BUTOLO, J.E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas – SP: Ed. Oesp Gráfica S/A, 2002.

BOWLUS, C.L. The role of iron in T cell development and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v.2, n.2, p.73-78, 2003.

CAMMANN, J., DENZEL, K., SCHILLING, G., GROSS, G.G. Biosynthesis of gallotannins: b-glucogallin-dependent formation of 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose by enzymatic galloylation of 1,2,3,6-tetragalloylglucose. **Archivos Biochemistry and Biophysic**, v.73, p.58–63, 1989.

CAO, L.; WANG, W.; YANG, C.; YANG, Y.; DIANA, J.; YAKUPITIYAGE, A.; LUO, Z.; Li, D.,. Application of microbial phytase in fish feed. **Enzyme and Microbial Technology,** v.40, p.497-507, 2007.

CARNEIRO, A.C.O.; VITAL, B.R.; PIMENTA, A.S.; MORI, F.A .Reatividade dos taninos da casca de *Eucalyptus grandis* para produção de adesivos. **Cerne,** v.7, p.01-09, 2001.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A..; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada.** Artmed, São Paulo - SP, 2006.

CHEN, Z.-U., ZHU, Q. Y., TSANG, D.; HUANG, Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.477–482, 2001.

CHUBB, L.G. Ant nutritive factor in animal feedstuffs. In: HARESING, W. **Studies in the agricultural and food sciences butterworths: recent advances in animal nutrition**. New York: Elsevier, 1982.

CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; WEI, C.I.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannins human health: A review. **Critical Review in Food, Science and Nutritio,** v.38, p.421–434, 1998.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos, 2009. Disponível em: www.conab.gov.br. Acessado em 15 de abril de 2009.

CORREIA, I.; NUNES, A.; DUARTE, I.F.; BARROS, A.; DELGADILLO, I. Sorghum fermentation followed by spectroscopic techniques. **Food Chemistry,** v.90, p.853-859, 2005.

COWIESON, A.J.; SINGH, D.N.; ADEOLA, O. Prediction of ingredient quality and the effect of a combination of xylanase, amylase, protease and phytase in the diets of broiler chicks. 2 . Energy and nutrient utilization. **British Poultry Science,** v.47(4), p. 490-500, 2006.

CROMWELL, G.L.; STAHLY, T.S.; COFFEY, R.D. et al. Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorus in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs. **Journal of Animal Science,** v.71, p.1831-1840, 1993.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M.N.; ASHIHARA, H. **Plant Secondary Metabolites – Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Ed.: Blckwell, 2006.

DENDY, D.A.V. **Sorghum and millets:** chemistry and technology. St. Paul, 1995.

DESPHANDE, S.S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of foods products. **CRC Critical Reviews in Food Science on Nutrition**, v.24, p.401-449, 1986.

DREW, S.W.; DEMAIN, A.L. Effect of primary metabolites of secondary metabolism. **Annual Review of Microbiology,** v.31, p.343-356, 1977.

ELKHALIFA, A.E.O.; SCHIFFLER, B.; BERNHARDT, R. Effect of fermentation on the functional properties of sorghum flour. **Food Chemistry,** v.92, p.1-5, 2005.

EL-MAMARY, M.; AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-OBEIDI, A. *In vivo* effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzymes and mineral absorption. **Nutrtion Research,** v. 21, p.1393-1401, 2001.

EL TINAY, A.H.; ABDEL GADIR, M.A.; EL HIDI, M. Sorghum fermented Kisra bread. 1. The nutritive value of Kisra. **Journal of Science and Food Agriculture,** v.30, p.859–863, 1979.

EMBRAPA MILHO E SORGO. **Cultivo do sorgo.** Disponível em http://www.embrapa.gov.br. Acesso em 23 de março de 2007.

ENGELEN, A.J.; HEEFT, V.D.; RANSDORP, H.G.P.; SMIT, L.C.E. Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal of AOAC Intetnational.**, v.77, p.760-764, 1994.

FARIA, A. I. G. Propriedades antioxidants e biológicas de procianidinas oligoméricas. Caracterização antioxidante de pigmentos antociânicos. **Dissertação de mestrado.** Porto, Portugal, p.186. 2005.

FAO - Food and Agriculture Organization. Statistical databases/Agriculture/Agricultural production/Crops/Primary/Sorghum,2000. Disponível em: www.fao.org. Acessado em 15 de abril de 2009.

FENNEMA, O. R. **Química de los Alimentos.** 1. ed. Zaragoza – Espanha: Acribia, S. A., 1993. 1096p.

FERKET, P. Enzymes offer way to reduce waste, improve performance. **Feedstuffs**, v.22, p.30-34, 1996.

FIALHO, E.T., BARBOSA, H.P. **Alimentos alternativos para suínos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 228p.

FIALHO, E.A; LIMA, J.A.F.; OLIVEIRA, V.; SILVA, H.O. Substituição do milho pelo sorgo sem tanino em rações de leitões: digestibilidade dos nutrientes e desempenho animal. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.1, p.105-111, 2002.

FILHO, S.L.S.C. Efeito do teor de tanino do sorgo sobre a fermentação ruminal e parâmetros nutricionais de ovinos. **Tese de doutorado,** 88fls. Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear, Piracicaba, São Paulo, 2004.

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

FREITAS, V. A. P.; CARVALHO, E.; MATEUS, N. Study of carbohydrate influence on protein–tannin aggregation by nephelometry. **Food Chemistry**, v.81, p.503–509, 2003.

FRONTELA, C.; GARCÍA-ALONSO, F.J.; ROS, G.; MARTÍNEZ, C. Phytic acid and inositol phosphates in raw flours and infant cereals: the effect of processing. **Journal of Food Composition and Analysis,** v. 21, p.343-350, 2008.

FURLAN, A. C.; FRAIHA, M.; MURAKAMI, E. Utilização de complexo enzimático em dietas de frangos de corte com triticale. 1 – Ensaio de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.26, p.759-764, 1997.

GETACHEW, G. Tannins in tropical multipurpose tree species: localization and quantification of tannins using histochemical and approaches and the effects of tannins on *in vitro* rumen fermentation. **Dissertation (M.S.)** 186p. Universität Hohenheim – Stuttgart, 1999.

GOENA, M.; MARZO, F.; FERNÁNDEZ-GONZALES, L.; TOSAR, A.; FRÜHBECK, G.; SANTIDRIÁN, S. Effect of the raw legume *Vicia ervilia* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Revista Espanõla de Fisiologia,** n.45, p.55-60, 1989.

GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; KLEEMAN, G.K.; ROCHA, D.F. Efeitos da suplementação de fitase sobre a disponibilidade aparente de Mg, Ca, Zn, Cu, Mn e Fé em alimentos vegetais para Tilápia-do-Nilo. **Revista brasileira de zootecnica,** v.34, p.2155-2163, 2005.

GOMES, P.C.; LIMA, G.J.M.M.; GOMES, J.M.M. et al. Disponibilidade de fósforo nos fosfato de tapira, fosforíndus e na farinha de ossos para suínos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia,** v.21, p.83-89, 1992.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme prodution by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology,** v.144, p.1-22, 2008.

GRIFFITHS, D. W.; BIRCH, A. N. E.; HILLMAN, J. R. Antinutritional compounds in the *Brassicaceae*: analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.73, p.1-18, 1998.

GROSS, G.G. Partial purification and properties of UDPglucose: vanillate 1-O-glucosyl transferase from oak leaves. **Phytochemistry**, v.22, p.2179–2182, 1983.

GROSS, G.G., DENZEL, K. Biosynthesis of gallotannins. β-glucogallin-dependent galloylation of 1,6-digalloylglucose to 1,2,6-trigalloylglucose. **Z. Naturforsch**, v.46, p.389–394, 1991.

GUGGENBUHL, P.; QUINTANA, A.P.; NUNES, C.S. Comparative effects of three phytases on phosphorous and calcium digestibility in the growing pig. **Livestock science,** v.109, p.258-260, 2007.

HAGENAH, S.; GROSS, G.G. Biosynthesis of 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-β-d-glucose, **Phytochemistry,** v.32, p.637–641, 1993.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L.G. The specificity of proantocyanidin-protein interactions. **Journal Biological Chemistry,** v.256, p.4494-4497, 1981.

HARLAND, B.F.; OBERBAS, D. Anion exchange for determination of phytate in food: collaborative study. **Journal of Associantion off Analytical Chemistry,** v.69, n.7, p.667-670, 1986.

HASLAM, E. **Chemistry of vegetable tannins.** New York: Academic Press, p.179, 1966.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-215, 1996,

HASSAN, I.A.G., EL TINAY, A.H. Effect of fermentation on tannin content and in-vitro protein and starch digestibilities of two sorghum cultivars. **Food Chemistry,** v.53, p.149-151, 1995.

HENTZE, W.M. et al. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, Heidelberg, v.117, p.285-297, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

HOWSON, S.J., DAVIS, R.P.. Production of phytate-hydrolising enzyme by some fungi. **Enzyme Microbiology and Technology,** v.5, p.377-343, 1983.

HURRELL, R. F., REDDY, M. B., JUILLERAT, M.-A., COOK, J. D. Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. **American Journal of Clinical Nutrition***,* v.77, p.1213–1219, 2003.

INBORR, J, MEULEN, J. V. Residual activity of added enzymes in relation to fibre digestibility in the terminal ileum of growing pigs. in: WENK, C. and BOESSINGER, M. Enzymes in animal nutrition - 1 st symposium. **Proceedings...** Kartause Ittingen, Switzerland. p. 34-37, 1993.

KAYODÉ, A.P.P; HOUNHOUIGAN, J.D.; NOUT, M.J.R. Impact of brewing process operatin on phytate, phenolic compounds and in vitro solubility of iron and zinc in opaque sorghum beer. **LWT - Food Science and Technology,** v.40, 834-841, 2007a.

KAYODÉ, A.P.P.; LINNEMANN, A.R.; NOUT, M.J.R.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. Impact of sorghum processing on phytate, phenolic compounds, and *in vivo* solubility of iron and zinc in thick porridges. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** v.87, p.832-838, 2007b.

KAZANAS, N; FIELDS, M.L. Nutritional improvement of sorghumby fermentation. **Journal of food Science,** v.46, p.819-821, 1981.

KEMM, E.H., BRAND, T.S. Grain sorghun as energy source for growing pigs. **Pig News and Information**, London, v. 17, p. 87-89, 1996.

KEROVUO, J.; TYNKKYNEN, S. Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum 755.* **Letters Applied Microbiology,** v.30, p.325-329, 2000.

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

KUMAR, R.A., GUNASEKARAN, P., LAKSHMANAN, M. Biodegradation of tannic acid by *Citrobacter freundii* from a tannery effluent. **Journal of Basic Microbiology,** v.39, p.161–168, 1999.

LEI, X.G.; KU, P.K.; MILLER, E.R. et al. Suplementing cor-soybean meal diets with microbial phytase linearly improves phytase phosphorus utilization by weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.71, p.3359-3367, 1993.

LEI, X.G., PORRES, J.M. Phytase enzimology, applications and biotechnology. **Biotechnology Letters,** v.25, p.1787-1794, 2003.

LEINMÜLLER, E.; STEINGASS, H.; MENKE, K. Tannin in ruminant feedstuffs. **Animal Research and Development,** v.33, p.9-62, 1991.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannic acyl hydrolase: State of the art. **Advances in Applied Microbiology,** v.44, p.215-260, 1997.

LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. Myo-inositol metabolism in plants. **Plant Science,** v.150, n.1, p.1-19, 2000.

LOPEZ, H.W.; OUVRY, A.; BERVAS, E.; GUY, C.; MESSAGER, A.; DEMINGUE, C.; REMESY, C. Strains of lactic acid bactéria isolated from sour doughs degrade phytic acid and improve calcium and magnesium solubility from whole wheat flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.48, p.2281-2285, 2000.

LUCKNER, M. **Secondary metabolism in Plants and Animals**. Academic Press: New York, 1972.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M.; SATO, H.H.; PARK,Y.K. **Bioquímica Experimental de Alimentos**. Ed Varela. Campinas, 2005a.

MACEDO, G. A.; KATSUDA, L. M. ; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, p.833-838, 2005b.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M. Tanino no grão de sorgo. **Informe técnico - Embrapa Milho e Sorgo,** Minas Gerais, 2003.

MAHGOUB, S.E.O.; ELHAG, S.A. Effect of milling, soaking, malting, heat-treatment and fermentation on phytate level of flour Sudanese sorghum cultivars. **Food Chemistry,** v.61, p.77-80, 1998.

MAHMOOD, S.; KHAN, M.A.; SARWAR, M.; NISA, M. Chemical treatments to reduce antinutritional factors in Salseed (*Shorea robusta)* meal: effect on nutrient digestibility in colostomized hens and intact broilers. **Poultry Science,** v. 85, p.2207-2215, 2006.

MAHMOOD, S.; KHAN, M.A.; SARWAR, M.; NISA, M. Use of chemical to reduce antinutritional effects of tannins in salseed meal: effect on performance and digestive enzymes of brilers. **Livestock Science,** v.116, p.162-170, 2008.

MAJERUS, P.W.; CONNOLY, T.M.; BANSAL, V.S.; INHORN, R.C.; ROSS, T.S.; LIPS, D. Minireview inositol phosphates: synthesis and degradation. **Journal of Biological Chemistry,** v.263, n.12, p.3051-3054, 1988.

MALLIN, M.A. Impacts of industrial animal production on rivers and estuaries. **American Science,** v.88, p.26-37, 2000.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTOS. **AGRONEGÓCIO BRASILEIRO: uma oportunidade de investimentos.** Disponível em http://www.agricultura.gov.br. Acesso em 23 de março de 2007.

MATUSCHEK, E.; TOWO, E.; SVANBERG, U. Oxidation of polyphenols in phytate-reduced high-tannin cereals: effect on different phenolic groups and on in vitro accessible iron. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v.49, p.5630-5638, 2001.

MAYNARD, L.A.; LOOSLY, J.K.; HINTZ, H.F. **Nutrição animal.** 3 ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1984, 7436p.

MIRANDA, E.C. Disponibilidade de fósforo e sua relação com o cálcio em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis* niloticus). **Tese de doutorado.** Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2000.

MOELJOPAWIRO, S.; GORDON, D.T.; FIELDS, M.L. Bioavalability of iron in fermented soybeans. **Journal of Food and Science,** v.52, p.102-105, 1987.

MONDAL, K.C.; BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B.R. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hidrolase activity. **Analytical Biochemistry,** v.295, p.168-171, 2001.

MOREIRA, J.A.; VITTI, D.M.S.S.; LOPES, J.B.; NETO, M.A.T. Biodisponibilidade e perdas endógenas mínimas de P em dietas com níveis crescentes de fitase para suínos em crescimento pela técnica de diluição isotópica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, 2003.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.51, p.331-339, 2003.

NÄVERT, B.B.S.; CEDERBALD, A. Reduction of the phytate content of bran by leavening en bread and its effect on zinc absorption in man. **British Journal of Nutrition,** v.53, p.47-53, 1985.

NAWAL, M.M.A.; EL TINAY, A.H.; ELKHALIFA, A.E.O.; SALIH, O.A.; YOUSIF, N.E. Effect of alkaline pretreatment and cooking on protein fractions of a high-tannin sorghum cultivar. **Food Chemistry,** v.114, p.649-651, 2009.

NEUCERE, J.N.; SUMRELL, G. Chemical composition of different varieties of grain sorghum. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.28, p.19-21, 1980.

NELSON, K.E.; PELL, A.N.; SCHOFIELD, P.; ZINDER, S. Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolysable tannins. **Applied and Environmental Microbiology,** v.61, p.3293-3298, 1995.

NIEMETZ, R.; GROSS, G.G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis, **Phytochemistry,** v.66, p. 2001–2011, 2005.

OKOH, P.N.; OBILANA, A.T.; NJOKU, P.C.; ADUKU, A.0. **Animal Feed Science Technology,** v.7, p.359, 1982.

OSAWA, R.; KUROISO, K.; GOTO, S.; SHIMIZU, A. Isolation of tannin-degrading lactobacilli from human and fermented foods. **Applied and Environmental Microbiology,** v.66, p.3093–3097, 2000.

PANDEY, A., SZKACKS, G., SOCCOL, C. R., RODRIGUEZ-LEON, J. A., SOCCOL, V. T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Biorescources Technology***,* v.77, p.203-214, 2001.

PATEL, T.R.; HAMEED, N.; MARTIN, A.M. Initial steps of phloroglucinol metabolism in *Penicillium simplicissimum.* **Archivos Microbiology**. 153,438-443, 1990.

PINTO, G. A. S. Produção de Tanase por Aspergillus niger – Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. **Tese de Doutorado**, p.213, 2003.

PORRES, J.M.; LOPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P.; URBANO, G. Effect of heat treatment and mineral and vitamin supplementation on the nutritive use of protein and calcium from Lentils (Lens culinaris M.) in growing rats. **Nutrition,** v.19, n.5, p.451– 456, 2003.

PORRES, J.M.; ARANDA, P.; LÓPEZ-JURADO, M.; URBANO, G. Effect of hydroalcolic α-galactoside extraction and phytase supplementation on the nutritive

utilisation of manganese, iron, zinc and potassium from lupin (*Lupins albuns* var. *multolupa*)-based diets in growing rats. **Food Chemistry,** v.109, p.554-563, 2008.

PRICE, M. L.; VAN SCOYOC, S.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.26, p.1214–1218, 1978.

POULSEN, H.D.; BLAABJERG K.; FEUERSTEIN, D. Comparison of different levels and sources of microbial phytases. **Livestock science,** v.109, p.255-257, 2007.

RABOY, V.; NOAMAN, M.M.; TAYLOR, G.A.; PICKETT, S.G. Grain phytic acid and protein are higly correlated in winter wheat. **Crop science,** v.1, n.7, p.631-635, 1991.

RABOY, V. The biochemistry and genetics of phytic acid synthesis in higher plants. **In:** MORRE, E.J.; BOSS, W.S.; LOEWUS, F.A. **Inositol metabolism in plants.** New York: John Wiley e Sons, v.1, p.55-76, 1990.

RADHAKRISHNAN, M.R.; SIVAPRASAD, J. Tannin contento f sorghum varieties ans their role in iron bioavailability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.28, p.55-57, 1980.

RAKIC, S., PETROVIC, S., KUKIC, J., JADRANIN, M., TESEVIC, V., POVRENOVIC, D., SILER-MARINKOVIC, S. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. **Food Chemistry,** v.104, p.830-834, 2007.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.597-635, 1998.

REDDY, N.R.; PIERSON, M.D. Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. **Food Research International,** v.27, p.281-290, 1994.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr. G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition,** v.123, p.1939-1951, 1993.

REINEFELD, E., AHRENS, D. Der Einfluss der Konfiguration auf die partielle Verestererung von D-Glucopyranosiden. **Liebigs Ann. Chem**, v.747, p.39–44, 1971. In: NIEMETZ, R.; GROSS, G. Enzimoly ...

REVISTA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Sindicato Nacional da Indústria Alimentação Animal – SINDIRAÇÕES**, Número 19, 2003.

RIZZATTO, M.L. Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* e *Aspergillus niger* por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado. **Tese de doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1999.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos – uma estratégia seqüencial de planejamentos. Ed: Casa do Pão, São Paulo – SP, 2005.

RODRIGUES, N. M.; GONÇALVES, N. F. S. Silagem de sorgo de porte baixo com diferentes teores de tanino e de umidade no colmo. I - pH e teores de matéria seca, e ácidos graxos durante a fermentação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.51, p.485-490, 1999.

RODRÍGUEZ, H., LANDETE, J.M., RIVAS, B.; MUÑOZ, R. Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748^{T}. **Food Chemistryu,** v.107, p.1393-1398, 2008.

ROTTER, B. A. The future of crude enzyme supplements in pig nutrition. **Pig News Information**. v. 11, p. 15-17, 1990.

RUNHO, R.C.; GOMES, P.C.; ROSTANGO, H.S.; ALBINO, L.F.; LOPES, P.S.; POZZA, P.C. Exigência de fósforo disponível para frangos de corte machos e fêmeas de 1 e 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.30, n.1, p.187-196, 2001.

SALUNKHE, D.K.; CHAVAN, J.K; KADAN, S.S. **Dietary tannins: consequences and remedies.** Boca Raton: CRC Press, 1990. 200p.

SANDBERG, A.S.; SVANBERG, U. Phytate hydrolysis by phytase in cereals: effects on in vitro estimation of iron availability. **Journal of Food Science**, v.56, p.1330–1333, 1991.

SANDBERG, A.S.; ANDLID, T. Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. **International Journal of Food and Technology,** v.37, p.823-833, 2002.

SANTOS, M.S.V.; ESPÍNDOLA, G.B.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R.; CARVALHO, L.E. Utilização de complexo enzimático em dietas à base de sorgo-soja para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.35, n.3, p.811-817, 2006.

SCALBERT, A. Antimicrobial proprieties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991.

SCHEUERMANN, N.G. **Utilização do sorgo em rações para frangos de corte**, Concordia: EMBRAPA-CNPSA. EMBRAPA - CNPSA COMUNICADO TÉCNICO, 1998.

SCHMIDT, S.W., DENZEL, K., SCHILLING, G., GROSS, G.G. Enzymatic synthesis of 1,6-digalloylglucose from β-glucogallin by β-glucogallin: β-glucogallin 6-O-galloyltransferase from oak leaves. **Z. Naturforsch**, v.42, p.87–92, 1987.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science Technology,** v.135, p.1-41, 2006.

SGARBIERI, V.C. **Alimentos e nutrição:** fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed UNICAMP, 1987.

SHARMA, S.; AGARWAL, L.; SAXENA, R.K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable.* **BiorescourceTechnology,** v.99, p.2544-2551, 2008.

SHIMIZU, M., 1992. Purification and characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry,** v.56, p.1266-1269, 1992.

SHIRAI, K.; REVAH M.S.; GARCIA G.M.; MARSHALL, V.M. Ability of some strains of lactic acid bacteria to degrade phytic acid. **Letters Applied Microbiology,** v.19, 366-369, 1995.

SILVA, H.O.; FIALHO, E.T.; SCHOULTEN, N.A.; SANTOS, W.G. Fitase em rações para suínos em crescimento: desempenho e teor de minerais nos ossos. **Tecnologia e Desenvolvimento Susutentável,** 2007.

SIMONS, P.C.M.; VERSTEEGH, H.A.J.; JONGBLOED, A.W.; KEMME, P.A.; SLUMP, P.; BOSS, K.D.; WOLTERS, G.E.; BEUDEKER, R.F.; VERSCHOOR, G.J. Improvement of phosphorous availability by microbial phytase in broiler and pigs. **British Journal of Nutrition,** v.64, p.525-540, 1990.

SINGH V.P.;STAPLETON, R.D. Biotransformations: bioremediation technology for heaalth and environmental protection. Ed. Elsevier: The netherlands, 2002.

SINGLETON, V.L.; ROSSI.J.A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture***,* v.16, p.144-158, 1965.

SOMOGYI, M.A. – A new reagent for the determination of sugars, **Journal of Biology and Chemistry**, v.160, p.61-68, 1945.

SOUZA, C.M.M.C.A. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos da regulação da biossíntese do ácido fítico em grãos em grãos de dois genótipos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

Piracicaba, 142p. 2003. **Tese de doutorado –** Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

SUN, B.; SILVA, J.M.R.; SPRANGER, I. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.46*,* p.4267-4274, 1998.

SVANBERG, U., LORRI, W.; SANDERG, A. S. Lactic fermentation of non-tannin and high-tannin cereals: effects on in vitro estimation of iron availability and phytate hydrolysis. **Journal of Food Science,** v.58, p.408-412, 1993.

TAIZ L.; ZEIGER E. **Plant Physiology,** 3rd. edition, Sinauer Assoc. Inc. Publ., Sunderland, Mass. p.690, 2002.

TAYLOR, A.N. In vitro phosphate transport in chickileum: effect of cholecalciferol, calcium, sodium, and metabolite inhibitors. **Journal of Nutrition, v.**104: 489-494, 1974.

TEIXEIRA, A.O.; LOPES, D.C.; FERREIRA, V.P.A.; PENA. S.M.; NOGUEIRA, E.T.; MOREIRA, J.A.; BÜNZEN, S.; NERY, L.R. Utilização de enzimas exógenas em dietas com diferentes fontes e níveis de proteína para leitões na fase de creche. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.43(3), p.900-906, 2005.

TOWO, E.; MATUSCHEK, E.; SVANBERG, U., Fermentation and enzyme treatment of tannin sorghum gruels: effects on phenolic compounds, phytate and in vitro accessible iron. **Food Chemistry***,* v.94, p.369-376, 2006.

TOWO, E.E; SVANDBERG, U.; NDOSSI, G.D. Effect of grain pretreatment on different extractable phenolic groups in cereals and legumes commonly consumed in Tanzania. **Journal of the Science of Food and Agricultural,** v. 83, p.980-986, 2003.

TÜRK, M.; SANDBERG, A.S. Phytate degradation during breadmaking: effect of phytase addition. **Journal of Cereal Science**, v.15, p.281–294, 1992.

URBANO, G.; LOPEZ-JURADO, M.; ARANDA, D.; VIDAL-VALVERDE, C.; TENORIO, E.; PORRES, J. The role of phytic acid in legumes: ant nutrient or beneficial function? **Journal of Physiology ans Biochemistry,** v.56, n.3, p.283-294, 2000.

URBANO, G.; PORRES, J.M.; FREJNAGEL, S.; LÓPEZ-JURADO, M.; GÓMEZ-VILLALVA, E.; VIDAL-VALVERDE, C.; ARANDA, P. Improvement of iron availability from phytate-treated *Pisum sativum,* L. flour. **Food Chemistry,** v.103, p.389-395, 2007a.

URBANO, G.; LÓPEZ-JURADO, M.; PORRES, J.M.; FREJNAGEL, S.; GÓMEZ-VILLALVA, E.; FRIÁS, J.; VIDAL-VALVERDE, C.; ARANDA, P. Effect of treatment with α-galactosidase, tannase or a cell-wall-degradin enzyme complex on the nutruitive utilisation of protein and carboydrates from peã (*Pisum sativum* L.) flour. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.87, p.1356-1363, 2007b.

VAHJEN, W.; BUSCH, T.; SIMON, O. Study on the use of soya bean polysaccharide degrading enzymes in broiler nutrition. **Animal Feed Science and Technology,** v.120, p. 259-276, 2005.

VAN DIEPENINGEN, A.; DEBETS, A.J.M.; VARGA, J.; VAN DER GAAG, M.; SWART, K.; HOEKSTRA, R.F. Efficient degredation of tannic acid by black *Apergillus* species. **Microbiology Research,** v.108, p.919-925, 2004.

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

VIEIRA, F.C.V.; PIERRE, C.T.; CASTRO, H.F. Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, UNICAMP, Campinas, 2005.

WILLIAM, F.; BOOMINATHAN, K.; VASUDEVAN, N.; GURUJEYALAKSHMI,G.; Mahadevan, A. Microbial degradation of lignin and tannin. **Journal Science Industrial Reserch,** v.45, p.232-243, 1986.

XU, B.; CHANG, S.K.C. Effect of soaking, boiling and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. **Food Chemistry,** v.110, 1-13, 2008.

9 ANEXOS

9.1 Permissão para o ensaio biológico

UNICAMP

CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **1623-1**, sobre **"Estudo da aplicação de complexo enzimático e fermentação em grãos de sorgo"**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo / Patrícia Fernanda Schons**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **15 de setembro de 2008**.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **1623-1**, entitled **"Study of application of enzimatic complex and fermentation in sorghum gruels"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 15, 2008**.

Campinas, 25 de setembro de 2008.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/