

**ESTABILIDADE DA FITASE E SUA
UTILIZAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO DE
FRANGOS DE CORTE**

CARLA CACHONI PIZZOLANTE

2000

48957

MFN 24901

CARLA CACHONI PIZZOLANTE

**ESTABILIDADE DA FITASE E SUA UTILIZAÇÃO NA
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Zootecnia, com concentração em Nutrição de monogástricos.

Orientador

Prof. Antônio Soares Teixeira

BIBLIOTECA CENTRAL

N.º CLAS ^{UFLA} T636.513

P12

est

N.º F.º REGISTRO 48957

DATA 26/05/00

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2000

BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA



48957

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pizzolante, Carla Cachoni

Estabilidade da fitase e sua utilização na alimentação de frangos de corte / Carla Cachoni Pizzolante. -- Lavras : UFLA, 2000.

117 p. : il.

Orientador: Antônio Soares Teixeira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Frango de corte. 2. Alimentação. 3. Fitase. 4. Atividade enzimática. 5. Dieta. 6. Biodisponibilidade de cálcio. 7. Fósforo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CDD-636.513
-636.50852**

CARLA CACHONI PIZZOLANTE

**ESTABILIDADE DA FITASE E SUA UTILIZAÇÃO NA
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Zootecnia, com concentração em Nutrição de Monogástricos.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2000

Prof. Antônio Gilberto Bertechini – UFLA

Prof. Custódio Donizete dos Santos – UFLA

Prof. Edivaldo Antônio Garcia - UNESP - Botucatu

Prof. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas - UFLA



Prof. Antônio Soares Teixeira
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

*Ao meu marido Breno Pereira Pizzolante,
pelo apoio e compreensão durante esta
tarefa.*

DEDICO

*“A ciência não é uma ilusão, ilusão seria acreditar
que pudéssemos encontrar em outra fonte o que
ela nos proporciona”*

Sigmund Freud

*Aos meus familiares, em especial aos sobrinhos
Wanessa, Maximillian, Matheus e Lara, pelo
Amor. Às famílias Ribeiro e Spigolon, pela
amizade, apoio e incentivo.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Instituto de Zootecnia do Estado de São Paulo, em especial ao Diretor Geral Dr. Gilberto Bufarah e Dr. Paulo Bardauil Ancântara, pela amizade, apoio e oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pelo financiamento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Antônio Soares Teixeira pela orientação, amizade, apoio e ensinamentos no curso e na realização deste trabalho.

Ao departamento de Zootecnia da UFLA, em especial aos professores Antônio G. Bertechini, Rilke T. F. de Freitas, Priscila V. R. Logato e Paulo B. Rodrigues, pela orientação, sugestões e ensinamentos para realização deste trabalho.

Ao Departamento de Química da UFLA, em especial aos professores Custódio D. dos Santos e Celeste M. P. de Abreu, pela orientação, amizade, paciência e valiosos ensinamentos no curso e na realização deste trabalho

Ao Prof. Edivaldo A. Garcia, da UNESP de Botucatu, pela amizade, sugestões e apoio.

À empresa BASF pela doação da enzima NATUPHOS 5000 e pela orientação no decorrer deste trabalho.

Aos pesquisadores científicos do Instituto de Zootecnia, em especial os da Estação Experimental de Zootecnia de Brotas, Vanderley B.O. Leite, Antônio P. Deodato, Erika S.P.B Saldanha; aos técnicos Ana M.M.R. Spigolon e Rodrigo B. Saldanha; aos auxiliares Nilson V. Pedro, Gilmar D. Nave, Gilmar R. Oliveira, Paulo P. Padilha, Geraldo de Campos, Valdir A. Ribeiro e à Irani M.R. da Silva, assistente técnico da administração pública, pela amizade, colaboração e incentivo para realização do curso.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia da UFLA, Luis C. Oliveira, Geraldo Alves e José Onofre do Setor de Avicultura; José G. V. Boas e Gilberto F. Alves da fábrica de ração; Carlos H. Souza, Mariana Cornélio, Pedro A. Pereira, Keila C. Oliveira e Isbela M. R. Silva da secretaria; Suelba F. Sousa, Márcio S. Nogueira, Eliana M. Santos e José Virgílio do Laboratório de nutrição; pela amizade e colaboração na execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Química, Liége J. G. Oliveira, Marli Ribeiro, Vera L. Pereira, Cleusa F. Silva, Marcelo S. Andrade, Wilson F. Carvalho Jr., Joalis de Castro e Oswaldo Guimarães Filho, pela amizade, ajuda, incentivo e prestimosa orientação durante as análises.

Aos funcionários da Biblioteca Central, pelo auxílio e colaboração.

Aos alunos Emanuel J.V.M.O. Lima, Celso M. Gomes Jr. e Cláudio H.O. Carvalho, pela colaboração durante a execução dos experimentos;

Aos colegas de pós-graduação, em especial Willibaldo B. Salum, Luis D. S. Murgas, Édson J. Fassani, Eduardo L. Alves, Sidnei T. Reis, Robson H. da Silva, Ingrid R. Moron, Vera L. Banys e Kleber J. Vilela, pela amizade e convívio diário;

A todos que ajudaram, direta ou indiretamente, para que se concluisse esse trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

CARLA CACHONI PIZZOLANTE, filha de Carlos Cachoni e Beatriz Cardozo Cachoni, nasceu em 11 de julho de 1964 em Ribeirão Preto (SP).

Graduou-se em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá (PR), em janeiro de 1989.

Em 1993, concluiu o curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Lavras.

Ingressou no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa através de Concurso Público, realizado no período de 22 a 23 de junho de 1993, para Pesquisador Científico Nível I, na Área de Avicultura.

Em março de 1995 iniciou seus estudos de Doutorado em Zootecnia, na Universidade Federal de Lavras.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 O Fósforo.....	3
2.2 Absorção, metabolismo e excreção do fósforo.....	4
2.3 Deficiência e toxidez pelo fósforo.....	5
2.4 Conteúdo no corpo animal.....	6
2.4.1 Fósforo nos ossos.....	6
2.4.2 Fósforo no sangue.....	7
2.5 Funções no organismo.....	8
2.6 Interação de fósforo com outros nutrientes.....	8
2.6.1. Fósforo e cálcio.....	8
2.6.2 Fósforo e vitamina D ₃	9
2.6.3 Fósforo e manganês.....	10
2.6.4 Fósforo e alumínio.....	10
2.6.5 Fósforo fitico como agente poluidor.....	10
2.7 O cálcio na nutrição animal.....	11
2.7.1 Cálcio nos vegetais.....	12
2.7.2 Absorção, metabolismo e excreção do cálcio.....	12
2.7.3 Deficiência e toxidez pelo cálcio.....	15
2.7.4 Conteúdo no corpo animal.....	16
2.7.5 Funções no organismo.....	17
2.7.6 Interação de cálcio com o fósforo e vitamina D ₃	18
2.8 Fitatos.....	19

2.9 Biodisponibilidade.....	23
2.9.1 Biodisponibilidade do fósforo de origem vegetal, inorgânica e animal.....	24
2.10 Fitase.....	26
2.10.1 Produção de fitase industrial.....	27
2.10.2 Propriedades físicas e químicas que afetam a estabilidade e atividade da fitase.....	28
2.10.3 Métodos de determinação e quantificação da atividade enzimática da fitase.....	30
2.11 Suplementação da fitase para melhorar a utilização do fósforo.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Procedimentos experimentais.....	40
3.2 Primeira etapa: determinação da atividade enzimática da fitase.....	40
3.2.1 Primeiro experimento: efeito de formas e condições de armazenamento da fitase pura, sobre a atividade da fitase.....	42
3.2.2 Segundo experimento: efeito de diferentes formas de mistura da fitase às rações armazenadas à temperatura ambiente, sobre a atividade da fitase.....	44
3.3 Segunda etapa: efeito da fitase na biodisponibilidade de cálcio e Fósforo em dietas de frangos de corte na fase inicial.....	46
3.3.1 Localização, instalações e equipamentos.....	46
3.3.2 Aves e manejo.....	47
3.3.3 Análise laboratoriais.....	48
3.3.4 Parâmetros avaliados.....	48
3.3.4.1 Consumo de ração.....	48
3.3.4.2 Ganho de peso.....	48
3.3.4.3 Conversão alimentar.....	49
3.3.4.4 Teores de cinzas, cálcio e fósforo na tibia.....	49
3.3.4.5 Teor de cinzas, cálcio e fósforo nas excretas.....	50
3.4 Terceiro experimento: efeito da fitase na biodisponibilidade de fósforo em dietas de frangos de corte na fase inicial.....	50

3.5 Quarto experimento: efeito da fitase na biodisponibilidade de cálcio em dietas de frangos de corte na fase inicial.....	52
3.6 Dietas experimentais.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 Primeira etapa: determinação da atividade enzimática da fitase.....	59
4.1.1 Primeiro experimento: efeito de formas e condições de armazenamento da fitase pura sobre a atividade da enzima.....	59
4.1.2 Segundo experimento: efeito de diferentes formas de mistura da fitase às rações, armazenadas à temperatura ambiente, sobre a atividade da Fitase.....	63
4.2 Segunda etapa: efeito da fitase na biodisponibilidade de cálcio e fósforo em dietas de frangos de corte na fase inicial.....	66
4.2.1 Avaliação do desempenho: resultados do terceiro experimento.....	66
4.2.2 Porcentagem de cinzas, cálcio e fósforo nas tíbias das aves do terceiro experimento.....	73
4.2.3 Fósforo no plasma das aves do terceiro experimento.....	78
4.2.4 Porcentagem de cinzas, cálcio e fósforo nas excretas das aves do terceiro experimento.....	80
4.3 Avaliação do desempenho: resultados do quarto experimento.....	84
4.3.1 Porcentagem de cinzas, cálcio e fósforo nas tíbias das aves do quarto experimento.....	88
4.3.2 Porcentagem de cinzas, cálcio e fósforo nas excretas das aves do quarto experimento.....	90
5 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXOS.....	108

RESUMO

PIZZOLANTE, Carla Cachoni. Estabilidade da fitase e sua utilização na alimentação de frangos de corte. Lavras: UFLA, 2000. 117p. (Tese – Doutorado em Zootecnia)¹.

Objetivou-se avaliar o efeito de formas e condições de armazenamento sobre a atividade enzimática da fitase e a biodisponibilidade de cálcio e fósforo em dietas para frangos de corte. O trabalho foi realizado em duas etapas. A primeira etapa, feita no laboratório, mediu a atividade da enzima fitase ao longo do período de armazenamento. Nesta etapa, foram realizados 2 experimentos: Experimento 1, constituído de 5 tratamentos (fitase pura armazenada a 0 °C; 4 °C e temperatura ambiente e misturada a suplemento vitamínico e mineral, armazenado à temperatura ambiente), em DIC e esquema de parcela subdividida. As atividades foram avaliadas a cada 14 dias, durante 112 dias de armazenamento, verificando-se que o armazenamento da fitase na forma pura, a 0 °C, foi superior aos demais tratamentos. Experimento 2, constituído de 4 tratamentos (fitase misturada a ração diretamente, diretamente e após peletizada, via suplemento mineral e via suplemento vitamínico), sendo todos os tratamentos armazenados à temperatura ambiente, em DIC e esquema de parcela subdividida. As atividades foram avaliadas a cada 7 dias, durante 56 dias de armazenamento, verificando-se que o armazenamento da fitase misturada à ração via suplemento vitamínico e diretamente com a ração posteriormente peletizada provocaram queda na atividade da fitase, quando comparados aos demais tratamentos. Na segunda etapa, avaliou-se o efeito da fitase sobre a biodisponibilidade do cálcio e do fósforo fítico, sendo realizados 2 experimentos (3 e 4); em ambos experimentos foram utilizados 576 pintos de linhagem para corte, alojados em um conjunto de baterias quentes, recebendo dietas práticas à base de milho e farelo de soja (basal), durante 21 dias. Ao final de 27 dias de idade, 96 aves foram abatidas para avaliação dos conteúdos de minerais (Ca e P) nas tíbias e fósforo plasmático. As excretas foram coletadas de 22 a 27 dias de idade das aves. Experimento 3: Foi utilizado um DIC com os tratamentos em arranjo fatorial 2 x 3 x 2 + 4, sendo, dois níveis de fósforo total (0,35 e 0,45%), três níveis de fitase (500, 750 e 1000 FTU) e quatro tratamentos adicionais com níveis de 0,35 e 0,45% de fósforo disponível para cada sexo, com 3 repetições por tratamento. Houve interação significativa entre níveis de fósforo e fitase ($P < 0,05$) para ganho

¹ Comitê orientador: Antônio Soares Teixeira – UFLA (Orientador); Custódio Donizete dos Santos – UFLA; Antônio Gilberto Bertechini– UFLA; Rilke Tadeu Fonseca de Freitas - UFLA.

de peso, consumo de ração e conversão alimentar. A fitase não indicou diferenças significativas quando o nível 0,45% foi utilizado, entretanto, no nível 0,35%, conforme a fitase foi suplementada, o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar foram melhorados, principalmente com 1000 FTU/kg, em ambos sexos. Os machos apresentaram maior ganho de peso. O consumo de ração e a conversão alimentar foram iguais aos das fêmeas. O contraste 0,45% não afetou o desempenho de machos e fêmeas, o mesmo não ocorrendo com nível 0,35%, em que o fósforo disponível foi superior, em ambos os sexos. Os maiores teores de cinzas, fósforo e cálcio nas tíbias, e fósforo plasmático, foram obtidos com os níveis 750 e 1000 FTU/kg de fitase e 0,45% de fósforo total. Os machos apresentaram maiores teores de cinzas nas tíbias. O nível 0,45% de fósforo disponível apresentou os maiores valores de cinzas, cálcio e fósforo nas tíbias e de fósforo no plasma. As menores excreções de fósforo ocorreram nos níveis 0,35% de fósforo total e 1000 FTU/kg de fitase. Os menores teores de cinzas e cálcio nas excretas foram obtidos com 0,35% e 1000 FTU/kg de fitase. As fêmeas excretaram menores quantidades de cinzas, cálcio e fósforo que os machos.

Experimento 4: foi utilizado um DIC com os tratamentos em arranjo fatorial 3 x 4 x 2, sendo três níveis de fitase (0, 500 e 1000 FTU), quatro níveis de cálcio (0,7, 0,8, 0,9 e 1,0%), com 4 repetições por tratamento. O desempenho não foi afetado pelos tratamentos utilizados, sendo os machos superiores às fêmeas em ganho de peso, consumo e conversão alimentar. Os teores de cinzas nas tíbias não foram afetados pelos níveis de fitase, mas conforme elevou-se os níveis de cálcio, os teores de cinzas se elevaram. Os teores de cálcio e fósforo nas tíbias se elevaram com a suplementação de 500 e 1000 FTU/kg de fitase e com os níveis de cálcio. A utilização de fitase não diminuiu a excreção de cinzas, cálcio e fósforo.

ABSTRACT

PIZZOLANTE, Carla Cachoni. Stability of phytase and its utilization in the feeding of broiler chickens. Lavras - MG: UFLA, 2000. 117p. (Thesis - Doctorate in Animal Science).¹

This work was designed to evaluate the effect of storage forms and conditions upon the enzyme activity of phytase and bioavailability of calcium and phosphorus in broiler diets. The work was accomplished in two steps. The first step, made in the laboratory measured the activity of the phytase enzyme along the storage period. In this step, two experiments were performed: Experiment 1, constituted of 5 treatments (pure phytase stored at 0 °C, 4 °C and environmental temperature and mixed to vitamin and mineral supplement, stored at environmental temperature) in CRD and split plot scheme. The activities were evaluated every 14 days for 112 days of storage, being verified that the phytase storage in the pure form at 0 C was superior to the other treatments. Experiment 2, made up of 4 treatments (phytase mixed to the ration directly, directly and afterwards pelleted, via mineral supplement and via vitamin supplement), all the treatments being stored at environmental temperature, in CRD and split plot scheme. The activities were evaluated every 7 days for 56 days' storage, being verified that the storage of the phytase mixed to the ration via vitamin supplement and directly with the ration pelleted later, provoked a fall in phytase activity when compared with the other treatments. In the second step, the effect of phytase on the bioavailability of calcium and phytic phosphorus was evaluated, 2 experiments being accomplished (3 and 4,) ;in both experiments were utilized 576 broiler line chicks, housed in an array of heated batteries, receiving practical diets on the basis of corn and soybean meal (basal) for 21 days. At the end of 27 days of age, 96 birds were slaughtered for evaluation of the mineral contents (Ca and P) in the tibias and plasma phosphorus. The excretae were collected from 22 to 27 days of age of the birds. Experiment 3: A CRD with the treatments in 2 x 3 x 2 +4 factorial arrangement was utilized ,namely, two levels of total phosphorus (0.35 and 0.45% of total phosphorus), three levels of phytase (500, 750 and 1,000 FTU) and four additional treatments with levels of 0.35 and 0.45 % of available phosphorus for each sex, with three replicates per treatment. There was significant interaction among levels of phosphorus and phytase ($P < 0.05$) for

¹Guidance Committee Antônio Soares Teixeira – UFLA (Adviser); Custódio Donizete dos Santos – UFLA; Antônio Gilberto Bertechini– UFLA; Rilke Tadeu Fonseca de Freitas - UFLA.

weight gain, ration consumption and feed conversion. Phytase did not indicate significant differences when the level 0.45% was utilized, nevertheless, at the level 0.35% as phytase was supplemented, weight gain, ration consumption and feed conversion were improved, chiefly with 1,000 FTU/Kg, in both sexes. The males presented greater weight gain. The ration consumption and feed conversion were equal to those of females. The contrast 0.45% did not affect the performance of males and females, the same not occurring with the level 0.35%, at which the available phosphorus was superior in both the sexes. The highest contents of ashes, phosphorus and calcium in the tibias and plasma phosphorus were obtained with the levels of 750 and 1,000 FTU/ Kg of phytase and 0.45% of total phosphorus. The males presented higher contents of ashes in the tibias. The level 0.45% of available phosphorus presented the greatest contents of ashes, calcium and phosphorus in the tibias, and phosphorus in the plasma. The lowest excretions of phosphorus occurred at the levels 0.35% of total phosphorus and 1,000 FTU/kg of phytase. The lowest contents of ashes and calcium in the excretae were obtained with 0.35% and 1,000 FTU/ Kg of phytase. The lowest contents of ashes and calcium in the excretae were obtained with 0.35% and 1,000 FTU/kg of phytase. The females excreted smallest amounts of ashes, calcium and phosphorus than the males.. Experiment 4: A CRD with the treatments in 3 x 4 x 2 factorial arrangement, namely, three levels of phytase (0, 500 and 1,000 FTU), four levels of calcium (0.7, 0.8, 0.9 and 1.0%) with four replicates per treatment. The performance was not affected by the treatments utilized, the males being superior to the females in weight gain, feed consumption and conversion. The contents of ashes in the tibias were not affected by the levels of phytase but as calcium levels raised, the ash contents increased. The contents of calcium and phosphorus in the tibias increased with the supplementation of 500 and 1,000 FTU/kg of phytase and with calcium levels. The utilization of phytase did not decrease the excretion of ashes, calcium and phosphorus

1 INTRODUÇÃO

A maioria das rações de aves produzidas no Brasil são compostas de ingredientes de origem vegetal, sendo que a maior parte do fósforo presente nestes alimentos encontra-se presa na forma de fitato, tornando-se indisponível para as aves.

O fosfato bicálcico tem sido altamente utilizado na produção agropecuária como fonte inorgânica de fósforo para atender às exigências nutricionais dos animais, entretanto, tem custo elevado e é um mineral não renovável na natureza, podendo se esgotar em menos de 100 anos.

O fitato praticamente não é hidrolisado pelos animais monogástricos, pois essas espécies possuem a enzima fitase (fosfatase) em quantidades muito pequenas no trato intestinal, assim, não consegue liberar todo o fósforo das plantas que é necessário para ser absorvido. Além do fósforo, o fitato dificulta a utilização ou reduz a retenção de cátions como cálcio, ferro, manganês, magnésio e zinco, causando os efeitos anti-nutricionais, interferindo na disponibilidade de proteína e energia.

As indústrias de rações têm procurado utilizar fitases exógenas industrialmente produzidas por fungos, bactérias e leveduras, geneticamente modificadas, e sua estabilidade e atividade sobre o fitato permite que seja utilizada nos diversos programas de alimentação.

A fitase possui especificidade relativa, pois é uma fosfatase que retira fósforo de qualquer substrato. A utilização de fitases exógenas permite um melhor aproveitamento do fósforo fítico dos vegetais reduzindo sua excreção no ambiente e os custos de produção.

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivos:

- (1) Avaliar o efeito de formas e condições de armazenamento da fitase, sobre a atividade da enzima;**
- (2) Avaliar o efeito dos níveis de fitase sobre a biodisponibilidade de cálcio e fósforo fítico em dietas de frangos de corte na fase inicial.**

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O fósforo

A palavra fósforo, do grego, significa “luz de referência”. É o elemento mineral economicamente mais importante na alimentação animal. Considerado o primeiro em custos entre os minerais e o terceiro no contexto global dos nutrientes, o fósforo é sobrepujado somente pela energia e a proteína (particularmente aminoácidos sulfurados e lisina) no custo da formulação de rações para aves e suínos (Borges, 1997). Por ser o mineral que mais onera o custo das dietas, requer atenção especial por participar de funções metabólicas essenciais no organismo (Barreto, 1994).

O fósforo é um mineral sólido, o segundo membro do grupo V A da tabela periódica, e possui o número atômico 15. Não ocorre isolado na natureza, sendo a maior parte encontrada em depósitos de rochas de fosfato $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, apatita $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$ e compostos semelhantes contendo fosfato de cálcio (Russel, 1982).

Industrialmente, obtém-se o fósforo elementar pelo aquecimento das rochas que contém este elemento com carbono (na forma de coque) e dióxido de silício (areia) em fornos elétricos. Inicialmente ocorre formação de moléculas P_2 que se dimerizam e são condensadas debaixo de água, formando moléculas de fósforo branco P_4 . A reação é apresentada a seguir: $2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{s}) + 6\text{SiO}_2(\text{s}) + 10\text{C}(\text{s}) \rightarrow \text{P}_4(\text{g}) + 6\text{CaSiO}_3 + 10\text{CO}(\text{g})$. Este mineral pode existir em pelo menos seis tipos de variedades alotrópicas, sendo as mais conhecidas o fósforo branco, o vermelho e o preto (Russel, 1982).

O fósforo, devido às várias funções que desempenha, é considerado, metabolicamente, o mineral mais utilizado (I.M.C., 1979).

2.2 Absorção, metabolismo e excreção do fósforo

O fósforo pode ser ingerido na forma orgânica (fitatos, fosfolipídeos, fosfoproteínas) ou na forma inorgânica (mono, bi e trifosfatos), que são solúveis ou não no suco gástrico.

O fósforo na forma de ortofosfato, para ser absorvido, deve estar em solução no ponto de contato com a membrana absorvente, no intestino delgado, principalmente na porção superior do duodeno (I.M.C., 1979).

A absorção é por difusão simples seguindo gradiente de concentração, mas existem evidências de que a absorção do fósforo parece envolver um transporte ativo, com gasto de energia, sendo este processo estimulado pela vitamina D e sódio dependente. A quantidade absorvida é dependente da fonte, relação cálcio:fósforo, pH intestinal, consumo de lactose, nível de vitamina D3, gordura da dieta, níveis de cálcio e outros elementos (Rutz, 1994).

O fósforo absorvido no intestino circula pelo corpo e é facilmente extraído do sangue para ser utilizado pelos ossos, podendo também ser reabsorvido dos ossos para manter níveis normais no plasma sanguíneo durante os períodos de escassez na dieta. O mecanismo de transporte envolve a ação dos hormônios paratireoideano (PTH), calcitonina (CT) e estrógeno que atuam nos órgãos, ossos, rins e intestino (Murray et al., 1990).

O paratormônio estimula o movimento do cálcio e fosfato dos ossos para o sangue e estimula os rins a aumentarem a reabsorção de cálcio e a excreção de fosfato. Nos rins, estimula a formação de 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25

(OH)₂D₃), que vai ativar a síntese da proteína transportadora no intestino, aumentando a absorção intestinal de cálcio e fosfato e, provavelmente, permitir a ação do paratormônio nos ossos e rins. As ações conjuntas destes compostos aumentam os níveis de cálcio no fluido extracelular, mantendo ou diminuindo as concentrações de fosfato (Sturkie, 1968).

A calcitonina atua no metabolismo do fosfato causando a entrada do fosfato nas células ósseas e no fluido periósseo, enquanto diminui o movimento do cálcio dos ossos para o plasma. Esta entrada de fosfato pode ser acompanhada pelo cálcio, pois os efeitos hipocalcêmicos da calcitonina dependem muito do fosfato.

A excreção em herbívoros ocorre nas fezes e, em carnívoros, através da urina.

2.3 Deficiência e toxidez pelo fósforo

O consumo inadequado de fósforo pode provocar anormalidades esqueléticas e aumento da mortalidade (Roland, 1992).

A ingestão de fósforo em níveis abaixo das exigências causa deficiência principalmente em animais jovens, afetando o desempenho e causando mineralização óssea deficiente. O raquitismo é um dos principais problemas que ocorrem em animais em crescimento, nos quais se observa um decréscimo no nível do cálcio e fósforo no sangue que flui para os ossos. As juntas mostram-se inchadas, os ossos arqueados, menos desenvolvidos que o normal, e na junção das costelas com o externo, formam-se nódulos característicos conhecidos por rosário raquítico.

Animais adultos com balanço negativo de cálcio e fósforo são acometidos de osteomalácea, uma desmineralização óssea.

O excesso de fósforo em dietas deficientes em cálcio pode resultar em raquitismo em animais jovens. Para adultos, quantidade excessiva somente ocorre quando fosfatos minerais são introduzidos indiscriminadamente. A fecundidade é comprometida, provavelmente devido à menor assimilação de manganês.

2.4 Conteúdo no corpo animal

O fósforo depois do cálcio, é o elemento mineral mais abundante no corpo animal, compreendendo 22% dos minerais totais do organismo.

2.4.1 Fósforo nos ossos

As cinzas dos corpo constituem 70% de cálcio e fósforo, sendo que, 80% do fósforo está presente sob a forma de cristais de fosfato de cálcio insolúveis (apatita) nos ossos e dentes e 20% são muito ativos metabolicamente e estão distribuídos em todas as células do organismo e no fluido extracelular em combinação com carboidratos, lipídeos, proteínas e reações de transferência de energia (Murray et al., 1990).

A composição aproximada do osso adulto normal, embora seja variável de acordo com a espécie, idade e estado nutricional, é de 45% de água, 25% cinzas, 20% proteína e 10% de gordura. A quantidade de cálcio e fósforo nas cinzas do osso é de 36% e 17%, respectivamente. A relação de cálcio e fósforo é de 2:1, com pouca variação.

O osso tem duas fases, uma cristalina, composta por hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, e uma amorfa, que contém $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaCO_3 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ e

pequenas quantidades de citratos, sódio, potássio, cloro e flúor. A matriz orgânica do osso, em que os sais minerais são depositados, é composta de uma mistura de proteínas, principalmente colágeno. O processo de formação dos ossos difere de osso para osso; contudo, consta basicamente da deposição de uma matéria mineral sobre uma matriz orgânica.

2.4.2 Fósforo no sangue

O sangue integral contém de 35 a 45 mg de fósforo por 100 ml, sendo que a maior parte encontra-se nas células. Pode estar na forma orgânica (lipoproteínas) e na forma inorgânica, no plasma. Nas aves, a relação de fósforo orgânico: fósforo inorgânico é de 10:1.

Os fosfatos no sangue têm função tamponante, mantendo o pH entre 7,36 e 7,44. No plasma, é encontrado como fosfato inorgânico (1 como ânion divalente HPO_4^{2-} e 1 como ânion monovalente H_2PO_4^-); contudo, quantidades pequenas de fosfato trivalente PO_4^{3-} existem. O nível de fósforo inorgânico no sangue é indicador importante do estado de nutrição deste elemento. Amostras não hemolisadas podem ser usadas para analisar o fósforo do soro ou do plasma porque os eritrócitos contêm 70 vezes mais fósforo que o plasma. O nível normal no plasma está entre 4 a 9 mg/100 ml, valores abaixo de 4 mg podem ser indicativos de deficiência (Guyton e Hall, 1996). Valores de 7,33 e 6,60 mg/100ml foram observados no plasma sanguíneo de frangos com três semanas de idade recebendo dietas contendo níveis de cálcio 0,65 e 1,0%, respectivamente (Elliot et al., 1995). Níveis baixos de fósforo no plasma estão diretamente relacionados com os níveis de fósforo na dieta e com a síntese de 1,25-dihidroxicolecalciferol nos rins (Caceres, 1994)

2.5 Funções no organismo

Em adição ao seu papel estrutural, o fósforo desempenha numerosas funções importantes, destacando-se a sua atuação no metabolismo de lipídeos, glicídeos e protídeos; síntese de ácidos nucléicos; formação de fosfolipídeos e atuação no equilíbrio ácido-básico das aves; participa como importante ânion, sob a forma de fosfato, na manutenção do equilíbrio ácido-básico e como componente vital do sistema intracelular de transferência de energia da qual o ATP é principal componente; componente essencial dos ácidos nucléicos, e dos fosfolipídeos, elementos-chave na estrutura das membranas celulares; faz parte dos hexosefosfatos, lecitinas, nucleoproteínas, caseína, ATP, creatina fosfato e uma variedade de outros compostos; componente de algumas proteínas como pepsina e caseína; a glicose é fosforilada na primeira etapa de sua utilização e em outras etapas; os compostos de fosfato de alta energia desempenham um papel central em diversas reações, assim como o AMPc; muitas vitaminas B funcionam como coenzimas somente quando em combinação com o fosfato; o tampão de fosfato é importante especialmente no líquido intracelular, em que sua concentração é muito maior do que no líquido extracelular, e nos fluidos tubulares do rim (Murray et al., 1990).

2.6 Interação de fósforo com outros nutrientes

2.6.1 Fósforo e cálcio

Estão intimamente associados ao metabolismo, ocorrendo no organismo combinados entre si na maioria das vezes, de modo que a deficiência de um deles na dieta limita o valor nutritivo de ambos (Maynard et al., 1984).

Uma alta proporção molar de cálcio e fósforo na dieta pode levar à formação de complexos cálcio-fitado altamente insolúveis, fazendo com que a molécula de fitato se torne inacessível à fitase. A presença desses complexos poderia explicar a aparente inatividade da fitase em dietas ricas em cálcio e não através de uma inibição direta da enzima pelo íon de cálcio (Fitase, 1999).

Wideman et al. (1985) e Wideman (1987) associaram desordens renais em aves quando receberam dietas com níveis elevados de cálcio, entretanto, quando níveis normais de cálcio foram utilizados com níveis inferiores de fósforo, o mesmo excesso de cálcio urinário foi detectado.

2.6.2 Fósforo e vitamina D₃

A vitamina D, para participar nos processos metabólicos do organismo, deve ser previamente metabolizada. Nos alimentos, encontra-se sob a forma de vitamina D₃ (colecalfiferol), que é absorvida no intestino delgado, juntamente com os lipídeos da dieta (Rutz, 1994), e transportada para o fígado, onde sofre hidroxilação, formando o hidroxicolecalfiferol (25-OH-D₃), que é transportado para os rins, onde é novamente hidroxilado, formando o 1,25-dihidroxicolecalfiferol [1,25-(OH)₂D₃], que é a forma ativa do colecalfiferol, essencial para a síntese da proteína responsável pela absorção do cálcio e fósforo no intestino (Maynard et al., 1984).

A vitamina D₃ aumenta a absorção intestinal do cálcio e fósforo, age diretamente no processo de calcificação e no controle de fosfato pelos rins (Murray et al., 1990).

Níveis normais de cálcio com níveis baixos de fósforo reduzem o fósforo inorgânico no soro, estimulando a síntese de 1,25-dihidroxicolecalfiferol [1,25-

(OH)₂D₃], que é responsável pela absorção intestinal de cálcio e fósforo (Wideman, 1987).

A adição de 1,25-dihidroxicolecalciferol [1,25(OH)₂D₃] à dieta basal de milho e farelo de soja para frangos de corte, na fase inicial, aumentou a utilização de fósforo fitico, teor de cinzas dos ossos, fósforo e cálcio no plasma (Mitchell e Edwards., 1993).

2.6.3 Fósforo e manganês

Níveis de cálcio têm pouco efeito sobre o aumento do manganês nos ossos, entretanto, o excesso de fósforo dietético, independente da forma catiônica, reduz a deposição de manganês nos ossos acima de 50% (Wedekind e Baker, 1990; Wedekind et al., 1991).

2.6.4 Fósforo e alumínio

O fósforo com o alumínio formam complexos insolúveis no aparelho digestivo, causando esgotamento de fósforo (Leach e Burdette., 1987).

2.6.5 Fosforo fitico como agente poluidor

O fósforo de fontes vegetais é pouco utilizado por animais não ruminantes. Desta maneira, as fezes excretadas por aves e suínos contêm altos teores de fósforo fitico. Segundo Cromwell e Coffey (1991), nos Estados Unidos da América, cerca de 13,4 milhões de toneladas de fezes são excretadas pelos suínos anualmente, representando ao redor de 12% do total; as aves contribuem com 6,8 milhões de toneladas, o que representa em torno de 6,1% do total. Aves e

suínos somados são responsáveis por 18% do total de excrementos, e como estes resíduos possuem, em média, 1,55% de fósforo, o total deste elemento excretado por aves e suínos, anualmente, é de 320 mil toneladas, correspondendo a 1/3 de todo o fósforo excretado pelas várias espécies de exploração doméstica. Grande parte destes resíduos são utilizados na adubação de plantações em geral. A lixiviação do fósforo a partir de excretas de aves para a água de superfície e lençóis freáticos é um grave problema de poluição ambiental. Um número crescente de países cria medidas legislativas, exigindo o manejo dos excrementos através da adição de fitase microbiana a dietas de aves e suínos, reduzindo a excreção de fósforo nas fezes em 20 e 50% (fitase, 1999).

Como a quantidade de fósforo que é fornecida ao solo geralmente excede as necessidades das plantas, ocorre acúmulo deste mineral no solo, sendo relativamente imóvel (Page e Pratt, 1975). Outra parte deste fósforo é transformada em formas insolúveis em água, aderindo-se às partículas do solo, tornando-se, assim, um contaminante parcial dos rios, lagos e córregos. O fósforo está sendo considerado como um elemento poluidor face às modernas técnicas usadas em agricultura e alimentação animal. A recomendação que se faz é a de que o fósforo fítico passe a tornar-se mais disponível aos animais não ruminantes, diminuindo, assim, a adição de fosfato inorgânico às suas dietas.

2.7 O cálcio na nutrição animal

O cálcio desempenha papel importante em uma larga variedade de funções essenciais no metabolismo. É um dos elementos mais abundantes do corpo, sendo 99% encontrados no esqueleto e o restante faz parte do metabolismo celular, ação neuro-muscular e na coagulação do sangue (Caceres, 1994).

Na natureza, o cálcio é encontrado como carbonato de cálcio (calcário e mármore), sulfato de cálcio (gipsita), fluoreto de cálcio (fluorita), dolomita ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$) e fluorapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$. São conhecidos onze isótopos de cálcio, sendo seis estáveis. Os isótopos de cálcio utilizados em estudos biológicos são radioativos ^{45}Ca (meia-vida de 165 dias, emite β -partículas de energia 0,25 MeV) e ^{47}Ca (meia-vida de 4,7 dias, energia de radiação β -partículas de energia 0,66 e 1,94 MeV, γ -quanto 0,48, 0,83 e 1,31 MeV) (Georgievskii, 1982).

2.7.1 Cálcio nos vegetais

O cálcio encontra-se nos vegetais na forma solúvel em água (maior mobilidade), solúvel em ácido (menos móvel) e frações adsorvidas. Na fração solúvel ocorre como sal de ácido orgânico (geralmente o ácido cítrico), e particularmente como proteinato de cálcio. A fração solúvel em ácido inclui malatos e oxalacetatos, e a fração adsorvida (extrato de sal) inclui proteinato de cálcio e outros compostos poliméricos.

As leguminosas e o girassol são alimentos ricos em cálcio, e os cereais de gramíneas e milho são pobres. A parte vegetativa da planta contém mais cálcio que as partes reprodutivas. Nas plantas, o nível ótimo de cálcio encontra-se na faixa de 40 a 60 mg por kg de matéria seca. Quantidades acima desses valores são consideradas elevadas (Georgievskii, 1982).

2.7.2 Absorção, metabolismo e excreção do cálcio

O cálcio é ingerido com os alimentos vegetais e aditivos minerais. Nos vegetais está ligado à proteínas e a ânions de ácidos orgânicos e nos aditivos

como carbonato ou fosfato. No estômago, é convertido pelo suco gástrico em cloreto de cálcio, sendo dissociado em íons (principal forma absorvida no duodeno). Para ser absorvido, precisa estar em solução no ponto de contato com a membrana absorvente, ocorrendo ativamente em todos os segmentos do intestino, principalmente no duodeno e jejuno, sendo a velocidade de absorção maior que a de qualquer outro íon, com exceção do sódio Berne e Levy (1988) citados por Rutz (1994). Uma vez absorvido, se apresenta na corrente sanguínea sob duas formas, ligado à proteína transportadora ou sais orgânicos e livre. A forma não difusível, a complexada, funciona como um estoque plasmático, altamente disponível para ser ionizado. O excesso de cálcio é depositado nos ossos, estrutural ou medular, constituindo um estoque menos lábil, mas não menos importante (Gonzales e Oliveira, 1999).

Os fatores pH intestinal, vitamina D, fosfatos, ácidos graxos livres influenciam a absorção de cálcio (Murray et al., 1990). O mecanismo de transporte dos íons cálcio pelas membranas do epitélio intestinal ainda não está bem elucidado. Acredita-se que uma proteína denominada transportadora de cálcio, produzida pelas células mucosas, possui grande afinidade pelos íons cálcio (Georgievskii, 1982). O 1,25-dihidroxicolecalciferol induz a formação da proteína transportadora, que vai atuar na borda-em-escova das células do epitélio e transportar o cálcio para dentro do citoplasma celular, este se deslocará através da membrana basolateral da célula por difusão facilitada (Guyton e Hall, 1996).

Os hormônios que regulam a homeostase do cálcio são o paratireoideiano (PTH), calcitriol ou 1,25-dihidroxicolecalciferol [1,25-(OH)₂D₃] e a calcitonina (CT), e atuam nos ossos, rins e intestino. Quando os níveis de cálcio ionizado no plasma caem abaixo dos limites dos níveis normais, as glândulas paratireoidianas aumentam a secreção de PTH que estimula o movimento do cálcio e fosfato dos

ossos para o sangue e estimula os rins a aumentarem a reabsorção de cálcio e a excreção de fosfato.

O PTH também age sobre os rins estimulando a formação de calcitriol, que atua no intestino aumentando a absorção de cálcio. A ação conjunta destes hormônios aumenta os níveis de cálcio no fluido extracelular mantendo ou diminuindo as concentrações de fosfato. Quando o cálcio extracelular alcança níveis normais, ocorre uma inibição por retroalimentação da secreção do PTH e inibição do calcitriol (em parte pela diminuição do PTH).

Este hormônio restaura as concentrações normais de cálcio no fluido extracelular, atuando diretamente nos ossos (velocidade de dissolução dos ossos, incluindo as fases orgânicas e inorgânicas, fornecendo cálcio ao fluido extracelular), rins (reduz a excreção renal do cálcio, e portanto aumenta a concentração deste elemento no fluido extracelular), e indiretamente na mucosa intestinal (aumenta a eficiência da absorção do cálcio pelos intestinos, pela promoção da síntese de calcitriol).

Ainda previne a hipocalcemia numa dieta deficiente em cálcio, mas o processo ocorre às custas do cálcio ósseo. As alterações mais rápidas ocorrem pela ação nos rins, mas as maiores são nos ossos (Murray et al., 1990).

A principal função do calcitriol é estimular a absorção intestinal de cálcio e fósforo. É o único hormônio que pode promover o transporte de cálcio contra o gradiente de concentração que existe através da membrana da célula intestinal. A produção deste hormônio é fortemente regulada, e portanto existe um mecanismo delicado para o controle do cálcio do fluido extracelular, apesar das marcadas flutuações do conteúdo de cálcio no sangue. Isto assegura concentrações adequadas de cálcio e fosfato para a deposição, originando os cristais de hidroxiapatita sobre as fibras de colágeno nos ossos.

O calcitriol funciona como hormônio, promovendo a absorção intestinal de cálcio, aumentando a formação da proteína ligante de cálcio (CBP) nas células epiteliais. Essa proteína atua na borda em escova dessas células transportando o cálcio para o interior do citoplasma; a seguir, o cálcio atravessa a membrana basolateral da célula por difusão facilitada. A velocidade da absorção de cálcio parece ser diretamente proporcional à quantidade dessa proteína ligante de cálcio.

A calcitonina está inversamente relacionada ao PTH, sendo ambos controlados pelos níveis de cálcio no fluido extracelular. A sua secreção aumenta linearmente quando concentrações de cálcio estão elevadas. Os ossos são os alvos primários da calcitonina; neles ela diminui a matrix de reabsorção e portanto diminui a liberação de cálcio e fosfato. Esta ação é independente de PTH.

As aves são naturalmente predispostas a apresentar acidose metabólica no período de rápido crescimento do tecido ósseo por remover cálcio e acrescentar hidrogênio à corrente sanguínea. Cerca de 40% do tamponamento da acidez metabólica ocorre no osso, com liberação de sódio e potássio em troca do excesso de hidrogênio, iniciada quando há uma queda da concentração plasmática do íon bicarbonato (HCO_3), o principal tampão do sangue. O fornecimento de dietas balanceadas em sódio e potássio reforça os sistemas naturais de tamponamento da acidez fisiológica, pois o sódio e o potássio possuem efeito alcalinizante nos fluidos corporais e o cloro, efeito acidificante (Gonzales e Oliveira, 1999).

2.7.3 Deficiência e toxidez pelo cálcio

A deficiência deste mineral na dieta provoca desmineralização dos ossos. Anormalidades de cálcio na estrutura óssea causam raquitismo, osteomalácea, osteoporose e escorbuto. Tétano e hipertensão estão relacionados às anomalias do

cálcio ionizado. A ingestão elevada de cálcio e vitamina D₃ causa hipercalcemia, ou seja, calcificação excessiva nos ossos e nos tecidos delicados dos rins (Georgievskii, 1982).

2.7.4 Conteúdo no corpo animal

O cálcio e fósforo constituem 70% das cinzas do corpo, e 99% do cálcio encontram-se no tecido ósseo e dentes.

A estrutura química do osso não foi ainda estabelecida. Parece, no entanto, que a parte mineral do osso existe, principalmente, sob a forma de hidroxi-apatita $3 \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$, que é um composto extremamente duro e dificilmente solúvel. O esqueleto de uma ave é constituído, na sua maior parte, de fosfato de cálcio e carbonato de cálcio. A matriz orgânica do osso, na qual os minerais são depositados, consiste de mistura de proteínas, das quais a osseína é a mais importante.

A porcentagem de cálcio e fósforo nos ossos aumenta linearmente com a idade das aves (Georgievskii, 1982), e a composição aproximada do osso adulto normal, embora seja variável de acordo com a espécie, idade e estado nutricional, é de 45% de água, 25% cinzas, 20% proteína e 10% de gordura. Utiliza-se a relação cálcio:nitrogênio para medir o grau de mineralização do tecido ósseo, no entanto, a concentração de nitrogênio varia com o conteúdo de matéria seca e desengordurada do osso, enquanto a concentração de cálcio nas cinzas do osso é bastante constante (37-38%), devendo este último ser utilizado (Georgievskii, 1982).

O cálcio plasmático existe em três formas: combinados às proteínas plasmáticas, que não se difundem através da membrana capilar (40%);

combinados com substâncias do plasma e dos líquidos intersticiais (citrato e fosfato) sob a forma não ionizada, que se difunde através da membrana capilar (10%), e o restante são difusíveis através da membrana capilar e está ionizado (50%) (Guyton e Hall, 1996).

O cálcio ionizado é a forma biologicamente ativa, mas os níveis variam dentre as espécies (Georgievskii, 1982). No plasma humano, a concentração de cálcio varia de 9 a 10 mg/100ml (Guyton e Hall, 1996). Elliot et al. (1995), utilizando níveis de 0,65 e 1,0% de cálcio, encontraram valores de 10,8 mg/100ml e 11,0 mg/100 ml no plasma sanguíneo de frangos com três semanas de idade. Estes autores observaram que aves recebendo as menores níveis de cálcio apresentaram maior capacidade de absorver este elemento no trato gastrointestinal. Uma maior produção do hormônio paratireoideano deve ter ocorrido, levando à maior conversão de 1,25 dihidroxicolecalciferol, responsável pela elevação dos níveis de cálcio plasmático, tornando o cálcio disponível para deposição nos ossos.

2.7.5 Funções no organismo

A função principal é de construir e manter ossos e dentes, mas apresenta diferentes funções como formação de grandes moléculas de proteína compondo as subunidades protoméricas, o íon cálcio estabiliza a estrutura terciária e quaternária da enzima α -amilase, as quais são resistentes às hidrolases do trato gastrointestinal (Georgievskii, 1982).

Importante metabolicamente para a atividade da enzima adenosina trifosfato na liberação de energia para a contração muscular e atividade do AMPc (Guyton e Hall, 1996).

Necessário na transmissão nervosa e regulação dos batimentos cardíacos (Georgievskii, 1982).

Na coagulação do sangue, inicia as alterações necessárias para formação do coágulo. O cálcio ionizado estimula a liberação de tromboplastina pelas plaquetas sanguíneas e também é um cofator necessário para a conversão de protrombina em trombina, que auxilia a polimerização de fibrinogênio em fibrina (Guyton e Hall, 1996).

Afeta a função de transporte das membranas celulares, possivelmente atuando como estabilizador da membrana; influencia a transmissão de íons através das membranas das organelas celulares; libera neurotransmissores nas junções sinápticas; atua na síntese, secreção e nos efeitos metabólicos dos hormônios protéicos; libera ou ativa enzimas intra e extracelulares. Os íons de cálcio são importantes mensageiros intracelulares. Comumente as suas mensagens são retransmitidas pela calmodulina, uma proteína que se liga aos íons de cálcio e é, então, ativada para regular várias enzimas (Murray et al., 1990).

2.7.6 Interação do cálcio com o fósforo e vitamina D₃

A nutrição adequada de cálcio e fósforo depende, principalmente do fornecimento adequado de cálcio e fósforo (em forma utilizável), da relação conveniente entre os dois elementos e presença de vitamina D. Todos estes fatores estão interrelacionados. A relação cálcio:fósforo é considerada desejável nos limites 2:1; entretanto, uma nutrição adequada é possível fora destes limites. A vitamina D, em quantidade elevada na dieta, torna esta relação menos importante, mas na ausência desta, mesmo que os outros fatores sejam ótimos, a assimilação de cálcio e fósforo é baixa. A vitamina D é essencial para a absorção de cálcio no

intestino, mas é preciso estar na sua forma ativa, cuja conversão é prejudicada se o balanço de eletrólitos na dieta não for adequado (Gonzales e Oliveira, 1999).

Edwards (1989 e 1990) observou que a suplementação de 1,25-dihidroxicolecalciferol [(1,25-(OH)D₃] em dietas de frangos evitou a redução do trato gastrointestinal quando níveis baixos de cálcio foram suplementados. O aumento de níveis de cálcio nas dietas leva à formação de sabões insolúveis, diminuindo a digestibilidade das gorduras.

2.8 Fitatos

As plantas, para o seu desenvolvimento normal, retiram seus nutrientes minerais do solo, sendo que na fase de maturação do grão há uma translocação destes elementos para as sementes, e no caso do fósforo, na forma de hexafosfato de inositol ou ácido fítico. Assim, a maior parte do fósforo nas rações compostas de grãos de cereais encontra-se na forma de fosforo fítico. Os sais de ácido fítico são descritos como fitato, e correspondem, aproximadamente, a 2/3 do total presente nas plantas (NRC, 1994; Mcknight, 1996 e Rostagno e Silva, 1998). A quantidade de ácido fítico varia entre as diversas fontes alimentares vegetais; por exemplo, o milho possui 65.6 a 67%, farelo de soja, 58 a 60.6%, farelo de arroz, 81.2 a 86%, e trigo, 68.5 a 70.7% (Nelson et al., 1967; Sauveurs (1989) citado por Borges (1997) e Jongbloed, Mroz e Kemme, 1992).

Fósforo fítico é a designação dada ao fósforo que faz parte da molécula do ácido fítico (Hexafosfato de inositol ou fitato), que é encontrado nos vegetais. A molécula de fitato possui alto teor de fósforo (28,2%) e alto potencial de quelação. O ácido fítico pode formar uma ampla variedade de sais insolúveis com cátions di e trivalentes, tais como cálcio, zinco, cobre, cobalto, manganês, ferro e

magnésio. Influencia negativamente a digestão nutrientes, diminuindo a energia metabolizável da ração (Keshavarz, 1999)

O cálcio presente nos grãos de cereais não é facilmente absorvido porque muito dele está fortemente ligado nos grupos fosfatos múltiplos formando uma fitina, um sal de cálcio, magnésio e zinco, etc, impedindo que estes íons metálicos essenciais sejam absorvidos. Segundo Maga (1982), numerosos hexafosfatos de inositol podem ser encontrados na natureza, e dependendo do complexo formado, resultam uma grande variedade de compostos. Entretanto, o ácido fitico ou fitato, comercialmente disponíveis, são frequentemente chamados de fitatos. Estas substâncias constituem por volta de 1 a 2% do peso de muitos cereais e leguminosas, embora quantidades maiores, como 3 a 6%, tenham sido encontradas em alguns produtos como farelo de colza e farelo de algodão (Cheryan, 1980). No arroz, Assada e Kasai (1962) observaram que no estágio inicial do amadurecimento do grão, a maior porção de mio-inositol está em estado livre, mas no final do amadurecimento, está na forma de éster-fosfato, e que representa 80% do total do fósforo na planta. No grão de arroz, o ácido fitico é encontrado principalmente no pericarpo.

Estudos feitos em misturas de sistemas contendo proteínas, sais e outros componentes e com a adição de ácido fitico, são de difícil interpretação devido à habilidade do ácido fitico em interagir fortemente com íons carregados positivamente e outros grupos funcionais positivos (Cheryan, 1980). Ainda de acordo com este autor, a solubilidade do ácido fitico é muito diferente na presença ou ausência de proteína. Quando na presença de proteína, sua solubilidade tem um comportamento paralelo ao da proteína, sugerindo uma possível interação entre fitato e proteína.

Um dos fatores que controlam a absorção dos minerais são os quelatos orgânicos desses elementos. Segundo Scott, Nesheim e Young, (1982), muitos quelatos são formados por “acidente” e não têm nenhum propósito biológico útil. Assim, numerosos estudos têm levado à conclusão de que ácido fítico e seus derivados podem ligar-se a minerais essenciais na dieta, tornando-os parcial ou totalmente indisponíveis para sua absorção (Figura 1). Este problema se agrava quando dois cátions estão presentes, podendo ocorrer uma ligação sinérgica (Maga, 1982).

Muitos alimentos como açúcares, melão e aminoácidos, contêm quelatos, o que dificulta a determinação da biodisponibilidade de elementos traços inorgânicos, pois estes elementos, ao entrarem no aparelho digestivo, combinam-se com outras substâncias, especialmente proteínas (Miller, 1981).

No trato gastrintestinal, o fitato inibe a ação de enzimas proteolíticas, tais como pepsina e tripsina. Complexos fitato-proteína/aminoácido ou fitatomineral-proteína são de difícil digestão, reduzindo a utilização de proteínas. Esses complexos ocorrem naturalmente em ingredientes de ração e podem ser formados na porção inicial do trato gastrintestinal. As cargas negativas da molécula de ácido fítico, em pH ácido ou neutro, reagem com as cargas positivas de alguns aminoácidos, tais como lisina, arginina, histidina, das moléculas de proteínas, incluindo as proteases (enzimas envolvidas na digestão de proteínas), ligações essas, que reduzem a disponibilidade dos aminoácidos (Ravindran, Bryden e Kornegay, 1995; Ravindran e Bryden, 1997; Kornegay et al., 1996 e Keshavarz, 1999). Contudo, a fitase hidrolisa a ligação de fósforo-proteína, remove os efeitos proteolíticos negativos do ácido fítico nas enzimas e aumenta a digestão e absorção de proteínas e aminoácidos (Ravindran e Bryden, 1997). O pH é um

fator muito importante na determinação da solubilidade final do fitato e proteína. Mudanças no pH afetam a dissociação do ácido fítico (Mroz e Jongbloed, 1998).

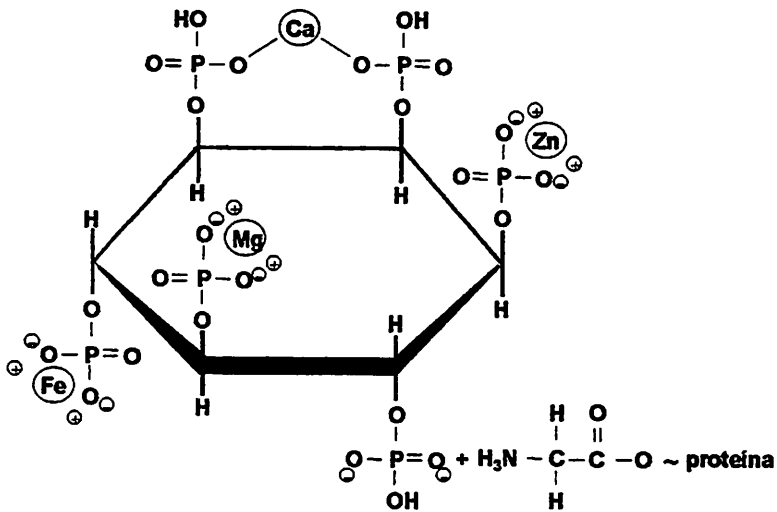
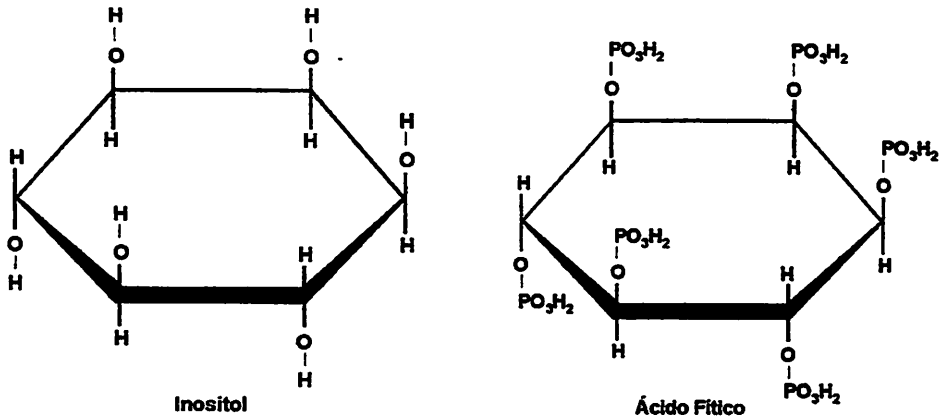


FIGURA 1. Exemplo de uma molécula completa de ácido fítico com cálcio (Ca), zinco (Zn), magnésio (Mg), ferro (Fe) e proteína.

2.9. Biodisponibilidade

A biodisponibilidade de um determinado alimento refere-se à porção que pode ser utilizada pelo animal para satisfazer as funções para os quais esse elemento é necessário (Miller, 1981). A determinação do conteúdo do mineral em um alimento é bastante simples, mas a biodisponibilidade torna-se complexa.

Nos experimentos conduzidos nas décadas de 50 e 60, utilizavam-se dietas purificadas e semi-purificadas, e como medidas de respostas, ganho de peso, consumo de ração, eficiência alimentar e mortalidade. Alguns autores avaliavam também a deformação dos ossos das pernas e o empenamento.

Os resultados obtidos eram comparados através de um teste de média e a disponibilidade das fontes eram classificadas de forma nominal, não havendo quantificação da biodisponibilidade. Esses métodos são de custo elevado, além das dietas purificadas e semi-purificadas serem de baixa palatabilidade e eficiência.

Os novos métodos utilizados para determinar a biodisponibilidade de microminerais usam dietas práticas, à base de milho e farelo de soja, com suplementação do mineral em estudo em níveis elevados por um período de tempo curto. Nesses métodos, além das medidas de desempenho, são utilizados os conteúdos do mineral nos tecidos para medir a biodisponibilidade do mineral (Rostagno e Silva, 1998).

A biodisponibilidade de minerais pode ser determinada usando, como parâmetro, de resposta à retenção corporal total do mineral, retenção em algum tecido específico ou síntese de um determinado composto. Por exemplo, a disponibilidade de cálcio e fósforo para animais em crescimento pode ser medida através da retenção total ou deposição nos ossos. Para determinação de fósforo, a

resistência à quebra de ossos é uma medida melhor, pois a resposta é mais linear e mais sensível ao nível de fósforo do que o conteúdo de cinzas nos ossos, Cromwell, [199_]). Nelson e Walker (1964) afirmaram que o ganho de peso é menos eficiente que as cinzas nos ossos para avaliar o fósforo de fosfatos.

Atualmente, a metodologia mais empregada implica na utilização de animais recebendo uma ração basal deficiente no mineral em estudo, suplementada com níveis crescentes do mesmo mineral proveniente de uma fonte padrão, considerada 100% de disponibilidade. Os outros tratamentos são formados no mínimo por 2 ou mais níveis da fonte do mineral a ser testado. Os dados obtidos são elaborados através de equações de regressão linear simples ou múltipla, sendo as medidas de respostas (variáveis dependentes) e os níveis do mineral (variáveis independentes). A disponibilidade biológica relativa do mineral nas fontes é calculada pela relação entre os coeficientes de regressão da fonte padrão (100%) e da fonte teste (Teixeira, 1994).

As vantagens deste método, segundo Miles, citado por Muirhead (1991), são: (1) utilização de dietas práticas; (2) o animal pode expressar ao máximo seu potencial genético devido ao consumo maximizado; (3) a contaminação ambiental das dietas e amostras são nocivas devido ao uso de altos níveis dos minerais; (4) a concentração do mineral nos tecidos é mais mensurável quantitativamente e (5) são necessários poucos animais para detectar diferenças na disponibilidade entre as várias fontes inorgânicas.

2.9.1 Biodisponibilidade do fósforo de origem animal, vegetal e inorgânica

A disponibilidade de fósforo vegetal varia de acordo com os ingredientes (Kratzer e Votra, 1986), e apenas 1/3 do fósforo total destas fontes é considerado

disponível, o restante encontra-se preso na forma de fitato (NRC, 1994). O inositol liga-se a 6 moléculas de ácido fosfórico, formando o fitato, e sua liberação depende de vários fatores, dentre eles a idade das aves, níveis de cálcio, fósforo, vitamina D e fitase na dieta (Nelson, Ferrara e Storer, 1968).

Nas formulações de rações para aves, o fornecimento de fósforo disponível pelas fontes de origem vegetal não é suficiente para atender as exigências nutricionais a fim de proporcionar adequado desempenho e mineralização óssea, havendo necessidade de suplementação com fontes de fósforo na forma inorgânica, que geralmente apresentam diferentes valores de disponibilidade biológica (Rostagno e Silva, 1998).

A biodisponibilidade estimada de fósforo na milho e farelo de soja alcança 10 a 30 %, causando dois problemas: (1) a necessidade de se adicionar um suplemento de fósforo inorgânico às dietas e (2) a excreção de grande quantidade de fósforo na natureza (Mcknight, 1996).

As estimativas de disponibilidade relativa de fósforo em diferentes fosfatos utilizados em dietas avícolas foram estudadas e os valores de fósforo encontrados variaram com as fontes utilizadas, autores e metodologias (Gomes, 1991).

Apesar do Brasil possuir grandes jazidas de fosfatos de rocha bruta, estes não são utilizados devido à porcentagem de flúor que possuem em relação ao fosfato bicálcico (Rostagno e Silva, 1998). O flúor interfere na utilização de fósforo, e os níveis deste mineral nas fontes de fosfato de rocha são bastante variáveis, afetando a biodisponibilidade (Lopes, 1983). Os fosfatos de sódio, ácido fosfórico, fosfato monocálcico, bicálcico e defluorinado ou tricálcico apresentam maior disponibilidade de fósforo devido à maior solubilidade (McGillivray, 1980). Lima (1995), comparando o fosfato bicálcico a diferentes

fontes de fósforo, avaliou o desempenho e características ósseas de frangos de corte até 21 dias. Os menores valores de biodisponibilidade foram observados com o uso de fosfatos de rocha.

O fósforo das farinhas de origem animal é considerado 100% disponível (Waldroup, Ammerman e Harms, 1965), mas pesquisas mostraram que o teor de fósforo da farinha de ossos apresenta disponibilidade de 83 a 96% quando comparado ao fosfato bicálcico (Orban e Roland, 1987) e, a farinha de carne e ossos 85 a 93% (Huang e Alle, 1981; Ketels e DeGroot, 1988). Brugalli (1996), avaliando o efeito da granulometria da farinha de carne e ossos sobre a biodisponibilidade de fósforo no desempenho e características ósseas de frangos de corte, observou um aumento na biodisponibilidade com a redução da tamanho das partículas.

2.10 Fitase

Na busca de alternativas para melhorar o valor nutricional dos alimentos, a biotecnologia tem, como objetivo, fornecer enzimas exógenas industrialmente produzidas que, suplementadas às dietas, buscam melhorar a eficiência alimentar e a produtividade das aves.

As enzimas exógenas atuam da mesma forma que as endógenas, apresentando um sítio ativo com capacidade de atuar sobre um substrato específico, hidrolizando-o. Esta ação catalítica é específica e é determinada pelas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas, que são todas proteínas. Qualquer alteração na estabilidade das enzimas provoca uma alteração na estrutura destas proteínas e isto pode promover a perda de sua capacidade catalítica (Penz Jr, 1998).

A fitase é encontrada em grande quantidade na natureza (sementes de plantas, fungos, bactérias, leveduras e microorganismos do rúmen), e quando incubada com fitato de sódio (substrato sintético), hidrolisa o fósforo do fitato presente nos grãos de cereais liberando fósforo inorgânico.

A presença e a atividade da fitase varia dentro de uma mesma ordem e espécie botânica, podendo perder atividade em pH ácido ou pelo processamento (Sauvers, 1989, citado por Borges, 1997).

A atividade da fitase pode variar nos diferentes grãos de cereais, por exemplo, na aveia, cevada, trigo e centeio possuem maior atividade quando comparadas ao milho e sorgo (Mollgaard, 1946, citado por Nelson, Ferrara e Storer, 1968).

Segundo Bitar e Reinhold (1972); Maddaiah et al. (1964); Davis e Flet (1978), Warden e Schaible (1962), citados por Vieira (1999), o fitato pode ser degradado pela ação de fitases presentes nos ingredientes, sintetizadas nas microvilosidades intestinais ou originadas de uma bactéria resistente, mas existem controvérsias quanto à possibilidade da presença de atividade de fitase na secreção intestinal e/ou de bactérias intestinais.

Alimentos como trigo, cevada, farelo de trigo e arroz são ricos em atividade de fitase, entretanto, milho e farelo de soja, ingredientes mais utilizados na fabricação de rações, contêm pouca ou nenhuma atividade (Selle, 1997).

2.10.1 Produção de fitase industrial

As enzimas oferecidas aos animais na ração são chamadas de enzimas exógenas e têm ação parecida com as sintetizadas pelos animais, as enzimas endógenas. Wenk (1993), citado por Penz (1998), comenta que a ação das

enzimas exógenas podem aumentar a ação das enzimas endógenas, reduzindo a quantidade de resíduos nutricionais que chegam ao intestino grosso, diminuindo a possibilidade de ação dos microorganismos nessa área.

A fitase exógena é produzida por bactérias e fungos dos tipos *Aspergillus ficuum*, *A. candidus*, *A. versicolor*, *A. sydowi*, *A. repens*, *A. amstelodani*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Mucor rancemosus*, *Geotrichum candidum*, *Botrytis cinera*, *Rhizopus orizae*, *R. oligosporum* e *R. stolonifer*; sob condições de processamento muito bem controladas (Inborr et al. (1991) e Vanbelle (1992), citados por Borges (1997). Segundo esses autores, os passos para o desenvolvimento de uma enzima consistem em selecionar a enzima, o organismo produtor e o melhoramento das cepas, assegurando uma estabilidade apropriada no processo de fabricação e compatibilidade com outras enzimas e substâncias químicas presentes no alimento e/ou animal.

Após a produção industrial, a atividade da fitase se mantém por no mínimo três meses após misturada às rações avícolas (Cowan, 1993).

2.10.2 Propriedades físicas e químicas que afetam a estabilidade e atividade da fitase

Para desempenhar suas funções, a fitase exógena deve chegar até o seu local de ação, no trato gastrointestinal, e atingir o substrato alvo, sem ser desnaturada. Portanto, deve suportar o processamento das dietas, o ambiente adverso do próprio trato digestivo, resistir às flutuações de pH e à ação das enzimas proteolíticas endógenas (Bedford, 1995).

A concentração de fitase, do substrato, pH e temperatura, afetam a estabilidade e a atividade enzimática. As fitases devem permanecer estáveis

durante o armazenamento, tanto nas formas pura, misturada às rações, na peletização, ou aos diferentes suplementos minerais e vitamínicos.

As fitases mantêm a estabilidade em pHs entre 3 e 9 e em temperaturas menores que 90°C. Variações extremas de pH e temperaturas elevadas resultam em significativa redução de sua atividade ou destruição da enzima.

Temperaturas extremamente baixas (cerca de 0°C ou menores) diminuem a atividade enzimática, mas não destroem as enzimas, que podem ser conservadas. A temperatura da peletização é um dos fatores que mais podem interferir na ação de enzimas exógenas. A peletização é um tratamento térmico muito utilizado; e se a temperatura de processamento das rações for elevada (superiores a 75°C), ocorre desnaturação parcial ou total das enzimas, podendo prejudicar o desempenho das aves (Graham e Inborr, 1993).

Segundo Simons et al. (1990), a atividade da fitase foi mantida em 96% em relação à inicial quando as rações foram processadas a 50 °C de condicionamento e 78 °C de peletização, entretanto, quando ambas foram elevadas para 60 °C de condicionamento e 87 °C de peletização, a atividade enzimática caiu 46% em relação a inicial. Newman (1991), citado por Zanini (1997), relatou que a fitase manteve a estabilidade, perdendo menos de 16% da atividade original após ser submetida à peletização com 90 °C, por 30 minutos.

As enzimas, quando armazenadas com produtos que possuem características inócuas, podem continuar estáveis e serem armazenadas por até 6 meses, mesmo em condições ambientais instáveis (Classen, 1996).

Swick e Ivey (1992) relataram que a efetividade da utilização de fitases depende da forma de armazenamento e da estabilidade na peletização de rações. A atividade original de rações contendo fitases, submetidas à peletização,

utilizando temperaturas não superiores a 80°C, mantiveram de 90 a 100% Walsh (1995), citado por Cantor (1995).

Mckinight (1996) observou um decréscimo de 58 e 81% na atividade da fitase “NatuphosTM 5000L” após serem peletizadas e estocadas por três meses em temperaturas 20° e 40 °C.

A atividade enzimática da fitase exógena deve ser mantida no trato gastrointestinal da ave mesmo após o contato com as enzimas proteolíticas endógenas das mesmas (Cantor, 1995), e apesar dos baixos valores de pH encontrados no proventrículo e na moela (2,5 a 5,5), não ocorre desnaturação enzimática das enzimas fúngicas devido à rápida passagem do alimento pelo trato gastrintestinal (Chesson, 1987, citado por Borges, 1997). A ação máxima desta enzima ocorre no proventrículo e papo (Liebert, Wecke e Schoner et al., 1993).

2.10.3 Métodos de determinação e quantificação da atividade enzimática

A determinação precisa da atividade da fitase é importante tanto para a indústria produtora de fitases (controle de qualidade do produto oferecido) quanto para o fabricante de ração.

Atualmente, diferentes métodos são utilizados pelas indústrias de enzimas, portanto, não existe uma padronização para os métodos, e nesses casos é impossível uma comparação direta dos resultados dos diferentes laboratórios, (Borges, 1997).

A maioria das metodologias existentes exige instrumentos elaborados e especiais, outras apenas tubos de ensaio e alguns reagentes, mas quaisquer delas são baseadas em alguns princípios simples como a natureza da reação a ser catalisada; os cofatores necessários; as concentrações necessárias do substrato,

do cofator; o pH ótimo da reação; a temperatura ótima da reação; um método analítico simples para determinar o consumo do substrato ou aparecimento dos produtos da reação.

A concentração do substrato deve estar acima do nível de saturação, de tal modo que a velocidade inicial seja da ordem zero para o substrato, o que significa que a velocidade da reação inicial é proporcional apenas à concentração da enzima (em seu pH e temperatura ótimos). Em geral, as medidas do produto da reação são mais precisas do que a medida do consumo do substrato (Pelczar, Reid e Chan, 1980).

2.11 Suplementação da fitase para melhorar a utilização do fósforo

Nelson et al. (1968) foram os primeiros a adicionar fitase, produzida por uma cultura de *Aspergillus ficuum*, a uma ração líquida de soja. O alimento foi fornecido a pintos de um dia de idade. As aves mostraram considerável aumento na porcentagem de cinzas dos ossos, concluindo que as aves utilizaram o fósforo do fitato tão bem como o fosfato inorgânico suplementado. Esses autores comentam que quando não há fitato presente na dieta de frangos, uma exigência de cálcio de 0,5% é necessária, entretanto, quando a dieta contém 1,25% de fitato, a exigência sobe para 0,95%. Em outro experimento, Nelson et al. (1971) utilizando uma dieta de milho e farelo de soja, suplementada com fósforo inorgânico e fitase, esta obtida a partir de *Aspergillus ficuum*, registraram aumento na porcentagem de cinzas dos ossos pela adição de fitase na dieta, indicando hidrólise do fitato pela enzima. Observaram que a quantidade de fósforo fitico presente nas fezes dos pintos foi reduzida na proporção em que se

adicionava fitase. Concluíram também que os pintos não utilizaram o fósforo do fitato na ausência de fitase.

Waldroup, Ammerman e Harms. (1964), suplementaram a dieta de frangos com vários níveis de fosfato bicálcico ou fitato de cálcio e observaram que através do ganho de peso e do teor de cinzas na tíbia, à medida que a relação cálcio:fósforo aumentou, diminuiu o aproveitamento do fósforo fitico.

Taylor (1965) afirma que em dieta com baixo teor de cálcio pode haver uma deficiência do mesmo devido à sua ligação com o fitato presente, e que em dietas com altos teores de cálcio ocorre uma baixa disponibilidade do fósforo fitico.

A atividade da fitase é influenciada por diversos fatores, entre eles, o substrato ou matérias primas vegetais utilizadas nas formulações de rações, níveis de cálcio e fósforo inorgânicos da dieta (Ballan, Nelson e Kirby, 1984)

Simons et al. (1990), utilizando *Aspergillus ficuum*, adicionaram a enzima em dietas contendo baixos níveis de fósforo para frangos de corte e observaram que a disponibilidade do fósforo aumentou, em média, 60% e a quantidade de fósforo excretado decresceu 50%. A taxa de crescimento e a conversão alimentar nas dietas com baixos teores de fósforo com fitase foram comparáveis ou mesmo melhores do que os resultados obtidos com dieta controle.

Em trabalho posterior de Simons e Versteegh (1991) com poedeiras e frangos, utilizando rações contendo 0,30% de fósforo fitico e 0,15% de fósforo inorgânico e fitase microbiana, observou-se um aumento na biodisponibilidade do fósforo em mais de 60%, com decréscimo de 40% nas excretas. Concluiu-se, também, que a estrutura óssea das aves, qualidade da casca dos ovos, não foram afetadas pela inclusão da enzima.

Perney et al. (1993), utilizando níveis de 250, 500 e 750 U de fitase/kg em rações contendo 0,32, 0,34, 0,38 e 0,44% de fósforo disponível, em pintos de corte de 4 a 10 dias, verificaram que as aves que receberam 0,32% de fósforo disponível suplementadas com 500 U de fitase/kg proporcionaram ganho de peso equivalente ao obtido com níveis de 0,38% de fósforo disponível. A adição de fitase aumentou significativamente o conteúdo de cinzas na tíbia e a retenção de fósforo, independente do conteúdo de fósforo das rações.

Lei et al. (1992) também afirmaram que suplementando dietas baixas em fósforo com fitase, é reduzida a quantidade de fósforo excretada no ambiente, o que é especialmente importante em áreas do planeta onde a densidade populacional animal é alta e onde os recursos de terra e água são limitantes.

Munaro (1993), utilizando pintos de corte criados até 49 dias, tendo como parâmetros o desempenho, teores de cinzas e de fósforo nas tíbias, no plasma sanguíneo e nas excretas, avaliou a biodisponibilidade de fósforo no milho e farelo de soja pela adição de níveis 500, 750 e 1000 PU de fitase. Observou maiores ganhos de peso e consumo de ração para os machos (com exceção da segunda semana) em relação às fêmeas. A conversão alimentar foi superior apenas na sexta e sétima semanas para os machos. Os menores valores de fósforo sanguíneo dos frangos, aos 28 dias, foram observados com o nível de fitase 500 FTU/kg. Os níveis de fitase não elevaram os teores de cinzas e fósforo nas tíbias. Os menores teores de fósforo nas excretas foram observados com os níveis 500 e 750 FTU/kg de fitase, para ambos os sexos.

Schoner et al. (1993), alimentando frangos de corte com dietas a base de milho e farelo de soja deficientes em fósforo (0,35%) com níveis crescentes de cálcio (0,6, 0,75 e 0,9%), suplementados com 125, 250, 500 ou 1500 FTU/kg de fitase e fósforo do fosfato monocálcico (0, 0,6, 1,2 e 1,8% de cálcio), observaram

um aumento no ganho de peso, consumo de ração e retenção de cálcio e fósforo quando a fitase ou o fósforo inorgânicos foram adicionados. A utilização do fósforo do fitato foi significativamente aumentada pela fitase. O fósforo inorgânico aumentou a utilização de fósforo após 14 dias e reduziu a utilização do fósforo liberado pela fitase entre 14 e 40 dias. A utilização de cálcio foi aumentada pela fitase e por fósforo inorgânico. Os tratamentos com fitase contendo altos níveis de cálcio nas dietas tiveram efeitos negativos significativos na utilização do fósforo, fósforo do fitato e cálcio. Nos tratamentos com fósforo inorgânico, os níveis de cálcio afetaram somente a utilização de cálcio, do fósforo e do fósforo do fitato após 14 dias. Usando como critério o ganho de peso e a retenção de fósforo, concluíram que os resultados com fósforo equivaleram à fitase.

Broz et al. (1994), utilizaram rações fareladas contendo 0.44, 0.45 e 0.52% de fósforo total, suplementadas com 0, 125, 250 e 500 U de fitase/kg, observaram um aumento linear no ganho de peso, consumo e teor de fósforo inorgânico no plasma e de cinzas, fósforo e cálcio na tibia.

Denbow et al. (1995), utilizando rações semi-purificadas contendo 0.20 e 0.27% de fósforo disponível, verificaram que a adição de fitase nos níveis 250, 500, 750 e 1000 U possibilitou a utilização de 31, 47, 54 e 58% do fósforo fítico do farelo de soja, respectivamente.

Sebastian et al. (1996), utilizando rações contendo 0.30% fósforo disponível e 1,0% de cálcio, verificaram que a suplementação de 600 U de fitase/kg melhorou o ganho de peso e aumentou o teor de cinzas na tibia. Esses autores, em 1997, submeteram pintos de corte a rações práticas com diferentes níveis de cálcio e fósforo disponível, suplementadas ou não com 600 U de fitase/kg, e observaram que as rações com níveis 0.35% fósforo disponível e

0.6% de cálcio, quando suplementadas com 600 U de fitase/kg, proporcionaram desempenho equivalente ao obtido com aves que receberam níveis adequados destes minerais. O desempenho não foi satisfatório quando a fitase foi adicionada em dietas contendo 0,35% de fósforo disponível e 1,0% de cálcio.

Aumentos lineares na retenção de fósforo, cálcio, peso corporal, fósforo orgânico do plasma e porcentagens de cinzas no osso do dedo médio, e diminuição da excreção de 42 para 51%, foram observados por Yi et al. (1996) e Qian et al. (1996).

A suplementação de fitase em rações de frangos de corte contendo baixos níveis de fósforo aumentou a disponibilidade do fósforo fitico, melhorando o desempenho e mineralização dos ossos (Simons et al., 1990; Schoner, Hoppe e Schowarz, 1991; Schoner et al., 1993; Denbow et al., 1995; Kornegay et al., 1996; Yi et al., 1996 e Borges, 1997), com diminuição de 30 a 60%, da excreção deste elemento no ambiente (Borges, 1997).

Jeroch (1992) citado por Ravindran e Bryden (1997), concluiu que a adição de 500 e 750 FTU/kg de fitase pode substituir 1,0 a 1,5 g/kg de fósforo de fontes inorgânicas. A suplementação de 600 FTU/kg em dietas de aves equivale à adição de 1,0 kg de fósforo do fosfato bicálcico (BASF, 1996).

Zanini (1997) avaliou a utilização de fitase em rações de frangos sobre o desempenho, características ósseas e balanço de nutrientes, e observou que o desempenho não foi afetado e que a adição de fitase aumentou significativamente o teor de cinzas na tíbia e a quantidade de fósforo e nitrogênio retido.

Kies e Schtte (1998), alimentando frangos de corte com níveis adequados de fósforo disponível, observaram que a adição de 500 U de fitase/kg de ração melhorou a conversão alimentar em aproximadamente 1,55%. Concluíram que a

inclusão de fitase melhorou a digestibilidade de proteínas e aminoácidos e utilização de energia.

A suplementação de fitase pode melhorar a digestibilidade do cálcio em aves e suínos, hidrolisando a ligação do fósforo com fitato. A retenção de cálcio aumenta linearmente com o aumento dos níveis de fitase suplementada e reduz à medida que a relação cálcio e fósforo se eleva e a concentração de fósforo aumenta (Fitase, 1999).

Kornegay et al. (1996) avaliaram o efeito da fitase sobre a digestibilidade da proteína bruta e de determinados aminoácidos utilizando quatro doses de fitase (0, 250, 500 e 750 FTU/kg), em três diferentes níveis de proteína bruta (25,5%, 22,6% e 19,4%). Observaram aumento dos aminoácidos digestíveis em aproximadamente 1% quando a fitase foi suplementada.

Ravindran e Bryden (1997) examinaram a influência de três níveis de fitase (0, 400 e 800 FTU/kg) sobre a digestibilidade ileal aparente de aminoácidos em dietas de trigo-sorgo-soja contendo três níveis de ácido fítico (10,4, 13,2 e 15,7 g/kg), assim como dos níveis de fósforo digestível (2,3 e 4,5 g/kg). Os diferentes níveis de ácido fítico foram obtidos mediante o acréscimo de farelo de arroz. Os resultados deste ensaio demonstraram influência negativa de concentrações crescentes de ácido fítico sobre o rendimento e digestibilidade de aminoácidos, efeitos estes anulados quando da suplementação de fitase. A digestibilidade aparente de proteína bruta melhorou aproximadamente 3% e a digestibilidade dos aminoácidos e aumentou em 2% e 2,5% para lisina e treonina, respectivamente.

Sebastian et al. (1997) avaliaram a influência da fitase sobre a digestibilidade ileal aparente de proteína e aminoácidos em dietas para frangos de corte contendo 0,45% de fósforo disponível e 1,0% de cálcio, 0,35% de fósforo

disponível e 1,0% de cálcio e 0,35% de fósforo disponível com 0,6% de cálcio e suplementação de 600 FTU/kg de fitase. O ganho de peso e o consumo de ração para machos e fêmeas melhorou com o uso de fitase. A digestibilidade ileal de proteína e aminoácidos (1-1,5% para proteína, lisina e metionina, 7% para metionina) melhorou, sendo seus efeitos mais pronunciados nas fêmeas. Os níveis 0,35% e 1,0% de cálcio exerceram influência negativa sobre a digestibilidade de proteína, mas nos níveis 0,35% de fósforo e 0,6% de cálcio, observou-se um crescimento ótimo com digestibilidades de proteína e aminoácidos significativamente melhoradas ao mesmo tempo.

Cerca de 20% de lisina livre foi ligada ao fitato, após incubação com farelo de arroz rico em fitato. Cerca de 50% desse volume foram liberados após a adição de fitase. A suplementação de fitase melhora a digestibilidade da proteína no íleo de vários ingredientes de ração. Uma melhora na digestibilidade foi observada em perús alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja com 22,5% de proteína, o mesmo não ocorrendo nas dietas contendo 28,0% de proteína (Fitase, 1999).

Frangos alimentados com dietas à base de farelo de soja e dextrose, deficientes em metionina, treonina ou lisina + valina, recebendo 1200 FTU/kg de fitase, apresentaram melhora na eficiência alimentar (Baker, 1998).

Estudos in vitro indicaram efeitos positivos da suplementação de fitase na disponibilidade de aminoácidos. O complexo proteína-ácido fítico pode ser hidrolisado e/ou os efeitos inibidores do ácido fítico sobre a atividade das enzimas digestivas são reduzidos (Rodehutschord, 1998).

Os teores de energia metabolizável aparente (EMA) podem ser melhorados com a suplementação de fitase em dietas à base de milho e farelo de soja, milho-farelinho de trigo-farelo de soja, milho-farinha de carne-farelo de soja

e trigo-milho-farelo de soja. Foram observadas elevações ligeiras, porém significativas da energia metabolizável aparente em frangos de corte alimentados à base de dietas contendo sorgo, farelo de soja, farelo de canola, farelo de caroço de algodão e farelinho de trigo (Fitase, 1999).

Attech e Leeson (1984) descreveram os efeitos do aumento dos níveis de cálcio em dietas contendo ácidos graxos saturados e seus efeitos na digestibilidade da energia metabolizável aparente (EMA). O fitato parece inibir a ação da alfa-amilase do quelato de cálcio, diminuindo a solubilidade e digestibilidade da energia.

Freitas, Saazad e Teixeira (1996) avaliaram os efeitos da energia e níveis de fósforo e fitase sobre a digestibilidade dos nutrientes da dieta de frangos de corte, criados por três semanas. As dietas continham 2800 e 3000 kcal/kg, 0,40 e 0,47% de fósforo disponível e 500 FTU/kg de fitase. Os tratamentos não influenciaram a quantidade de fósforo nos ossos, portanto, a inclusão de enzima, aliada aos menores níveis de energia metabolizável (EM) e fósforo disponível, conseguiram reter valores iguais de fósforo em relação aos outros tratamentos. Os tratamentos recebendo fitase apresentaram maior absorção de fósforo. A porcentagem de cálcio nos ossos foi melhor no nível 2800 kcal/kg com fitase. A maior absorção de cálcio ocorreu com os tratamentos 2800 kcal/kg e 0,40% de fósforo disponível e 500 FTU/kg de fitase, apresentando valores semelhantes ao tratamento 0,47% de fósforo disponível sem fitase. A dieta com 500 FTU/kg de fitase e 0,40% de fósforo disponível apresentou maior taxa de absorção e menor excreção nitrogenada. Os tratamentos influenciaram a quantidade de proteína bruta nas excretas, em que o menor valor observado foi com o tratamento contendo fitase e baixo nível de energia.

Ácidos orgânicos na ração, idade e estado fisiológico do animal e tratamentos da ração, antes de fornecê-la, podem influenciar os efeitos da fitase (Fitase, 1999).

Os resultados da pesquisa demonstraram unanimidade no efeito benéfico da adição de fitase sobre a disponibilidade do fósforo; entretanto, os níveis de inclusão nas dietas variam de 290 FTU/g (Kornegay et al., 1996) a 1146 FTU/g P (Yi et al., 1996). Essa variação pode ser explicada pelos diversos fatores que afetam diretamente a efetividade da fitase como a presença de ácidos orgânicos na ração, idade e estado fisiológico do animal e tratamentos da ração (Fitase, 1999) e dos métodos para avaliar as respostas de critério. A amplitude desse benefício encontra contradições devidas, provavelmente, à não uniformidade dos tratamentos a que a fitase foi submetida, tais como temperatura, pH, quantidade de fitase adicionada, tipo de ração e fonte de obtenção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos experimentais

O trabalho de pesquisa foi conduzido em duas etapas distintas, num total de 4 experimentos. A primeira etapa constou de dois experimentos, realizados no laboratório de bioquímica do Departamento de Química, para determinar atividade enzimática da fitase em diferentes formas de armazenamento. A segunda etapa constou de mais dois experimentos, realizados no Setor de avicultura do Departamento de Zootecnia, para determinar o efeito de níveis de fitase na biodisponibilidade de cálcio e fósforo em dietas de frangos de corte na fase inicial.

3.2 PRIMEIRA ETAPA: Determinação da atividade enzimática da fitase

As enzimas, por serem proteínas, sofrem modificações parciais e/ou totais de acordo com a forma em que são processadas ou armazenadas, assim, o objetivo deste experimento foi de verificar a estabilidade da fitase nas diferentes formas de armazenamento. A fitase é incubada, em pH e temperatura controlada, juntamente com o substrato sintético, o fitato de sódio, que tem propriedade semelhante ao da molécula natural, gerando um produto fácil de detectar, resultante da ação enzimática (Terra, 1991).

Preparação da enzima pura:

Em 0,5g da enzima Natuphos 5000® - Basf, foram adicionados 25 ml de tampão acetato 0,05 mol.L⁻¹ e colocados em agitação durante 20 minutos a 4°C.

Esse extrato foi utilizado para a realização do ensaio enzimático, após diluição em tampão acetato, para manter 0,1 U de atividade por mililitro da preparação.

Preparação da enzima misturada na ração:

Em 5 g de ração contendo 1 unidade de fitase por grama, foram adicionados 50 ml de tampão acetato 0,05 mol.L⁻¹ e colocados em agitação durante 20 minutos a 4°C. Após a extração, a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo e o filtrado foi utilizado para a realização do ensaio enzimático, após diluição em tampão acetato para manter 0,02 U de atividade por mililitro de preparação.

Preparação da enzima misturada aos suplementos:

A fitase foi misturada aos suplementos conforme descrição no item 3.2.1. Para a extração da fitase misturada aos suplementos, pesaram-se 2,4 g da mistura com suplemento mineral (2000 U) e completou-se o peso para 2kg com uma mistura de milho e soja, na mesma proporção das rações das aves, para manter 1 unidade de fitase por grama. O mesmo procedimento foi utilizado para a extração da fitase do suplemento vitamínico; porém, foram pesados 8,4 g da mistura (2000 U).

A preparação da enzima para a realização do ensaio enzimático foi feita da mesma forma que a utilizada para a preparação da enzima misturada na ração, descrita acima.

Atividade da fitase:

A atividade da fitase foi realizada segundo a metodologia descrita em Engelen et al. (1994). Em 2,0 ml de extrato enzimático contendo 0,1 unidades de fitase (enzima pura) ou 0,02 unidades de fitase (enzima extraída da ração ou de suplementos), foram adicionados 4 ml de substrato (fitato de sódio 0,01 mol.L⁻¹ - Sigma P-3169), preparados em tampão acetato 0,05 mol.L⁻¹ pH 5,5), e os tubos foram colocados em banho maria a 37°C. A reação foi interrompida adicionando-se 4 ml do reagente de cor (Engelen et al., 1994) e a absorbância foi lida a 415 nanômetros.

Em cada determinação, a mistura de reação foi incubada por pelo menos quatro diferentes períodos de tempo. Controles sem enzima (branco de substrato) e sem substrato (branco de enzima) foram incubados do mesmo modo que os tubos experimentais. A atividade calculada foi expressa em µmol de produto formado por minuto (unidades FTU).

3.2.1 PRIMEIRO EXPERIMENTO: Efeito de formas e condições de armazenamento da fitase pura, sobre a atividade da enzima.

O experimento foi realizado durante 112 dias, com o objetivo de avaliar a atividade enzimática da fitase em diferentes formas e condições de armazenamento.

Tratamentos

Os tratamentos consistiram de diferentes formas e condições de armazenamento, conforme listado abaixo:

1. Fitase pura armazenada no congelador a 0 °C;

2. Fitase pura armazenada em temperatura ambiente;
3. Fitase pura armazenada no refrigerador a 4 °C;
4. Fitase misturada ao suplemento mineral, armazenada na temperatura ambiente;
5. Fitase misturada ao suplemento vitamínico, armazenada na temperatura ambiente.

A cada 14 dias, foram retiradas quatro amostras aleatórias de cada lote para avaliar a atividade enzimática da fitase durante o período de armazenamento de 112 dias.

A fitase foi misturada aos suplementos da seguinte forma: 30 g de fitase foram misturadas em 150 gramas de um suplemento mineral e 5 gramas de fitase foram misturadas em 100 gramas de um suplemento vitamínico, a composição dos suplementos encontra-se na Tabela 2 (1º experimento).

Delineamento experimental e análise estatística

Um delineamento inteiramente ao acaso em parcela subdividida, sendo a parcela constituída pelas 5 formas de armazenamento e as sub-parcelas pelo tempo de armazenamento, com quatro repetições por sub-parcela. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o pacote computacional SISVAR (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados), descrito por Ferreira (1998). O modelo estatístico usado para análise dos dados foi:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_{(i)k} + S_i + (AS)_{ij} + e_{(ijk)}$$

onde:

Y_{ijk} = Observação k da atividade enzimática da fitase, no tratamento i e tempo j;

μ = média geral

A_i = efeito do tratamento i, onde $i = 1, 2, 3, 4, 5$;

$D_{(i)k}$ = erro associado às observações na parcela que recebeu o tratamento i na repetição k.; onde $k = 1, 2, 3, 4$;

S_j = efeito do tempo de armazenamento j; onde $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$;

$(AS)_{ij}$ = efeito da interação entre tratamento i e o tempo de armazenamento j;

$e_{(ijk)}$ = erro associado a subparcela que recebeu o tratamento i, no tempo de armazenamento j e na repetição k;

3.2.2 SEGUNDO EXPERIMENTO: Efeito de diferentes formas de mistura da fitase às rações, armazenadas à temperatura ambiente, sobre a atividade da enzima.

O experimento foi realizado durante 56 dias, com o objetivo de avaliar a atividade enzimática da fitase em diferentes formas de armazenamento

Tratamentos

Para avaliar o efeito do armazenamento de diferentes formas de misturas da fitase às rações, à temperatura ambiente, foram elaborados os seguintes tratamentos:

1. Mistura da fitase via suplemento vitamínico;
2. Mistura da fitase diretamente à ração;
3. Mistura da fitase via suplemento mineral;
4. Mistura da fitase diretamente à ração e posteriormente peletizada;

Cinco amostras aleatórias de cada lote foram retiradas, a cada 7 dias, para avaliar a atividade enzimática da fitase ao longo do período de armazenamento de 56 dias.

A ração utilizada neste experimento foi formulada para frangos de corte na fase inicial, segundo as recomendações do NRC (1994). Esta ração foi constituída de milho e farelo de soja e suplementada com calcário, fosfato bicálcico, sal, óleo, DL-metionina e lisina. A fitase foi adicionada à ração de acordo com os tratamentos. Nos tratamentos, 1 e 3, 0,4 g de fitase foram misturadas a 2,0 g do suplemento mineral e oito gramas do suplemento vitamínico, respectivamente (A composição dos suplementos está na Tabela 2 - 2º experimento), e, 5 horas depois, misturadas a 2 kg da ração. Contudo, para os tratamentos 2 e 4, a mesma quantidade de fitase foi misturada diretamente à ração, e no tratamento 4, a mistura foi peletizada. As misturas, assim preparadas, foram acondicionadas, de acordo com os tratamentos, em potes de vidro, no laboratório de bioquímica da UFLA, à temperatura ambiente Figura 2.

Delineamento experimental e análise estatística

Um delineamento inteiramente ao acaso em parcela subdividida, sendo a parcela constituída pelas 4 formas de armazenamento e as sub-parcelas pelo tempo de armazenamento, com cinco repetições por sub-parcela. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o pacote computacional SISVAR (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados), descrito por Ferreira (1998). O modelo estatístico usado para análise dos dados foi:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_{(i)k} + S_j + (AS)_{ij} + e_{(ijk)}$$

onde:

Y_{ijk} = Observação k da atividade enzimática da fitase, no tratamento i e tempo j;

μ = média geral

A_i = efeito do tratamento i, onde $i = 1, 2, 3, 4$;

$D_{(i)k}$ = erro associado às observações na parcela que recebeu o tratamento i na repetição k.; onde $k = 1, 2, 3, 4, 5$;

S_j = efeito do tempo de armazenamento j; onde $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$;

$(AS)_{ij}$ = efeito da interação entre tratamento i e o tempo de armazenamento j;

$e_{(ijk)}$ = erro associado a subparcela que recebeu o tratamento i, no tempo de armazenamento j e na repetição k;

3.3 SEGUNDA ETAPA: Efeito da fitase na biodisponibilidade de cálcio e fósforo em dietas de frangos de corte na fase inicial.

3.3.1 Localização, instalações e equipamentos

A parte experimental de campo, desenvolvida no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Lavras, e constou de 2 experimentos. O galpão experimental de alvenaria, com dimensões de 6 x 8 metros, com paredes laterais de 1,5 m e o restante de telas, com telhado de telhas de cimento-amianto, sem forração na parte inferior. As aves foram alojadas neste galpão em 4 conjuntos de baterias, com 4 andares cada, com 3 gaiolas de 0,9 x

1,0 m por andar, totalizando 48 gaiolas. As gaiolas possuíam lâmpadas para aquecimento e eram construídas com arames e chapas galvanizadas.

3.3.2 Aves e manejo

Para ambos experimentos, utilizaram-se pintos de corte de 1 dia de idade, da linhagem Hubbard, sexados e vacinados contra as doenças de Marek e Boubá aviária. Foram distribuídos 12 pintos por unidade experimental e ao final da primeira semana, foi feita uma seleção, reduzindo o total para 10 pintos. A partir do primeiro dia de idade, as aves receberam as dietas experimentais e água à vontade. Foi mantido um programa de 24 horas de luz natural mais artificial e as temperaturas máxima e mínima, no interior do galpão, foram registradas diariamente às 9 horas.

A ração e o grupo de aves de cada parcela experimental foram pesados no início do experimento e semanalmente até os 21 dias, terminando a fase de coleta de dados para avaliar o desempenho das aves. Para os dois experimentos, foram realizadas coletas das excretas para determinação de cinzas, cálcio e fósforo entre o término do desempenho (21 dias) e o abate das aves (27 dias).

Foram escolhidas, ao acaso, 96 aves, correspondentes a seis e oito repetições de cada tratamento, para o terceiro e quarto experimentos, respectivamente, para serem abatidas. As aves foram pesadas individualmente e aneladas no pé direito, usando anilhas numeradas feitas de alumínio. Após serem sangradas, a tibia direita foi retirada, descarnadas e levadas para o refrigerador, para posteriormente serem preparadas para as análises de acordo com a técnica descrita no item 3.7.4., a seguir.

3.3.3 Análises laboratoriais

As amostras dos ingredientes e das rações foram analisadas no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da UFPA, determinando-se a matéria seca, as cinzas e proteína bruta (AOAC, 1990). As determinações do fósforo foram feitas segundo o prescrito pelo (AOAC, 1990) e por Fick et al. (1976).

3.3.4 Parâmetros avaliados

Para avaliar os experimentos, utilizaram-se os seguintes parâmetros:

3.3.4.1 Consumo de ração

A medida de consumo de ração foi feita, a cada 7 dias, pela diferença entre as pesagens da ração fornecida e sobra nos comedouros das unidades experimentais. No final da 3ª semana foi calculado o consumo acumulado médio por ave.

3.3.4.2 Ganho de peso

O controle do aumento de peso foi feito, a cada 7 dias, pela pesagem do grupo de aves das unidades experimentais. Foi calculado o ganho médio por ave por semana, e no final de 3ª semana foi calculado o ganho de peso médio acumulado por ave.

3.3.4 3 Conversão alimentar

A conversão alimentar foi calculada para cada semana e acumulada na 3ª semana, utilizando-se o consumo e o ganho de peso semanais das unidades experimentais.

3.3.4.4 Teores de cinzas, cálcio e fósforo nas tíbias.

As tíbias retiradas das aves no 27º dia de idade, conforme descrito no item 3.5., foram colocadas em uma panela de alumínio e fervidas até amolecer os resíduos de carne. Em seguida, foram lavadas em água fria e com auxílio de uma escova para retirada dos resíduos de carne, a fibula e a cartilagem proximal. Após a secagem a 100 °C por aproximadamente 16 horas, foram colocadas em um frasco de vidro com boca larga e tampa hermética, juntamente com éter etílico para serem desengorduradas. Durante 5 dias o éter do frasco foi trocado pela manhã e à tarde. Este processo foi repetido até não se observarem resíduos de gordura no éter, concluindo que os ossos estavam desengordurados. Após evaporar-se o éter, a anilha de cada osso foi retirada e seu número escrito no próprio osso usando um lápis com grafite comum.

Foi feita uma nova secagem a 105 °C, e após esfriarem em dessecador as tíbias, estas foram pesadas individualmente em balança de precisão. Posteriormente, as tíbias foram trituradas em almofariz, secas a 105 °C, pesadas e incineradas a 550 °C por cerca de 8 horas, sendo novamente pesadas e determinada a porcentagem de cinzas. Após a incineração, foi feita a digestão das cinzas com 10 ml de HCl concentrado em chapa aquecida a 200 °C. A solução assim obtida foi filtrada em papel de filtro quantitativo para um balão volumétrico de 250 ml, completando o volume com água destilada e deionizada.

Esta solução foi utilizada para determinar o teor de fósforo por colorimetria e cálcio por espectrofotometria de absorção atômica, segundo o AOAC (1990).

Os teores de fósforo e cálcio foram calculados de duas maneiras:

(1) em relação ao peso da tibia seca e (2) em relação ao peso das cinzas da tibia. Como os resultados do segundo método tiveram resultados coerentes com a literatura, deu-se preferência para apresentar os resultados com base nas cinzas dos ossos.

3.3.4.5 Teores de cinzas, cálcio e fósforo nas excretas

Foram pesadas 2 g de excretas, secas a 105 °C em cadinho de porcelana, e colocadas em mufla a 550 °C, por 4 horas, determinando-se o teor de cinzas. A digestão das cinzas foi feita com adição de 10 ml de ácido clorídrico concentrado, em chapa aquecida a 200 °C. As amostras frias foram filtradas para balões volumétricos de 50 ml, completando-se o volume com água destilada. Desta solução foi determinado o teor de fósforo por colorimetria e cálcio por espectrofotometria de absorção atômica, segundo o AOAC (1990).

3.4 TERCEIRO EXPERIMENTO: Efeito da fitase na biodisponibilidade de fósforo em dietas de frangos de corte na fase inicial

O experimento foi realizado para avaliar o desempenho (1 a 21 dias de idade das aves) e o abate foi feito no 27º dia de idade das aves, para retirada de amostras de tecidos.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso com três repetições, e os tratamentos arranjados em esquema fatorial 2 x 3 x 2 + 4 tratamentos adicionais, sendo dois níveis de fósforo total (0,35 e 0,45%) x 3 níveis de fitase (500, 750 e 1000 FTU) x sexo, e os 4 tratamentos adicionais consistindo das dietas com 0,45% e 0,35% de fósforo disponível para cada sexo, configurando-se os seguintes tratamentos:

1. Dieta basal com 0,45 % fósforo total e 500 FTU.
2. Dieta basal com 0,45 % fósforo total e 750 FTU.
3. Dieta basal com 0,45 % fósforo total e 1000 FTU.
4. Dieta basal com 0,35 % fósforo total e 500 FTU.
5. Dieta basal com 0,35 % fósforo total e 750 FTU.
6. Dieta basal com 0,35 % fósforo total e 1000 FTU.
7. Dieta basal com 0,45% de fósforo disponível e 0 FTU.
8. Dieta basal com 0,35% de fósforo disponível e 0 FTU.

Os dados foram analisados através do pacote computacional SAS (*SAS User's guide: statistics*) e as médias de tratamentos, de acordo com o teste de t, através do pacote computacional SISVAR (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados), descrito por Ferreira (1998).

O modelo estatístico usado para analisar os dados do experimento foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + F_j + S_k + PF_{(ij)} + PS_{(ik)} + FS_{(jk)} + PFS_{(ijk)} + C_{(ii)} + e_{ijkl}$$

onde:

Y_{ijkl} = Observação l do nível de fósforo i , com o nível j de fitase e no sexo k ;

μ = Média geral;

P_i = efeito do nível de fósforo total i , onde $i = 1$ e 2 ;

F_j = efeito do nível de fitase j , onde $j = 1, 2$ e 3 ;

S_k = efeito do sexo k , onde $k = 1$ e 2 ;

$PF(ij)$ = efeito da interação entre o nível i de fósforo total e nível j de fitase;

$PS(ik)$ = efeito da interação entre o nível i de fósforo total e sexo k ;

$FS(jk)$ = efeito da interação entre o nível j de fitase e sexo k ;

$PFS(ijk)$ = efeito da interação entre o nível i de fósforo total, nível j de fitase e sexo k ;

$C(ii)$ = contraste entre os tratamentos com níveis de fósforo disponível e de fósforo total i para o sexo k ;

$e(ijkl)$ = erro associado a cada observação.

3.5 QUARTO EXPERIMENTO: Efeito da fitase na biodisponibilidade de cálcio em dietas de frangos de corte na fase inicial.

O experimento foi realizado para avaliar o desempenho (1 a 21 dias de idade das aves) e o abate foi feito no 27^º dia de idade das aves, para retirada de amostras de tecidos.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso, com quatro repetições, e os tratamentos em arranjo fatorial $3 \times 4 \times 2$, sendo três níveis de

fitase (0,500 e 1000 FTU) x quatro níveis de cálcio (0,7, 0,8, 0,9 e 1,0%) x sexo, configurando-se os seguintes tratamentos:

1. Dietas basal 0,7% de cálcio sem fitase.
2. Dieta basal 0,8% de cálcio sem fitase.
3. Dieta basal 0,9% de cálcio sem fitase.
4. Dieta basal 1,0% de cálcio sem fitase.
5. Dieta basal com 0,7% de cálcio e 500 FTU.
6. Dieta basal com 0,8% de cálcio e 500 FTU.
7. Dieta basal com 0,9% de cálcio e 500 FTU.
8. Dieta basal com 1,0% de cálcio e 500 FTU.
9. Dieta basal com 0,7% de cálcio e 1000 FTU.
10. Dieta basal com 0,8% de cálcio e 1000 FTU.
11. Dieta basal com 0,9% de cálcio e 1000 FTU.
12. Dieta basal com 1,0% de cálcio e 1000 FTU.

Os dados foram analisados através do pacote computacional SISVAR (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados), descrito por Ferreira (1998).

O modelo estatístico usado para analisar os dados do experimento foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + F_j + S_k + CF_{(ij)} + CS_{(ik)} + FS_{(jk)} + SFC_{(ijk)} + e_{ijkl}$$

onde:

Y_{ijkl} = Observação l do nível de cálcio i, com o nível j de fitase e no sexo k

μ = Média geral;

C_i = efeito do nível i de cálcio, onde $i = 1, 2, 3, 4$;

F_j = efeito do nível j de fitase, onde $j = 1, 2, 3$;

S_k = efeito do sexo k , onde $k = 1, 2$;

$CF(ij)$ = efeito da interação entre o nível i de cálcio e nível j de fitase;

$CS(ik)$ = efeito da interação entre o nível i de cálcio e sexo k ;

$FS(jk)$ = efeito da interação entre o nível j de fitase e sexo k ;

$CFS(ijk)$ = efeito da interação entre o nível i de cálcio, nível j de fitase e sexo k ;

$e(ijk)$ = erro associado a cada observação.

3.6 Dietas experimentais

As dietas isocalóricas e isoproteicas, para o 3 e 4º experimento da segunda etapa (Tabelas 3 e 4), foram formuladas à base de milho e farelo de soja, suplementadas com vitaminas, minerais e aditivos seguindo as recomendações de Rostagno, Barbarino Jr e Barboza (1996), com exceção do fósforo e cálcio.

No terceiro experimento, os tratamentos constaram de dietas contendo 500, 750 e 1000 FTU/kg de dieta, cada uma com 0,35 % e 0,45% de fósforo total e de dietas testemunhas sem adição de fitase, com 0,35% e 0,45% de fósforo disponível. Houve adição de fosfato bicálcico para completar as exigências de fósforo quando foi necessário. Nas dietas com fitase, todo o fósforo do milho e do farelo de soja foi considerado disponível. O cálcio foi mantido em 0,9 %.

No quarto experimento, os tratamentos constaram de uma dieta basal (sem fitase) e de dietas com níveis de 500 e 1000 FTU/g aplicadas em quatro níveis de cálcio, 0,7, 0,8, 0,9 e 1,0%. Foi mantido em 0,45% o fósforo disponível.

Nas Tabelas 1 a 4 são mostradas, respectivamente a composição dos ingredientes, dos suplementos mineral e vitamínico e a composição das dietas experimentais utilizadas no 3º e 4º experimentos.

TABELA 1. Composição dos ingredientes utilizados nas dietas.

Ingredientes	E.M. kcal/kg	P.B. %	Met %	M+C %	Lis. %	P _i %	Ca %
Milho grão ¹	3350*	7.8	0.20*	0.35*	0.24*	0.22	0.02
Milho grão ²	3350*	8.78	0.20*	0.35*	0.24*	0.26	0.03
Farelo de soja ¹	2230*	48.65	0.65*	1.34*	2.93*	0.66	0.32
Farelo de soja ²	2230*	45.86	0.65*	1.34*	2.93*	0.61	0.41
Óleo de soja	8800*	--	--	--	--	--	--
Fosf. Bicálcico ¹	--	--	--	--	--	18.97	22.55
Fosf. Bicálcico ²	--	--	--	--	--	19.70	23.71
Calcário ¹	--	--	--	--	--	--	39.86
Calcário ²	--	--	--	--	--	--	39.86
Metionina-DL	--	--	98.0 ¹	--	--	--	--
Sal (NaCl)	--	--	--	--	--	--	--

* Retirados da tabela do NRC (1994); os demais foram determinados em laboratório. ¹e²/ 3º Experimento e 4º Experimentos, respectivamente.

TABELA 2. Composição do suplemento mineral e vitamínico dos experimentos.

Ingredientes	Unidade	1, 2 e 3º EXPERIMENTOS		4º EXPERIMENTO	
		Quantidade por kg do produto	Enriquecimento por kg de ração	Quantidade por kg do produto	Enriquecimento por kg de ração
Vitamina A	UI	3.500.000,000	14,000	1.600.000,000	8,000
Vitamina D ₃	UI	625.000,000	2,500	500.000,000	4,000
Vitamina E	mg	6.250,000	25,0	3.200,000	16,0
Vitamina K ₃	mg	750,000	3,0	400,000	2,0
Tiamina B ₁	mg	500,000	2,0	300,000	1,5
Riboflavina B ₂	mg	1.250,000	5,0	800,000	4,0
Piridoxina B ₆	mg	1.000,000	4,0	400,000	2,0
B ₁₂	mg	6,250	0,025	3.000,000	0,015
Ácido nicotínico	mg	8.750,000	35,0	6.000,000	30,0
Ácido pantotênico	mg	3.000,000	12,0	2.200,000	11,0
Biotina	mg	25,000	0,100	10,000	0,050
Ácido fólico	mg	250,000	0,1	100,000	0,5
Vitamina C	mg	12.500,000	50,0	-	-
Colina	mg	200.000,000	800	90.000,000	450
Metionina	mg	450.000,000	1.800	360.000,000	1.800
Antioxidante	mg	125,000	0,5	6.000,000	30,0
Promotor de crescimento	mg	5.000,000	20	2.000,000	10
Anticoccidiano	mg	100.000,000	400	20.000,000	100
Selênio	mg	180	0,18	60	0,3
Iôdo	mg	700	0,7	120	0,6
Ferro	mg	50.100	50,1	12.000	60,0
Cobre	mg	10.000	10,0	1.600	8,0
Manganês	mg	78.000	78,0	14.000	70,0
Zinco	mg	55.000	55,0	10.000	50,0

TABELA 3. Composição das dietas do 3º experimento

Ingredientes	Dietas experimentais							
	0,45% P/FTU			0,35% P/FTU			0,45% P _{disp.}	0,35% P _{disp.}
	500	750	1000	500	750	1000	Sem fitase	Sem fitase
Milho moído	548,9	548,9	548,9	584,9	584,9	584,9	584,9	584,9
Farelo de soja	354,2	354,2	354,2	354,2	354,2	354,2	354,2	354,2
Sal (NaCl)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Suplemento. mineral ¹	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Suplemento. vitamínico. ²	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Óleo de soja	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0
DL-metionina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lisina	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Calcário	17,1	17,1	17,1	20,6	20,6	20,6	8,6	12,0
Fosfato. bicálcico	5,7	5,7	5,7	-	-	-	19,6	13,7
Caulin	5,3	5,25	5,20	7,5	7,45	7,40	-	2,3
Fitase	0,10	0,15	0,20	0,10	0,15	0,20	-	-
TOTAL	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
NUTRIENTES								
Energia metabolizável (kcal/kg)	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Proteína bruta (%)*	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13
Metionina+cistina (%)	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881
Lisina (%)	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165
Triptofano (%)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Fósforo total (%)*	0,45	0,45	0,45	0,35	0,35	0,35	0,684	0,587
Fósforo disponível calculado (%)	0,22	0,22	0,22	0,12	0,12	0,12	0,45	0,35
Cálcio (%)*	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,09	0,90

* Determinados em laboratório; os demais foram calculados.

TABELA 4. Composição das dietas do 4º experimento

Ingredientes	Dietas experimentais											
	Sem fitase				500 FTU				1000 FTU			
	0,7% Ca	0,8% Ca	0,9% Ca	1,0% Ca	0,7% Ca	0,8% Ca	0,9% Ca	1,0% Ca	0,7% Ca	0,8% Ca	0,9% Ca	1,0% Ca
Milho moído	579,86	579,86	579,86	579,86	579,86	579,86	579,86	579,86	579,86	579,86	579,86	579,86
Farelo de soja	355,16	355,16	355,16	355,16	355,16	355,16	355,16	355,16	355,16	355,16	355,16	355,16
Sal	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Suplemento ¹	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo	23,72	23,72	23,72	23,72	23,72	23,72	23,72	23,72	23,72	23,72	23,72	23,72
DL-met.	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Lisina	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16
Calcário	3,167	5,869	8,572	11,1	3,167	5,869	8,572	11,16	3,167	5,869	8,572	11,06
Fosfato bicálcico	19,61	19,61	19,61	19,61	19,61	19,61	19,61	19,61	19,61	19,61	19,61	19,61
Caulin	8,093	5,391	2,688	-	7,993	5,291	2,588	-	7,893	5,191	2,488	-
Fitase	-	-	-	-	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,20	0,20	0,20
TOTAL	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
NUTRIENTES												
E.M. (kcal/kg)	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000
P.B (%)*	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13	21,13
Met.+cis. (%)	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881	0,881
Lisina (%)	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165	1,165
Triptofano (%)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Fósforo total (%)*	0,6858	0,6858	0,6858	0,6858	0,6858	0,6858	0,6858	0,6858	0,6858	0,6858	0,6858	0,6858
Fósforo disp. (%)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Calcio (%)*	0,7	0,8	0,9	1,0	0,7	0,8	0,9	1,0	0,7	0,8	0,9	1,0

* Determinados em laboratório; os demais foram calculados. 1/ Suplemento mineral e vitamínico (Tabela 2 - 4º experimento).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRIMEIRA ETAPA: Determinação da atividade enzimática da fitase

4.1.1 PRIMEIRO EXPERIMENTO: Efeito de formas e condições de armazenamento da fitase pura, sobre a atividade da enzima.

Os valores médios de atividade enzimática da fitase no primeiro experimento estão na Tabela 5 e a análise de variância no anexo A. A temperatura ambiente apresentou médias de 21,8 e 27,7 °C para as mínimas e máximas, respectivamente. A temperatura mínima no período foi de 19 °C e a máxima, de 31 °C. As amplitudes foram uniformes (Figura 2).

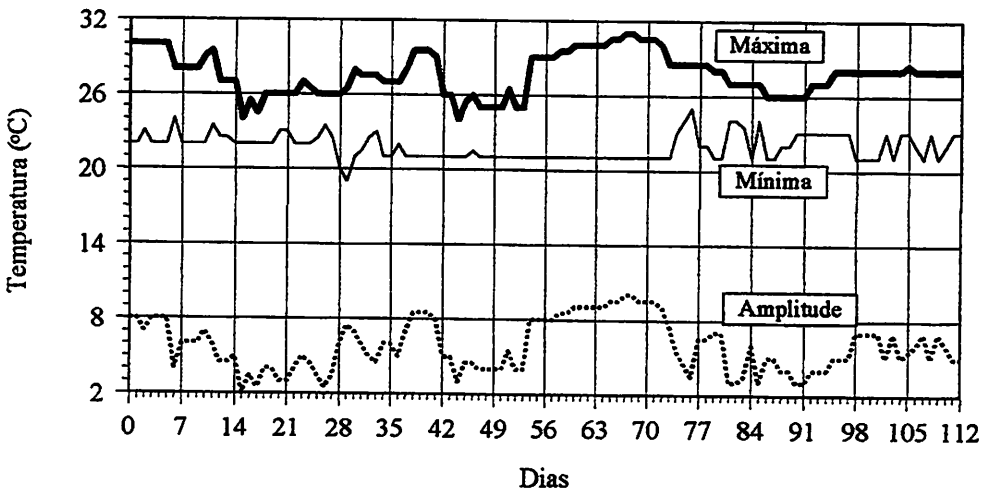


FIGURA 2. Temperatura ambiente no interior do laboratório de bioquímica durante a avaliação do 1º e 2º experimentos da primeira etapa.

TABELA 5 - Valores médios de atividade da fitase (FTU/g) no primeiro experimento.

Tempo (dias)	Atividade da fitase (FTU/g) no armazenamento				
	Fitase pura			Fitase misturada ao Suplemento	
	0 °C	4 °C	T° ambiente	Mineral	Vitamínico
0	5416 ^a	5108 ^b	5059 ^b	4839 ^c	5190 ^b
14	5279 ^a	5038 ^b	5094 ^b	4645 ^c	4629 ^c
28	5258 ^a	5064 ^b	5010 ^b	4478 ^c	4064 ^d
42	5244 ^a	5054 ^b	4993 ^b	4199 ^c	3818 ^d
56	5205 ^a	5053 ^b	4986 ^b	4148 ^c	3603 ^d
70	5138 ^a	5031 ^{ab}	4928 ^b	3818 ^c	3411 ^d
84	5092 ^a	5015 ^{ab}	4922 ^b	3517 ^c	3331 ^d
98	5079 ^a	4925 ^c	4758 ^b	3188 ^d	3279 ^d
112	4876 ^a	4830 ^a	4669 ^b	2753 ^d	3244 ^c
Média	5177 ^a	5013 ^b	4935 ^c	3954 ^d	3841 ^e

MÉDIA GERAL 4584 FTU/g

COEF. DE VARIAÇÃO DA FORMA DE ARMAZENAMENTO: 1.94%

COEF. DE VARIAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO: 1.45%

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Houve interação significativa entre a forma e tempo de armazenamento ($P < 0,05$) sobre a atividade enzimática da fitase. O teste de tukey mostrou que, na média, a fitase pura, armazenada em diferentes temperaturas, mostrou-se superior quando comparada aos tratamentos em que a elas foram misturadas aos suplementos mineral e vitamínico, e armazenada em temperatura ambiente. A atividade enzimática da fitase armazenada a zero °C apresentou maiores valores de atividade quando comparada aos demais os tratamentos. Os resultados obtidos neste experimento confirmam os de Swick e Ivey (1992), quando afirmam que a efetividade do uso da fitase e sua estabilidade dependem da forma de armazenamento e do processamento aos quais é submetida.

Cowan (1993), explicando o processo de produção, distribuição e aplicação de enzimas às rações, afirmou que a atividade enzimática é mantida por três meses em produtos líquidos e até seis meses em forma de pó em temperaturas menores que 25 °C. Quando a enzima é misturada à ração, a atividade pode ser mantida, no mínimo, por três meses.

A queda na atividade da fitase armazenada em suplementos pode ser explicada pela presença de substâncias higroscópicas como o sulfato de ferro, sulfato de zinco, cloreto de colina e cloreto de sódio, que possuem efeitos adversos na estabilidade da fitase (BASF, 1996). O pH da colina é bastante alto em relação às demais vitaminas, o que pode provocar efeitos cáusticos, afetando ainda mais a atividade da fitase (Islabão, 1982 e Combs Jr, 1992).

Segundo o fabricante desta enzima, as possíveis soluções seriam proteger a mistura da absorção de água usando somente elementos traço com baixo conteúdo de água de cristalização e armazená-la nestas condições por pouco tempo (2 a 4 semanas); preparar o suplemento sozinho e/ou trabalhar com dois tipos de suplementos, como exemplo um com os elementos traço contendo alto teor de água de cristalização, cloreto de colina, etc, e outro contendo as enzimas, vitaminas, promotores de crescimento, aminoácidos, etc, evitando, assim, perda da atividade da enzima.

A Figura 3 mostra o efeito linear decrescente sobre o tempo de armazenamento da fitase ($P < 0,05$) para o tratamento em que a enzima pura foi armazenada a zero °C. Efeitos quadráticos foram observados nos demais tratamentos. As perdas nas atividades foram de 9,97%; 5,44%; 7,71%; 43,11% e 37,49% para fitase pura armazenada a zero °C, 4 °C, temperatura ambiente, fitase armazenada ao suplementos mineral e fitase armazenada ao suplemento vitamínico, respectivamente. Os resultados obtidos indicaram que a fitase

armazenada na forma pura em diferentes temperaturas apresentou menores perdas de atividade ao longo do tempo de armazenamento quando comparada aos tratamentos em que foi misturada aos suplementos mineral e vitamínico e armazenada a temperatura ambiente.

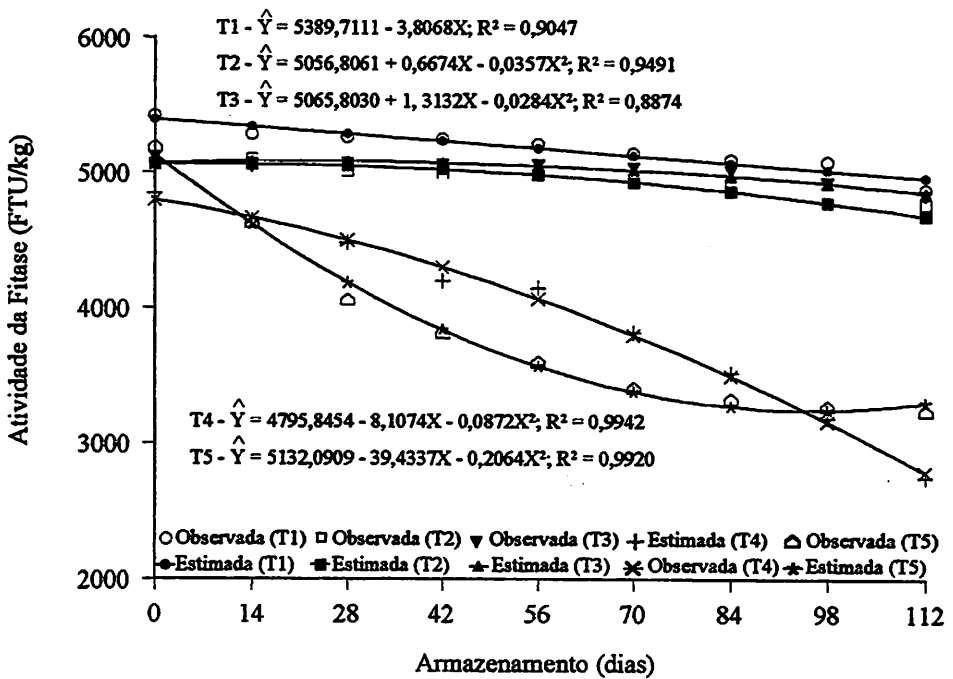


FIGURA 3. Atividade enzimática da fitase em função do tempo de armazenamento de acordo com os tratamentos.

4.1.2 SEGUNDO EXPERIMENTO: Efeito de diferentes formas de mistura da fitase às rações, armazenadas à temperatura ambiente, sobre a atividade da enzima.

Os valores médios de atividade enzimática da fitase no segundo experimento são apresentados na tabela 6 e a análise de variância no anexo A. A temperatura ambiente apresentou médias de 21,7 e 27,1 °C para as mínimas e máximas, respectivamente. A temperatura mínima no período foi de 19 °C e a máxima de 31 °C. As amplitudes foram uniformes (Figura 2).

TABELA 6 - Valores médios de atividade da fitase (FTU/kg) no segundo experimento.

Tempo (dias)	Atividade da fitase no armazenamento (FTU/kg)			
	Fitase misturada aos suplementos e após 5 horas à ração		Fitase misturada diretamente à ração	
	Mineral	Vitamínico	Farelada	Farelada e após peletizada
0	5140	4930	5014	2184
7	5054	4496	4900	2130
14	4831	4398	4863	1999
21	4825	4376	4856	1988
27	4581	4363	4949	1954
35	4564	4202	4796	1930
42	4515	4192	4683	1793
49	4439	4139	4657	1780
56	4439	4073	4644	1779
Média	4710 ^a	4352 ^b	4818 ^a	1949 ^c

MÉDIA GERAL 3957 FTU/kg

COEF. DE VARIAÇÃO DA FORMA DE ARMAZENAMENTO: 7.47 %

COEF. DE VARIAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO: 6.32 %

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Não houve interação significativa entre tempo e forma de armazenamento, entretanto, a forma e o tempo de armazenamento influenciaram a atividade enzimática da fitase ($P < 0,05$). O teste de tukey mostrou que a fitase misturada diretamente à ração e a fitase misturada ao suplemento mineral e após 5 horas misturada diretamente à ração apresentaram atividades enzimáticas superiores aos demais tratamentos.

Comparando-se os tratamentos aos quais a fitase foi misturada diretamente à ração, observa-se que a peletização provocou perda significativa de 56,44% da atividade enzimática inicial quando comparada à fitase misturada diretamente à ração e armazenada à temperatura ambiente. Estes resultados confirmam os encontrados por Simons et al. (1990), quando testaram o efeito da peletização em rações. Estes autores observaram que o aumento da temperatura de condicionamento de 50 para 60 °C e da peletização de 78 para 87 °C provocou perda significativa na atividade original que era de 250 FTU/kg de ração para 115 FTU/kg de ração, correspondendo a uma redução na atividade de 54%.

Contradizendo estas afirmações, Newman (1991), citado por Zanini (1997), verificou que a fitase perdeu apenas 16% de sua atividade original quando peletizada a 90 °C por 30 minutos, mostrando que a fitase possui boa estabilidade.

A recomendação para o armazenamento da fitase é de 4 meses em locais secos e frescos após a sua produção. Em rações fareladas, observaram-se perdas de até 10 a 15% em rações de poedeiras, armazenadas por 4 meses em temperatura ambiente. Durante a peletização, a perda da atividade inicial é esperada e dependente da temperatura, quantidade e tipo de vapor e tipo de pelete (comprimento e diâmetro) (BASF, 1996).

As temperaturas dos grãos após peletização excedem 55 °C e as dos peletes, 75 °C, causando um estresse hidrotérmico grande, podendo desnaturar a fitase, proteínas e outras enzimas. Aconselha-se, sob estas condições, pulverizar a fitase (5000 L líquida) sobre os peletes; esta permanecerá estável por 4 meses, armazenada em temperaturas frias (BASF, 1996). É aconselhável investigar a perda da atividade da fitase sob condições de peletização, já que muitas controvérsias ainda existem a este respeito.

A análise de regressão para tempo de armazenamento, em relação às formas de armazenamento, indicou efeitos lineares decrescentes ao longo dos 56 dias de avaliação ($P < 0,05$) (Figura 4). Pode-se observar que as perdas nas atividades enzimáticas da fitase ao longo dos 56 dias, foram de 7,38%; 13,64%; 17,38% e 18,54% para fitase misturada diretamente à ração, fitase misturada ao suplemento mineral e após 5 horas à ração, fitase misturada ao suplemento vitamínico e após 5 horas à ração e fitase misturada diretamente à ração e esta posteriormente peletizada, respectivamente.

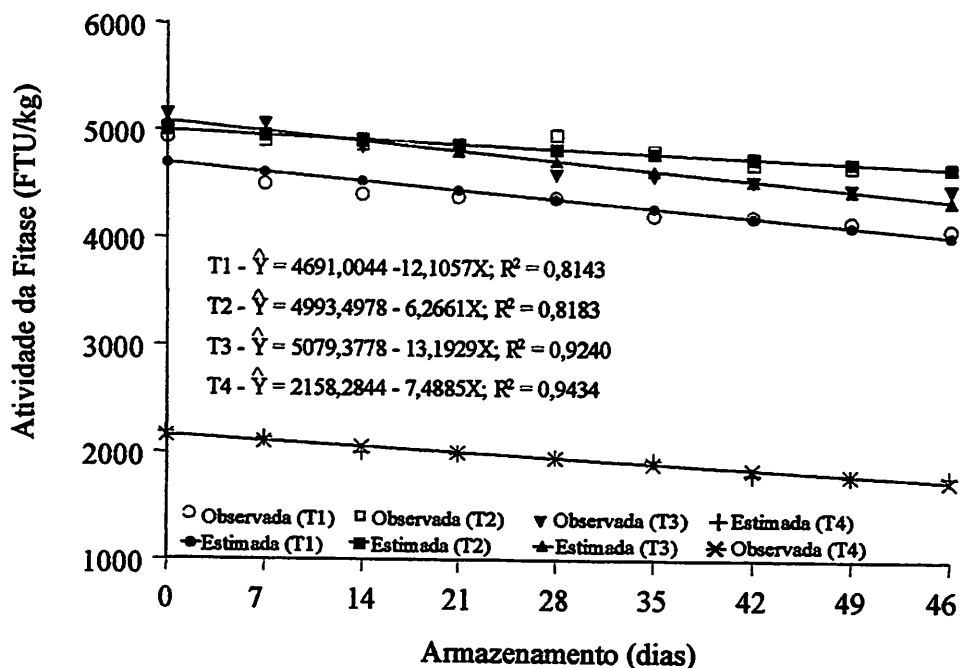


FIGURA 4. Atividade enzimática da fitase em função do tempo de armazenamento de acordo com os tratamentos.

4.2 SEGUNDA ETAPA: Efeito da fitase na biodisponibilidade de cálcio e fósforo em dietas de frangos de corte na fase inicial

4.2.1 Resultados do terceiro experimento: Avaliação do desempenho

Os valores médios em ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, aos 21 dias de idade das aves, são apresentados na tabela 7 e 8. As análises de variância são mostrados no anexo B. As condições ambientais foram normais, com médias de 19,4 e 34,4 °C para as temperaturas mínimas e máximas,

respectivamente. A temperatura mínima no período foi de 15 °C e a máxima de 38 °C. Houve muita variação nas amplitudes (Figura 5).

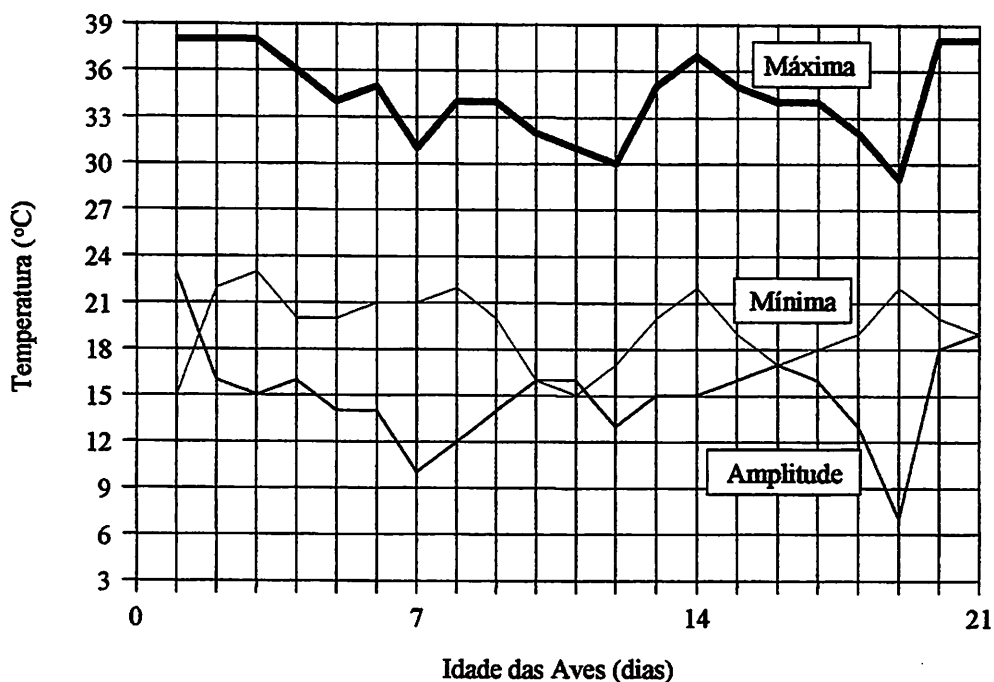


FIGURA 5. Temperaturas no interior da sala experimental durante a realização do 3º experimento.

TABELA 7. Médias do ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar dos frangos no período de 1 a 21 dias de idade, observados durante o 3º experimento.

Fítase	Ganho de peso (g)		Consumo de ração (g)		Conversão alimentar	
	0,35%	0,45%	0,35%	0,45%	0,35%	0,45%
500	273 ^{bb}	628 ^{aa}	530 ^{bb}	871 ^{aa}	1,95 ^{bb}	1,39 ^{aa}
750	382 ^{bb}	655 ^{aa}	606 ^{bb}	910 ^{aa}	1,62 ^{aa}	1,39 ^{aa}
1000	575 ^{ab}	658 ^{aa}	799 ^{ab}	904 ^{aa}	1,40 ^{aa}	1,38 ^{aa}
Macho	549 ^a		779 ^a		1,57 ^a	
Fêmea	507 ^b		761 ^a		1,47 ^a	
Média geral	571		816		1,48	
CV (%)	7,31		11,82		15,11	

Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha e minúsculas nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de t de Student.

TABELA 8. Médias do ganho de peso, consumo da dieta e conversão alimentar dos frangos no período de 1 a 21 dias de idade, observados nos contrastes, durante o 3º experimento.

Contrastes	Ganho de peso (g)		Consumo da dieta (g)		Conversão alimentar		
	Pd ¹	Pt ²	Pd	Pt	Pd	Pt	
0,45%	C:1Macho	722,88 ^a	673,95 ^a	963,74 ^a	925,55 ^a	1,41 ^a	1,34 ^a
	C:2Fêmea	677,22 ^a	619,63 ^a	924,96 ^a	864,05 ^a	1,37 ^a	1,40 ^a
0,35%	C:1Macho	696,45 ^a	424,74 ^b	985,63 ^a	632,82 ^b	1,41 ^a	1,57 ^b
	C:2Fêmea	697,31 ^a	395,00 ^b	953,02 ^a	657,13 ^b	1,37 ^a	1,74 ^b

Médias com letras diferentes minúsculas na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de t de Student.

1 e 2/ Fósforo disponível e fósforo total, respectivamente.

a) GANHO EM PESO: A análise de variância indicou interação significativa entre os níveis de fósforo total e níveis de fitase ($P < 0,05$) para ganho de peso (Tabela 7). Efeitos significativos foram observados para sexo ($P < 0,05$). Segundo o teste de t de Student, os machos ganharam mais peso que as fêmeas; a suplementação dos três níveis de fitase, em 0,45% de fósforo total, não apresentou resultados significativos, mas no nível 0,35% de fósforo total, conforme o nível de fitase foi aumentado, os valores de ganho de peso também se elevaram, alcançando os maiores valores com o nível 1000 FTU.

Os resultados observados neste experimento (Tabela 7) assemelham-se aos encontrados por Munaro et al. (1996a), que afirmam que os machos tiveram maior ganho de peso que as fêmeas e que o melhor nível de fitase para este parâmetro foi o 1000 FTU/kg, contradizendo os resultados de Simons et al. (1990) e Farrel, Martin e Farrel (1993), que indicaram que a adição de níveis crescentes de fitase não provoca aumento ou diminuição linear de ganho de peso.

Não ocorreram diferenças significativas no ganho de peso quando o nível 0,45% de fósforo disponível contra 0,45% de fósforo total foram utilizados, nos dois sexos; entretanto, quando o nível de 0,35% de fósforo disponível contra 0,35% de fósforo total foi utilizado, efeitos significativos foram observados, tanto para machos como para fêmeas ($P < 0,05$) (Tabela 8). Considerando-se que a diferença entre as dietas era a presença ou não da fitase, admite-se que a sua suplementação na ração liberou eficientemente o fósforo fítico das dietas à base de milho e soja, sem prejudicar o ganho de peso, concordando com resultados de Munaro (1993).

Simons e Versteegh (1990) avaliaram a suplementação de níveis de fitase a dietas com níveis reduzidos de fósforo sobre o desempenho e a excreção de fósforo em pintos de corte com 1 a 24 dias de idade. Verificaram que no nível

0,45%', em relação ao 0,75% de fósforo total sem suplementação de fitase, o desempenho foi afetado. Quando o nível 0,45% de fósforo total recebeu níveis crescentes de fitase, uma melhora significativa no ganho de peso foi observada. Estes autores concluíram que 750 U de fitase/kg em 0,45% de fósforo total proporciona desempenho equivalente ao tratamento 0,75% de fósforo total sem fitase.

Munaro et al. (1996b) testaram níveis crescentes de fitase no aproveitamento do fósforo fítico do milho, farelo de soja e farelo de arroz desengordurado, em substituição total do fosfato bicálcico, em rações de frangos de corte. As dietas foram formuladas substituindo o milho pelo farelo de arroz desengordurado nas proporções 10% e 15%, com níveis crescentes de suplementação de fitase (500, 750 e 1000 FTU/kg). Duas testemunhas foram utilizadas, sendo uma dieta sem farelo de arroz desengordurado, contendo 750 FTU/kg de ração, e outra sem farelo de arroz desengordurado e sem fitase. Os resultados observados mostraram que a inclusão dos níveis de farelo de arroz desengordurado e de fitase não prejudicaram o desempenho dos frangos e nem diminuíram os teores de fósforo nas tíbias e no plasma sanguíneo, com redução significativa nos teores de fósforo excretado.

Em outro experimento, Munaro et al. (1996c), substituindo totalmente o fosfato bicálcico pela fitase nos níveis 250, 500, 750, 1000 e 1250 FTU/kg de ração e por farelo de arroz, determinaram o nível adequado de fitase (FTU/kg) a ser utilizado em rações de frangos de corte. Observaram que os maiores níveis de fitase (1000 e 1250 FTU/kg de ração) foram benéficos para os frangos durante 5 semanas, coincidindo com a fase de maior necessidade dietética por fósforo. As rações contendo 15% de farelo de arroz desengordurado e fitase promoveram desempenho semelhante ao de rações comercialmente disponíveis.

Lima (1995) e Brugalli (1996), utilizando dietas com diferentes níveis de fósforo disponível (0,15, 0,25, 0,35, 0,45 e 0,55%) e 3000 kcal EM/kg, para pintos de 1 a 21 dias criados com separação de sexo, verificaram que o nível 0,45% de fósforo disponível apresentou o melhor desempenho.

Runho (1998) citado por Rostagno e Silva (1998), obteve as estimativas de exigência de fósforo disponível através de modelos de regressão quadrática e linear response plato (LRP), utilizando os parâmetros de ganho de peso, conversão alimentar e resistência da tibia à quebra. Estabeleceu, assim, a exigência de 0,45% de fósforo disponível para pintos de 1 a 21 dias de idade recebendo dietas contendo 3000 kca EM/kg.

b) CONSUMO DE RAÇÃO: A análise de variância não indicou efeitos significativos para sexo no consumo de ração, mas observou-se interação significativa entre os níveis de fósforo e níveis de fitase ($P < 0,05$). Não ocorreram diferenças significativas quando os três níveis de fitase foram suplementados em 0,45% de fósforo total, mas no nível 0,35% de fósforo total, os níveis 500 e 750 foram inferiores ao 1000 FTU/kg, segundo mostrou o teste de t de Student. Ainda, o nível 0,45% de fósforo total apresentou maiores consumos que 0,35% de fósforo total, em todos os níveis de suplementação de fitase. Neste experimento, o maior consumo de dieta ocorreu no nível 1000 FTU/kg, indicando a necessidade de ingestão de maior quantidade de fósforo pelo organismo.

Na Tabela 8, pode-se observar que no consumo da dieta, no contraste 0,45% de fósforo disponível, contra 0,45% de fósforo total, não foram observados efeitos significativos para nenhum dos sexos. Considerando-se que a diferença entre as dietas no nível 0,45% de fósforo era a presença ou não da fitase, admite-se que a sua suplementação nas dietas liberou eficientemente o fósforo fítico das dietas à base de milho e soja, sem prejudicar o desempenho;

entretanto, quando o nível 0,35% de fósforo disponível foi comparado ao 0,35% de fósforo total, o consumo de dieta foi afetado ($P < 0,05$); assim, machos e fêmeas alimentados com dietas em fósforo disponível apresentaram maior consumo. A deficiência de fósforo nas dietas causa perda do apetite nas aves, resultando em menor consumo de ração quando comparado as dietas com níveis de fósforo mais elevados Scott, Nesheim e Young (1982).

Souza (1992) e Munaro et al. (1996b), não encontraram diferenças significativas no consumo de ração em todos os tratamentos, apenas que no nível 1000 FTU/kg o consumo foi inferior na 4^a, 5^a e 6^a semanas.

Perney (1993) verificou que utilizando rações contendo 0,32, 0,34, 0,38 e 0,44% de fósforo disponível com níveis crescentes 250, 500 e 750 U de fitase/kg, em pintos de corte de 4 a 10 dias, o ganho de peso das aves que receberam 0,32% de fósforo disponível suplementadas com 500 U de fitase/kg foi similar ao das aves que receberam 0,38% de fósforo disponível.

c) **CONVERSÃO ALIMENTAR:** Os resultados da análise de variância não indicou efeitos significativos para sexo, mas houve interação significativa entre os níveis de fósforo e níveis de fitase ($P < 0,05$). Não houve diferença na conversão alimentar em nenhum dos níveis de fitase quando o nível 0,45% de fósforo total foi utilizado, mas no nível 0,35%, a melhor conversão foi obtida com os níveis 750 e 1000 FTU (Tabela 7). Comparando-se a suplementação de fitase com os níveis de fósforo, observa-se que apenas no nível 0,35%, com 500 FTU, a conversão alimentar foi pior. Os resultados encontrados assemelham-se aos de Souza (1992) e Munaro et al. (1996a), segundo os quais nenhum dos tratamentos afetou a conversão alimentar, apenas o nível 1000 FTU/kg apresentou melhor conversão alimentar aos 28 dias.

A tabela 8 mostra que a conversão alimentar não foi afetada pelos contrastes 0,45% de fósforo disponível contra 0,45% de fósforo total, em nenhum dos sexos ($P>0,05$), nem nos níveis 0,35% de fósforo disponível contra 0,35% de fósforo total para machos; entretanto, este mesmo contraste nas fêmeas foi significativo ($P<0,05$).

4.2.2 Percentagem de cinzas, cálcio e fósforo nas tíbias no terceiro experimento.

Os teores médios de cinzas nas tíbias, cálcio e fósforo nas cinzas das tíbias dos frangos com 27 dias de idade, são apresentados nas tabelas 9 e 10. As análises de variância são mostrados no anexo B.

TABELA 9. Teores médios de cinzas nas tíbias, cálcio e fósforo nas cinzas das tíbias dos frangos com 27 dias de idade, observados durante o 3º experimento.

Fitase	Cinzas (%)			Cálcio (%)			Fósforo (%)		
	0,35%	0,45%	Média	0,35%	0,45%	Média	0,35%	0,45%	Média
500	43,58	48,99	46,28 ^b	29,03	34,72	31,87 ^b	14,30	18,15	16,22 ^b
750	45,13	49,56	47,34 ^{ab}	30,37	36,21	33,29 ^a	16,00	18,91	17,45 ^a
1000	45,82	50,18	48,00 ^a	31,26	37,69	34,48 ^a	16,46	19,23	17,84 ^a
Média	44,84^B	49,57^A		30,22^B	36,20^A		15,59^B	18,76^A	
Macho		49,20 ^a			33,98 ^a			18,05 ^a	
Fêmea		47,53 ^b			33,34 ^a			18,14 ^a	
Média geral		48,37			33,66			18,10	
CV		3,92			7,90			7,89	

Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha e minúsculas nas colunas diferem significativamente ($P<0,05$) pelo teste de t de Student.

TABELA 10. Teores médios de cinzas nas tíbias, cálcio e fósforo nas cinzas das tíbias dos frangos com 27 dias de idade, observados nos contrastes, durante o 3^a experimento..

Contrastes	Cinzas		Cálcio (%)		Fósforo (%)		
	Pd ¹	Pt ²	Pd	Pt	Pd	Pt	
0,45%	C:1Macho	51,79 ^a	50,42 ^a	37,79 ^a	35,82 ^b	20,76 ^a	18,74 ^b
	C:2Fêmea	50,81 ^a	48,72 ^b	38,89 ^a	36,59 ^b	21,49 ^a	18,78 ^b
0,35%	C:1Macho	52,87 ^{a*}	45,89 ^b	31,23 ^a	30,08 ^b	20,21 ^a	15,74 ^b
	C:2Fêmea	51,88 ^a	43,78 ^b	32,10 ^a	30,36 ^b	21,05 ^a	15,42 ^b

Médias com letras diferentes minúsculas na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de t de Student.

1 e 2/ Fósforo disponível e fósforo total, respectivamente.

a) CINZAS: Não houve interação significativa entre sexo, níveis de fitase e níveis de fósforo, entretanto, efeitos significativos foram observados no sexo ($P < 0,05$), níveis de fósforo ($P < 0,05$) e níveis de fitase ($P < 0,05$). A Tabela 9 mostra que o nível 0,45% de fósforo total apresentou os maiores teores de cinzas nas tíbias dos machos, segundo o teste de t de Student. Quando o nível 1000 FTU/kg de fitase foi utilizado, maiores valores de cinzas foram observados. Estes resultados confirmam os encontrados por Nelson et al. (1968), que encontraram elevação nos níveis de cinzas nos ossos com o aumento nos níveis de fitase.

Nelson e Walker (1964) afirmaram que o parâmetros cinzas nos ossos é mais eficiente que o ganho de peso, na avaliação de fósforo. Munaro (1993) não encontrou diferenças significativas nos teores de cinzas em nenhum dos tratamentos utilizados.

A tabela 10 mostrou que o contraste 0,45% de fósforo disponível, contra 0,45% de fósforo total, não apresentou diferenças significativas nos teores de cinzas nas tíbias dos machos ($P > 0,05$), indicando que a suplementação de fitase

conseguiu manter os mesmos teores de cinzas nas tíbias, quando comparadas ao tratamento sem fitase. Este mesmo contraste para fêmeas foi significativo ($P > 0,05$), mostrando que o tratamento com fósforo disponível apresentou maior deposição de cinzas nas tíbias quando comparado ao tratamento com suplementação de fitase. As dietas contendo 0,45% de fósforo apresentaram maior consumo de ração e, conseqüentemente, maior consumo de minerais que o tratamento com 0,35% de fósforo, o que resultou em maior deposição de cinzas nas tíbias (Tabela 10). O contraste 0,35% de fósforo disponível apresentou maior deposição de cinzas nas tíbias quando comparado ao tratamento 0,35% de fósforo total, em ambos os sexos ($P < 0,05$).

Lima (1995), utilizando pintos de corte de 1 a 21 dias, adotando como parâmetros o ganho de peso, resistência à quebra, porcentagem de cinzas e porcentagem de fósforo, verificou que ocorreram variações na biodisponibilidade de fósforo nas diferentes fontes utilizadas.

Schoner, Hoppe e Schwarz (1991) utilizaram dietas à base de milho e farelo de soja contendo 0,35% de fósforo fitico, 1,0% de fósforo do fosfato monocálcico, 0,45% de fósforo total e 0,6% de cálcio suplementados com níveis de fitase 0 a 800 FTU/kg, 0 a 1,2 % de fósforo inorgânico, 0 a 1,2% de cálcio ou cálcio e fósforo juntos. O ganho de peso aumentou com os níveis de fitase, fósforo e fósforo e cálcio, mas não pelo cálcio. A retenção de cálcio, fósforo e cinzas foi elevada pela fitase, fósforo, fósforo e cálcio, mas não pelos níveis de cálcio. Estes autores concluem que as cinzas podem ser usadas como indicativo da retenção de fósforo em frangos com 2 semanas de idade.

Perney et al. (1993) afirmaram que a porcentagem de cinzas e retenção de fósforo aumentaram significativamente, independente do conteúdo de fósforo das dietas. Sebastian et al. (1996) verificaram que rações contendo 0,33% de fósforo

disponível, suplementadas com 600 U de fitase/kg, apresentaram deposição de cálcio e fósforo superior às obtidas com dietas em que 0,46% de fósforo disponível, sem suplementação de fitase, foi utilizado.

Freitas, Saazad e Teixeira (1996) observaram que frangos recebendo dietas 0,4% de fósforo disponível, 2800 kcal/kg e 500 FTU/kg de fitase, apresentaram maior absorção de cálcio que os tratamentos 0,47% de fósforo disponível sem a fitase.

b) CÁLCIO: A análise de variância indicou efeitos significativos para níveis de fósforo ($P<0,05$) e níveis de fitase ($P<0,05$). Não houve efeitos significativos para sexo. Os teores de cálcio foram maiores no nível 0,45% de fósforo total (Tabela 9). Nos dois níveis de fósforo total, ocorreu elevação dos teores de cálcio nas tíbias conforme o nível de fitase foi aumentado, sendo os níveis 750 e 1000 FTU/kg superiores ao 500 FTU/kg, como indicado pelo teste de t de Student (Tabela 9).

Diferenças significativas nos teores de cálcio nas tíbias foram observadas em todos os contrastes testados ($P<0,05$); nestes, os teores de cálcio encontrados foram maiores nos tratamentos 0,45% de fósforo disponível (Tabela 10).

Os resultados obtidos demonstram que apesar dos níveis de fitase terem elevado os teores de cálcio nos tratamentos com fósforo total (Tabela 10), os teores deste elemento nos tratamentos com fósforo disponível estavam mais disponíveis para deposição nas tíbias. Estes resultados confirmam os encontrados por Broz et al. (1994) quando testaram 0,44, 0,45 e 0,52% de fósforo total em dietas de origem vegetal suplementadas com 0, 125, 250 e 500 U de fitase/kg, para pintos de corte, concluindo que os teores de cinzas, cálcio e fósforo nas tíbias aumentou linearmente com o aumento da fitase.

Freitas, Sazzad e Teixeira (1996) observaram que frangos recebendo dietas 0,40% de fósforo disponível, 2800 kcal/kg e 500 FTU/kg, apresentaram maior absorção de cálcio que os tratamentos 0,47% de fósforo disponível sem fitase. Confirmando esses resultados, Schoner et al. (1993) afirmaram que a fitase aumenta a utilização de cálcio.

c) FÓSFORO: A análise de variância indicou efeitos significativos para níveis de fósforo ($P<0,05$) e níveis de fitase ($P<0,05$). Não houve efeitos significativos para sexo. O teste de t de Student mostrou que os teores de fósforo foram maiores no nível 0,45% de fósforo total. Nos dois níveis de fósforo ocorreu elevação dos teores de fósforo nas tíbias, conforme o nível de fitase foi aumentado, sendo o nível 500 FTU/kg inferior aos demais (Tabela 9).

Diferenças significativas nos teores de fósforo nas tíbias foram observadas em todos os contrastes testados ($P<0,05$) em que os teores de fósforo encontrados foram maiores nos tratamentos 0,45% de fósforo disponível (Tabela 10). Apesar da fitase ter hidrolisado eficientemente o fósforo fitico, os teores de fósforo nos tratamentos com fósforo disponível estavam mais disponíveis para deposição nas tíbias.

Vogt (1992), utilizando dietas à base de milho e farelo de soja com níveis 0,52; 0,57 e 0,62% de fósforo disponível, com suplementação de níveis de fitase de 0, 200, 400, 800 e 1600 FTU/kg, por 6 semanas, concluiu que dietas contendo níveis mais baixos de fósforo diminuíram o crescimento e a mineralização dos ossos e aumentou a mortalidade. Todas as variáveis medidas foram aumentadas com a suplementação da fitase.

Munaro (1993) cita que os níveis 0, 500, 750 e 1000 U de fitase/kg não aumentaram os valores de fósforo nas cinzas das tíbias. Munaro et al. (1996 a, b,

c), em diversos ensaios com fitase, concluíram que os diferentes tratamentos utilizados não diminuíram os teores de fósforo nas tibias.

4.2.3 Fósforo no plasma (mg/100ml) do 3º experimento.

Os teores médios de fósforo no plasma dos frangos com 27 dias de idade, são apresentados nas tabelas 11 e 12. As análises de variância são mostradas no anexo B.

A análise de variância não indicou efeitos significativos para sexo. Houve efeitos significativos para níveis de fósforo ($P < 0,05$) e níveis de fitase ($P < 0,05$). O teste de t de Student apresentou maiores teores de fósforo no plasma no nível 0,45% de fósforo total. No nível 500 FTU/kg, menores valores de fósforo plasmático foram observados (Tabela 11). Os níveis 750 e 1000 FTU/kg mantiveram eficientemente os teores de fósforo plasmático nos tratamentos com 0,45% de fósforo total suplementados com fitase nas rações à base de milho e farelo de soja.

Todos os contrastes testados apresentaram diferenças significativas quanto aos teores de fósforo no plasma, sendo os maiores observados nos tratamentos com fósforo disponível ($P < 0,05$) (Tabela 12).

Estes resultados são similares aos encontrados por Munaro (1993), que encontraram no nível 500 U de fitase /kg valores inferiores aos demais níveis de fitase aos 28 dias de idade das aves, e por Broz et al. (1994), testando os níveis 0,44, 0,45 e 0,52% de fósforo total, utilizando dietas de origem vegetal, com suplementação 0, 125, 250 e 500 U de fitase/kg, para pintos de corte, concluíram que o teor de fósforo inorgânico no plasma aumentou linearmente com o aumento da fitase.

Munaro et al. (1996 a, b, c) avaliaram diferentes inclusões de fitase a dietas de frangos de corte, em que os teores de fósforo no plasma sanguíneo não diminuíram em nenhum dos tratamentos testados. O valores médios de fósforo plasmático observados neste experimento (Tabela 11) estão próximos aos encontrados por Munaro (1993), que foram respectivamente, 6,24; 6,28; 6,18 e 5,33 mg/100 ml nos tratamentos 0,45% de fósforo disponível sem suplementação de enzima, 0,45% de fósforo total com 1000 U de fitase/kg, 0,45% de fósforo total com 750 U de fitase/kg, e 0,45% de fósforo total com 500 U de fitase/kg, aos 28 dias de idade das aves.

TABELA 11. Teores médios de fósforo no plasma dos frangos (mg/100 ml) com 27 dias de idade, observados durante o 3º experimento.

Fitase	Fósforo (mg/100ml)		
	0,35%	0,45%	Média
500	4,82	5,77	5,30 ^b
750	5,89	6,63	6,26 ^a
1000	6,36	6,79	6,58 ^a
Média	5,69 ^B	6,40 ^A	
Sexo			
Macho	5,53	6,40	5,97a
Fêmea	5,86	6,40	6,13a
Média geral	6,40		
CV (%)	10,05		

Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha e minúsculas nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de t de Student.

TABELA 12. Teores médios de fósforo no plasma dos frangos (mg/100 ml) com 27 dias de idade, observados nos contrastes, durante o 3º experimento.

Contrastes		Fósforo (mg/100ml)	
		Fósforo disponível	Fósforo total
0,45%	C:1Macho	7,05 ^a	6,40 ^b
	C:2Fêmea	7,20 ^a	6,40 ^b
0,35%	C:1Macho	7,55 ^a	5,52 ^b
	C:2Fêmea	8,17 ^a	5,86 ^b

Médias com letras diferentes minúsculas na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de t de Student.

4.2.4 Porcentagem de cinzas, cálcio e fósforo nas excretas do terceiro experimento.

Os teores médios de cinzas, cálcio e fósforo nas excretas dos frangos com 27 dias de idade são apresentados nas tabelas 13, 14 e 15. As análises de variância são mostradas no anexo B.

a) CINZAS E CÁLCIO: Houve interação significativa entre sexo, níveis de fósforo e níveis de fitase ($P < 0,05$), para os teores de cinzas e cálcio nas excretas. Segundo o teste de t de Student, os machos excretaram mais cinzas e cálcio que as fêmeas. Em ambos sexos, o nível 0,35% de fósforo total e 1000 FTU apresentou as menores excreções de cinzas e cálcio (Tabela 13).

Todos os contrastes testados apresentaram diferenças significativas quanto aos teores de cinzas e cálcio nas excretas ($P < 0,05$), e as menores excreções deste mineral foram encontradas nos tratamentos contendo 0,35% e 0,45% de fósforo total com fitase (Tabela 15).

Munaro (1993) observou diferenças significativas nos teores de cinzas nas excretas aos 28 dias de idade das aves. Os valores encontrados foram 16,30, 13,80, 14,33 e 15,30% para os tratamentos 0,45% fósforo disponível sem fitase, 0,45% de fósforo total e 1000 U de fitase/kg, 0,45% de fósforo total e 750 U de fitase/kg e 0,45% de fósforo total e 500 U de fitase/kg, respectivamente, valores similares observados neste experimento.

TABELA 13. Teores médios de cinzas e cálcio nas excretas dos frangos, observados durante o 3º experimento.

	Cinzas (%)			Cálcio (%)		
	0,35%	0,45%	Média	0,35%	0,45%	Média
Macho						
500	15,50 ^c	15,88 ^c	15,69 ^c	2,57 ^c	2,63 ^c	2,6 ^c
750	15,22 ^b	15,21 ^b	15,22 ^b	2,24 ^b	2,25 ^b	2,3 ^b
1000	14,50 ^a	15,16 ^a	14,83 ^a	1,98 ^a	2,20 ^a	2,09 ^a
Média	15,07 ^A	15,42 ^B		2,26 ^{A-}	2,36 ^B	
Fêmea						
500	15,05 ^c	14,81 ^c	14,93 ^c	2,17 ^c	2,24 ^c	2,21 ^c
750	14,38 ^b	14,73 ^b	14,56 ^b	1,98 ^b	2,21 ^b	2,10 ^b
1000	12,81 ^a	14,54 ^a	13,68 ^c	1,95 ^a	2,13 ^a	2,04 ^a
Média	14,08 ^A	14,69 ^B		2,03 ^A	2,19 ^B	
Média geral			15,09		2,24	
CV			2,10		2,54	

Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha e minúsculas nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de t de Student.

TABELA 14. Teores médios de fósforo nas excretas dos frangos, observados durante o 3º experimento.

Níveis de Fitase	Fósforo (%)		
	0,35%	0,45%	Média
500	0,53	0,78	0,66 ^c
750	0,52	0,75	0,64 ^b
1000	0,48	0,71	0,60 ^a
Média	0,51 ^A	0,75 ^B	
Macho	0,55	0,79	0,67 ^B
Fêmea	0,47	0,70	0,59 ^A
Média geral	0,60		
C.V. (%)	2,03		

Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha e minúsculas nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de t de Student.

TABELA 15. Teores médios de cinzas, cálcio e fósforo nas excretas dos frangos, observados nos contrastes, durante o 3º experimento.

Contrastes	Cinzas (%)		Cálcio (%)		Fósforo (%)		
	Pd ^{1 e 2/}	Pt ^{1 e 2/}	Pd	Pt	Pd	Pt	
0,45%	C:1Macho	16,32 ^b	15,42 ^a	2,73 ^b	2,36 ^a	1,75 ^b	0,79 ^a
	C:2Fêmea	15,41 ^b	14,69 ^a	2,35 ^b	2,19 ^a	1,48 ^b	0,70 ^a
0,35%	C:1Macho	16,58 ^b	15,07 ^a	2,40 ^b	2,36 ^a	1,22 ^b	0,75 ^a
	C:2Fêmea	15,31 ^b	14,08 ^a	2,05 ^b	2,03 ^a	1,07 ^b	0,47 ^a

^{1 e 2/} Fósforo disponível e fósforo total, respectivamente.

Freitas, Sazzad e Teixeira (1996) observaram maior retenção de cálcio, em estudos com fitase, sobre a digestibilidade dos nutrientes nas dietas. Menores excreções deste mineral foram encontrados quando níveis baixos de fósforo,

energia e fitase foram adicionados às dietas. Schoner et al. (1993) observaram utilização mais eficiente do cálcio quando a fitase foi suplementada, mas quando os níveis de cálcio se elevaram nas dietas e a fitase foi suplementada, efeitos negativos significativos na retenção de cálcio foram constatados.

b) FÓSFORO: Não houve interação significativa entre sexo, níveis de fósforo e níveis de fitase, entretanto, a análise de variância indicou efeitos significativos para sexo ($P<0,05$), níveis de fósforo ($P<0,05$) e níveis de fitase ($P<0,05$). Segundo o teste de t de Student, as menores excreções de fósforo ocorreram no nível 0,35% de fósforo total com 1000 FTU/kg de fitase. As fêmeas excretaram menos fósforo que os machos (Tabela 14).

Todos os contrastes testados apresentaram diferenças significativas quanto aos teores de fósforo nas excretas ($P<0,05$). Os valores de fósforo excretados, foram menores nos tratamentos contendo 0,35% e 0,45% de fósforo total contendo fitase (Tabela 15).

Os resultados obtidos e apresentados na tabela 15 sugerem que a fitase conseguiu hidrolisar o fósforo fitico, que foi eficientemente retido pelo organismo, com conseqüente diminuição de sua excreção. As maiores excreções de fósforo foram observadas nos tratamentos contendo fósforo disponível sem fitase, talvez a quantidade fornecida nestas dietas tenha excedido as exigências dos frangos, sendo o excesso eliminado através das excretas.

Estes resultados confirmam a afirmação que Borges (1997) faz em sua revisão, na qual a suplementação de fitase em rações com baixos níveis de fósforo reduz sua excreção no ambiente. O valor 1,75% de fósforo observado no tratamento 0,45% de fósforo disponível para machos assemelha-se aos valores médios citados na literatura, que são de 1,70% (Cromwell, 1991).

Simons e Versteegh (1990) avaliaram a suplementação de níveis de fitase a dietas com 0,45, 0,60 e 0,75% de fósforo total, sem suplementação de fitase e 0,45% de fósforo total, com suplementação de 250, 500, 750, 1000, 1500 U de fitase/kg, e seus efeitos na excreção de fósforo em pintos de corte com 1 a 24 dias de idade. Verificaram que no nível 0,45% de fósforo total com níveis crescentes de fitase, diminuiu a excreção deste elemento.

Munaro (1993) utilizou o tratamento 0,45% de fósforo disponível sem suplementação de fitase como referência, tomando-se o valor médio de 1,9% como 100% de fósforo excretado. Assim, obteve redução média de fósforo nas excretas de 42%, 56% e 53%, valores próximos aos encontrados por Simons et al. (1990) e Lei et al. (1992). Munaro et al. (1996a, b e c) constataram redução significativa nos teores de fósforo nas excretas.

4.3 Resultados do quarto experimento: Avaliação do desempenho

Os valores médios em ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar aos 21 dias de idade das aves, são apresentados na tabela 16. As análises de variância são mostrados no anexo C.

As condições ambientais foram normais, com médias de 21,6 e 33,9 °C para as temperaturas mínimas e máximas, respectivamente. A temperatura mínima no período foi de 19 °C e a máxima de 38 °C. As amplitudes foram uniformes, favorecendo os resultados (Figura 6).

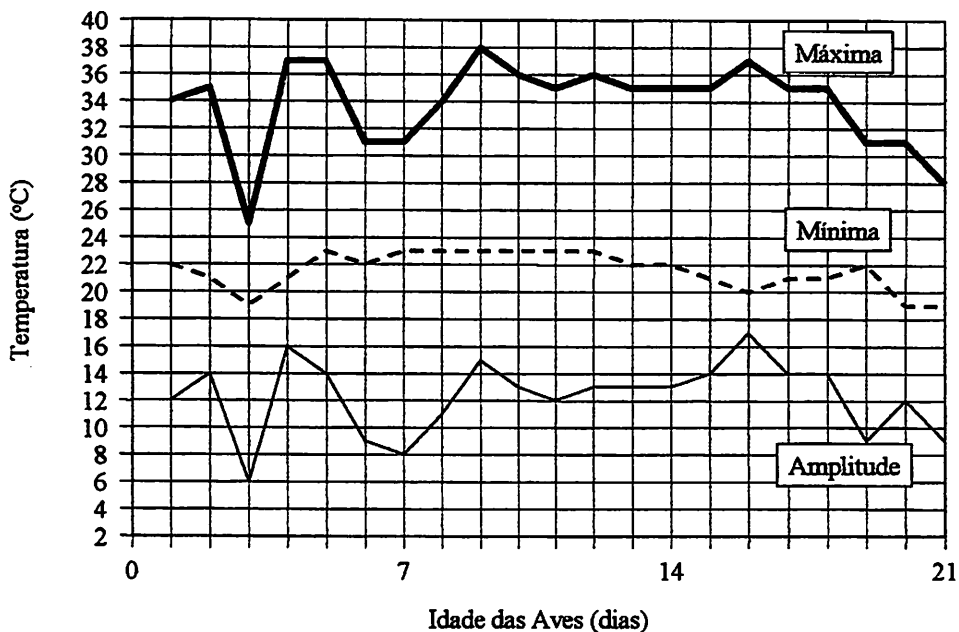


FIGURA 6. Temperaturas no interior da sala experimental durante a realização do 4º experimento.

Não houve interação significativa entre níveis de cálcio, níveis de fitase e sexo, entretanto, as análises de variância indicaram efeitos significativos para sexo. Os machos apresentaram maior ganho de peso ($P < 0,05$), consumo de ração ($P < 0,05$) e conversão alimentar ($P < 0,05$). Como era esperado, os machos consumiram 5,1% a mais de alimento, ganharam 8,5% a mais de peso e apresentaram conversão alimentar 2,75% menor do que as fêmeas, segundo teste de t de Student ($P < 0,05$).

O maior crescimento dos machos pode ser explicado pelo efeito ativador da testosterona sobre a síntese de RNA-polimerase (Teixeira, 1994). Segundo este autor, este hormônio possui efeito anabólico protéico superior aos demais esteróides naturais.

Schoner et al. (1993), utilizando dietas contendo 0,35% de fósforo disponível, níveis crescentes de cálcio (0,6, 7,5 e 0,9%) e 125, 250, 500 e 1500 FTU/kg de fitase, observaram que a adição de fitase aumentou o ganho de peso, consumo de ração e retenção de cálcio e fósforo, para machos.

Pelos valores apresentados na tabela 16, observa-se que o desempenho não foi afetado pelos níveis de cálcio utilizados, nem pelos níveis de fitase. Isto sugere que todos os níveis de cálcio utilizados neste experimento atenderam as necessidades nutricionais das aves.

TABELA 16. Médias do ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar dos frangos no período de 1 a 21 dias de idade no quarto experimento.

Fatores analisados	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g)	Conversão alimentar
Níveis de cálcio (%)			
0,7	692	984	1,42
0,8	700	989	1,41
0,9	706	1025	1,45
1,0	704	1000	1,42
Níveis de fitase (FTU)			
0	701	1005	1,44
500	705	991	1,41
1000	696	1002	1,44
Sexo			
Macho	730 ^a	1025 ^a	1,41 ^a
Fêmea	672 ^b	976 ^b	1,45 ^b
Média geral	701	999	1,43
C.V. (%)	4,83	4,47	4,95

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de t de Student.

Simons e Versteegh (1990) avaliaram a suplementação de dietas com 0,60, 0,75 e 0,90 de cálcio e 0,45, 0,60 e 0,75% de fósforo total, sem suplementação de fitase e 0,60% de cálcio e 0,45% de fósforo total, com suplementação de 250, 500, 750, 1000, 1500 U de fitase/kg, sobre o desempenho e a excreção de fósforo em pintos de corte com 1 a 24 dias de idade. Verificaram que o nível 0,45% de fósforo total, em relação ao 0,75% sem suplementação de fitase, afetou negativamente o desempenho, mas quando o nível 0,6% de cálcio e 0,45% de fósforo total e 750 U de fitase/kg foi suplementado, uma melhora significativa no ganho de peso foi observada, equivalendo ao ganho de peso do tratamento 0,90% de cálcio e 0,75% de fósforo total sem suplementação de fitase.

Os resultados encontrados neste experimento diferem dos obtidos Reid e Weber (1976), em que esses autores afirmam que o aumento dos níveis de cálcio na dieta, elevam o ganho de peso dos frangos. Gonzales (1987); Furtado (1991) e Borges (1991) verificaram menor consumo de ração em dietas contendo fosfatos de rochas naturais. Os fosfatos de rochas naturais geralmente apresentam níveis elevados de fluor, fazendo com que as aves consumam menor quantidade de ração.

Ballam et al. (1984), estudaram o efeito de diferentes níveis de cálcio (0,9 e 1,0%) e fósforo disponível (0,12 e 0,45%) em dietas à base de milho e farelo de soja e a habilidade dos frangos em hidrolisar o fitato, O aumento do nível de cálcio na dieta para 1,0 % reduziu a hidrólise do fitato independente do nível do fósforo disponível. O aumento do fósforo disponível para 0,45% aumentou a hidrólise do fitato na presença ou não de níveis de cálcio. Em outro experimento, em que todas as dietas continham 1,0% de cálcio, a adição de fósforo inorgânico como fosfato bicálcico diminuiu a hidrólise do fitato.

4.3.1 Porcentagem de cinzas, cálcio e fósforo nas tíbias no quarto experimento.

Os teores médios de cinzas nas tíbias, cálcio e fósforo, nas cinzas das tíbias dos frangos com 27 dias de idade, são apresentados na tabela 17. As análises de variância são mostrados no anexo C.

TABELA 17. Teores médios de cinzas nas tíbias, cálcio e fósforo nas cinzas das tíbias dos frangos com 27 dias de idade, observados durante o 4º experimento.

Fatores analisados	Tíbias		
	Cinzas (%)	Cálcio (%)	Fósforo (%)
Níveis de cálcio (%)			
0,7	50,77	34,83	18,21
0,8	51,67	37,01	18,71
0,9	52,38	38,26	19,72
1,0	53,08	39,03	20,60
Níveis de fitase (FTU)			
0	51,55 ^a	35,81 ^b	18,41 ^b
500	51,90 ^a	37,08 ^{ab}	19,35 ^{ab}
1000	52,48 ^a	38,97 ^a	20,17 ^a
Sexo			
MACHOS	52,17 ^a	37,91 ^a	19,18 ^a
FÊMEAS	51,78 ^a	36,66 ^a	19,45 ^a
Média geral	51,17	37,28	19,31
C.V. (%)	3,84	10,53	14,84

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de t de Student.

a) CINZAS: A análise de variância indicou efeitos significativos apenas para níveis de cálcio ($P < 0,05$). A análise de regressão para os efeitos dos níveis de suplementação de cálcio indicou haver um efeito linear crescente nos teores de cinzas nas tíbias dos frangos ($P < 0,05$) (Figura 7).

b) CÁLCIO e FÓSFORO: Não houve interação significativa entre níveis de cálcio, níveis de fitase e sexo, entretanto, a análise de variância indicou efeitos significativos para níveis de cálcio ($P < 0,05$) e níveis de fitase ($P < 0,05$). Tanto os teores de cálcio como de fósforo nas tíbias elevaram-se com a suplementação dos níveis de cálcio e de fitase. Não houve efeitos significativos para sexo. O teste de t de Student mostrou maior deposição de cálcio e fósforo com o nível 1000 FTU de fitase. Esses resultados mostram que a fitase pode ter, provavelmente, liberado o cálcio preso na forma de quelato dos ingredientes da dieta, milho e farelo de soja.

Farkan et al. (1989) utilizaram níveis crescentes de cálcio em dietas milho e farelo de soja, contendo diferentes conteúdos de fitato. A porcentagem de cinzas nos ossos foi o indicativo da utilização de cálcio. Conforme o conteúdo de fitato aumentou nas dietas, maiores quantidades de cálcio foram necessárias para manter o nível de cinzas nos ossos.

Schoner et al. (1993), avaliando dietas deficientes em fósforo contendo níveis 0,6, 0,75 e 0,9% de cálcio, observaram aumento na retenção de cálcio e fósforo do fitato em frangos de corte quando a fitase foi suplementada, mas nos tratamentos com níveis altos de cálcio e com fitase, afetaram negativamente a retenção do fósforo e do cálcio.

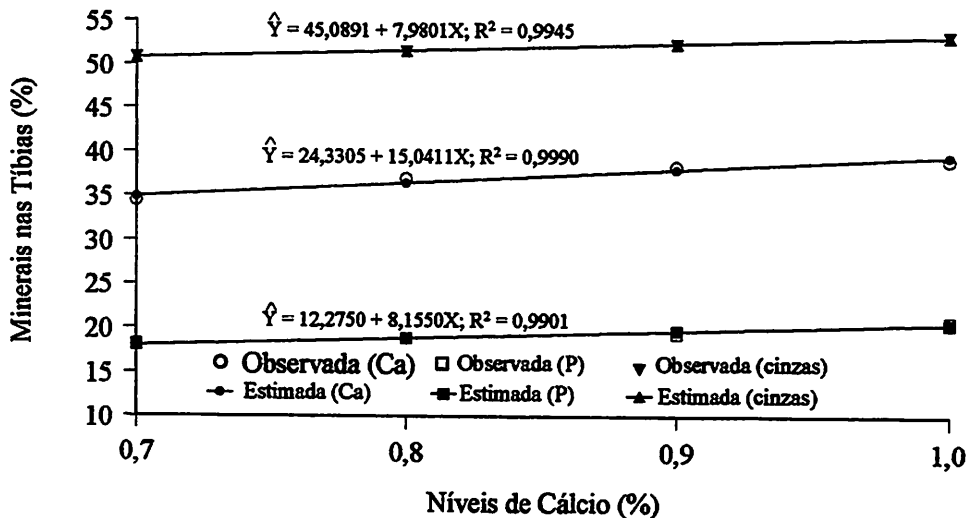


FIGURA 7. Efeito de 4 níveis de cálcio sobre a deposição de cinzas, cálcio e fósforo nas tíbias dos frangos.

A Figura 7 mostra que à medida que se elevou o nível de cálcio nas dietas, efeitos lineares crescentes foram observados nos teores de cálcio e fósforo nas tíbias dos frangos ($P < 0,05$).

4.3.2 Percentagem de cinzas, cálcio e fósforo nas excretas do quarto experimento.

Os teores médios de cinzas, cálcio e fósforo, nas excretas dos frangos com 27 dias de idade, são apresentados na tabela 18. As análises de variância são mostrados no anexo C.

TABELA 18. Teores médios de cinzas, cálcio e fósforo nas excretas dos frangos com 27 dias de idade, observados durante o 4º experimento.

Fatores analisados	Excretas		
	Cinzas (%)	Cálcio (%)	Fósforo (%)
Níveis de cálcio (%)			
0,7	13,69	1,50	1,41
0,8	14,39	1,64	1,42
0,9	14,82	2,33	1,43
1,0	15,14	2,69	1,45
Níveis de fitase (FTU)			
0	13,87 ^b	1,98 ^a	1,42 ^a
500	14,53 ^a	2,03 ^a	1,43 ^a
1000	15,13 ^a	2,11 ^a	1,44 ^a
Sexo			
Machos	14,77 ^a	2,10 ^a	1,47 ^b
Fêmeas	14,25 ^b	1,98 ^a	1,39 ^a
Média geral	14,51	2,04	1,43
C.V. (%)	4,80	11,03	3,37

Médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de t de Student.

a) CINZAS: A análise de variância indicou efeitos significativos para níveis de cálcio ($P < 0,05$), níveis de fitase ($P < 0,05$) e sexo ($P < 0,05$). O teste de t de Student mostrou que o teor de cinzas nas excretas se elevou com o aumento dos níveis de fitase. A porcentagem maior de cinzas foi observada nos níveis 750 e 1000 FTU/kg. Os machos apresentaram maiores porcentagens de cinzas nas excretas que as fêmeas (Tabela 18).

A análise de regressão para os efeitos dos níveis de suplementação de cálcio indicou haver um efeito linear crescente sobre a porcentagem de cinzas nas excretas ($P < 0,05$) (Figura 8).

b) CÁLCIO: Apenas os níveis de cálcio utilizados nas dietas apresentaram efeitos significativos na excreção deste mineral ($P < 0,05$). Efeitos lineares crescentes foram observados com o aumento dos níveis de cálcio nas dietas (Figura 8).

Freitas, Saazad e Teixeira (1996) testando níveis de energia, fósforo e fitase sobre a digestibilidade dos nutrientes das dietas de frangos de corte, observaram que o cálcio foi melhor absorvido e menos excretado quando níveis de fósforo disponível 0,4%, 2800 kcal/kg e 500 FTU/kg de fitase foram suplementados.

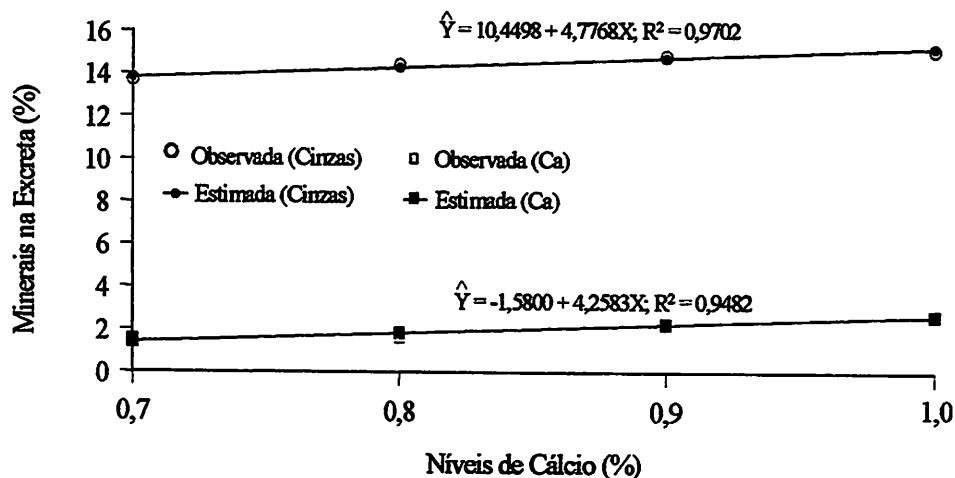


FIGURA 8. Efeito de 4 níveis de cálcio sobre a deposição de cinzas, cálcio e fósforo nas excretas dos frangos.

A Figura 8 mostra que conforme aumentaram-se os níveis de cálcio das dietas, os teores de cinzas e de cálcio nas excretas também aumentaram. Estes valores sugerem que a quantidade de cálcio das dietas dos frangos excederam suas exigências; portanto, o cálcio em excesso que não foi retido pelo organismo, provavelmente deve ter sido excretado.

c) FÓSFORO: A análise de variância indicou efeitos significativos para sexo ($P < 0,05$). Segundo o teste de Tukey, os machos excretaram maiores quantidades de fósforo que as fêmeas (Tabela 18). Não houve efeitos significativos para os demais fatores analisados.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram realizados os experimentos do presente trabalho, pode-se concluir que:

1. A fitase deve ser armazenada na forma pura em baixas temperaturas.
2. Para o armazenamento da fitase misturada à ração e em condições de temperatura ambiente, esta enzima deve ser misturada a ração diretamente ou via suplemento mineral.
3. A fitase aumenta a biodisponibilidade de fósforo do fitato, sugerindo que esta enzima libera eficientemente o fósforo do fitato, podendo, portanto, ser utilizada para reduzir a suplementação com fósforo inorgânico.
4. O nível recomendado pelo fabricante da fitase, 750 FTU/kg, pode ser adotado sem prejuízos no desempenho dos frangos.
5. A fitase aumenta a biodisponibilidade do cálcio e fósforo, independente do nível de cálcio da ração. A deposição, tanto de cálcio como de fósforo nas tíbias, aumenta à medida que se eleva o nível de cálcio na ração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASADA, k.; KASAI, Z. Formation of myo-inositol and phytin in ripening rice grain. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 3, p. 397, 1962.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Vol I. Agricultural chemicals, contaminants and drugs. 15. ed. Arlington: A.O.A.C, 1990. 684 p.
- ATTECH, J.O.; LEESON, S. Effects of dietary saturated or unsaturated fatty acids and calcium levels on performance and mineral metabolism of poultry chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.63, n. 12, p. 2252-2260, Dec. 1984.
- BAKER, D. H. Beyond phosphorus: phytase effects on protein, energy and trace-mineral utilization of swine and poultry. In: **BASF TECHNICAL SYMPOSIUM: Carolina Swine Nutrition Conference**. Durham, NC: 1998. P. 48-62.
- BALLAM, G. C.; NELSON, T. S; KIRBY, L. K. Effect of fiber and phitate source and of calcium and phosphorus level on phytate hydrolysis in the chick. **Poultry Science**, Champaign, v. 63, p. 333-338, Feb. 1984.
- BARRETO, S.L. de T. **Efeitos de níveis de fósforo disponível durante o pico de postura para duas linhagens de poedeiras comerciais leves**. Lavras:ESAL, 1994. 142p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia).
- BASF - Phytase: Interesting facts about Natuphos®. **Investigación y práctica**, BASF Aktiengesellschaft Marketing Vitamine 67056 Ludwigshafen, ed. 30, 12p. [1996].
- BEDFORD, M.R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 53, p. 145-55, 1995.

- BORGES, F. M. O. Utilização do fósforo disponível de dez fontes de fósforo para frangos de corte. Belo Horizonte: UFMG. Escola de Veterinária, 1991. 55 p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia).**
- BORGES, F. M.O. Utilização de enzimas em dietas avícolas. In: Nunes, I. J. Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, n. 20, p. 5-30, 1997.**
- BROZ, J.; OLDALE, P.; PERRIN-VOLTZ, A. H.; RYCHEN, G.; SCULZE, J.; NUNES, C. S.; SIMÕES, N.C. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *British Poultry Science*, Harlow, v. 35, n. 2, p. 273-280, may, 1994.**
- BRUGALLI, I. Efeito da granulometria na biodisponibilidade de fósforo e valores energéticos da farinha de carne e osso e exigência nutricional de fósforo para pintos de corte. Viçosa, MG: UFV, 1996. 83p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia).**
- CACERES, V. C. Efectos nutricionales sobre la calidade de la cáscara. In: CONFERÊNCIA APINCO 1994 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1994, Santos. Anais... Santos: FACTA, 1994. p. 35-66.**
- CANTOR, A. Enzimas: Usadas na Europa, Estados Unidos e Ásia. Possibilidades para uso no Brasil. RONDA LATINOAMERICANA DE BIOTECNOLOGIA, 5., 1995, Curitiba. p. 31-42.**
- CHERYAN, M. Phytic acid interactions in foods systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca ration, v. 13, n.4, p.296-335, Dec. 1980.**
- CLASSEN, H. L. Enzymes in action. *Feed Mix*. V. 4, nº 2, 1996.**
- COMBS JR, G. F. The vitamins - fundamental aspects in nutrition and health. Academic Press, Inc. 1992, 528 p.**

- COWAN, W. D. Understanding the manufacturing distribution, application, and overall quality of enzymes in poultry feeds. *J. Appl. Poultry Research*, v. 1, p. 93-99, 1993.
- CROMWELL, G.L. **Bioavailability of minerals: phosphorus as a model.** Kentucky: University of Kentucky. Department of Animal Science, [199_] v.1.
- CROMWELL, G. L.; COFFEY, R. D. Phosphorus - A key essential nutrient, yet a possible major pollutant - its central role in animal nutrition. **Biotechnology in the Feed Industry.** Proceedings of Alltech's Seventh Annual Symposium. p. 133-45. 1991.
- DENBOW, Z.; RAVINDRAN, V.; KORNEGAY, D.; YI, Z.; HULET, R. M. Improving phosphorus availability in soybean meal for broiler by supplemental phytase. *Poultry Science*, Champaign, v. 74, n. 11, p. 1831-1842. 1995.
- EDWARDS, H.M., Jr. The effect of dietary cholecalciferol, 25-hydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol on the development of tibial dyschondroplasia in broiler chickens in the absence and presence of disulfiram. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 119, p. 647-652, 1989.
- EDWARDS, H.M, Jr. Efficacy of several cholecalciferol compounds in the prevention of tibial dyschondroplasia in broiler chickens. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 120, n. 9, p. 1054-1061, Sept. 1990.
- ELLIOT, M. A.; ROBERSON, K. D.; ROWLAND III, G. N. e EDWARDS, JR, H. M. Effects of dietary calcium and 1,25-dihydroxycholecalciferol on the development of tibial dyschondroplasia in broilers during the starter and grower periods. *Poultry Science*, Champaign, v. 74, n. 9, p. 1495-1505, Set. 1995.
- ENGELEN, A. J.; HEEFT, F. C. VAN DER.; RANDSDORP, P. H. G.; SMIT, E. L. C. Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International*, Washington, v. 77, n. 3, p. 760-764, 1994.

REVISTA DE ZOOTECNIA

FARKAN, D. O.; NELSON, T. S.; KIRBY, L.K.; JOHNSON, Z.B.; STAMPS, A. T. Nutrition Reports international, Los Altos, CA, v. 40, n. 1, p. 33-42, 1989.

FARREL, D. J.; MARTIN, E.; FARREL, D. J. Recents advances in animal nutrition in Australia. Local: Editora, 1993. p. 266-276.

FERREIRA, D.N. Sistema de análise estatística para dados balanceados. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 1998.

FICK, K. R.; MILLER, S. M.; FUNK, J. D.; McDOWELL, L. R.; HOUSER, R. H. Methods of mineral analysis for plant and animal tissues. Gainesville: University of Flórida, 1976. 62 p.

FITASE, a enzima milagrosa. AVES E OVOS, São Paulo, n. 8/9, p.24-28, 1999.

FREITAS, S.A.; SAAZAD, M.H.; TEIXEIRA, A.A.P. Efeito de dois níveis de energia metabolizável e fósforo disponível com e sem suplementação de fitase na digestibilidade da dieta de frangos de corte na fase inicial. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1996, Curitiba. PR. Anais... Curitiba – PR: FACTA, 1996. p. 38.

FURTADO, M. A. O. Determinação da biodisponibilidade de fósforo em suplementos de fósforo para aves e suínos. Belo Horizonte: UFMG. Escola de Veterinária, 1991. 60 p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia).

GEORGIEVSKII, V.I. Mineral nutrition of animals - [studies in the agricultural and food sciences]. London: Butterworths, 1982. 474 p.

GOMES, P. C. Disponibilidade de fósforo em fosfato não convencionais para suínos e aves. In: MINI-SIMPÓSIO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 6. 1991, Campinas. Anais... Campinas: CBNA, 1991. p. 79-96.

- GONZALES, C. I. L. Biodisponibilidade de fósforo de seis fontes de fósforo usadas na alimentação animal. Belo Horizonte: UFMG. Escola de Veterinária, 1987. 47 p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia).
- GONZALES, E.; OLIVEIRA, B.L. A qualidade da casca do ovo. *Alimentação Animal*, v. 4, n. 16, p.20-22, 1999.
- GRAHAM e INBORR, Stability of enzymes during processing. *Feed Mix*, v. 1, n. 3, p. 18, 1993.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 1014.
- HUANG, K. C.; ALLEE, G. L. Bioavailability of phosphorus in selected feedstuffs for young chicks and pigs. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 53, p. 248, 1981. Supplement 1.
- INTERNATIONAL MINERALS & CHEMICAL CORPORATION. El calcio y el fosforo en la nutrition animal. [S. l], 1979. 77 p.
- ISLABÃO, N. Vitaminas: [seu metabolismo no homem e nos animais domésticos]. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1982. 201p.
- JONGBLOED, A. W.; MROZ, Z.; KEMME, P. A. The effect of supplementary *Aspargillus niger* phytase in diet for pigs on P, and phytic acid in different sections of the alimentary tract. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 70, n. 4, p. 1159-1168, Apr. 1992.
- KESHAVARZ, K. Por que "es necesario emplear la fitasa en la dieta de las ponedoras ?. *Indústria avícola*. Mount Morris, v. 46, n. 10, p.13-14, 1999.
- KETELS, E.; DeGROOTE, G. The relative bioavailability and ileal digestibility of phosphorus from mineral and animal sources. In: WORD'S POULTRY CONGRESS, 18., 1988, Nagoya. *Proceedings...* Nagoya: WPSA, 1988. p. 873-874.

- KIES, A.; SCHUTTE, B.** The effect of microbial phytase on broiler performances. Netherlands: ILOB, 1998. 2p. (Comunicado técnico).
- KORNEGAY, E.T.; DENBOW, D.M.; YI, Z.; RAVINDRAN, V.** Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize-soyabean-meal-based diets containing three levels of non-phytate phosphorus. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 75, n. 4, p. 839-852, Apr. 1996.
- KRATZER, F. H.; VOTRA, P.** Chelates in nutrition. Boca Ration: CRC. Press, 1986. 458 p.
- LEACH, R. M.; BURDETTE, J. H.** Influence of dietary calcium on the pathological lesions associated with endochondral bone formation. *Federation Proceedings*, Bethesda, v. 46, p. 887, 1987 (Abstracts).
- LEI, X. G.; KU, P. K.; MILLER, E. R.; YOKOYAMA, M. T.** Improvement of phytate phosphorus utilization by a microbial phytase in weanling pigs. Michigan State University. Agricultural Experiment Station East Lansing: 1992. 199 p.
- LIEBERT, F.; WECKE, C.; SCHONER, F. J.** Phytase activities in different gut contents of chickens as dependent on level of phosphorus and phytase supplementations. In: SYMPOSIUM KARTAUSE ITTINGEN: enzymes in animal nutrition, 1993, Switzerland. *Proceedings...* Switzerland, 1993. p.
- LIMA, I. L.** Disponibilidade de fósforo e de fluor de alguns alimentos e exigências nutricionais de fósforo para frangos de corte. Viçosa, MG: UFV, 1995. 121p. (Tese -Doutorado em Zootecnia).
- LOPES, Z. M. A.** Utilização de fosfato bruto de rocha em rações para frangos de corte. Belo Horizonte: UFMG. Escola de Veterinária, 1983, 52 p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia).
- MAGA, J. A.** Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 30, n. 1, p. 1-9, Jan/Feb. 1982.

- MAYNARD, L. A.; LOOSLI, J. K.; HINTZ, H. F.; WARNER, R. G. Nutrição animal. 3. ed. Rio de Janeiro: Biblioteca Freitas Bastos, 1984, 726p.**
- McGILLIVRAY, J. J. Calcium and phosphorus. Separata de Animal Nutrition & Health, San Francisco, 1980.**
- McKNIGHT, W.F. Technical specifications and properties of phytase: BASF Technical Symposium. Ithaca, NY, 1996. p. 1-15.**
- MILLER, W.J. Biological value of different sources of inorganic trace elements. Feedstuffs, Mineapolis, v.53, n.13, p. 20, Mar.1981.**
- MITCHELL, R.D.; EDWARDS, J.R.H.M. The effect of 1,25-Dihidroxycholecalciferol on calcium and phosphorus requeriments of broiler chicks. Poultry Science, Champaign, v. 72, n. 1, p. 83, 1993. Supplement.**
- MROZ, Z.; JONGBLOED, A. W. The influence of phytase on the availability of protein and energy in swine: BASF Technical Symposium. Carolina Swine Nutrition Conference. Durham, NC. P. 65-88, 1998**
- MUIRHEAD, S. Tracking trace elements. In: Researchers reveal latest finfings with ruminants, weaned pigs, poultry. Feedstuffs, Minneapolis, v.22, p.14, 1991.**
- MUNARO, F. A. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo do farelo de arroz desengordurado em rações para frangos de corte. Porto Alegre, RS: UFRGS, 1993. 174p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia).**
- MUNARO, F. A.; LÓPEZ, J.; LOPEZ, S.E.; RUTZ, F. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo em rações com farelo de arroz desengordurado para frangos de corte. Revista da SBZ, Viçosa, v. 25, n. 5, p. 932-943, Set/out. 1996b.**

- MUNARO, F. A.; LÓPEZ, J.; TELXEIRA, A. S.; LOPEZ, S.E. Efeito da fitase em rações com 15% de farelo de arroz desengordurado no desempenho de frangos de corte. *Revista da SBZ*. V. 25. N. F. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo em rações com farelo de arroz desengordurado para frangos de corte. *Revista da SBZ*, Viçosa, v. 25, n. 5, p. 932-943, Set/out. 1996c.
- MUNARO, F. A.; LÓPEZ, J.; TELXEIRA, A.S.; RUTZ, F. Aumento da disponibilidade do fósforo fitico pela adição de fitase a rações para frangos de corte. *Revista da SBZ*. Viçosa, v. 25, n. 5, p. 921-931, Set/out. 1996a.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYNES, P.A.; RODWELL, V.W. *Harper: bioquímica*. São Paulo: Atheneu, 1990. 705 p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of poultry*. 9. ed. Washington, DC: National Academy of Science, 1994. 155 p.
- NELSON, T.S. The utilization of phytase phosphorus by poultry. *Poultry Science*, Champaign, v.46, n. 4, p.862-870, July. 1967.
- NELSON, T.S.; FERRARA, L.W.; STORER, N.L. Phytate phosphorus content of feed ingredients derived from plants. *Poultry Science*, Champaign, v. 47, n. 4, p. 1372-1374, July. 1968.
- NELSON T.S.; SHIEH, T.R.; WODZINSKI, R.J.; WARE, J.H. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poultry Science*, Champaign, v.47, n. 6, p.1842 – 1848, Nov. 1968.
- NELSON, T.S.; SHIEH, T.R.; WODZINSKI, R.J. e WARE, J.H. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytase phosphorus by chicks. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v.101, n. 10, p. 1289-1294, Oct. 1971.
- NELSON, T. S.; WALKER, A. C. The biological evaluation of phosphorus compounds. *Poultry Science*, Champaign, v. 43, n. 1, p. 94-98, Jan. 1964.

- ORBAN, J.I.; ROLAND, S.R.D.A. Availability of phosphorus from chicken bone meal as influenced by particle size. *Poultry Science*, Champaign, v. 66, p.32, 1987. Supplement. 1.
- PAGE, A.L.; PRATT, P.F. Effects of sewage sludge on effluent application to soil on the movement of n, p, soluble salts, and trace elements to groundwaters. *Second Nat. Municipal Sludge Management and Disposal*. Cal. 1975.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. V. 1, 565 p.
- PENZ Jr, A.M. Enzimas em rações de aves e suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu, SP. *Anais...* Botucatu, SP:SBZ, 1998. p. 165-178.
- PERNEY, M.; CANTOR, A.H.; STRAW, M.L.; HERKELMAN, K.L. The effect of dietary on growth performance and phosphorus utilization of broiler chicks. *Poultry Science*. Champaign, v. 72, n. 11, p. 2106-2114, Nov. 1993.
- QIAN, H.; VEIT, H.P.; KORNEGAY, E.T.; RAVINDRAN, V.; DENBOW, D.M. Effects of supplemental phytase and phosphorus on histological and other tibial bone characteristics and performances of broilers fed semi-purified diets. *Poultry Science*. Champaign, v. 75, n. 5, p. 618-626, May. 1996.
- RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W.L. Influence of dietary phytic acid and available phosphorus levels on the response of broilers to supplemental natuphos®. In: *SHORT COURSE ON FEED TECHNOLOGY*, 7., 1997, Ansong, Korea: Korean Society of Animal Nutrition and feedstuffs, 1997. p.
- RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W.L.; KORNEGAY, E.T. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poultry & Avian Biology Research*, Northwood, v. 6, p. 125-143, 1995.
- REID, B.L.; WEBER, C.W. Calcium availability and trace mineral composition of feed grade calcium supplements. *Poultry Science*, Champaign, v. 55, n. 2, p. 600-605, Mar. 1976.

- RODEHUTSCORD, M.** The effect of phytase on the availability of phosphorus in different ingredients in swine. In: **BASF TECHNICAL SYMPOSIUM: Caroline Swine Nutrition Conference.** Durham, NC., 1998. p. 32-45.
- ROLAND, SR. D. A.** Recent developments with calcium and phosphorus with emphasis on osteopenia in comercial laying hens. In: **MINI-SIMPÓSIO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 7., 1992, Campinas. Anais...** Campinas: CBNA, 1992. p. 85-102.
- ROSTAGNO, S.H.; BARBARINO Jr, P.; BARBOZA, W.A.** Exigências Nutricionais das Aves Determinadas no Brasil. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE AVES E SUÍNOS. Anais...** Viçosa – MG, 1996, p. 361-388.
- ROSTAGNO, H.S.; SILVA, M.A.** Exigências nutricionais e biodisponibilidade de fósforo para frangos de corte. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES, 1998, Campinas. Anais...** Campinas: CBNA, 1998. p. 1-27.
- RUSSEL, J. B.** *Química geral.* São Paulo, McGraw-Hill, 1982. 897 p.
- RUTZ, F.** Absorção de minerais e vitaminas. In: **FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. Fisiologia da digestão e absorção das aves.** Campinas: FACTA, 1994. p. 83-98.
- SAS SAS User's guide: statistics, 5 ed.** Cary, NC: SAS Inst. itute; 1985. 956p.
- SCHONER, F. J.; HOPPE, P. P.; SCHWARZ, G.; WIESCHE, H.** Comparison of microbial phytase and inorganic phosphate in male chickens: the influence on performance data, mineral retention and dietary calcium. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.** Hamburg, v. 69, p. 235-244, 1993.
- SCHONER, F. J; HOPPE, P.P. e SCHAWARZ, G.** Comparative effects of microbial phytase and inorgânico phosphorus on performance and retention of phosphorus, calcium and crude ash in broilers. **Journal Animal Nutrition,** v. 66, p. 248-55. 1991.

- SCOTT, M. L.; NESHEIM, M. C.; YOUNG, R. **Journal Nutrition of the Chicken**. 3.ed. Ithaca, NY: M. L. Scott & Associates, 1982. 562 p.
- SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S. P.; CHAVEZ, E. R.; LAGUE, P. C. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, n. 12, p. 1516-1526, Dec. 1996.
- SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R.; LAGUE, P.C. Apparent digestibility of protein and amino acids in broiler chickens fed a corn-soybean diet supplemented with microbial phytase. **Poultry Science**. Champaign, v.76, n. 12, p.1760-1769, Dec. 1997.
- SELLE, P.H. The potential of microbial phytase the sustainable production of pigs and poultry. In: **SHORT COURSE AND FEED TECHNOLOGY**, 7., 1997, Korean Society of Animal Nutrition and Feedstuffs, 1997. p. 124.
- SIMONS, P. C.; VERSTEEGH, H. A. J. Application of microbial phytase in poultry nutrition. **Poultry Science**, Champaign. v. 70, n. 6, p. 110, June. 1991.
- SIMONS, P.C.; VERSTEEGH, H.A.; JONGBLOED, A.W.; KEMME, P.A.; SLUMP, P.; BOS, K.D.; WOLTERS, M.G.; BEUDEKER, R.F.; VERSCHOOR, G.J. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. **The British Journal of Nutrition**, New York, v. 64, p. 525-540, 1990.
- SOUZA, G. A. **Farelo de arroz integral como fonte de fósforo em rações para frangos de corte**. Porto Alegre: UFRGS, 1992. 148 p. (Tese - Doutorado em Zootecnia).
- STURKIE, P. D. **Fisiologia aviar**. Zaragoza: Acribia, 1968. 607 p.
- SWICK, R. A., IVEY, F. J. Use of enzymes in poultry diets. **Feed Manegement**, Sea Isle City, jan. p. 11-17, 1992.

- TAYLOR, T.G.** The availability of plant material for animal. **Proceedings of the Nutrition Society, Cambridge**, v. 24, p. 105-12, 1965.
- TEIXEIRA, A.S.** Exigências nutricionais de zinco e sua biodisponibilidade em sulfatos e óxidos de zinco para pintos de corte. Porto Alegre: UFRGS 1994. 172 p. (Tese - Doutorado em Zootecnia).
- TERRA, W.R.** A digestão dos insetos. **Ciência Hoje, São Paulo**, v. 12, p. 30-38, 1991.
- VIEIRA, R. S. A.** Efeito de níveis de fitase e tipos de ração sobre o desempenho e qualidade de ovos de poedeiras mudadas. Lavras, MG: UFLA, 1999. p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia)
- VOGT, H.** Einsatz Von Phytase in broilermostfutter mit unterschiedlichem phosphorgehalt. **Archiv-fur-geflugelkunde, Berlin**, v. 56, n. 3, p. 93-98, 1992.
- WALDROUP, P.W.; AMMERMAN, C.B.; HARMS, R.H.** The availability of phytin acid phosphorus for chicks. II. Comparison of phytin phosphorus sources. **Poultry Science, Champaign**, v. 43, n. 1, p. 426, Jan. 1964.
- WALDROUP, P.W.; AMMERMAN, C.B.; HARMS, R.H.** The utilization of phosphorus from animal protein sources for chicks. **Poultry Science, Champaign**, v. 44, n. 5, p. 1302-1306, Sep. 1965.
- WEDEKIND, K. J.; BAKER, D. H.** Effect of varying calcium and phosphorus level on manganese utilization. **Poultry Science, Champaign**, v. 69, n. 7, p. 1156-1164, July. 1990.
- WEDEKIND, K. J.; TITGEMEYER, E. C.; TWARDOCK, A. R. e BAKER, D. H.** Phosphorus, but not calcium, affects manganese absorption and turnover in chicks. **Journal of Nutrition, Bethesda**, v. 121, n. 11, p. 1776-1786, Nov. 1991.

WIDEMAN, J.R.R.F.; Renal regulation of avian calcium and phosphorus metabolism. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 117, n.4, p. 808-815, Apr. 1987.

WIDEMAN, J.R.R.F.; CLOSSERS, J.A.; ROUSH, W.B.; COWEN, B.S. Urolithiasis in pullets and laying hens: role of dietary calcium and phosphorus. *Poultry Science*, Champaign, v. 64, n.12, p. 2300-2307, Dec. 1985.

YI, Z.; KORNEGAY, E.T.; RAVINDRAN, V.; DENBOW, D.W. Improving phytase phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values for phytase. *Poultry Science*. Champaign, v. 75, n. 12, p. 240-249, Feb. 1996.

ZANINI, S. F. Efeitos da adição de enzimas à ração sobre a utilização de nutrientes para frangos de corte. Belo Horizonte: UFMG. Escola de Veterinária, 1997. p. (Dissertação - Mestrado em Zootecnia).

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A Análise de variância da atividade da fitase (FTU/g) por 112 dias de avaliação do 1º experimento.....	109
TABELA 2A Análise de variância da atividade da fitase (FTU/g) por 56 dias de avaliação do 2º experimento.....	109

TABELA 1A. Análise de variância da atividade da fitase (FTU/g) durante 112 dias de armazenamento do 1º experimento.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	Q.M.
Forma de armazenamento (F)	4	14466486,85480**
Erro a	15	7891,92405
Tempo de armazenamento (T)	8	2221484,34732**
F * T	32	436559,61813**
Erro b	120	4401,83244
Total	179	90254328,73108
Média geral = 4584 FTU Coeficiente de variação = 9,38% e 4,48%		

TABELA 2A. Análise de variância da atividade da fitase (FTU/g) durante 56 dias de armazenamento do 2º experimento.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	Q.M.
Forma de armazenamento (F)	3	82464859,38245**
Erro a	16	87273,15552
Tempo de armazenamento (T)	8	741700,76796**
F * T	24	44125,26257**
Erro b	128	62462,85242
Total	179	263778806,19116
Média geral = 3957 FTU Coeficiente de variação = 7,47% e 6,32%		

ANEXO B		Página
TABELA 1B	Análise da variância para o ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar no 3º experimento.....	111
TABELA 2B	Análise da variância para os teores de cinzas, cálcio (Ca) e fósforo (P) nas tíbias das aves, com 27 dias de idade, observados durante o 3º experimento.....	112
TABELA 3B	Análise da variância para os teores de e fósforo no plasma das aves, com 27 dias de idade, observados durante o 3º experimento.....	113
TABELA 4B	Análise da variância para os teores de cinzas, cálcio (Ca) e fósforo (P) nas excretas das aves, com 27 dias de idade, observados durante o 3º experimento.....	114

TABELA 1B. Análise da variância para o ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA), no 3^o experimento.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	GP	CR	CA
		Q.M.	Q.M.	Q.M.
Sexo	1	15,899**	3,111 ^{NS}	0,0803 ^{NS}
Fósforo	1	505,175**	561,712**	0,6507**
Fitase	2	83,659**	69,286**	0,2400*
Sexo vs fósforo	1	1,358 ^{NS}	16,564 ^{NS}	0,0469 ^{NS}
Sexo vs Fitase	2	3,882 ^{NS}	8,806 ^{NS}	0,0031 ^{NS}
Fósforo vs Fitase	2	58,542**	48,256**	0,2141**
Sexo vs Fósforo vs Fitase	2	2,630 ^{NS}	1,591 ^{NS}	0,0055 ^{NS}
Contraste 1	1	5,385 ^{NS}	3,281 ^{NS}	0,0032 ^{NS}
Contraste 2	1	5,462 ^{NS}	8,346 ^{NS}	0,0020 ^{NS}
Contraste 3	1	166,103**	280,072**	0,0584 ^{NS}
Contraste 4	1	205,628**	196,988**	0,3099*
ERRO	32	1,741	9,322	0,0502
Total	47			
Média geral (g)		570,86	816,62	1,48
CV (%)		7,31	11,82	15,11

TABELA 2B. Análise da variância para os teores de cinzas, cálcio (Ca) e fósforo (P), nas tíbias do 3º experimento.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	Cinzas	Ca	P
		Q.M.	Q.M.	Q.M.
Sexo	1	65,3606**	0,7771 ^{ms}	0,34722 ^{ms}
Fósforo	1	403,9429**	409,9339**	182,0868**
Fitase	2	17,9572**	38,5461**	17,15034**
Sexo vs fósforo	1	0,7688 ^{ms}	1,2113 ^{ms}	0,53734 ^{ms}
Sexo vs Fitase	2	2,7804 ^{ms}	0,3423 ^{ms}	0,14865 ^{ms}
Fósforo vs Fitase	2	1,9989 ^{ms}	4,6526 ^{ms}	2,06623 ^{ms}
Sexo vs Fósforo vs Fitase	2	0,7368 ^{ms}	3,7689 ^{ms}	1,67586 ^{ms}
Contraste 1	1	8,3709 ^{ms}	41,1627**	18,28109**
Contraste 2	1	19,4896**	74,3793**	33,04845**
Contraste 3	1	219,1022**	202,9105**	90,11531**
Contraste 4	1	295,1235**	320,1293**	142,298,5**
Erro	80	3.5934	6.2414	2.7738
Total	95			
Média geral (%)		48,37	33,66	18,10
CV (%)		3,92	7,90	7,89

TABELA 3B. Análise da variância para os teores de fósforo no plasma das aves, com 27 dias de idade, observados durante o 3º experimento.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	Fósforo Q.M.
Sexo	1	0,4950 ^{ns}
Fósforo	1	8,9535 ^{**}
Fitase	2	10,6518 ^{**}
Sexo vs fósforo	1	0,4950 ^{ns}
Sexo vs Fitase	2	0,2801 ^{ns}
Fósforo vs Fitase	2	0,4229 ^{ns}
Sexo vs Fósforo vs Fitase	2	0,2275 ^{ns}
Contraste 1	1	1,9045 ^{**}
Contraste 2	1	2,8960 ^{**}
Contraste 3	1	18,3921 ^{**}
Contraste 4	1	24,0471 ^{**}
ERRO	80	0,0502
Total	95	6,40
Média geral (mg/100 ml)		10,05
CV (%)		

TABELA 4B. Análise da variância para os teores de cinzas, cálcio (Ca) e fósforo (P) nas excretas das aves, com 27 dias de idade, observados durante o 3º experimento.

CAUSAS DE VARIÇÃO	G.L.	Cinzas	Ca	P
		Q.M.	Q.M.	Q.M.
Sexo	1	6,665003**	0,557511**	0,071111**
Fósforo	1	2,049669**	0,057600**	0,499378**
Fitase	2	3.388103**	0,343878**	0,009436**
Sexo vs fósforo	1	0,161336**	0,060844**	0,000400 ^{NS}
Sexo vs Fitase	2	0.202569**	0,096011**	0,000086 ^{NS}
Fósforo vs Fitase	2	1.166219**	0,038933**	0,000203 ^{NS}
Sexo vs Fósforo vs Fitase	2	0.531219**	0,074211**	0,000175 ^{NS}
Contraste 1	1	1,840544**	0,306178**	2,044900**
Contraste 2	1	1,159211**	0,054444**	1,365003**
Contraste 3	1	5,115136**	1,030225**	0,996669**
Contraste 4	1	3,397878**	1,159211**	0,804011**
ERRO	32	0.000208	0,000163	0.000275
Total	47			
Média geral (%)		15,09	2,36	0,815
CV (%)		0,10	0.54	2,03

ANEXO C**Página**

TABELA 1C	Análise da variância para o ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) no 4^o experimento.....	116
TABELA 2C	Análise da variância para os teores de cinzas, cálcio (Ca) e fósforo (P) nas tíbias do 4^o experimento.....	116
TABELA 3C	Análise da variância para os teores de cinzas, cálcio (Ca) e fósforo (P) nas excretas das aves, com 27 dias de idade, observados durante o 4^o experimento.....	117

TABELA 1C. Análise da variância para o ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) no 4º experimento.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	GP	CR	CA
		Q.M.	Q.M.	Q.M.
Níveis de fitase	2	353.88701 ^{NS}	781.91946 ^{NS}	0.00571 ^{NS}
Níveis de cálcio	3	468.00050 ^{NS}	3972.04130 ^{NS}	0.00402 ^{NS}
Sexo	1	39568.1221 ^{**}	32440.7204 ^{**}	0.02253 ^{**}
Fitase * cálcio	6	433.46012 ^{NS}	1144.09110 ^{NS}	0.00532 ^{NS}
Fitase * sexo	2	250.55939 ^{NS}	325.00348 ^{NS}	0.00050 ^{NS}
Cálcio * sexo	3	438.12050 ^{NS}	1657.96407 ^{NS}	0.00113 ^{NS}
Fitase * cálcio * sexo	6	1172.43778 ^{NS}	4470.21270 ^{NS}	0.00140 ^{NS}
Erro	24	1145.99571	1997.84516	0.00500
Total	47			
Média geral (g)		700.56	999,29	1,43
CV (%)		4,83	4,47	4,95

TABELA 2C. Análise da variância para os teores de cinzas, cálcio (Ca) e fósforo (P) nas tíbias do 4º experimento

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	Cinzas	Ca	P
		Q.M.	Q.M.	Q.M.
Níveis de fitase	2	7,08051 ^{NS}	80,82961 ^{**}	24,77053 ^{**}
Níveis de cálcio	3	26,32831 ^{**}	95,84762 ^{**}	28,92803 ^{**}
Sexo	1	3,78023 ^{NS}	37,73788 ^{NS}	1,75230 ^{NS}
Fitase * cálcio	6	0,59209 ^{NS}	0,77946 ^{NS}	1,07163 ^{NS}
Fitase * sexo	2	0,37649 ^{NS}	0,80407 ^{NS}	1,86004 ^{NS}
Cálcio * sexo	3	6,16146 ^{NS}	10,01012 ^{NS}	0,61816 ^{NS}
Fitase * cálcio * sexo	6	0,62467 ^{NS}	7,23699 ^{NS}	1,54855 ^{NS}
Erro	72	3,97334	15,41363	8,22106
Total	95			
Média geral (%)		51,97	37,28	19,31
CV (%)		3,84	10,53	14,85

TABELA 3C. Análise da variância para os teores de cinzas, cálcio (Ca) e fósforo (P) nas excretas das aves, com 27 dias de idade, observados durante o 4º experimento.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	Cinzas	Ca	P
		Q.M.	Q.M.	Q.M.
Níveis de fitase	2	6,36383**	0,06333 ^{NS}	0,00123 ^{NS}
Níveis de cálcio	3	4,70353**	3,82465**	0,00424 ^{NS}
Sexo	1	3,27608**	0,15187 ^{NS}	0,06675**
Fitase * cálcio	6	0,11165 ^{NS}	0,12194 ^{NS}	0,00037 ^{NS}
Fitase * sexo	2	0,00582 ^{NS}	0,00750 ^{NS}	0,00000 ^{NS}
Cálcio * sexo	3	0,27643 ^{NS}	0,01354 ^{NS}	0,00217 ^{NS}
Fitase * cálcio * sexo	6	0,15047 ^{NS}	0,03667 ^{NS}	0,00044 ^{NS}
Erro	24	0,48516	0,05062	0,00232
Total	47			
Média geral (%)		14,51	2,04	1,43
CV (%)		4,80	11,03	3,37