



**NICOLE BATELLI DE SOUZA NARDELLI**

**DIFERENTES RELAÇÕES CÁLCIO:FÓSFORO  
DISPONÍVEL E SUPLEMENTAÇÃO DE  
FITASES EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE  
CORTE**

**LAVRAS – MG**

**2014**

**NICOLE BATELLI DE SOUZA NARDELLI**

**DIFERENTES RELAÇÕES CÁLCIO:FÓSFORO DISPONÍVEL E  
SUPLEMENTAÇÃO DE FITASES EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE  
CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção de Monogástricos, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Paulo Borges Rodrigues

Coorientadores

Dr. Édison José Fassani

Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu

**LAVRAS – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Nardelli, Nicole Batelli de Souza.

Diferentes relações cálcio:fósforo disponível e suplementação de  
fitases em rações para frangos de corte / Nicole Batelli de Souza  
Nardelli. – Lavras : UFLA, 2014.

58 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Paulo Borges Rodrigues.

Bibliografia.

1. Avicultura. 2. Cinzas ósseas. 3. Desempenho. 4. Enzima. 5.  
Fitato. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.508557

**NICOLE BATELLI DE SOUZA NARDELLI**

**DIFERENTES RELAÇÕES CÁLCIO:FÓSFORO DISPONÍVEL E  
SUPLEMENTAÇÃO DE FITASES EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE  
CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção de Monogástricos, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de Julho de 2014.

Dr. Édison José Fassani UFLA

Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu UFLA

Dr. Adriano Geraldo IFMG

Dr. Paulo Borges Rodrigues  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2014**

*A Deus, o Mestre dos Mestres, meu guia, minha luz.*

*Á minha mãe Liliane e ao meu Pai Théo, por  
todo amor e dedicação, por compartilharem  
dos meus sonhos, ajudando-me a  
torná-los realidade.*

*Ao meu amado irmão Enrico  
pelo carinho, amizade, cumplicidade  
e companheirismo.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus e ao Sagrado Coração de Jesus, pela proteção constante e pelo dom da vida.

Ao meu pai, Théo, minha mãe, Liliane e ao meu irmão Enrico, pelo apoio, incentivo e amor incondicional.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia (DZO), pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Paulo Borges Rodrigues pela paciência, sabedoria, confiança, amizade e ensinamentos.

Aos professores, Édison José Fassani e Márvio Lobão Teixeira de Abreu pela coorientação e disposição em contribuir com esta pesquisa.

À Luciana de Paula Naves, pela colaboração, incentivo, companheirismo, paciência e humildade em dividir comigo seus conhecimentos.

Aos professores do departamento de Zootecnia e de Medicina Veterinária, pelos valiosos ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas de graduação e pós-graduação, em especial Alisson, Amanda, Antônio, Bernardo, Camila, David, Eduardo, Evelyn, Fábio, Gabriel, Juliana, Kianne, Luciana, Marcelo, Marcos Paulo, Pâmela, Rafael, Rafaela, Renata, Rodrigo, Vanessa e Yuri, pelas contribuições para realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia e do Laboratório de Nutrição Animal, especialmente Eliana, Sr. Geraldo (Totosa), José Virgílio, Leandro, Luís Carlos (Borginho) e Márcio, pela atenção, auxílio e ensinamentos.

## RESUMO GERAL

Os frangos de corte apresentam baixa ou ausência de atividade da fitase endógena, portanto, apenas uma pequena fração do fósforo fítico ( $P_{fit}$ ) da dieta é naturalmente aproveitada. Assim, é crescente o uso da fitase exógena em rações destinada a esses animais, pois esta enzima proporciona maior aproveitamento do fósforo (P). Entretanto, ao utilizar fitases em rações formuladas com reduzido teor de P, faz-se necessário avaliar a relação cálcio: P disponível ( $Ca:P_{disp}$ ) da dieta, pois ela pode interferir na eficiência catalítica da enzima. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes relações  $Ca:P_{disp}$  e suplementação de diferentes fitases (3-fitase e 6-fitase), de maneira individual ou combinada, no desempenho e determinação dos teores de cinzas ósseas, Ca e P na tíbia de frangos de corte. Foram utilizados 900 frangos de corte, machos Cobb-500<sup>®</sup>, dos 22 aos 35 dias de idade, os quais foram distribuídos em dez tratamentos (6 repetições/15aves). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, disposto em esquema fatorial  $3 \times 3 + 1$ , sendo três maneiras de suplementação da ração com fitase (1.500 FTU da 3-fitase/kg de ração; 1.500 FTU da 6-fitase/kg de ração e combinação das duas fitases na proporção de inclusão de 750 FTU/kg para cada enzima), três relações  $Ca:P_{disp}$  (7,5:1,0; 6,0:1,0 e 4,5:1,0) mais uma dieta controle positivo, sem fitase, formulada para atender as exigências nutricionais das aves. Foi avaliado o consumo de ração (CR), o ganho de peso (GP) e a conversão alimentar (CA) dos frangos no período total. Além disso, ao final do ensaio, duas aves por repetição foram abatidas, para retirada da tíbia esquerda para posteriores análises ósseas. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativa, as diferentes relações  $Ca:P_{disp}$  e as diferentes maneiras de suplementação das enzimas foram comparadas entre si pelo teste de SNK ( $P < 0,05$ ). Não houve interação entre a forma de suplementação da fitase e a relação  $Ca:P_{disp}$  da dieta, para a CA, CR, GP e teores de cinzas e Ca determinados na tíbia. Contudo, independente da relação  $Ca:P_{disp}$  da dieta, a 6-fitase proporcionou a melhor CA. Por outro lado, independente da maneira de suplementação da enzima, a relação 7,5:1,0 proporcionou a melhor CA. Houve interação das fitases e teor de fósforo na tíbia, sendo que a enzima 6-fitase nas relações 4,5:1 e 6,0:1,0 proporcionou maior conteúdo de fósforo na tíbia das aves. Conclui-se que é viável formular dietas com relação  $Ca:P_{disp}$  na ração de 4,5:1 ou 6,0:1 e 1500 FTU  $kg^{-1}$  da 6-fitase, utilizando-se apenas 1,0 g/kg de  $P_{disp}$  e na relação 4,5:1,0 para a 3-fitase, não comprometendo o desempenho e a mineralização óssea das aves.

Palavras-chave: Avicultura. Cinzas ósseas. Desempenho. Enzima. Fitato.

## GENERAL ABSTRACT

The chicken for slaughtering has low or no endogenous phytase activity. However, only a small fraction of phytic phosphorus of the diet is naturally used. Thus, the use of exogenous phytase from ration intended to these animals is crescent, because this enzyme provides greater usage of phosphorus (P). When using phytase on formulating rations with low content of P, was found to be necessary assessing the relation of available phosphorus on the diet, because this can interfere in the catalytic efficiency of the enzyme. In this work, we sought to assess the effect of different relations of available phosphorus and supplementation of two different phytases (3-phytase and 6-phytase), separated or in association, in the performance of contents of bony ashes, Calcium (Ca) and P in the tibia of chicken for slaughtering. We used 900 male-chickens, commercial line Cobb-500<sup>®</sup>, of 22 to 35 living days, using completely randomized design with ten treatments, six replications of 15 chickens in 3×3+1 factorial scheme, this representing three different forms of supplementing rations containing phytase, three relations of available phosphorus, and a diet as positive control with no phytase, formulated for attending chickens nutritional requirement. We also assessed the ration consumption (RC), weight gain (WG) and chicken feed conversion (FC). Besides, at the end of the experiment, two chicken per replication were slaughtered for extracting left tibia for further bony analysis. Data were subjected to analysis of variance and, when statistically significant, different relations of available phosphorus and different forms of enzymes supplementation were compared among themselves by using the SNK test at 5% of significance. There was no interaction between the form of phytase supplementation and the relation of available phosphorus for RC, WG, FC and content of bony ashes and Ca. Therefore, regardless the relation of available phosphorus in the diet, the 6-phytase provided the best FC. In addition, regardless the form of enzyme supplementation, the relation 7.5:1.0 also provided the best FC. There were interactions of phytase and tibia phosphorus. Thus, the enzyme 6-phytase in the proportion 4.5:1.0 and 6.0:1.0 provided greater content of phosphorus in the chicken tibia, so that we may conclude that, formulating diets using the proportion of available phosphorus on these rations and on 1500 FTU kg<sup>-1</sup> of 6-phytase, is viable, the same way such in the proportion 4.5:1.0 for the enzyme 3-phytase, without compromising the performance and bone mineralization of fowls.

Key-words: Aviculture. Bony ashes. Performance. Enzyme. Phytate.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 9
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> ..... 12
<b>2.1</b>	<b>Fitato (ácido fítico, hexafosfato de mio-inositol)</b> ..... 12
<b>2.1.1</b>	<b>Fitato em dietas para frangos de corte</b> ..... 13
<b>2.1.2</b>	<b>A atuação do fitato como fator antinutricional</b> ..... 16
<b>2.1.3</b>	<b>Formação do complexo Ca-fitato e ação da fitase</b> ..... 19
<b>2.2</b>	<b>Fitase</b> ..... 21
<b>2.3</b>	<b>Influência dos níveis de cálcio dietético e relação Ca: P sobre a utilização do fósforo fítico, desempenho e mineralização óssea nas aves</b> ..... 25
	<b>REFERÊNCIAS</b> ..... 28
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> ..... 36
	<b>ARTIGO 1 Suplementação de fitases em rações para frangos de corte com diferentes relações cálcio:fósforo</b> ..... 36

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um dos mais importantes e onerosos minerais exigidos por frangos de corte por desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético, além de participar de numerosas reações bioquímicas no organismo animal, essenciais à manutenção da vida. Entretanto, a maior parte do P encontra-se indisponível na forma de fitato (ácido fítico), que é a principal forma de armazenamento de P na maioria dos grãos, inclusive no milho e farelo de soja, os quais são amplamente utilizados nas formulações de dietas para frangos de corte.

O fitato, além de se complexar com o P, também pode ligar-se a outros minerais, como o cálcio (Ca), e outros nutrientes da dieta durante a passagem pelo trato digestório. Além disso, os animais monogástricos apresentam ausência ou baixa atividade da fitase endógena, sendo assim, apenas uma pequena fração do P fítico ( $P_{fit}$ ) é naturalmente aproveitada da dieta, o que pode comprometer a formação óssea e o desempenho das aves.

Deste modo, é crescente o uso de fitases exógenas em rações para frangos de corte, sendo sua eficácia, na disponibilização do P e demais nutrientes da dieta, comprovada em diversas pesquisas. As fitases (hexafosfato de mio-inositol fosfohidrolases) hidrolisam as ligações fosfoéster da molécula de fitato, tornando o P hidrolisado potencialmente disponível aos monogástricos, incluindo as aves (HAN et al., 2009).

O uso de fitase exógena na nutrição avícola também é favorecido por outros fatores, como a obtenção do P inorgânico ( $P_{inorg}$ ) que é um recurso natural não renovável, e sua fonte, fosfato bicálcico, ser um dos ingredientes que mais oneram a ração. Há também, atualmente, um forte apelo ambiental pela redução

da deposição de P no solo e na água, quando o P é depositado de forma irregular na água, por exemplo, pode causar a eutrofização da mesma, o que contribui para uma proliferação desenfreada de algas que consomem todo oxigênio e impedem o desenvolvimento e a manutenção da vida dos organismos ali presentes. Outro fator que contribui para o uso de fitase exógena é que, devido aos avanços das técnicas de produção desta enzima e a grande concorrência entre as empresas, o preço das fitases comercializadas vem sendo reduzido.

Entretanto, a eficácia da fitase para frangos de corte é dependente de vários fatores (SINGH, 2008), dentre eles se destacam o tipo da fitase utilizada e a relação Ca:P na dieta. As fitases podem ser classificadas em 3-fitase, as quais iniciam a hidrólise do fitato no carbono três e 6-fitase, que iniciam a hidrólise no carbono seis (SELLE; RAVINDRAN, 2007). Contudo fitases microbianas distintas (3-fitase ou 6-fitase) podem apresentar diferentes estruturas e variadas propriedades físico-químicas e catalíticas (MULLANEY; ULLAH, 2003), o que pode resultar em diferentes valores de equivalência de  $P_{inorg}$  (fosfato bicálcico).

O Ca e P são minerais que desempenham importantes funções no metabolismo fisiológico das aves e uma relação Ca:P adequada na dieta destes animais proporciona melhor aproveitamento destes minerais, o que pode resultar em uma melhora significativa na produção e desenvolvimento dos frangos de corte. Entretanto, o Ca tem alta inclusão nas dietas, em relação aos outros minerais, o que aumenta a probabilidade da formação de complexos fitato-Ca no trato digestório.

É de conhecimento que quanto maior a relação Ca:P maior será a probabilidade de formação dos referidos complexos, todavia, esses valores ainda não foram completamente estabelecidos. Também se sabe que a fase de crescimento representa aproximadamente 35% do consumo de ração dos frangos de corte, e essa fase, juntamente com a fase final de criação, representa 75% de todo consumo durante a produção. Sendo assim, este trabalho foi desenvolvido

com o objetivo de determinar qual tipo de suplementação, individual ou combinada, entre a 3 e/ou 6-fitase e qual a relação Ca:P<sub>disp</sub> que possibilite o melhor desempenho, sem comprometer a deposição de cinzas, cálcio e fósforo nos ossos de frangos de corte, no período de 22 a 35 dias de idade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fitato (ácido fítico, hexafosfato de mio-inositol)

As plantas, para o seu desenvolvimento normal, retiram seus nutrientes do solo. Na fase de maturação do grão, há uma translocação desses elementos para as sementes e, no caso do P, na forma de hexafosfato de mio-inositol ou ácido fítico. A sua função fisiológica na semente do vegetal é servir de estoque de P e outros minerais, além da energia, que são liberados pela ação da fitase endógena à medida que ocorre a germinação (BORGES et al., 1997).

Assim, o fitato é a principal forma de armazenamento de P durante o desenvolvimento de grãos, legumes e sementes (LEI; PORRES, 2003), sendo que, aproximadamente dois terços do P total ( $P_{total}$ ) nas plantas estão na forma de fitato (PUNNA; ROLAND, 1999; SANDBERG, 2002). As dietas de frangos de corte são compostas principalmente por ingredientes a base de vegetais e contém cerca de 60 a 90% do P em forma de P fítico ( $P_{fit}$ ) (CHERYAN, 1980; OBERLEAS, 1973).

No milho, cerca de 90% do ácido fítico está concentrado na parte do gérmen. A concentração de fitato nos vegetais varia de acordo com o estágio de maturidade da planta, o grau de processamento do grão, as cultivares utilizadas, fatores climáticos, localização e os anos durante os quais eles são cultivados (REDDY; SATHE; SALUNKHE, 1982; MANANGI; COON, 2006).

Segundo Selle e Ravindran (2007), o termo fitato refere-se quimicamente ao sal do ácido fítico com um único tipo de mineral como, por exemplo, fitato de sódio ou fitato de potássio. Porém, esse termo é comumente utilizado na área zootécnica, estando ele na forma livre ou na forma complexada.

De acordo com Almeida et al. (2003), o fitato é sintetizado a partir da fosforilação completa do mio-inositol (Figura 1) o qual tem a glicose como precursora.

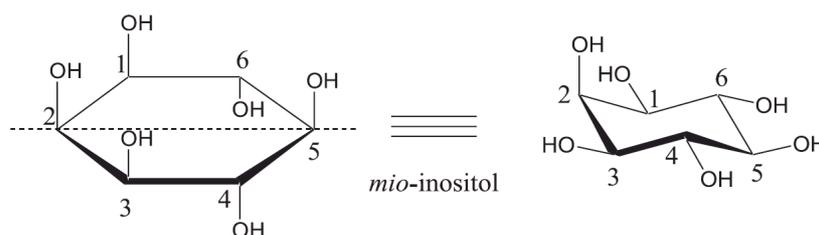


Figura 1 Estrutura do mio-inositol

Fonte: (ALMEIDA et al., 2003).

A estrutura do ácido fítico é indicativa do seu forte potencial quelante. O fitato é um ácido forte e forma uma grande variedade de sais insolúveis com cátions bivalentes ou trivalentes em pH neutro (OBERLEAS, 1973), tornando estes elementos potencialmente indisponível para a absorção (MADDAIAH et al., 1964; VOHRA; GRAY; KRATZER, 1965).

### 2.1.1 Fitato em dietas para frangos de corte

No Brasil, as rações para frangos de corte são geralmente a base de milho e farelo de soja, e o fitato está naturalmente presente nesses ingredientes. A Tabela 1 contém a concentração (valores médios) de  $P_{total}$ ,  $P$  disponível ( $P_{disp}$ ) e  $P_{fit}$  dos principais alimentos utilizados na formulação de rações para aves.

Tabela 1 Teor de fósforo dos principais alimentos utilizados nas rações de aves

Alimentos	% de fósforo (P)*		
	P total	P disponível <sup>1</sup>	P fítico
Farelo de arroz	1,67	0,24	1,43
Farinha de carne e ossos (41% de PB <sup>2</sup> )	6,53	5,88	–
Farinha de carne e ossos (44% de PB)	6,14	5,53	–
Milho	0,25	0,06	0,19
Farelo de soja (45% de PB)	0,56	0,22	0,34
Soja integral tostada	0,52	0,19	0,33
Sorgo baixo tanino	0,26	0,08	0,18
Farelo de trigo	0,97	0,33	0,64
Farinha de vísceras de aves	2,54	2,54	–
Fosfato bicálcico	18,5	18,5	–

\*Em matéria natural. Adaptado de Rostagno et al. (2011). <sup>1</sup>Valores calculados ou estimados. <sup>2</sup>PB = proteína bruta.

Observa-se, de acordo com a Tabela 1, que apenas 14,37% do  $P_{total}$  contido no farelo de arroz está disponível. Para os outros ingredientes de origem vegetal, apenas de 24,0 a 36,53% do  $P_{total}$  é  $P_{disp}$ . Já segundo o National Research Council (1994), em média de 70% do P de origem vegetal corresponde ao  $P_{fit}$ .

Também pode se verificar na Tabela 1 que as farinhas de carne e ossos (41% de PB) e a farinha de vísceras de aves contribuem com 90 e 100% de  $P_{disp}$ , respectivamente. Apesar disso, há limitações para o seu uso em rações, sendo que determinados países (principalmente europeus) não importam carnes advindas de animais alimentados com essas fontes de P (BELLAYER, 2002).

De acordo com Selle, Cowieson e Ravindran (2009) o fitato está sempre presente em dietas de aves, em uma concentração aproximada de  $10 \text{ g kg}^{-1}$  e segundo Ravindran, Bryden e Kornegay (1995), as dietas de frangos de corte contêm de 2,0 a 4,0 g de  $P_{fit}$ /kg de ração. Aproximadamente 66% do  $P_{total}$  dos

vegetais se encontram na forma de ácido fítico, o qual é indisponível para animais monogástricos devido à baixa ou ausência de atividade de fitase no trato gastrointestinal (CASEY; WALSH, 2004). Entretanto, a utilização do  $P_{fit}$  pelas aves pode variar de 0 a 50%, dependendo da idade dos animais e da adaptação metabólica em circunstâncias críticas (MANANGI; COON, 2008).

Porém, mesmo as aves conseguindo aproveitar 50% do  $P_{fit}$  presente na dieta (o que é muito difícil de ocorrer), ainda assim é necessário adicionar  $P_{inorg}$  (fosfato bicálcico) na dieta para atender às exigências nutricionais dos animais para esse mineral. Visto que o P é um mineral essencial para o desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético (é o segundo maior constituinte mineral ósseo), está envolvido no metabolismo dos lipídeos e carboidratos, faz parte da composição celular de fosfolipídeos, fosfoproteínas, ácidos nucleicos e moléculas transferidoras de energia (ATP- trifosfato de adenina), também é componente do sistema tampão fosfato no sangue, além de atuar na regulação do metabolismo através dos mecanismos de fosforilação/desfosforilação.

Portanto, o P é um nutriente essencial nas rações para aves e sua utilização eficiente é importante para a produção, visto que ele desempenha várias funções fisiológicas importantes no organismo, incluindo aquelas responsáveis pelo crescimento das aves (ASSUENA et al., 2009). Sua suplementação em dietas para frangos de corte geralmente é feita através da inclusão de fosfato bicálcico na ração.

O fosfato bicálcico é considerado uma fonte inorgânica de P 100% disponível (ROSTAGNO et al., 2011), entretanto, sua digestibilidade para aves está entre 70 e 80% (ZWART, 2009). A suplementação de P nas rações representa o 3º maior custo da produção de carne de frangos e trata-se de um recurso mineral não renovável o que tem provocado especulações de uma crise futura no seu suprimento (AUGSPURGER; FRANKENBACH; GOLDFLUS, 2010). Além disso, com a suplementação do fosfato bicálcico nas rações há um

aumento de P nas excretas das aves tanto pela perda de  $P_{fit}$ , complexado à molécula de fitato, quanto pelo P não aproveitado na forma inorgânica.

Seguindo esse raciocínio, é de se esperar que o uso de fitase exógena na ração diminua, de maneira indireta, a excreção de P advindo do fosfato utilizado, uma vez que a ração terá menor teor de fosfato em função da suplementação com fitase e consequente maior aproveitamento do  $P_{fit}$ , o qual contém grande quantidade de P (282 g de P/kg de fitato). Tudo isso interfere de forma positiva e direta na economicidade da produção, além de assegurar uma produção animal de maneira mais sustentável.

### **2.1.2 A atuação do fitato como fator antinutricional**

O ácido fítico é considerado como um fator antinutricional por complexar-se com o P e outros importantes nutrientes da dieta, diminuindo suas disponibilidades (CABAHUG et al., 1999), ele apresenta alto potencial para complexar com íons ou até mesmo moléculas, conforme demonstrado na Figura 2.

A formação do complexo fitato-mineral tem grande importância nutricional, pois os nutrientes uma vez complexados, não podem ser absorvidos no intestino (LEI; PORRES, 2003) o que interfere diretamente no desempenho zootécnico e produtividade das aves.

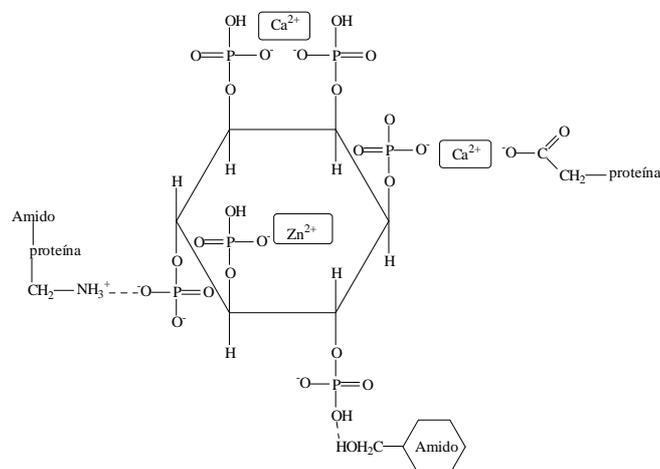


Figura 2 Exemplos de possíveis ligações entre o ácido fítico e alguns nutrientes

Fonte: (KORNEGAY, 2001).

A desprotonação dos grupos fosfatos está intimamente relacionada ao pH no qual a molécula se encontra e sabe-se que quanto maior é o grau de fosforilação do mio-inositol, maior é seu poder de complexação com nutrientes, deste modo, o número de cargas iônicas no fosfato de mio-inositol influencia a capacidade complexante das moléculas (OH et al., 2006).

O fitato carregado negativamente pode complexar-se com minerais catiônicos sendo que os divalentes (como Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>) são os mais susceptíveis (KORNEGAY, 2001). Vários pesquisadores observaram que a solubilidade desses complexos é pH dependente (SELLE et al., 2000; CHAMPAGNE, 1988). A maioria dos complexos de fitato-mineral são solúveis em pH baixo (inferiores a 3,5), com a máxima insolubilidade ocorrendo entre pH de 4 a 7 (SELLE et al., 2000). Entretanto, o pH aproximado do intestino onde a absorção dos íons metálicos ocorre, coincide com os valores de pH em que estes complexos precipitam (CHAMPAGNE, 1988).

Vohra, Gray e Kratzer (1965), utilizando-se curvas de titulação para monitorar ácido livre na presença de um único cátion, relatou que a formação de complexos de fitato com cátions segue a seguinte ordem decrescente de força:  $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Ca}^{2+}$ . Apesar do Ca ter uma das mais baixas afinidades com o fitato, ele é o que proporciona maior impacto, pois é o mineral presente em maior concentração na dieta de frangos de corte.

O Ca dietético pode complexar-se ao fitato formando complexos, ou ao  $\text{P}_{\text{inorg}}$ , formando fosfatos de Ca, como o  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (TAMIM; ANGEL; CHRISTMAN, 2004). Além de quelatar-se com o Ca, o ácido fitico é um potente agente quelante de proteínas, aminoácidos, amido e cátions (RAVINDRAN et al., 1999), também de enzimas, como a pepsina, tripsina e  $\alpha$ -amilase (SEBASTIAN; TOUCHBURN; CHAVEZ, 1998), desse modo pode reduzir a digestibilidade da ração através da formação desses complexos insolúveis. Singh e Krikorian (1982) sugeriram que o fitato pode inibir a proteólise alterando a configuração proteica das enzimas digestivas.

Também foi sugerido que o fitato pode ligar-se com a tripsina, através da formação de um complexo terciário de Ca, inibindo, assim, a atividade da tripsina. Essa inibição também pode resultar a partir da formação de quelatos de íons de Ca, que são essenciais para a atividade da tripsina e  $\alpha$ -amilase ou, possivelmente, a partir de uma interação com o substrato para estas enzimas (LIENER, 1989).

A formação desses complexos que ocorre no trato digestório das aves é de relevância nutricional, pois a má utilização dos nutrientes da dieta pode comprometer o desenvolvimento e desempenho das aves. Deste modo, a suplementação com a fitase exógena é uma alternativa para diminuir a formação desses complexos e reduzir os efeitos antinutricionais do fitato nas aves.

Biehl e Baker (1997) observaram que a adição da fitase, no nível de inclusão de 1220 FTU/kg da ração, teve uma influência positiva sobre a

utilização da metionina, lisina e ou valina derivados da proteína da soja em dietas de frangos.

Realizando um experimento com frangos de corte para avaliar o efeito de quatro níveis dietéticos de Ca (0,47; 0,70; 0,93 e 1,16%) e três níveis de  $P_{fit}$  (0,28; 0,24 e 0,10%) sobre a digestibilidade e retenção de nutrientes Plumstead et al. (2008) observaram que a digestibilidade aparente pré cecal do  $P_{fit}$  foi reduzida linearmente em até 71% quanto o nível de Ca variou de 4,7 até 11,6 g/kg de ração provavelmente, devido à maior taxa de formação do complexo fitato-Ca.

Ravindran et al. (2001), relataram que a suplementação de fitase em níveis graduais (0-1000 FTU/kg de ração) em dietas para frangos (a base de trigo e sorgo) deficientes em lisina, teve efeito significativo sobre a digestibilidade de todos os aminoácidos avaliados.

### **2.1.3 Formação do complexo Ca-fitato e ação da fitase**

A molécula de fitato transporta um máximo de 12 cargas negativas e pode potencialmente quelatar com seis átomos de Ca (VOHRA; GRAY; KRATZER, 1965). No entanto Nash, Jensen e Schmidt (1998) relataram que o fitato de Ca sólido contem uma média de 4,62 Ca átomos por molécula a pH 7. Sabe-se que a formação de complexos fitato-nutriente está intimamente ligada ao pH do meio, porém, o pH ao longo do trato digestório animal assume diferentes valores, variando de acordo com os diferentes segmentos, como pode ser observado na Figura 3.

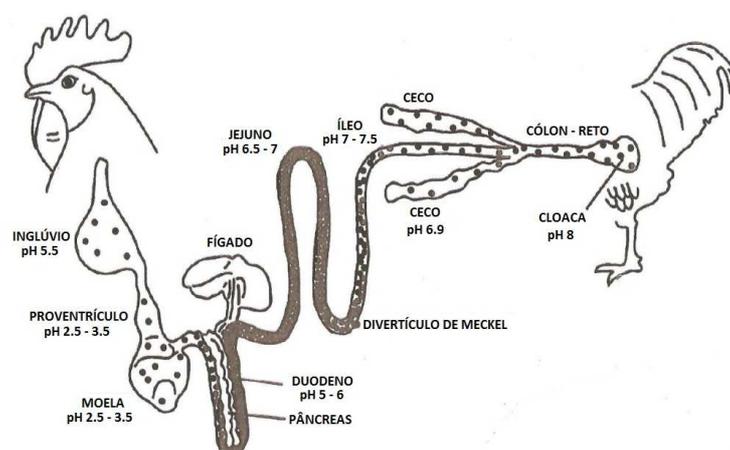


Figura 3 pH da digesta (ração farelada) nos diferentes segmentos do trato digestório do frango de corte alimentado, *ad libitum*, durante 6 semanas

Fonte: (Adaptado de Gauthier, 2002).

De acordo com Oh et al. (2001), o complexo fitato-Ca é formado principalmente em pH de 5,0 a 8,5 sendo que a afinidade do fitato pelo  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta com o aumento do pH. Porém, como pode ser observado na figura 3, apenas no proventrículo e na moela das aves, esse tipo de complexo não poderia ser formado, devido ao baixo pH (2,5 – 3,5).

Grande parte das fitases comercializadas para a nutrição animal atuam em pH ácido (fitases ácidas) e reconhecem como substrato apenas o fitato livre, ou seja, não complexado. Por conseguinte, para essas enzimas, o complexo fitato-Ca é resistente à hidrólise e o Ca atua como um fator limitante na degradação do fitato reduzindo a eficiência enzimática. Portanto, o uso de fitase ácida na ração implica em uma atuação “preventiva” (nos locais ácidos do trato digestório, como proventrículo e moela) reduzindo a formação de complexos (nas porções onde o pH é neutro ou básico). Essa atuação é interessante do ponto de vista nutricional e econômico, pois permite uma maior biodisponibilidade dos

nutrientes presentes na dieta, reduz o custo da ração e aumenta a produtividade sem prejudicar o meio ambiente.

Yu et al. (2004) realizaram um experimento avaliando a digesta retirada em diferentes segmentos do trato digestório (inglúvio, moela, duodeno, jejuno e íleo) de frangos de corte alimentados com dietas contendo 750 U de fitase/kg de ração e identificaram a presença da fitase no inglúvio, moela, duodeno e jejuno sendo que nos dois últimos segmentos a massa molecular da fitase foi inferior à 65 kDa indicando proteólise parcial da enzima. Por outro lado, a fitase apresentou atividade enzimática apenas no inglúvio, moela e duodeno, sendo a menor atividade determinada no duodeno. Já Liebert, Wecke e Schoner (1993) observaram, em aves de 3 a 5 semanas de idade, que 25-50% da atividade da fitase microbiana adicionada à ração foi detectada no inglúvio, 10-25% no proventrículo e nenhuma atividade foi detectada no intestino delgado.

Pressupõe-se que as fitases exógenas hidrolisam o fitato em segmentos anteriores ao duodeno resultando em fosfatos de mio-inositol menores, os quais têm uma capacidade desproporcionalmente reduzida (em relação ao  $IP_6$ ) para quelatar e indisponibilizar o  $Ca^{2+}$  (NAVES, 2012).

Porém, a possibilidade de complexação durante a passagem do alimento pelo inglúvio (pH 5,5) não pode ser descartada e é provável que esse evento comprometa em algum grau a eficácia das fitases ácidas suplementadas na ração. Portanto, é provável que várias moléculas de fitato cheguem intactas ao intestino ou desfosforiladas apenas parcialmente possibilitando sua complexação com o  $Ca^{2+}$  e outros nutrientes.

## **2.2 Fitase**

A fitase comercial ou mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolase é uma enzima pertencente, na sua maioria, ao grupo das fosfatases de histidina ácida,

que hidrolisa o ácido fítico e seus sais, produzindo inositol, inositol monofosfato e  $P_{\text{inorg}}$  (CASEY; WALSH, 2004). De acordo com Lei e Porres (2003), essa enzima catalisa a reação de desfosforilação do ácido fítico em ésteres de fosfato de mio-inositol menores e  $P_{\text{inorg}}$ . A hidrólise do fitato é um processo serial, portanto, cada intermediário fosfatado do mio-inositol é liberado da enzima e pode ser o substrato para a hidrólise seguinte. Teoricamente, a hidrólise enzimática completa do fitato gera uma série de fosfatos de mio-inositol menores ( $IP_6 \rightarrow IP_5 \rightarrow IP_4 \rightarrow IP_3 \rightarrow IP_2 \rightarrow IP_1$ ), por meio de uma série de reações de desfosforilação, para produzir o mio-inositol e seis  $P_{\text{inorg}}$ . Entretanto, o mecanismo de catálise e o grau de desfosforilação do ácido fítico são variáveis entre fitases diferentes (GREINER et al., 2002).

A fitase é amplamente encontrada nos microrganismos, plantas e certos tecidos animais, entretanto as fontes microbianas são as mais adequadas para sua produção em escala comercial (VATS; BANERJEE, 2004). A maioria das fitases produzidas na indústria são oriundas de alguns fungos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus ficcum*, *Aspergillus oryzae*), bactérias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Estas fitases possuem uma maior faixa de atuação em relação às fitases de plantas e são mais efetivas no ambiente gastrointestinal e resistentes à ação de enzimas digestivas.

Duas classes de fitases são reconhecidas pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e pela *International Union of Biochemistry* (IUB): A mioinositol hexaquisfosfato 3-fosfohidrolase (EC 3.1.3.8) denominada 3-fitase e que libera preferencialmente o P na posição C3, e a mioinositol hexaquisfosfato 6-fosfohidrolase (EC 3.1.3.26) denominada 6-fitase, a qual inicia a hidrólise na posição C6 (GREINER et al., 2002; RAGON et al., 2008). Entretanto, segundo Wodzinski e Ullah (1996) a 3-fitase não é capaz de hidrolisar o inositol monofosfato, enquanto a 6-fitase hidrolisa completamente o ácido fítico.

De acordo com o pH de ação, as fitases podem ser classificadas em: fitases ácidas (com pH ótimo entre 2,5 e 6,0) ou fitases alcalinas (com pH ótimo entre 6,0 e 8,0) (GREINER et al., 2001). A atividade da fitase é expressa, normalmente, em unidades de fitase (FTU) sendo que uma FTU é a quantidade de  $P_{inorg}$  liberado ( $\mu\text{mol}$ ) durante um minuto de reação em uma solução de fitato de sódio 5,1 mmol/L em pH 5,5 e temperatura de 37°C (ENGELEN et al., 1994).

No Brasil, mais de 50% do plantel de frangos de corte recebe fitase nas dietas. Isto, sem dúvida, está alicerçado na especificidade da ação desta enzima sobre um substrato específico, melhorando a disponibilidade do P (MENEGETTI, 2013). Além de melhorar o aproveitamento de P, a suplementação com fitase pode aumentar os valores energéticos das rações e, conseqüentemente, o aproveitamento de outros nutrientes, como proteínas, aminoácidos, Zn e Cu (NAMKUNG; LEESON, 1999; CONTE et al., 2002).

Choct (2006), em revisão, destacou que a fitase exógena permite aumentar entre 25 a 75% a disponibilidade do P presente do fitato. Através de outros trabalhos, verifica-se que é possível reduzir níveis de nutrientes nas dietas, mantendo satisfatoriamente o desempenho das aves e minimizando a excreção de alguns elementos minerais (GOMIDE et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Recentemente, Walk et al. (2013) verificaram que superdoses ( $>1.500$  FTU/kg) de fitase microbiana melhorou o desempenho, particularmente a conversão alimentar (CA), em frangos de corte aos 49 dias de idade alimentados com dietas com redução de Ca e P disponível.

Naves (2012) realizou um experimento de metabolismo para avaliar o efeito do nível de inclusão de 6-fitase (0, 750, 1.500 e 2.500 FTU  $\text{kg}^{-1}$  da dieta) em uma dieta deficiente em  $P_{disp}$ , sobre o coeficiente de hidrólise do  $P_{fit}$ , utilizando valores de  $P_{fit}$  determinados nas dietas e excretas, e concluíram que 1.500 FTU  $\text{kg}^{-1}$  proporcionaram o maior aproveitamento do  $P_{fit}$  (88,45%).

Naves (2012), ao analisar a eficiência de seis fitases microbianas suplementadas em rações (1.500 FTU/kg de ração), formuladas com três diferentes relações Ca:P<sub>disp</sub> (3,5:1; 5,0:1 e 6,5:1) e fornecidas a frangos de corte no período de 35 a 42 dias de idade, concluiu que é possível reduzir o teor de fósforo disponível da ração para 1,0 g/kg de ração ao suplementá-la com 1500 unidades de atividade de fitase.

O teor preconizado de fitase (FTU) pela indústria, em dietas para frangos de corte, é de 500 FTU/kg de dieta, o qual libera em média, 0,1% de P<sub>disp</sub> (DARI, 2006).

Augspurger e Baker (2004) realizaram um trabalho com frangos de corte suplementando uma dieta a base de milho e farelo de soja deficiente em Ca (4,8 g/kg) com fitase de *E. coli* (500 FTU/kg) e concluíram que a fitase liberou em média 0,90 g de Ca/kg de ração com base nas cinzas da tibia. Schöner et al. (1994) observaram, também em experimento com frangos de corte, que 500 FTU da fitase de *A. niger* equivale a 0,444 g de Ca/kg de ração (a dieta basal continha 4,0 g de Ca/kg; 6,0 g de P<sub>total</sub>/kg e 2,3 g de P<sub>disp</sub>/kg).

Diferentemente dos resultados encontrados acima, Yan et al. (2006) observaram que a fitase disponibiliza quantidades mínimas de Ca em frangos de corte (em rações a base de milho-soja suplementadas com 1000 FTU/kg, três níveis de Ca e oito de P<sub>disp</sub>). Mitchell e Edwards (1996) também relataram que a fitase exógena não reduziu as necessidade de Ca na dieta de frangos jovens (as dietas continham 2,02 g de P<sub>fit</sub>/kg de ração e a relação Ca:P variou de 0,86 a 2,30).

Infelizmente ainda não é possível tirar uma conclusão objetiva da equivalência de Ca pela fitase, pois diferenças entre as pesquisas (tipo de fitase, composição da ração, parâmetros avaliados para determinar a equivalência, relação Ca:P<sub>disp</sub>; relação Ca:P<sub>fit</sub>, etc.) dificultam a comparação de dados, o que justifica resultados de equivalência tão diferentes.

### **2.3 Influência dos níveis de cálcio dietético e relação Ca: P sobre a utilização do fósforo fítico, desempenho e mineralização óssea nas aves**

De acordo com Edwards Júnior e Veltmann (1983) níveis de Ca e P na ração para frangos influenciam a utilização do  $P_{fit}$ . As aves que consomem rações com baixos níveis de P e Ca inorgânicos apresentam maior capacidade para hidrolisar o fitato do que aquelas que recebem níveis altos (DENBOW et al., 1995). E a relação Ca:P influencia a atividade da fitase, que é reduzida com a elevação do nível de cálcio na ração (QUIAN; KORNEGAY; DENBOW, 1997). Em rações práticas suplementadas com fitase, esta relação parece mais crítica do que quantidades individuais destes minerais.

A elevação da relação Ca:P reduz significativamente o desempenho de frangos alimentados com rações à base de milho e farelo de soja suplementadas com fitase (LEESON, 1999), provavelmente devido à reação do cálcio com o ácido fítico, formando o fitato de cálcio, que precipita e não pode ser hidrolisado pela fitase. Além disso, complexos terciários de proteína-fitato podem ser formados no intestino delgado, sendo que estes complexos são formados apenas na presença de cátions bivalentes, especialmente de  $Ca^{2+}$  (SING, 2008), o que também pode comprometer o desempenho e mineralização óssea das aves.

Trabalhos realizados por diversos autores (SEBASTIAN et al., 1996; MCGUAIG; DAVIES; MOTZOK, 1972; WISE, 1983; SHAFEY; MCDONALD, 1991) concluíram que ampla relação Ca:P na dieta de frangos de corte reduz a eficácia da fitase e a utilização do P em altas concentrações de Ca através (1) da ligação da molécula de fitato no Ca em excesso formando complexos insolúveis que são menos acessíveis a fitase (2) o excesso de cálcio dietético competindo diretamente com o sítio ativo da fitase (3) aumento do pH intestinal causado pelo Ca, o qual reduz a solubilidade mineral, e, conseqüentemente, a disponibilidade.

Tamim e Angel (2003), analisando a hidrólise *in vitro* do  $P_{fit}$  através da 3-fitase, em pH de 2,5 e 6,5, e com diferentes níveis de inclusão de Ca ou premix mineral, observaram que a adição de Ca ou premix mineral reduziu a hidrólise do fósforo fítico em ambos os pHs, entretanto o maior efeito foi observado no pH de 6,5.

Rama et al. (2006) afirmaram que tanto o Ca quanto o P coexistem em várias funções biológicas no organismo, e a exigência dietética destes minerais é interdependente. Sendo que, o excesso de Ca na dieta reduz a absorção de P, devido à formação de complexos insolúveis no lúmen intestinal. Em contrapartida, um baixo nível de Ca é insuficiente para a mineralização do osso. Esses mesmos autores mostraram que o aumento das concentrações dietéticas de Ca (0,6-0,9%) entre 22 e 42 dias de idade pode ser prejudicial para o desempenho e mineralização óssea das aves, caso o P dietético não for aumentado na medida em que se aumenta o Ca. Outros estudos realizados para avaliar a interação entre Ca e P dietéticos têm mostrado que as aves alimentadas com dietas com um alto teor de Ca e baixo teor de P possuem menor teor de cinzas na tíbia e apresentam maior incidência de raquitismo (DRIVER et al., 2005).

Rousseau et al.(2012), analisando os efeitos do Ca dietético e fitase microbiana na utilização do P em frangos de corte dos 21 aos 38 dias de idade, observaram que o aumento da concentração de Ca dietético de 0,37-0,57 e 0,77% melhorou o conteúdo de cinzas da tíbia 30,5-32,5 e 32,8% respectivamente e a adição de fitase (500 FTU/kg da ração) também resultou em um aumento significativo no teor de cinzas na tíbia de frangos de corte alimentados com dietas com baixos níveis de  $P_{disp}$ .

No trabalho de revisão realizado por Selle, Cowieson e Ravindran (2009) observa-se que atualmente as fitases comercializadas são mais eficientes quando as dietas de aves contém reduzido nível de Ca e baixa relação  $Ca:P_{total}$ ,

entretanto esses valores ainda não estão completamente estabelecidos. Desta forma, é necessário pesquisas que determinem qual a melhor relação Ca:P<sub>disp</sub> para frangos de corte nas diferentes fases de criação, quando suplementa-se as rações com fitase.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. V. de et al. A cascata dos fosfoinosítídeos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 105–111, jan./fev. 2003.
- ASSUENA, V. et al. Effect of dietary phytase supplementation on the performance, bone densitometry, and phosphorus and nitrogen excretion of broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 25–30, Jan./Mar. 2009.
- AUGSPURGER, N. R.; BAKER, D. H. High dietary phytase levels maximize phytate-phosphorus utilization but do not affect protein utilization in chicks fed phosphorus- or amino acid -deficient diets. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 135, n. 7, p. 1712-1717, July 2004.
- AUGSPURGER, N. R.; FRANKENBACH, S. D.; GOLDFLUS, F. Phytase & phosphorus: an overview of the U.S. poultry industry. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 4., 2010, Estância de São Pedro. **Anais...** Estância de São Pedro: Stilo, 2010. p. 129–134.
- BELLAVER, C. Uso de resíduos de origem animal na alimentação de frangos de corte. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 3., 2002, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Embrapa, 2002. p. 6–22.
- BIEHL, R. R.; BAKER, D. H. Microbial phytase improves amino acid utilization in young chicks fed diets based on soybean meal but not diets based on peanut meal. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 2, p. 355-360, Feb. 1997.
- BORGES, F. M. O. et al. Avaliação de fontes de fósforo para frangos de corte em crescimento, considerando-se o fósforo disponível. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 49, n. 5, p. 629-638, out. 1997.
- CABAHUG, S. et al. Response of broilers to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. I. Effects on broiler performance and toe ash content. **British Poultry Science**, London, v. 40, n. 5, p. 660-666, Dec. 1999.

CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 313-322, May 2004.

CHAMPAGNE, E. T. Effects of pH on mineral-phytate, proteinmineral- phytate, and mineral-fiber interactions. Possible consequences of atrophic gastritis on mineral bioavailability from highfiber foods. **The Journal of the American College of Nutrition**, Clearwater, v. 7, n. 6, p.499-508, Dec. 1988.

CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amherst, v. 13, n. 4, p. 297-335, May 1980.

CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 5-15, Mar. 2006.

CONTE, A. J. et al. Efeito da fitase e xilanase sobre a energia metabolizável do farelo de arroz integral em frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1289-1296, nov./dez. 2002.

DARI, R. L. Porque utilizar blend de enzimas e não apenas uma? In: SEMINÁRIOS TÉCNICOS NUTRON, 2006, Campinas. **Anais...** Campinas: Nutron, 2006. 1 CD-ROM.

DENBOW, D. M. et al. Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. **Poultry Science**, Champaign, v. 74, n. 11, p. 1831-1842, Nov.1995.

DRIVER, J. P. et al. Effects of calcium and nonphytate phosphorus concentrations on phytase efficacy in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 9, p. 1406–1417, Sept. 2005.

EDWARDS JUNIOR, H. M.; VELTMANN, J. R. The role of calcium and phosphorus in the etiology of tibial dyscondroplasia in young chicks. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 113, n. 8, p. 1568-1575, Aug. 1983.

ENGELEN, A. J. et al. Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal of AOAC International**, Washington, v. 77, n. 3, p. 760–764, May/June 1994.

GAUTHIER, R. La salud intestinal: clave de la productividad (El caso de los Ácidos Orgânicos). In: PRECONGRESO CIENTIFICO AVICOLA, 27., 2002, México. **Anais...** México: IASA, 2002. Disponível em: <<http://www.engormix>>

com/MA-avicultura/nutricion/ articulos/salud-intestinal-clave-productividad-t518/p0.htm>. Acesso em: 23 maio 2014.

GOMIDE, E. M. et al. Planos nutricionais com a utilização de aminoácidos e fitase para frangos de corte mantendo o conceito de proteína ideal nas dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 6, p. 1769–1774, nov./dez. 2007.

GREINER, R. et al. The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 11, p. 986–994, Nov. 2002.

GREINER, R.; ALMINGER, M. L.; CARLSSON, N.-G. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of baker's yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 5, p. 2228–2233, May 2001.

HAN, J. C. et al. Evaluation of equivalency values of microbial phytase to inorganic phosphorus in 22- to 42-day-old broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 18, n. 4, p. 707–715, Dec. 2009.

KORNEGAY, E. T. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Wallingford: CABI, 2001. p. 237–271.

LEESON, S. Enzimas para aves. In. SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES, 1999, Campinas. **Anais...** Campinas: Facta, 1999. p. 173-185.

LEI, X. G.; PORRES, J. M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, n. 21, p. 1787–1794, Nov. 2003.

LIEBERT, F.; WECKE, C.; SCHONER, F. J. Phytase activities in different gut contents of chickens as dependent on levels of phosphorus and phytase supplementations. In: SYMPOSIUM ON ENZYMES IN ANIMAL NUTRITION. 1993, Switzerland. **Anais...** Switzerland: Warth-Weiningen, 1993. p. 202–205.

- LIENER, I. E. Anti nutritional factors in legume seeds: state of art. In: HUISMEN, J.; VAN DER POEL, T. F. B.; LIENER, I. E. (Ed.). **Recent advances of research on anti- nutritional factors in legume seeds**. Wageningen: EAAP, 1989. p. 6-13.
- MADDAIAH, V. T. et al. Nature of intestinal phytase activity. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 115, n. 4, p. 1054-1057, Apr. 1964.
- MANAGI, M. K.; COON, C. K. Phytate phosphorus hydrolysis in broilers in response to dietary phytase, calcium, and phosphorus concentrations. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, n. 8, p. 1577-1586, Aug. 2008.
- MANANGI, M. K.; COON, C. K. Evaluation of phytase enzyme with chicks fed basal diets containing different soyabean meal samples. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 15, n. 2, p. 292-306, Apr. 2006.
- MCGUAIG, L. W.; DAVIES, M. I.; MOTZOK, I. Intestinal alkaline phosphatase and phytase of chicks: Effect of dietary magnesium, calcium, phosphorus, and thyroactive casein. **Poultry Science**, London, v. 51, n. 2, p. 526-530, Mar. 1972.
- MENEGHETTI, C. **Associação de enzimas em rações para frangos de corte**. 2013. 93 p. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção de Não Ruminantes) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- MITCHELL, R. D.; EDWARDS, H. M. Effects of phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on phytate utilization and the quantitative requirement for calcium and phosphorus in young broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, n. 1, p. 95–110, Jan. 1996.
- MULLANEY, E. J.; ULLAH, A. H. J. The term phytase comprises several different classes of enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 312, n. 1, p. 179–184, Dec. 2003.
- NAMKUNG, H.; LEESON, S. Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, n. 9, p. 1317-1319, Sept. 1999.
- NASH, K. L.; JENSEN, M. P.; SCHMIDT, M. A. Actinide immobilization in the subsurface environment by in-situ treatment with a hydrolytically unstable organophosphorous complexant: uranyl uptake by calcium phytate. **Journal of**

**Alloys and Compounds**, Lausanne, v. 271, n. 1, p. 271–273, 257–261, June 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of poultry. 9. ed. Washington: **National Academy of Science**, 1994.

NAVES, L. de P. **Metodologias para quantificar fitato e uso de fitases em rações para frangos de corte**. 2012. 152 p. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção de não Ruminantes) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

OBERLEAS, D. Phytate. In: OBERLEAS, D. **Toxicants occurring naturally in foods**. Washington: National Academy of Sciences, 1973. p. 363-371.

OH, B.-C. et al. Ca<sup>2+</sup>-inositol phosphate chelation mediates the substrate specificity of  $\beta$ -propeller phytase. **Biochemistry**, New York, v. 45, n. 31, p. 9531–9539, Aug. 2006.

OH, B.-C. et al. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. **Biochemistry**, New York, v. 40, n. 32, p. 9669–9676, Aug. 2001.

PLUMSTEAD, P. W. et al. Interaction of calcium and phytate in broiler diets. 1. Effects on apparent prececal digestibility and retention of phosphorus. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, n. 3, p. 449–458, Mar. 2008.

PUNNA, S.; ROLAND, D. A. Variation in phytate phosphorus utilization within the same broiler strain. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 8, n. 1, p. 10-15, 1999.

QIAN, H.; KORNEGAY, E. T.; DENBOW, D. M. Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol and the calcium: total phosphorus ratio in broiler diets. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 5, p. 37-46, May 1997.

RAGON, M. et al. Complete hydrolysis of myo-inositol hexakisphosphate by a novel phytase from *Debaryomyces castellii* CBS 2923. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 78, n. 1, p. 47–53, Feb. 2008.

RAMA, R. A. O. et al. Interaction between dietary calcium and non-phytate phosphorus levels on growth. Bone mineralization and mineral excretion in commercial broilers. **Animal Feed Science and Technology**, Athens, v. 131, n. 2, p. 133-148, Nov. 2006.

RAVINDRAN, V. et al. () Influence of supplemental microbial phytase on the performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, n. 3, p. 338-344, Mar. 2001.

RAVINDRAN, V. et al. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broiler. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, n. 4, p. 699-706, Apr. 1999.

RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L.; KORNEGAY, E. T. Phytases: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. **Poultry and Avian Biology Reviews**, Northwood, v. 6, n. 2, p. 125-143, Mar. 1995.

REDDY, N. R.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Phytates in legumes and cereals. **Advances in Food Research**, Lincoln, v. 28, p. 1-9, 1982.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa: Editora da UFV, 2011.

ROUSSEAU, X. et al. Phosphorus utilization in finish broiler chickens: Effects of dietary calcium and microbial phytase. **Poultry Science**. Champaign, v. 91, n. 11, p. 2829-2937, Nov. 2012.

SANDBERG, A. S. Bioavailability of minerals in legumes. **British Journal of Nutrition**, Southampton, v. 88, n. 3, p. S281-S285, Dec. 2002.

SCHÖNER, F. J. et al. Effect of microbial phytase on Ca-availability in broilers. In: SCHÖNER, F. J. et al. **Third conference on poultry and swine nutrition**. Germany: Halle, 1994. p. 147-150.

SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S. P.; CHAVEZ, E. R. Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. **World's Poultry Science Journal**, Oxford, v. 54, n. 1, p. 27-47, Mar. 1998.

SEBASTIAN, S. et al. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. **Poultry Science**. Champaign, v. 75, n. 6, p. 729-736, June 1996.

SELLE, P. H. et al. Phytate and phytase: consequences for protein utilization. **Nutrition Research Reviews**, Belfast, v. 13, n. 2, p. 255-278, Dec. 2000.

SELLE, P. H.; COWIESON, A. J.; RAVINDRAN, V. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. **Livestock Science**, New York, v. 124, n. 1–3, p. 126–141, Sept. 2009.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Athens, v. 135, n. 1-2, p. 1–41, May 2007.

SHAFEY, T. M.; MCDONALD, M. W. The effects of dietary calcium, phosphorus and protein on the performance and nutrient utilization of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 70, n. 3, p. 548-553, Mar. 1991.

SILVA, Y. L. da et al. Níveis de proteína e fósforo em rações com fitase para frangos de corte, na fase de 14 a 21 dias de idade. 2. Valores energéticos e digestibilidade de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 469–477, Mar. 2008.

SINGH, M.; KRIKORIAN, A. D. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v. 30, n. 4, p. 799-800, July 1982.

SINGH, P. K. Significance of phytic acid and supplemental phytase in chicken nutrition: a review. **World's Poultry Science Journal**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 553-580, Dec. 2008.

TAMIM, N. M.; ANGEL, R. Phytate phosphorus hydrolysis as influenced by dietary calcium and micro-mineral source in broiler diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 51, n. 16, p. 4687–4693, July 2003.

TAMIM, N. M.; ANGEL, R.; CHRISTMAN, M. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 8, p. 1358–1367, Aug. 2004.

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

VOHRA, P.; GRAY, G. A.; KRATZER, F. H. Phytic acid-metal complexes. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 120, n. 2, p. 447-449, Nov. 1965.

WALK, C. L. et al. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. **Poultry Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 719–725, Apr. 2013.

WISE, A. Dietary factors determining the biological activities of phytate. **Nutrition Abstracts and Reviews**, Farnham, v. 53, p. 791-806, 1983.

WODZINSKI, R. J.; ULLAH, A. H. J. Phytase. **Advances in Applied Microbiology**, Somerset, v. 42, p. 263-302, 1996.

YAN, F. et al. Effect of phytase supplementation on the calcium requirement of broiler chicks. **International Journal of Poultry Science**, New York, v. 5, n. 2, p. 112–120, May 2006.

YU, B. et al. Exogenous phytase activity in the gastrointestinal tract of broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, Athens, v. 117, n. 3-4, p. 295–303, Dec. 2004.

ZWART, S. Properties of high quality feed phosphates. In: CONGRESSO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2009, Campinas. **Anais...** Campinas: CBNA, 2009. p. 15–18.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO 1 ‘Suplementação de fitases em rações para frangos de corte com diferentes relações cálcio:fósforo**

**Nardelli, N. B. S.; Rodrigues, P. B. et al.**

**Artigo redigido conforme normas da Revista *Animal Feed Science and Technology***

## Suplementação de fitases em rações para frangos de corte com diferentes relações cálcio:fósforo

### RESUMO

Um experimento foi realizado com 900 frangos de corte no período de 22 a 35 dias de idade para avaliar o efeito de diferentes relações cálcio:fósforo disponível ( $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ ) e suplementação de diferentes fitases (3-fitase e 6-fitase), de maneira individual ou combinada, no desempenho e determinação dos teores de cinzas ósseas, Ca e P na tíbia. As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, disposto em esquema fatorial  $3 \times 3 + 1$ , sendo três maneiras de suplementação da ração com fitase (1.500 FTU da 3-fitase/kg de ração; 1.500 FTU da 6-fitase/kg de ração e combinação das duas fitases na proporção de inclusão de 750 FTU/kg para cada enzima), três relações  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  (7,5:1,0; 6,0:1,0 e 4,5:1,0) mais uma dieta controle positivo, sem fitase, formulada para atender as exigências nutricionais das aves no período avaliado. Seis repetições de quinze aves foram utilizadas para cada tratamento avaliado. Foram avaliados o consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) dos frangos no período total. Além disso, ao final do ensaio, duas aves por repetição foram abatidas, para retirada da tíbia esquerda para posteriores análises ósseas. Não houve interação entre a forma de suplementação da fitase e a relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  da dieta, nem efeito isolado destes fatores, para o CR, GP e teores de cinzas e Ca determinados na tíbia. Também não foi observada interação entre os fatores avaliados para a CA das aves. Contudo, independente da relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  da dieta, a 6-fitase proporcionou a melhor CA. Por outro lado, independente da maneira de suplementação da enzima, a relação 7,5:1,0 proporcionou a melhor CA. Além disso, para todos os parâmetros de desempenho avaliados, não houve diferença entre a dieta controle positivo e as demais dietas experimentais. Entretanto, para o teor de P na tíbia, houve interação das fitases e as diferentes relações  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ , sendo que a ração contendo a enzima 6-fitase nas relações  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  de 4,5:1 e 6,0:1,0 proporcionaram maior deposição de P na tíbia das aves. Em comparação à dieta controle, as aves alimentadas com a ração formulada com a relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  6,0:1,0 suplementada com a 3-fitase, apresentaram menores teores de cinzas ósseas e P. Portanto, é viável formular dietas com relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  na ração de 4,5:1 ou 6,0:1 e 1500 FTU  $\text{kg}^{-1}$  da 6-fitase, e na relação 4,5:1,0 para a 3-fitase utilizando-se apenas 1,0 g/kg de  $\text{P}_{\text{disp}}$ .

Palavras-chave: aves, cinzas ósseas, desempenho, enzima, fitato, relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ .

## 1. Introdução

Os frangos de corte são animais que apresentam baixa ou ausência de atividade da fitase endógena e, deste modo, de acordo com Lalpanmawia et al. (2014), dois terços do fósforo (P) presente em rações de origem vegetal, em forma de ácido fítico, são excretados sem digestão. Além disso, o ácido fítico tem uma capacidade substancial para complexar com cátions divalentes, incluindo cálcio (Ca), formando complexos fitato-mineral (SELE et al. 2009). A formação desses complexos tem uma grande importância nutricional, pois os nutrientes complexados não podem ser absorvidos no intestino (LEI; PORRES, 2003). Desta forma, é crescente o uso de fitases microbianas nas dietas fornecidas aos frangos de corte.

As fitases (hexafosfato de mio-inositol fosfohidrolases) hidrolisam as ligações fosfoéster da molécula de fitato, tornando o fósforo hidrolisado potencialmente disponível para as aves (HAN et al., 2009). Deste modo, além de aumentar a disponibilização do P fítico, e assim reduzir a inclusão de P inorgânico ( $P_{inorg}$ ) na ração (que é um recurso natural não-renovável e um dos ingredientes que mais oneram a ração), o uso da fitase também contribui com a diminuição do impacto ambiental devido a menor excreção de P no ambiente.

As fitases são classificadas em duas categorias, de acordo com o local onde a hidrólise do fitato se inicia. A 3-fitase (EC 3.1.3.8) libera preferencialmente o P na posição C3, enquanto a 6-fitase (EC 3.1.3.26) inicia a hidrólise na posição do C6 do anel de hexafosfato de mio-inositol (SELLE; RAVINDRAN, 2007). Porém, fitases microbianas distintas podem apresentar diferentes estruturas e variadas propriedades físico-químicas e catalíticas (MULLANEY; ULLAH, 2003), o que pode resultar em diferentes respostas de desempenho e mineralização óssea nos frangos de corte.

Em experimento de metabolismo, Naves (2012) avaliou o efeito do nível de inclusão de 6-fitase (0, 750, 1.500 e 2.250 unidades de atividade da fitase, FTU, por kg de dieta), em dieta deficiente em P disponível ( $P_{disp}$ ), sobre o coeficiente de hidrólise do P fítico ( $P_{fit}$ ), cujos valores foram determinados nas dietas e nas excretas, e concluiu que 1.500 FTU  $kg^{-1}$  proporcionaram o maior aproveitamento do  $P_{fit}$  (88,45%). Ainda de acordo com Naves (2012), é possível reduzir o teor de  $P_{disp}$  da ração de frangos de corte (dos 35 aos 42 dias de idade) para 1,0 g/kg de ração ao suplementá-la com 1500 unidades de atividade de fitase (FTU).

Entretanto, as condições que otimizam a ação da fitase e a eficiência do P ainda não foram determinados, especialmente em relação ao Ca (NARCY et al., 2009). Segundo Angel et al. (2002), os níveis dietéticos de Ca (e a relação Ca:P) são cruciais para a eficácia da fitase. Porém, se por um lado níveis elevados de Ca e a relação Ca:P mais ampla nas dietas, diminuem a eficácia da fitase exógena, (LEI et al. 1994), do outro, sua deficiência nutricional pode comprometer a integridade óssea e prejudicar o desempenho de frangos de corte (SELLE et al., 2009).

Portanto, este trabalho foi realizado para determinar qual tipo de suplementação, individual ou combinada, entre a 3 e/ou 6-fitase e qual a relação Ca: $P_{disp}$  que possibilite a melhor deposição de cinzas, cálcio e fósforo nos ossos de frangos de corte, sem comprometer o desempenho, no período de 22 a 35 dias de idade.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Aves e procedimentos experimentais

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, Brasil. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras, sob o protocolo nº 004/11.

Foram utilizados 900 frangos machos, da linhagem comercial Cobb-500<sup>®</sup> na fase de crescimento (dos 22 aos 35 dias de idade). As aves foram adquiridas em incubatório comercial, com um dia de idade e criadas em galpão convencional para frangos de corte até os 21 dias, compondo um lote único. Durante este período, água e ração foram fornecidas a vontade. As rações foram à base de milho e farelo de soja, formuladas para atender as necessidades nutricionais específicas de cada fase das aves (de 1 a 7 e de 8 a 21 dias de idade) segundo as recomendações de Rostagno et al. (2011).

No 22º dia, as aves foram pesadas individualmente, homogeneizadas por faixas de peso ( $936,39 \pm 9,94$ ) e distribuídas em 60 boxes de 2,0 x 1,5 metros (com 15 aves cada) em galpão de desempenho. Cada parcela experimental foi composta por um bebedouro e um comedouro do tipo pendular e o piso coberto com maravalha. As rações foram fornecidas à vontade, de acordo com os tratamentos sorteados para cada parcela experimental, assim como a água que também foi fornecida à vontade durante todo ensaio.

O programa de luz adotado foi o de luz contínua, com 24 horas de iluminação durante todo período experimental. As temperaturas e umidades máxima e mínima foram registradas, diariamente, às 16 horas, por meio de um termo-higrômetro localizado na parte central do galpão, aproximadamente na

altura das aves. A média máxima e mínima das temperaturas no galpão durante a fase experimental foi de 34,0 °C e 19,9 °C, respectivamente. Já a média da umidade relativa máxima foi de 96,7% e da umidade relativa mínima de 41,9%.

## 2.2. Delineamento experimental e dietas

As 900 aves foram distribuídas em 10 tratamentos (Tabela 1) com seis repetições cada, totalizando 60 unidades experimentais com 15 aves cada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, disposto em esquema fatorial  $3 \times 3 + 1$ , sendo três relações Ca:P<sub>disp</sub> (ração com 0,10% de P<sub>disp</sub> e com nível de Ca de 0,75%, atendendo à exigência, e rações com dois níveis de Ca abaixo da exigência – 0,45 e 0,60%, resultando nas três relações Ca:P<sub>disp</sub> - 7,5; 6,0 e 4,5:1) e três maneiras de suplementação da fitase, cujo nível de suplementação foi de 1.500 FTU/kg, sendo: (1) 1.500 FTU da 3-fitase/kg de ração; (2) 1.500 FTU da 6-fitase/kg de ração e (3) combinação das duas fitases na proporção de 50:50 de modo a atender aos 1.500 FTU/kg.

Foram utilizadas fitases de diferentes origens microbianas, sendo a 6-fitase uma enzima expressa por *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado com genes de *Citrobacter braakii* enquanto a 3-fitase foi produzida por *A. niger* modificado geneticamente pela adição do gene que codifica fitase de *A. ficuum*. As diferentes relações Ca:P<sub>disp</sub> foram ajustadas variando-se a quantidade de fosfato e calcário nas rações.

As dietas experimentais (Tabela 2) foram à base de milho e farelo de soja e disponibilizadas aos animais na forma farelada. A ração controle positivo, sem adição de fitase, foi formulada segundo as recomendações de Rostagno et al. (2011) para fins de comparação da eficácia da fitase e para atender as necessidades nutricionais das aves. As demais rações experimentais foram

deficientes em  $P_{\text{disp}}$  e suplementadas com fitase, considerando-se que essa enzima disponibilizaria o  $P_{\text{fit}}$  equivalente ao atendimento da exigência em  $P_{\text{disp}}$ .

Tabela 1 Tratamentos experimentais

<b>Tratamentos</b>	<b>Relação Ca:P*</b>	<b>Fitase</b>
1	2,0:1	Sem adição de fitase
2	4,5:1	6-fitase
3	6,0:1	6-fitase
4	7,5:1	6-fitase
5	4,5:1	3-fitase
6	6,0:1	3-fitase
7	7,5:1	3-fitase
8	4,5:1	50% 3-fitase + 50% 6-fitase
9	6,0:1	50% 3-fitase + 50% 6-fitase
10	7,5:1	50% 3-fitase + 50% 6-fitase

\* Dieta controle positivo foi formulada com 0,75% de Ca e 0,34% de  $P_{\text{disp}}$ ; Dietas com relação 4,5:1 continham 0,45% de Ca e 0,10% de  $P_{\text{disp}}$ ; Dietas com relação 6,0:1 continham 0,60% de Ca e 0,10% de  $P_{\text{disp}}$ ; Dietas com relação 7,5:1 continham 0,75% de Ca e 0,10% de  $P_{\text{disp}}$ .

Tabela 2 Composição das dietas experimentais para frangos de corte machos, Cobb 500, de 22 a 35 dias de idade (g kg<sup>-1</sup>).

Ingredientes (g/kg de ração)	DCP <sup>a</sup>	3-Fitase			6-Fitase			3/6Fitase		
		Relação Ca:P <sub>disp</sub>			Relação Ca:P <sub>disp</sub>			Relação Ca:P <sub>disp</sub>		
		4,5:1	6,0:1	7,5:1	4,5:1	6,0:1	7,5:1	4,5:1	6,0:1	7,5:1
Milho	605,00	605,00	605,00	605,00	605,00	605,00	605,00	605,00	605,00	605,00
Farelo de Soja 45%	317,70	317,70	317,70	317,70	317,70	317,70	317,70	317,70	317,70	317,70
Óleo de soja	36,00	36,00	36,00	36,00	36,00	36,00	36,00	36,00	36,00	36,00
Fosfato Bicálcico	12,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Calcário	7,80	8,80	12,50	16,20	8,80	12,50	16,20	8,80	12,50	16,20
Sal comum	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
DL-Metionina 99%	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60
L-Lisina HCl 99%	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90
Suplemento Mineral <sup>b</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Suplemento Vitamínico <sup>c</sup>	0,450	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Cloreto de colina 60%	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Salinomicina 12%	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Avilamicina 20%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
3-Fitase	0,00	0,15	0,15	0,15	0,00	0,00	0,00	0,075	0,075	0,075
6-Fitase	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,15	0,15	0,075	0,075	0,075
Inerte	9,60	20,95	17,25	13,55	20,95	17,25	13,55	20,95	17,25	13,55
Composição nutricional (g/kg de ração)										
EM <sup>d</sup> , (kcal/kg)	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100
Proteína Bruta	194,98	194,98	194,98	194,98	194,98	194,98	194,98	194,98	194,98	194,98
Cálcio	7,50	4,52	6,02	7,52	4,52	6,02	7,52	4,52	6,02	7,52
Fósforo disponível	3,40	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06
Fósforo total	5,63	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29
Lisina digestível	10,79	10,79	10,79	10,79	10,79	10,79	10,79	10,79	10,79	10,79

“Tabela 2, conclusão”

Ingredientes (g/kg de ração)	DCP <sup>a</sup>	3-Fitase			6-Fitase			3/6Fitase		
		Relação Ca:P <sub>disp</sub>			Relação Ca:P <sub>disp</sub>			Relação Ca:P <sub>disp</sub>		
		4,5:1	6,0:1	7,5:1	4,5:1	6,0:1	7,5:1	4,5:1	6,0:1	7,5:1
Composição nutricional (g/kg de ração)										
Metionina + cistina digestível	7,89	7,89	7,89	7,89	7,89	7,89	7,89	7,89	7,89	7,89
Sódio	1,97	1,97	1,97	1,97	1,97	1,97	1,97	1,97	1,97	1,97
Treonina digestível	6,98	6,98	6,98	6,98	6,98	6,98	6,98	6,98	6,98	6,98

<sup>a</sup>Dieta controle positivo. <sup>b</sup> Suplementado por kg de ração: 55 mg de Zn; 0,18 mg de Se; 0,70 mg de I; 10 mg de Cu; 78 mg de Mn; 48 mg de Fe. <sup>c</sup> Suplementado por kg de ração: 0,48 mg de ácido fólico; 8,70 mg de ácido pantotênico; 0,018 mg de biotina; 1,5 mg de butilhidroxi-tolueno (BHT); 11,1 mg de niacina; 6000 UI de vitamina A; 0,8 mg de vitamina B1; 12,15 UI de vitamina E; 8,10 µg de vitamina B12; 3,6 mg de vitamina B2; 1,80 mg de vitamina B6; 1500 UI de vitamina D3; 1,44 mg de vitamina K3. <sup>d</sup>EM: Energia Metabolizável.

### 2.3. Variáveis analisadas e análises laboratoriais

O consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e a conversão alimentar (CA) das aves foram avaliados no período experimental. Para os cálculos do GP, pesagens das aves foram realizadas no 22º e 35º dia de idade. O controle do CR foi realizado com a pesagem da ração e das sobras nos comedouros no 22º e 35º dia da fase experimental. A CA foi calculada dividindo-se o CR pelo GP e corrigida pela mortalidade das aves no período experimental, pesando-se a ração da parcela que houve a mortalidade.

A mortalidade foi monitorada diariamente, pela manhã e pela tarde, efetuando-se a correção do consumo e da CA. Além disso, ao final do ensaio, aos 35 dias de idade, duas aves por repetição, com peso médio de cada parcela, foram abatidas, por deslocamento cervical, para a retirada da tíbia esquerda. Os ossos da tíbia esquerda foram descarnados cuidadosamente e limpos manualmente para retirada dos músculos e tecidos conjuntivos e submetidos a secagem em estufa a 105°C por 12 horas. Após este procedimento, as tíbias foram desengorduradas no extrator de gordura com éter etílico por aproximadamente 12 horas, e posteriormente secas ao ar e novamente secas em estufa a 105°C até obtenção de peso constante. Então, as tíbias foram pesadas e submetidas à incineração na mufla a 600°C, durante seis horas para determinação do teor de cinzas. Com as amostras de cinzas obtidas foram determinados os teores de cálcio e fósforo respectivamente pelos métodos 935.13 e 965.17 da AOAC (2005).

### 2.4. Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) conforme os procedimentos do pacote estatístico SAEG (UFV, 2007) e quando

significativa, as diferentes relações Ca:P<sub>disp</sub> e as diferentes maneiras de suplementação das enzimas foram comparadas entre si pelo teste de SNK a 5% de probabilidade, e os tratamentos do fatorial foram comparados ao controle, quando significativo, pelo teste de Dunnet (P<0,05).

### **3. Resultados**

#### **3.1. Consumo de ração e ganho de peso**

Não houve (P>0,05) interação entre a forma de suplementação da fitase e a relação Ca:P<sub>disp</sub> da dieta, nem efeito isolado destes fatores (P>0,05), para o CR e GP das aves (Tabela 3). Comparado à dieta controle positivo, não houve diferença (P>0,05) entre esta e as demais dietas experimentais para estas características avaliadas.

#### **3.2. Conversão alimentar**

Ao analisar a CA das aves, não houve (P>0,05) interação entre esses fatores (Tabela 3), embora a forma de suplementação da fitase e a relação Ca:P<sub>disp</sub> da dieta, tenham influenciado (P<0,05) a CA. Analisando a relação Ca:P<sub>disp</sub> da dieta, a melhor CA das aves foi obtida com a relação Ca:P<sub>disp</sub> de 7,5:1, sendo observado que a diminuição da relação Ca:P<sub>disp</sub> piorou (P<0,05) a CA das aves, porém as diferentes relações Ca:P<sub>disp</sub> da dieta não diferiram estatisticamente (P>0,05) da dieta controle positivo.

Por outro lado, independente da relação Ca:P<sub>disp</sub> da ração, a suplementação isolada da 6-fitase resultou na melhor (P<0,05) CA, não diferindo estatisticamente da suplementação combinada entre a 3 e 6 fitases (50% 3-fitase + 50% 6-fitase). Entretanto, o uso isolado da 3-fitase proporcionou

a pior CA. Além disso, em relação à dieta controle positivo, nenhuma ração suplementada com fitase influenciou ( $P>0,05$ ) a CA dos frangos de corte no período avaliado.

### 3.3. Cinzas ósseas

Não houve interação significativa ( $P>0,05$ ) entre a forma de suplementação da fitase e a relação Ca:P<sub>disp</sub> da dieta, nem efeito isolado destes fatores, para cinzas ósseas (CO) da tíbia (Tabela 4). Entretanto, quando comparado ao controle, a suplementação da enzima 3-fitase na relação Ca:P<sub>disp</sub> 6,0:1 proporcionou menor ( $P<0,05$ ) teor de cinzas na tíbia.

### 3.4. Cálcio e Fósforo na tíbia

As concentrações de cálcio nas tíbias não foram afetadas ( $P>0,05$ ) com as diferentes formas de suplementação das fitases e com as diferentes relações de Ca:P<sub>disp</sub> na dieta (Tabela 4). Assim, o teor de Ca encontrado na tíbia das aves que receberam as dietas experimentais não diferiu daquelas que consumiram a dieta controle.

Entretanto, para o teor de P na tíbia, houve ( $P<0,05$ ) interação da forma de suplementação da fitase e a relação Ca:P<sub>disp</sub>, sendo que a enzima 6-fitase na relação 6,0:1,0 foi a que proporcionou maior deposição de P na tíbia das aves, porém, não diferiu estatisticamente do teor de P encontrado quando se utilizou a relação Ca:P<sub>disp</sub> 4,5:1,0 (Tabela 4). Já a enzima 3-fitase mostrou-se mais eficiente ( $P<0,05$ ) em depositar P nas tíbias das aves, quando se utilizou a relação Ca:P<sub>disp</sub> 4,5:1,0.

Também foi observado que as aves alimentadas com a ração formulada com a relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  6,0:1,0 suplementada com a 3-fitase, em comparação à dieta controle, apresentaram menor teor de fósforo na tíbia.

#### 4. Discussão

A suplementação de 1500 FTU de fitase em rações com 0,10% de  $\text{P}_{\text{disp}}$  e relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  variando de 4,5:1 até 7,5:1 não influenciou o CR e o GP das aves, sugerindo que a suplementação da enzima foi eficiente na hidrólise do fitato e conseqüentemente na liberação de P e outros nutrientes, como o Ca. Segundo Muniz et al. (2007), os minerais possuem papel importante na nutrição de frangos de corte, pois uma deficiência ou excesso dietético impossibilita a expressão do máximo desempenho na fase de crescimento. Seguindo o mesmo raciocínio, de acordo com Parmer et al. (1987), a deficiência de P em aves é caracterizada por uma redução no consumo de ração e redução do nível circulante do hormônio do crescimento. Deste modo, a não diferença encontrada entre os tratamentos analisados, no CR e no GP indicam que não houve deficiência de P ou outros nutrientes a ponto de comprometer o desempenho das aves, mesmo em dietas consideradas deficientes em Ca e P, na fase de criação avaliada.

Naves et al. (2012), analisando a eficiência de seis distintas fitases microbianas suplementadas em rações (1500 FTU/kg de ração), formuladas com três diferentes relações  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  (3,5:1; 5,0:1 e 6,5:1), não encontraram interação nem efeito isolado da relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  da dieta para o CR e GP das aves, no período de 35 a 42 dias.

A melhor CA obtida com a suplementação da 6-fitase, independentemente da relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  utilizada, sugere que o uso da 6-fitase na ração foi mais eficiente, em relação a 3-fitase, para disponibilização dos

nutrientes presentes na ração em forma de fitato. O fitato interfere na secreção e atividade das enzimas endógenas (LIU et al., 2009), e reduz a digestibilidade de aminoácidos e minerais (COWIESON et al., 2006 a,b). Além disso, de acordo com Wodzinski & Ullah (1996), a 3-fitase não é capaz de hidrolizar o inositol monofosfato, enquanto a 6-fitase hidrolisa completamente o ácido fítico.

A diminuição da relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  da ração piorou a CA das aves, sendo que a relação 7,5:1 foi a que proporcionou melhor conversão, indicando que ao formular a ração com 7,5 g de Ca/kg atendeu-se a exigência de Ca, porém, ao reduzir os níveis de Ca para valores menores que 7,5 g/kg parece ter ocorrido deficiência deste nutriente, piorando a CA das aves.

Segundo Lalpanmawia et al. (2014), a adição de fitases, experimentais ou comerciais, em dietas de frangos de corte, aumenta o teor de cinzas na tibia proporcionalmente a quantidade de P que elas liberam, e isso infere que o teor de cinzas na tibia é um indicador muito sensível do estado de P. Esta afirmação está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho, uma vez que a suplementação da enzima 3-fitase, na relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  6,0:1, proporcionou concomitantemente menores teores de P e cinzas ósseas, quando comparados ao grupo controle. Deste modo, a enzima 3-fitase, na relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  6,0:1, foi menos eficaz na hidrólise do fitato e biodisponibilização do fósforo interferindo de forma negativa e direta tanto nos teores de P, quanto na mineralização óssea dos frangos de corte.

Entretanto, as aves submetidas a este mesmo tratamento (suplementação da 3-fitase, na relação  $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$  de 6,0:1) obtiveram desempenho semelhante as das aves que receberam níveis recomendados de Ca e  $\text{P}_{\text{disp}}$  para fase de criação analisada, inferindo que níveis de P abaixo da recomendação em dietas para frangos de corte, compromete primeiramente os teores de P nas túbias e, por conseguinte, a mineralização óssea das aves, ao invés de comprometer o desempenho.

Vários autores, como Libal et al. (1969), Koch et al. (1984) e Gomes et al. (1993), também relataram que a exigência de P para otimizar o desempenho é inferior àquele exigido para maximizar o desenvolvimento ósseo. O mesmo foi verificado por Mello et al. (2012), que avaliando os requerimentos dietéticos de  $P_{\text{disp}}$  para frangos de corte na fase de crescimento (22 a 33 dias de idade), alimentados com dietas com relação Ca: $P_{\text{disp}}$  constantes, verificaram que níveis mais baixos de  $P_{\text{disp}}$  melhoram o GP e a CA, porém os mesmo níveis não são capazes de melhorar os parâmetros ósseos das aves. Waldroup (1999) sugeriu que, em termos relativos, a exigência de P se dá na seguinte ordem: calcificação óssea > peso corporal > eficiência alimentar > mortalidade.

As aves suplementadas com os diferentes tipos de fitase, com exceção da 3-fitase na relação Ca: $P_{\text{disp}}$  6,0:1, obtiveram porcentagens de cinzas ósseas similares ao das aves que receberam a dieta controle. Isto possivelmente está relacionado com a efetiva ação da enzima, aumentando principalmente a biodisponibilidade do P, mas também dos outros minerais que participam da formação óssea, como Ca, Mg, Zn, K, F, Na e até mesmo o Cu, antes complexados na molécula de fitato. Vale ressaltar que no presente estudo as aves foram avaliadas no período de 22 a 35 dias de idade, podendo ainda estar em fase de crescimento ósseo e, conseqüentemente, necessitar de maior aporte de minerais.

Naves et al (2014), avaliando o uso de valores de equivalência da fitase como base para redução de  $P_{\text{disp}}$  em dietas para frangos de corte, de 8 a 21 dias de idade, verificaram que a redução do teor de  $P_{\text{disp}}$  na dieta de 3,9 para 2,5 g kg<sup>-1</sup>, acompanhada da suplementação de 1.500 FTU kg<sup>-1</sup>, manteve desempenho e teor de cinzas ósseas semelhantes aos determinados para frangos alimentados com a dieta formulada com 3,9 g kg<sup>-1</sup> de  $P_{\text{disp}}$  de ração sem fitase.

A enzima fitase mostrou-se muito eficiente na liberação do Ca, o que pode ser observado com a similaridade encontrada no teor de Ca na tíbia das

aves que foram submetidas aos diferentes tratamentos (sendo algumas dietas formuladas com níveis de Ca abaixo do recomendado pela literatura), com as aves que receberam a dieta controle. Augspurger & Baker (2004) realizaram um estudo com frangos de corte suplementando uma dieta a base de milho/soja deficiente em Ca (4,8 g/kg) com fitase de *E. coli* (500 FTU/kg) e concluíram que a fitase liberou em média 0,90 g de Ca/kg de ração com base nas cinzas da tibia. Entretanto, Yan et al. (2006), avaliando a inclusão de 1.000 FTU kg<sup>-1</sup> de fitase em dietas a base de milho e farelo de soja, contendo três níveis de Ca e oito níveis de P não fítico, concluíram que a fitase libera quantidades mínimas de Ca em frangos de corte.

De acordo com os resultados obtidos para os teores de P na tibia das aves, a enzima 6-fitase mostrou-se mais eficaz na hidrólise do fitato, entretanto ao utilizá-la concomitantemente com a maior relação Ca:P<sub>disp</sub> na dieta (7,5:1) resultou em menor deposição de P na tibia, reforçando a hipótese de que um maior teor de cálcio na ração compromete a eficácia catalítica da fitase. Segundo Ravindran, Cowieson & Selle (2008), as fitases são mais eficientes em dietas com reduzido teor de Ca e baixa relação Ca:P. Isso possivelmente ocorre devido o Ca em excesso se ligar à molécula de fitato ou ácido fítico formando compostos que não são degradados eficientemente pela fitase (TAMIN; ANGEL, 2003).

Um aumento nos níveis de Ca em dietas de frangos de corte, de 1,2 para 5,2 g / kg, reduz a hidrólise do fitato de 55,0% para 5,6%, respectivamente, (NELSON; KIRBY, 1987). Além disso, uma redução nos níveis de Ca dietético de 10,0-5,0 g / kg de ração aumentou a hidrólise do fitato em frangos em 15%, de acordo com Subba Rao & Narasinga Rao (1983).

Tabela 3 Desempenho de frangos de corte (22 a 35 dias de idade), alimentados com rações contendo diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P<sub>disp</sub>) suplementadas com 3-fitase e/ou 6-fitase.

Forma de suplementação da fitase <sup>1</sup>	Consumo de ração (kg/ave)				Ganho de peso (kg/ave)				Conversão alimentar (kg/kg)			
	Relação Ca:P <sub>disp</sub> na ração				Relação Ca:P <sub>disp</sub> na ração				Relação Ca:P <sub>disp</sub> na ração			
	4,5:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,5:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,5:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média
3-Fitase (1.500FTU/kg)	2,197	2,197	2,179	2,191	1,271	1,273	1,307	1,284	1,73	1,73	1,67	1,71A
6-Fitase (1.500FTU/kg)	2,212	2,183	2,254	2,216	1,310	1,307	1,356	1,324	1,69	1,67	1,66	1,67B
3-fitase + 6-fitase (750+750 FTU/kg)	2,265	2,228	2,184	2,226	1,358	1,306	1,304	1,323	1,67	1,71	1,68	1,68A
Média	2,225	2,203	2,206		1,313	1,295	1,322		1,70a	1,70a	1,67b	B
Dieta controle positivo <sup>2</sup>				2,190				1,313				1,67
P-valor												
Forma de suplementação da fitase x Ca:P <sub>disp</sub>		NS				NS				NS		
Forma de suplementação da fitase		NS				NS				P < 0,05		
Relação Ca:P <sub>disp</sub>		NS				NS				P < 0,05		
Coefficiente de variação (%)		3,68				4,47				2,21		

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna ou por letras minúsculas na linha diferem entre si (P < 0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

<sup>1</sup>1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. <sup>2</sup>Dieta sem fitase suplementar, formulada com 7,5 g de cálcio/kg de ração e 3,4 g de fósforo disponível/kg de ração.

Tabela 4 Cinzas ósseas, cálcio (Ca) e fósforo (P) na tíbia de frangos de corte, recebendo rações contendo diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P<sub>disp</sub>) suplementadas com fitase.

	Cinzas (%)				Cálcio (%)				Fósforo (%)			
	Relação Ca:P <sub>disp</sub> na ração				Relação Ca:P <sub>disp</sub> na ração				Relação Ca:P <sub>disp</sub> na ração			
Forma de suplementação da fitase	4,5:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,5:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,5:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média
3-Fitase (1.500FTU/kg)	51,04	49,76*	50,31	50,37	36,19	35,84	36,82	36,28	17,19a	15,81*B	15,99b	16,33
6-Fitase (1.500FTU/kg)	50,84	51,43	51,09	51,12	36,84	37,29	37,30	37,14	17,35ab	18,18Aa	16,39b	17,31
3-fitase + 6-fitase (750+750 FTU/kg)	50,88	50,88	51,13	50,96	36,52	35,77	37,54	36,61	17,13	16,11 B	17,25	16,83
Média	50,92	50,69	50,84		36,52	36,30	37,22		17,22	16,70	16,54	
Dieta controle positivo <sup>1</sup>				51,91				37,56				17,16
P-valor												
Forma de suplementação da fitase x Ca:P <sub>disp</sub>		NS				NS				P<0,05		
Forma de suplementação da fitase		NS				NS				P < 0,05		
Relação Ca:P <sub>disp</sub>		NS				NS				NS		
Controle x Fatorial		P<0,05				NS				P<0,05		
Coefficiente de variação (%)		1,86				5,21				6,23		

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna ou por letras minúsculas na linha diferem entre si (P < 0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

<sup>1</sup>Dieta sem fitase suplementar, formulada com 7,5 g de cálcio/kg de ração e 3,4 g de fósforo disponível/kg de ração.

\* Difere da dieta controle positivo, pelo teste de Dunnet, a 5% de probabilidade.

## 5. Conclusão

O consumo de ração, o ganho de peso das aves e a deposição de Ca na tíbia de frangos de corte não são afetados pela forma de suplementação da fitase nem pela relação Ca:P<sub>disp</sub> da ração. A CA das aves foi pior com a utilização da enzima 3-fitase. Porém, a associação das duas enzimas resulta em CA semelhante.

O uso de fitases (1500 FTU/ kg de ração) em dietas para frangos de corte na fase de crescimento (22 a 35 dias de idade) é viável ao se formular dietas com relação Ca:P<sub>disp</sub> de 4,5:1,0 ou 6,0:1,0 utilizando-se apenas 1,0 g/kg de P<sub>disp</sub>, e na relação 4,5:1,0 para a 3-fitase, não comprometendo o desempenho e a mineralização óssea das aves. Entretanto, ao se utilizar a suplementação combinada das enzimas (750 FTU da 3-fitase + 750 FTU da 6-fitase), a relação Ca:P<sub>disp</sub> da dieta não interfere nos teores de fósforo disponibilizados.

## Referências

Angel, R., Tamim, N.M., Applegate, T.J., Dhandu, A.S., Ellestad, L.E., 2002. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *J. Appl. Poultry Res.* 11, 471–480.

Association of Official Analytical Chemists - AOAC., 2005. *Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists.* 18.ed. Gaithersburg, Maryland.

Augspurger, N.R., Baker, D.H., 2004. Phytase improves dietary calcium utilization in chicks, and oyster shell, carbonate, citrate, and citratemalate forms of calcium are equally bioavailable. *Nutrit. Res.* 24, 293–301.

Cowieson, A. J., Acamovic, T., Bedford, M. R., 2006a. Phytic acid and phytase: Implications for protein utilization by poultry. *Poult. Sci.* 85, 878–885.

Cowieson, A. J., Acamovic, T., Bedford, M. R., 2006b. Supplementation of corn-soy-based diets with an *Escherichia coli* derived phytase: Effects on broiler chick performance and the digestibility of amino acids and metabolizability of minerals and energy. *Poult. Sci.* 85, 1389–1397.

Gomes, P.C., Gomes, M.F.M., Lima, G.J.M.M., Bellaver, C., 1993. Exigência de fósforo e sua disponibilidade nos fosfatos monoamônio e monocálcico para frangos de corte até 21 dias de idade. *R. Soc. Bras. Zootec.* 22,755-763.

Han, J. C., Yang, X. D., Qu, H. X., Xu, M., Zhang, T., Li, W. L., Yao, J. H., Liu, Y. R., Shi, B. J., Zhou, J. F., Feng, X. Y., 2009. Evaluation of equivalency values of microbial phytase to inorganic phosphorus in 22- to 42-day-old broilers. *J. Appl. Poultry Res.* 18, 707–715.

Koch, M. E., Mahan, D.C., Corley, J.R., 1984. An evaluation of various biological characteristics in assessing low phosphorus intake in weanling swine. *J. Anim. Sci.* 59, 1546-1556.

Lalpanmawia, H., Elangovan, A.V., Sridhar, M., Shet, D., Ajith, S., Pal, D.T., 2014. Efficacy of phytase on growth performance, nutrient utilization and bone mineralization in broiler chicken. *Anim. Feed Sci. Technol.* 192, 81–89.

Lei, X. G., Porres, J. M., 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol. Lett.* 25, 1787–1794.

Lei, X. G., Ku, P.K., Miller, E.R., Yokoyama, M.T., Ullrey, D.E., 1994. Calcium level affects the efficacy of supplemental microbial phytase in corn–soybean meal diets of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 139–143.

Libal, G.W., Peo, E.R., Andrews, R.P., 1969. Levels of calcium and phosphorus for growing- finishing swine. *J. Anim. Sci.* 28, 331-335.

Liu, N., Ru, Y. J., Li, F. D., Wang, J., Lei, X., 2009. Effect of dietary phytate and phytase on proteolytic digestion and growth regulation of broilers. *Arch. Anim. Nutr.* 63, 292–303.

Mello, H.H.C., Gomes, P.C., Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Rocha, T. C., Almeida, R. L. A., Calderano, A. A., 2012. Dietary requirements of available phosphorus in growing broiler chickens at a constant calcium:available phosphorus ratio. *R. Bras. Zootec.* 41, 2323-2328.

Mullaney, E.J., Ullah, A.H.J., 2003. The term phytase comprises several

different classes of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 179–184.

Muniz, E. B., Arruda, A. M. V., Fassani, E. J., Teixeira, A. S., Pereira, E. S., 2007. Avaliação de fontes de cálcio para frangos de corte. *R. Caatinga.* 20, 05-14.

Narcy, A., Letourneau-Montminy, M. P., Magnin, M., Lescoat, P., Jondreville, C., Sauvant, D., Nys, Y., 2009. Phosphorus utilization in broilers. *World Poultry Science Association (WPSA), 17th European Symposium on Poultry Nutrition, Edinburgh, UK, 23–27 August, p.14–20.*

Naves, L. N., Rodrigues, P. B., Bertechini, A. G., Lima, E. M. C., Teixeira, L. V., Alvarenga, R. R., Nardelli, N. B. S., Oliveira, D.H., Oliveira, M. H., 2014. Redução de fósforo em dietas para frangos com base em valores de equivalência da fitase. *Pesq. agropec. bras.* 49, 71-77.

Naves, L. P. Metodologias para quantificar fitato e uso de fitases em rações para frangos de corte. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 152p.

Nelson, T. S., Kirby, L. K., 1987. The calcium binding properties of natural phytate in chick diets. *Nutr. Rep. Int.* 35, 949-956.

Parmer, T. G., Carew, L. B., Alster, F. A., Scanes, C. G., 1987. Thyroid function, growth hormone, and organ growth in broilers deficient in phosphorus. *Poult. Sci.* 66, 1995-2004.

Ravindran, V., Cowieson, A. J., Selle, P. H., 2008. Influence of dietary electrolyte balance and microbial phytase on growth performance, nutrient utilization and excreta quality of broiler chickens. *Poult. Sci.* 87, 677-688.

Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F., Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, L.S.T., Euclides, R.F., 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Terceira .ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Selle, P. H., Cowieson, A. J., Ravindran, V., 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livest Sci.* 124, 126-141.

Selle, P. H., Ravindran, V., 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 1-41.

Subba Rao, K., Narasinga RAO, B. S., 1983. Studies on iron chelation by phytate and the influence of other mineral ions on it. *Nutr. Reports Int.* 28, 771-782.

Tamin, N. M., Angel, R., 2003. Phytate phosphorus hydrolysis as influenced by dietary calcium and micro-mineral source in broiler diets. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4687-4693.

Universidade Federal DE Viçosa – UFV. 2007. Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG . Versão 9.1. Viçosa, MG, (CD-ROM).

Waldroup, P.W. 1999. Nutritional approaches to reducing phosphorus excretion by poultry. *Poult Sci.* 78, 683-691.

Wodzinski, R.J., Ullah, A. H. J., 1996. Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302.

Yan, F., Kersey, J.H., Fritts, C.A., Waldroup, P.W., 2006. Effect of phytase supplementation on the calcium requirement of broiler chicks. *Int. J. Poult. Sci.* 5, 112–120.

**(VERSÃO PRELIMINAR DO ARTIGO)**