



LUCIANA DE PAULA NAVES

**METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAR
FITATO E USO DE FITASES EM RAÇÕES
PARA FRANGOS DE CORTE**

LAVRAS - MG

2012

LUCIANA DE PAULA NAVES

**METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAR FITATO E USO DE FITASES
EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador
Dr. Paulo Borges Rodrigues

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Naves, Luciana de Paula.

Metodologias para quantificar fitato e uso de fitases em rações para frangos de corte / Luciana de Paula Naves. – Lavras : UFLA, 2012.

151 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Paulo Borges Rodrigues.

Bibliografia.

1. Nutrição avícola. 2. Ácido fítico. 3. Enzima. 4. Fósforo. 5. Metabolismo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.50877

LUCIANA DE PAULA NAVES

**METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAR FITATO E USO DE FITASES
EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de setembro de 2012.

Dra. Angelita Duarte Corrêa	DQI/UFLA
Dr. Antônio Gilberto Bertechini	DZO/UFLA
Dr. Édison José Fassani	DZO/UFLA
Dr. Luiz Fernando Teixeira Albino	DZ/UFV

Dr. Paulo Borges Rodrigues
Orientador

LAVRAS - MG

2012

A Deus,

À minha mãe Maria Lucia e ao meu pai José Augusto,
pelo amor e dedicação.

Ao meu irmão Fernando, pelo carinho,
amizade e companheirismo.

Ao meu esposo Rodrigo, pelo amor,
incentivo e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e presença constante.

Aos meus pais, irmão e meu esposo, que sempre me apoiaram.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Paulo Borges Rodrigues, pela orientação, confiança, amizade e por tudo que me ensinou.

A todos os professores que participaram da minha formação, em especial a Dra. Angelita Duarte Corrêa e o Dr. Antônio Gilberto Bertechini, pelo apoio, amizade e sugestões.

A todos os colegas de graduação e pós-graduação dos Departamentos de Zootecnia e Medicina Veterinária da UFLA, em especial Alysson, Antônio, Camila, Carol, David, Eduardo, Evelyn, Heloísa, Isabel, Leonardo, Lucas, Letícia, Levy, Luziane, Marcelo, Matheus, Nicole, Nidia, Pâmela, Renata, Rodrigo, Solange, Verônica, Yuri pela amizade e disposição em ajudar sempre que necessário.

Aos funcionários dos Laboratórios de Bioquímica (DQI/UFLA) e de Pesquisa Animal (DZO/UFLA), pela atenção.

Aos funcionários da Biblioteca e do Departamento de Zootecnia da UFLA, pela atenção e presteza com que sempre me atenderam.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho está dividido em duas partes, sendo a primeira referente à introdução e o referencial teórico que contempla tópicos sobre os assuntos discutidos na segunda parte, que por sua vez, está subdividida em quatro artigos científicos. No artigo 1, um experimento foi realizado com frangos de corte, no período de 15 a 28 dias de idade, para comparar duas metodologias analíticas empregadas para quantificar fósforo fítico (P_{fit}) nas rações e nas excretas das aves e para determinar a eficiência catalítica da fitase suplementada na ração utilizando os resultados da metodologia que se mostrou mais apropriada. Concluiu-se que a proporção de extração de 1:20 (massa de amostra em g:volume de solvente extrator em mL) e a metodologia colorimétrica foi a que proporcionou os melhores resultados e que a suplementação de 1.950 unidades de atividade da fitase (FTU)/kg de ração permite reduzir o P inorgânico na formulação em quantidade equivalente a 87,85% do teor de P_{fit} presente na ração, correspondendo à redução de 2,86 g de P/kg de ração formulada. No artigo 2, um experimento foi conduzido para determinar o nível de fitase que deve ser suplementado na ração de frangos de corte machos e fêmeas, no período de 15 a 28 dias de idade, quando esta for formulada com apenas 0,213% de P disponível (P_{disp}). Concluiu-se que, independente do sexo, ao utilizar 2.250 FTU/kg de ração é possível reduzir o teor de P da ração sem prejudicar o desempenho, teor de cinzas na tibia e a retenção do cálcio (Ca), além de reduzir a excreção do P total em 56,75% e melhorar seu aproveitamento em 38,58%. No artigo 3, um experimento foi conduzido com frangos de 22 a 33 dias de idade, para avaliar a eficiência de seis distintas fitases microbianas suplementadas em rações formuladas com três diferentes relação Ca: P_{disp} . Concluiu-se que é possível reduzir o teor de P_{disp} da ração para 1,0 g/kg, ao suplementá-la com 1.500 FTU da fitase A, C, D ou E/kg, devendo-se fixar o nível de Ca em 7,5 g/kg para manter o desempenho e adequada mineralização óssea das aves, além de melhorar o aproveitamento do Ca e P_{fit} , otimizar a retenção do P total e diminuir a excreção de nitrogênio e P. No artigo 4, um experimento foi conduzido com frangos de corte de 35 a 42 dias de idade, para avaliar a eficiência de seis fitases microbianas suplementadas em rações formuladas com três diferentes relação Ca: P_{disp} . Concluiu-se que é possível reduzir o teor de P_{disp} da ração para 1,0 g/kg, ao suplementá-la com 1.500 FTU das enzimas A, B, C, D ou E/kg, devendo-se fixar o nível de Ca em 6,5 g/kg para manter o desempenho e otimizar a mineralização ósseas das aves, além de melhorar o coeficiente de retenção do Ca, P_{fit} , P total e nitrogênio e diminuir a excreção de P.

Palavras-chave: Ácido fítico. Enzima. Fósforo. Metabolismo. Nutrição avícola.

ABSTRACT

This study is divided in two parts: the first refers to the introduction and the theoretical framework which contemplates topics about subjects discussed in the second part, which in turn is subdivided in four scientific papers. In manuscript 1, one experiment was conducted with broilers in the period from 15 to 28 days of age, to compare two analytical methodologies utilized to quantify the phytate phosphorus ($_{\text{phy}}\text{P}$) content in the diets and excreta from birds and to determine the catalytic efficiency of the phytase supplemented in the diet through the results from the methodology that proved to be the most adequate. It was concluded that the extraction ratio of 1:20 (mass of sample in g:volume of extraction solvent in mL) and the colorimetric methodology was that which promoted the best results, and that supplementation of 1,950 units of phytase activity (FTU)/kg of diet allows reducing the inorganic P in the formulation in a quantity equivalent to 87.85% of the $_{\text{phy}}\text{P}$ content present in the diet, corresponds to a reduction of 2.86 g of P/kg of diet formulated. In manuscript 2, one experiment was conducted to determine the level of phytase that should be supplemented in the diet for male and female broilers from 15 to 28 days of age, when formulated with only 0.213% available P ($_{\text{av}}\text{P}$). The results showed that regardless of sex, when utilizing 2,250 FTU/kg of diet, it is possible to reduce the P content of the diet without impairing performance, ash content in the tibia and retention of calcium (Ca), in addition to reducing the excretion of total P in 56.75% and improving its utilization in 38.58%. In manuscript 3, one experiment was conducted with broilers from 22 to 33 days of age to evaluate the efficiency of six different microbial phytases supplemented in diets formulated with three different Ca: $_{\text{av}}\text{P}$ ratios, and the conclusion was that it is possible to reduce the content of $_{\text{av}}\text{P}$ in the diet to 1.0 g/kg by supplementing it with 1,500 FTU of the phytases A, C, D or E/kg, fixing the Ca level at 7.5 g/kg to maintain the performance and appropriate bone mineralization of the birds, in addition to improving the retention coefficient of Ca and $_{\text{phy}}\text{P}$, optimize the total P utilization and decrease the excretion of nitrogen and P. In manuscript 4, one experiment was carried out with broilers from 35 to 42 days of age to evaluate the efficiency of six different microbial phytases supplemented in diets formulated with three different Ca: $_{\text{av}}\text{P}$ ratios, and it was concluded that it is possible to reduce the content of $_{\text{av}}\text{P}$ of the diet to 1.0 by supplementing it with 1,500 FTU of the enzymes A, B, C, D or E/kg, fixing the level of Ca at 6.5 g/kg to maintain the performance and optimize the bone mineralization of the birds, in addition to improving the retention coefficient of Ca, $_{\text{phy}}\text{P}$, total P and nitrogen, and reducing the excretion of P.

Key words: Phytic acid. Enzyme. Phosphorus. Metabolism. Poultry nutrition.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE		
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	Fitato.....	12
2.1.1	Nomenclatura e símbolos.....	12
2.1.2	Considerações sobre o precursor do fitato: o mio-inositol.....	12
2.1.3	Concentração de fitato na dieta das aves.....	13
2.1.4	Atuação do fitato como fator antinutricional.....	15
2.1.4.1	Principais locais de complexação do fitato com o cálcio.	17
2.1.4.2	Forma de complexação entre os fosfatos de mio-inositol e o cálcio.....	20
2.2	Fitase.....	21
2.2.1	Classificação das fitases.....	21
2.2.1.1	Segundo o local do substrato onde a hidrólise se inicia.....	21
2.2.1.2	Segundo o pH de ação.....	21
2.2.1.3	Segundo diferenças estruturais e catalíticas.....	22
2.2.2	Hidrólise enzimática do ácido fítico.....	22
2.2.2.1	Informações gerais sobre a hidrólise.....	22
2.2.2.2	Estereoespecificidade da desfosforilação enzimática dos fosfatos de mio-inositol.....	23
2.3	Eficiência das fitases exógenas em liberar P_{fit} da dieta.....	25
2.4	Fitase na nutrição de frangos de corte: considerações sobre o cálcio.....	25
2.4.1	Efeito da fitase na digestibilidade ileal do cálcio.....	25
2.4.2	Efeito dos níveis de cálcio e relação Ca:P sobre a atividade da fitase.....	26
2.4.3	Equivalência de cálcio por fitases exógenas.....	27
2.5	Determinação de fitato por colorimetria x HPLC com detector de índice de refração.....	27
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	29
	REFERÊNCIAS.....	30
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS		
	ARTIGO 1 Metodologias para quantificar fósforo fítico em rações contendo fitase e em excretas de frangos de corte.....	36

ARTIGO 2 Níveis crescentes de fitase em rações para frangos de corte, formuladas com reduzido teor de fósforo disponível.....	60
ARTIGO 3 Eficiência de fitases microbianas suplementadas em rações formuladas com diferentes relação cálcio:fósforo, fornecidas à frangos de corte no período de 22 a 33 dias de idade.....	76
ARTIGO 4 Eficiência de fitases microbianas suplementadas em rações formuladas com diferentes relação cálcio:fósforo, fornecidas à frangos de corte no período de 35 a 42 dias de idade.....	101
APÊNDICES.....	123

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O fitato é a principal forma de armazenamento de fósforo (P) em sementes e grãos comumente utilizados nas rações de frangos de corte, entretanto, apenas uma pequena fração do P fítico (P_{fit}) da dieta é naturalmente aproveitada por esses animais. Além disso, o ácido fítico pode complexar-se com nutrientes da dieta durante sua passagem pelo trato digestório, diminuindo a biodisponibilidade desses nutrientes e podendo comprometer o desempenho zootécnico das aves. Tais complexos são formados principalmente em pH neutro e básico, pois em pH ácido a protonação parcial ou total do ácido fítico diminui sua capacidade de ligar-se a nutrientes catiônicos como, por exemplo, minerais divalentes. Outros fatores também favorecem o uso de fitase exógena na ração de aves: (1) o P inorgânico é um recurso natural não-renovável, representando um dos ingredientes mais caros da ração, (2) há atualmente um forte apelo ambiental pela redução da deposição de P no solo/água e (3) o preço das fitases comercializadas vem sendo reduzido em função do avanço das técnicas de biotecnologia e fermentação (SELLE; COWIESON; RAVINDRAN, 2009).

Portanto, fitases têm sido adicionadas às rações de frangos de corte para minimizar esses problemas e diversos pesquisadores comprovaram que seu uso é viável nutricionalmente, ambientalmente e economicamente (GOMIDE et al., 2007; NAGATA et al., 2009; SANTOS et al., 2008; SILVA et al., 2008).

As fitases hidrolisam as ligações fosfoéster da molécula de fitato, tornando o P hidrolisado disponível para ser aproveitado pelas aves (HAN et al., 2009). Apesar do número crescente de trabalhos sobre a eficácia da fitase na nutrição de frangos de corte, de modo geral, essas pesquisas não incluem a comparação direta (determinada) da concentração de fitato na ração e na excreta,

podendo acarretar em interpretações equivocadas (ANGEL et al., 2002). Até o momento, não há relato de pesquisas comparando o método colorimétrico e o método cromatográfico (HPLC) com detector de índice de refração para a quantificação de fitato nas rações e excretas de frangos de corte. Portanto, a padronização de uma metodologia para a determinação de fitato (P_{fit}) nesses tipos de amostras contribuirá para o avanço das pesquisas em nutrição avícola.

O P e cálcio (Ca) desempenham importantes funções no metabolismo das aves contribuindo para o seu desenvolvimento adequado (MACARI; FURLAN; GONZALES, 2002). Embora a fonte inorgânica de Ca seja de custo relativamente baixo, é importante avaliar qual deve ser o nível de inclusão deste nutriente quando se formula a ração com determinado teor de P e certa atividade de fitase suplementada. Se por um lado, o excesso de Ca na ração pode reduzir sua utilização e também a de outros nutrientes como o P (SCHOULTEN et al., 2002), além de poder diminuir a atividade catalítica da fitase utilizada (SANTOS et al., 2008), sua deficiência pode prejudicar a integridade óssea e o desempenho dos frangos (SELLE; RAVINDRAN, 2007). Além disso, distintas fitases microbianas podem apresentar variadas propriedades catalíticas (MULLANEY; ULLAH, 2003) fazendo-se necessário avaliar se podem acarretar em diferentes resultados quando adicionadas nas rações de frangos de corte.

Portanto, este trabalho foi realizado com os objetivos de: (i) comparar duas metodologias analíticas empregadas para quantificar o teor de P_{fit} em rações e excretas de frangos de corte e determinar a eficiência catalítica da fitase suplementada na dieta; (ii) determinar o nível de fitase que deve ser utilizado na dieta para frangos de corte, no período de 15 a 28 dias de idade, quando esta for formulada com apenas 0,213% de P_{disp} e (iii) avaliar a eficiência de seis distintas fitases microbianas suplementadas em rações formuladas com três diferentes relação Ca: P_{disp} , fornecidas à frangos de corte nos períodos de criação de 22 a 33 dias de idade e (iv) de 35 a 42 dias de idade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fitato

2.1.1 Nomenclatura e símbolos

Vários nomes e símbolos têm sido usados para referir-se à molécula de fitato, como: ácido fítico, hexafosfato de mio-inositol, IP_6 , $InsP_6$ ou $Ins(1,2,3,4,5,6)P_6$ (ALMEIDA et al., 2003). 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. Entretanto, o termo fitato é cotidianamente utilizado na área zootécnica independentemente da forma na qual a molécula se encontra (forma livre ou complexada).

2.1.2 Considerações sobre o precursor do fitato: o mio-inositol

O fitato é a principal forma de armazenamento de fósforo (P) durante o desenvolvimento de grãos, legumes e sementes (LEI; PORRES, 2003). Segundo Almeida et al. (2003), o fitato é sintetizado a partir da fosforilação completa do mio-inositol (Figura 1) que, por sua vez, tem a glicose como precursora.

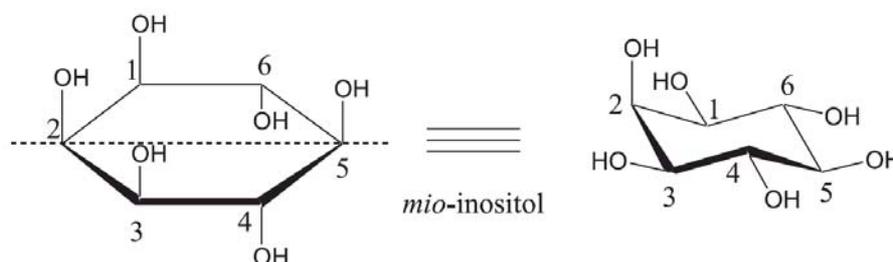


Figura 1 Estrutura do mio-inositol. Pertence à família dos inositóis e é o estereoisômero mais abundante na natureza (ALMEIDA et al., 2003).

Segundo a nomenclatura oficial, o único grupo hidroxila axial do mio-inositol ocupa a posição C_2 na estrutura (Figura 1), conseqüentemente, o único grupo fosfato do fitato disposto axialmente será aquele ligado ao C_2 (Figura 2).

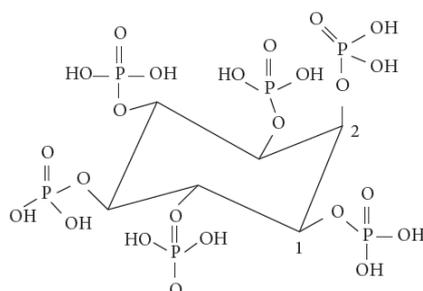


Figura 2 Ácido fítico na conformação de cadeira (energeticamente mais estável) mostrando um grupo fosfato em posição axial (C_2) e cinco grupos fosfatos equatoriais (QUIRRENBACH et al., 2009).

A posição C_2 no fitato tem um papel particular, pois as fitases são estereoespecíficas e apresentam forte preferência pelos grupos fosfatos ligados equatorialmente ao anel de mio-inositol, sendo o grupo fosfato disposto axialmente no C_2 resistente à hidrólise enzimática (LEI; PORRES, 2003).

2.1.3 Concentração de fitato na dieta das aves

O fitato está naturalmente presente na dieta das aves, pois as rações contêm ingredientes vegetais, destacando-se o milho e o farelo de soja como os mais comuns. Segundo Ravindran, Bryden e Kornegay (1995), as dietas das aves contêm de 2 a 4 g de P fítico (P_{fit})/kg de ração indicando uma variação de até 100%. Parte dessa variabilidade no teor de P_{fit} da ração é devida a diferenças na concentração de fitato nos alimentos ocasionadas por variações no clima, solo/adubação, idade e estágio de maturação do vegetal, cultivar, grau de

processamento, melhoramento genético (Exemplo: milho híbrido com baixo teor de fitato) e assim por diante.

Na Tabela 1 consta a concentração média 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 ¹	P fítico
Farelo de arroz	1,67	0,24	1,43
Farinha de carne e ossos (41% de PB ²)	6,53	5,88	–
Farinha de carne e ossos (46% de PB ²)	5,97	5,37	–
Milho	0,25	0,06	0,19
Farelo de soja (45% de PB ²)	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). ¹Valores calculados ou estimados. ²PB = proteína bruta.

Utilizando as informações contidas na Tabela 1, tem-se que apenas 14,37% do P_{total} contido no farelo de arroz está disponível. Para os demais ingredientes de origem vegetal entre 24,00 a 39,29% do P_{total} é P_{disp} . Segundo o National Research Council - NRC (1994), em média, apenas 30% do P de origem vegetal é P_{disp} , sendo os 70% restantes correspondentes ao P_{fit} .

Já as farinhas de carne e ossos e a farinha de vísceras de aves contribuem com, respectivamente, 90% e 100% de P_{disp} . Todavia, 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). Já o fosfato bicálcico é considerado uma fonte inorgânica de P 100% disponível, embora sua digestibilidade para aves seja de

apenas 70% (ROSTAGNO et al., 2011); mas é importante considerar que trata-se de um ingrediente caro que onera o custo com a alimentação das aves, além de ser um recurso mineral não renovável o que tem provocado a preocupação de uma crise futura no seu suprimento.

O P é um nutriente que desempenha várias funções fisiológicas incluindo aquelas responsáveis pelo crescimento da ave (ASSUENA et al., 2009). A molécula de ácido fítico tem alto conteúdo de P (282 g de P/kg de IP₆) e diante dos problemas discutidos anteriormente, justifica-se a necessidade de um maior aproveitamento do P_{fit} pelas aves, utilizando fitases exógenas para diminuir os custos da ração além de permitir uma produção animal com maior responsabilidade ambiental devido à redução na excreção de P.

2.1.4 Atuação do fitato como fator antinutricional

O ácido fítico possui alto potencial para complexar nutrientes (íons ou até mesmo moléculas), conforme demonstrado na Figura 3.

O número de cargas iônicas no fosfato de mio-inositol influencia sua capacidade complexante e a desprotonação dos grupos fosfatos está intimamente ligada ao pH no qual a molécula se encontra. O fitato pode ter até 12 cargas negativas, sendo 2 cargas localizadas em cada um dos 6 grupos fosfatos da molécula (QUIRRENBACH et al., 2009). O fitato carregado negativamente pode complexar-se com minerais catiônicos sendo que os divalentes (Ca²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺) são mais susceptíveis (KORNEGAY, 2001). A formação de complexos fitato-nutriente tem grande importância nutricional, pois os nutrientes complexados podem não ser absorvidos no intestino (LEI; PORRES, 2003), o que pode reduzir o desempenho/produktividade das aves.

Quanto maior o grau de fosforilação do mio-inositol, maior é o seu poder de complexação. Segundo Cúneo, Amaya-Farfan e Carraro (2000), os fosfatos

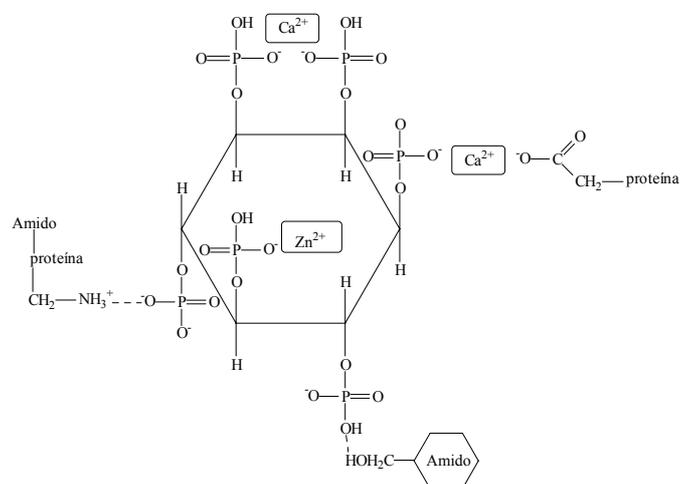


Figura 3 Exemplos de possíveis ligações entre o ácido fítico e alguns nutrientes (KORNEGAY, 2001).

de inositol determinados em grãos correspondem, aproximadamente, a 90% na forma hexafosfórica com os 10% restantes referentes ao somatório das frações penta-, tetra- e trifosfórica.

É importante lembrar que o Ca dietético pode se ligar ao fitato formando complexos ou se ligar ao P inorgânico – P_{inorg} – formando fosfatos de cálcio como o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TAMIM; ANGEL; CHRISTMAN, 2004). As concentrações molares relativas de P_{inorg} e fitato podem influenciar a espécie química que vai ser formada, entretanto, sabe-se que o Ca^{2+} tem maior afinidade pelo fitato do que pelo ortofosfato (GOSELIN; COGHLAN, 1953). Segundo Selle, Cowieson e Ravindran (2009), é provável que o Ca não esteja complexado com o fitato nos ingredientes que compõem a ração (ex.: milho, soja, etc) porque eles possuem baixa concentração desse mineral. Portanto, a maior taxa de formação dos complexos se dá no trato digestório das aves e é de relevância nutricional, pois estima-se que aproximadamente um terço do Ca dietético forme complexos com o fitato durante a passagem da ração pelo intestino reforçando, assim, a necessidade de suplementar as rações com fitase.

Plumstead et al. (2008) realizaram um experimento com frangos de corte para avaliar o efeito de quatro níveis de Ca na ração (0,47; 0,70; 0,93 e 1,16%) e de três níveis de P_{fit} (0,28; 0,24 e 0,10%) sobre a digestibilidade e retenção de nutrientes. Os níveis de P_{fit} foram obtidos utilizando-se farelos de soja produzidos a partir de três variedades de soja contendo diferentes teores de fitato. A digesta ileal foi coletada aos 21 dias de idade e, assim como a ração, teve os teores de Ca, P_{total} e P_{fit} determinados. A digestibilidade pré-cecal do P_{fit} foi reduzida linearmente em até 71% quando 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. As proporções de Ca: P_{disp} que resultaram na maior retenção e menor excreção de P foram 2,53:1 (dieta com 0,28% de P_{fit}), 2,40:1 (dieta com 0,24% de P_{fit}) e 2,34:1 (dieta com 0,10% de P_{fit}).

2.1.4.1 Principais locais de complexação do fitato com o cálcio

O pH do trato digestório do frango é alterado em função do segmento (Figura 4), o que irá influenciar diretamente na taxa de formação dos complexos fitato-nutrientes. Segundo 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 Ca^{2+} aumenta com o aumento do pH. Portanto, teoricamente, esse tipo de complexo não pode ser formado *in vivo* apenas no proventrículo e moela devido ao forte caráter ácido desses segmentos. Até o momento, as fitases comercializadas atuam de modo eficiente apenas sobre o substrato livre (fitato não complexado), portanto, são suplementadas na ração no sentido de reduzir a formação de complexos pelo fitato aumentando, conseqüentemente, a biodisponibilidade de nutrientes da dieta. Diante disso, muita atenção tem sido dada para as fitases que atuam em baixo pH e a maioria das fitases comercializadas atualmente possuem essa particularidade que as caracteriza como fitases ácidas.

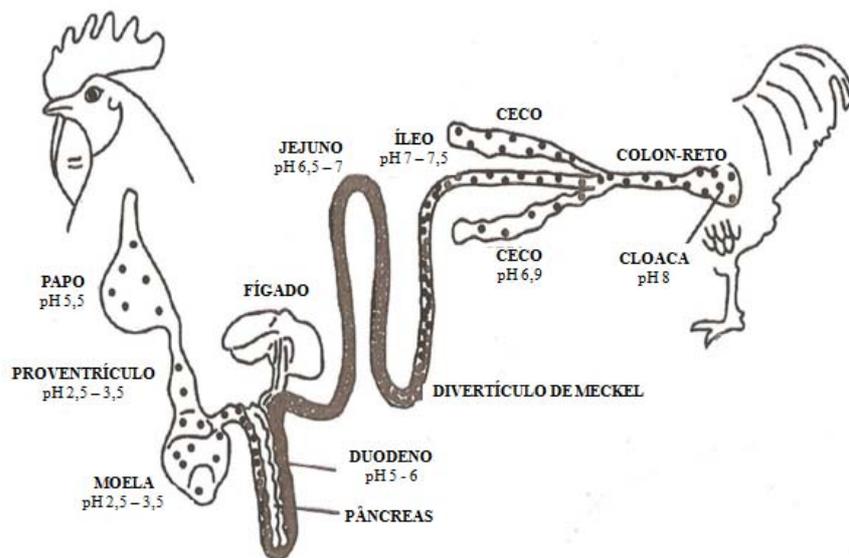


Figura 4 pH do alimento (ração farelada) nos diferentes segmentos do trato digestório de frango de corte alimentado, ad libitum, durante 6 semanas (GAUTHIER, 2002).

Liebert, Wecke e Schöner (1993) concluíram, em aves de 3 a 5 semanas de idade, que 25 a 50% da atividade da fitase microbiana adicionada à ração foi detectada no papo, 10 a 25% no proventrículo e nenhuma atividade foi detectada no intestino delgado. Posteriormente, Yu et al. (2004) avaliaram a digesta retirada de diferentes segmentos do trato digestório (papo, moela, duodeno, jejuno e íleo) de frangos alimentados com dietas contendo 750 unidades de atividade de fitase/kg de ração e identificaram, por meio de Western blot com anticorpos específicos, a presença da fitase (ou seja, da cadeia proteica) no papo, 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 apenas no papo, moela e duodeno, sendo a menor atividade determinada no duodeno.

Embora ainda existam algumas dúvidas sobre este tema, a hipótese mais aceita atualmente é 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 IP₆) para quelar e indisponibilizar o Ca²⁺. Esse mecanismo permitiria, portanto, que maiores concentrações de Ca e P estejam potencialmente disponíveis para serem absorvidas ao passar pelo intestino delgado (LUTTRELL, 1993).

Considerando os dados contidos na Tabela 2 e que as fitases ácidas atuam com eficiência catalítica máxima no papo, proventrículo e moela, essas enzimas dispõem de aproximadamente 55% do tempo total de permanência da digesta no trato digestório para atuar sobre o fitato da dieta.

Tabela 2 Tempo de permanência, em minutos, da digesta em diferentes partes do trato digestório de frangos de corte.

Segmento do trato digestório	Tempo de permanência da digesta
Papo	50
Proventrículo e moela	90
Duodeno	5 a 8
Jejuno	20 a 30
Íleo	50 a 70
Reto	25

Retirado de Gauthier (2002).

Entretanto, a possibilidade de formação de complexos durante a passagem da ração pelo papo não pode ser descartada, pois é provável que o pH 5,5 permita algum grau de ação antinutricional do fitato podendo diminuir, no proventrículo e moela, a eficácia da fitase ácida suplementada na ração.

2.1.4.2 Forma de complexação entre os fosfatos de mio-inositol e o cálcio

Em pH neutro ou básico, a desprotonação dos grupos fosfatos do fitato aumenta sua afinidade por cátions metálicos divalentes, como por exemplo Ca^{2+} e Mg^{2+} , promovendo a formação de complexos fitato-metal. Como o íon Ca^{2+} possui grande raio iônico (0,99 Å), ele se liga a dois oxianions de grupos fosfatos adjacentes do fitato, de uma maneira bidentada (MARTIN; EVANS, 1986). Posteriormente, Oh et al. (2006) confirmaram essa preferência de ligação bidentada por meio de estudos cinéticos e de cromatografia em camada delgada.

A quelação pelo grupo fosfato envolve a ligação de coordenação do ligante para um íon metálico pela doação de elétrons dos átomos de oxigênio do fosfato. Cátions divalentes como o Ca^{2+} são mais susceptíveis à quelação do que os monovalentes (OH et al., 2006). A ligação dos grupos fosfatos depende do raio iônico do cátion e do número de grupos fosfato da molécula (MARTIN; EVANS, 1986) (Figura 5). Por exemplo, com 1 único grupo fosfato em um anel de inositol (InsP_1) ou 2 grupos fosfatos distantes, como o $\text{Ins}(1,4)\text{P}_2$, forma-se preferencialmente um quelato monodentado com o Mg^{2+} que possui pequeno raio iônico. Entretanto, se houverem 2 grupos fosfato adjacentes, como no $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ e no $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, é provável a formação de um quelato bidentado com o Ca^{2+} , o qual possui raio iônico maior que o do Mg^{2+} (0,99 Å versus 0,65 Å).

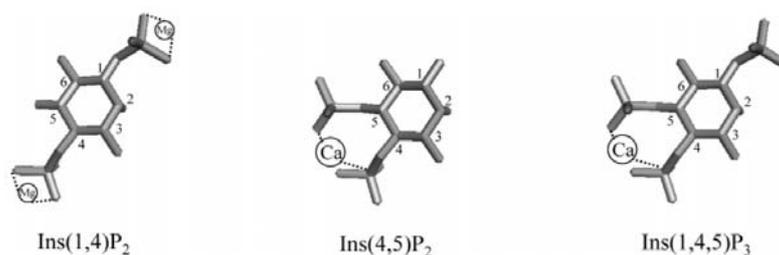


Figura 5 Interação de fosfatos de inositol com cátions divalentes (CHERYAN, 1980 citado por OH et al., 2006).

O InsP_6 é um forte quelante do Ca^{2+} e pode formar vários quelatos bidentados em uma mesma molécula (OH et al., 2006). Portanto, sua presença compromete a absorção intestinal do Ca^{2+} da dieta, entre outros nutrientes.

2.2 Fitase

As fitases (hexafosfato de mio-inositol fosfohidrolases) são enzimas amplamente encontradas 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 fitase catalisa a reação de desfosforilação do ácido fítico em ésteres de fosfato de mio-inositol menores e P_{inorg} (LEI; PORRES, 2003). A atividade dessa enzima é, normalmente, expressa em unidades de atividade de fitase (FTU) sendo que 1 FTU é a quantidade de P_{inorg} liberado (μmol) 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).

2.2.1 Classificação das fitases

2.2.1.1 Segundo o local do substrato onde a hidrólise se inicia

Duas classes de fitases são reconhecidas pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e pela International Union of Biochemistry (IUB): 3-fitases (EC 3.1.3.8) que removem o primeiro ortofosfato na posição D-3 (L-1) do fitato e 6-fitases (EC 3.1.3.26) as quais iniciam preferencialmente a desfosforilação na posição L-6 (D-4) (RAGON et al., 2008).

2.2.1.2 Segundo o pH de ação

Utilizando este critério, 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; ALMINGER; CARLSSON, 2001).

2.2.1.3 Segundo diferenças estruturais e catalíticas

Baseado nas suas diferenças estruturais e catalíticas, as fitases foram subdivididas em três principais classes: histidina fosfatase ácida (HFA), fitase β -hélice (FBH) e fosfatase ácida “purple” (FAP) (MULLANEY; ULLAH, 2003).

A Classe HFA é a que possui maior número de representantes, sendo caracterizada pela presença de uma sequência conservada de aminoácidos no sítio ativo (RHG_xR_xP) e um dipeptídeo cataliticamente ativo (His³⁶¹Asp³⁶²). As demais classes (FBH e FAP) não possuem a sequência conservada no sítio ativo e/ou o dipeptídeo cataliticamente ativo (LEI; PORRES, 2003).

A FBH tem sido isolada principalmente de microrganismos do gênero *Bacillus* e exibe atividade máxima em pH de 6,0 a 8,0 (FU; SUN; QIAN, 2008) e são capazes de hidrolisar o Ca ligado ao fitato, pois o seu substrato é o complexo fitato de cálcio (SHIN et al., 2001). Segundo Selle, Cowieson e Ravindran (2009), a inclusão destas fitases em rações para aves e suínos parece promissora, entretanto, até o momento não são comercializadas apesar de já estarem bem caracterizadas quanto suas propriedades moleculares e catalíticas.

2.2.2 Hidrólise enzimática do ácido fítico

2.2.2.1 Informações gerais sobre a hidrólise

A hidrólise enzimática consiste em uma reação química catalisada por uma enzima (uma hidrolase) que utiliza H₂O para “quebrar” uma molécula em duas outras moléculas. Um dos produtos da reação catalisada receberá um grupo OH⁻ enquanto o outro receberá um próton de hidrogênio (H⁺) que serão

incorporados em suas estruturas químicas. De acordo com Greiner et al. (2002), a hidrólise do fitato pela fitase é um processo serial, portanto, cada intermediário fosfatado do mio-inositol é liberado do sítio ativo da enzima mas pode ser 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_{inorg} . Entretanto, o mecanismo de catálise e o grau de desfosforilação do ácido fítico são variáveis entre fitases diferentes (GREINER et al., 2002).

2.2.2.2 Estereoespecificidade da desfosforilação enzimática dos fosfatos de mio-inositol

A estereoespecificidade da desfosforilação enzimática do ácido fítico por algumas fitases consta na Tabela 3, a fim de exemplificar que fitases de diferentes origens possuem distintas características físico-químicas e catalíticas.

Greiner et al. (2002) determinaram a rota de desfosforilação do IP_6 pela ação de três diferentes fitases de *Bacillus* spp e concluíram que as três enzimas apresentaram ação similar. Somente após 60 minutos de incubação (fitase-substrato) o IP_6 e IP_5 foram completamente degradados em IP_4 [Ins(2,4,5,6) P_4 e D/L-Ins(1,2,5,6) P_4] e IP_3 [D/L-Ins(1,2,6) P_3 e D/L-Ins(2,4,5) P_3] e após 90 minutos de incubação foram observados apenas os picos referentes aos trifosfatos de mio-inositol citados anteriormente. Portanto, houve uma relação direta entre o grau de desfosforilação com o tempo de incubação (mantendo-se a concentração da enzima fixa). Observaram também que o aumento da concentração da fitase em 10x e do tempo de incubação para 300 minutos resultou em uma degradação quase total do D/L-Ins(1,2,6) P_3 para D/L-Ins(2,4) P_2 , enquanto que nenhuma variação na quantidade de D/L-Ins(2,4,5) P_3

Tabela 3 Estereoespecificidade da desfosforilação enzimática do ácido fítico por algumas fitases microbianas

Fitase – origem	Massa molecular e/ou pH da reação	Produtos da hidrólise	Sequência de desfosforilação	Métodos utilizados	Referência
P2 – <i>Escherichia coli</i>	45 kDa; Tampão acetato 0,1M; pH 4,5	D-Ins*(1,2,3,4,5)P ₅ ; D-Ins(2,3,4,5)P ₄ ; D-Ins(2,4,5)P ₃ ; Ins(2,5)P ₂ ; Ins(2)P	6-1-3-4-5	Cromatografia iônica de alta eficiência (HPIC); estudos cinéticos	Greiner, Carlsson e Alminger (2000)
Fermento de pão – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60 kDa; Tampão acetato 0,1M; pH 4,5	D-Ins(1,2,4,5,6)P ₅ ; D-Ins(1,2,5,6)P ₄ ; D-Ins(1,2,6)P ₃ ; D-Ins(1,2)P ₂ ; Ins(2)P	3-4-5-6-1	HPIC; estudos cinéticos	Greiner, Carlsson e Alminger (2000)
<i>Paramecium</i>	Tampão Tris-HCl 0,05M; pH 7,0	Ins(1,2,3,4,5)P ₅ ; Ins(1,2,3,4)P ₄ ; Ins(1,2,3)P ₃ ; Ins(2,3)P ₂	6-5-4-1	HPLC e compostos com P marcado (³² P)	Kaay e Haastert (1995)
<i>Debaryomyces castellii</i> CBS 2923	74 kDa (com 28,8% de glicosilação); Tampão acetato 0,25M; pH 4,0	Ins(1,2,4,5,6)P ₅ ; Ins(1,2,5,6)P ₄ ; Ins(1,2,6)P ₃ ; Ins(1,2)P ₂ ; Ins(1 ou 2)P ; inositol	3-4-5-6-(1 ou 2)	HPIC; ressonância magnética nuclear	Ragon et al. (2008)
Gene de <i>Bacillus subtilis</i> 168 ¹ , <i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 15841 ² , <i>B. amyloliquefaciens</i> 45 ³ (expresso independentemente em <i>B. subtilis</i> MU331)	40 kDa; Tampão Tris-HCl 0,1M; pH 7,0	D-Ins*(1,2,4,5,6)P ₅ ; Ins(2,4,5,6)P ₄ ; D/L-Ins(2,4,5)P ₃ ou Ins(2,4,6)P ₃ ; ou D-Ins(1,2,4,5,6)P ₅ ; D-Ins(1,2,5,6)P ₄ ; D-Ins(1,2,6)P ₃ ; D-Ins(2,6)P ₂ ; Ins(2)P	3-1-(6 ou 5) 3-4-5-1-6	HPIC; estudos cinéticos	Greiner et al. (2002)

*Ins = inositol. ¹Número de acesso (NA): P42094; Swiss Prot Database. ²NA: AF453255; National Center for Biotechnology Information – NCBI – Database. ³NA: AY055220; NCBI Database. As três fitases contêm 383 resíduos de aminoácidos e apresentam 90 a 98% de identidade de sequência.

foi observada, indicando que a taxa de desfosforilação não é a mesma entre isômeros com o mesmo número de grupos fosfatos. Além disso, Greiner et al. (2002) determinaram as constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_m) e catalítica (K_{cat}) de vários fosfatos de mio-inositol e concluíram que: (a) a afinidade das fitases e suas taxas de hidrólise máxima foram menores para os IP_5 avaliados do que para o IP_6 e (b) que o Ins(2)P quase não foi hidrolisado já que apresentou K_{cat} extremamente baixo ($0,12 \pm 0,01$).

2.3 Eficiência das fitases exógenas em liberar P_{fit} da dieta

Apesar da crescente experiência prática e científica sobre o uso de fitases microbianas na nutrição de frangos de corte, as pesquisas que avaliam a eficiência da fitase geralmente não incluem a comparação direta da concentração de P_{fit} determinada na ração e na excreta das aves e, segundo Angel et al. (2002), isso pode levar à equivocados valores de equivalência de Pinorg pela fitase. A variabilidade no teor de P_{fit} dos grãos e sementes tem sido relatada por vários pesquisadores (DOST; TOKUL, 2006; STEINER et al., 2007; WU et al., 2009) entretanto, até o momento, não há uma metodologia padronizada para a determinação de fitato nas rações e excretas de frangos de corte nem pesquisas comparando os resultados obtidos por colorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de índice de refração (comparação não somente da sensibilidade entre os métodos, mas também de que efeito o tipo de metodologia pode causar na interpretação dos resultados experimentais).

2.4 Fitase na nutrição de frangos de corte: considerações sobre o cálcio

2.4.1 Efeito da fitase na digestibilidade ileal do cálcio

Ravindran et al. (2006) determinaram o efeito da fitase de *E. coli* sobre a

digestibilidade ileal aparente do Ca em frangos de corte alimentados com dieta a base de milho e soja, contendo 8,2 g de Ca/kg de ração e concluíram que suplementações gradativas da fitase (0, 500, 750 e 1.000 FTU/kg) aumentaram os coeficientes de digestibilidade ileal do Ca em até 10,5%. Já em trabalho posterior também realizado com frangos de corte, Ravindran, Cowieson e Selle (2008) relataram que 500 FTU/kg (fitase de *E. coli*) aumentou a digestibilidade ileal de Ca em 27,0% quando a dieta continha 7,8 g de Ca/kg de ração.

Apesar da variação de resultados entre diferentes pesquisas, é evidente que a fitase melhora a digestibilidade de Ca nas aves.

2.4.2 Efeito dos níveis de Ca e relação Ca:P sobre a atividade da fitase

Trabalhando com frangos de corte de 1 a 42 dias de idade, Aksakal e Bilal (2002) concluíram que a fitase (600 FTU/kg) aumentou em 39,8% a retenção de P nos animais que receberam dietas com relação Ca:P_{total} de 1:1, todavia, quando as dietas continham relação Ca:P_{total} de 2:1 houve um aumento na retenção de P de apenas 8,5%. Esses resultados corroboram com o trabalho de revisão escrito por Selle, Cowieson e Ravindran (2009) no qual os pesquisadores relataram que é aceito atualmente que as fitases comercializadas são mais eficientes quando as dietas contém reduzido nível de Ca e baixa relação Ca:P_{total}, entretanto esses valores ainda não estão completamente estabelecidos para as diferentes fases de criação dos frangos de corte.

Isso provavelmente acontece porque o aumento da concentração de Ca na dieta intensifica a formação de complexos fitato-Ca resistentes à hidrólise pelas fitases até então utilizadas (TAMIN; ANGEL, 2003). Portanto, ao comparar trabalhos diferentes quanto à eficiência da fitase é importante considerar também os níveis de cálcio utilizados nas dietas. Desta forma, faz-se necessário avaliar qual a real concentração de P_{fit} nas rações, além de determinar

a relação Ca:P indicada para frangos de corte alimentados com dietas deficientes em P_{disp} e suplementadas com fitase, nas diferentes fases de criação.

2.4.3 Equivalência de cálcio por fitases exógenas

Augsburger e Baker (2004) realizaram um estudo 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. Já Schöner et al. (1994) observaram, também em frangos, 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_{total} /kg e 2,3 g de P_{disp} /kg), entretanto, basearam-se no ganho de peso vivo e teor de cinzas ósseas. Por outro lado, Yan et al. (2006) concluíram que a fitase disponibiliza quantidades mínimas de Ca em frangos de corte (avaliaram rações a base de milho e soja suplementadas com 1.000 FTU/kg, três níveis de Ca e oito de P_{disp}). Mitchell e Edwards (1996) também relataram que a fitase exógena não reduziu a necessidade de Ca na dieta de frangos quando as dietas continham 2,02 g de P_{fit} /kg de ração e a relação Ca:P variou de 0,86 a 2,30. Provavelmente, as diferenças entre estas pesquisas (tipo de fitase, composição da ração, parâmetros avaliados para determinar a equivalência, relação Ca: P_{disp} , relação Ca: P_{fit} , etc.) justificam os diferentes resultados de equivalência, estabelecer uma conclusão objetiva da equivalência de Ca pela fitase.

2.5 Determinação de fitato por colorimetria x HPLC com detector de índice de refração

De modo geral, o método colorimétrico para a determinação de fitato baseia-se na reação entre o íon férrico e o ácido sulfossalicílico (Reagente de

Wade – RW) com formação de complexo cor rosa escuro que possui absorção máxima em $\lambda = 500$ nm. Na presença do fitato, o ferro se liga a este grupo fosfato ficando indisponível para reagir com o ácido sulfossalicílico reduzindo, assim, a intensidade da cor do RW. Entretanto, o ferro do RW não discrimina o P_{fit} do P_{inorg} podendo ligar-se a qualquer um dos dois tipos de grupamentos fosfatos presentes na amostra. Assim, recomenda-se que após a etapa de extração a amostra seja purificada em resina de troca aniônica (cromatografia preparativa para separar o fitato do P_{inorg}) (LATTA; ESKIN, 1980; WU et al., 2009).

Segundo Latta e Eskin (1980), o P_{inorg} deve ser eluído da resina com NaCl 0,1 mol/L e o P_{fit} com NaCl 0,7 mol/L. Todavia, Alves et al. (2010) verificaram o efeito da concentração da solução salina (NaCl de 0,1 a 0,7 mol/L para a eluição do P_{inorg} e NaCl de 0,7 a 1,0 mol/L para a eluição do fitato) sobre a porcentagem de recuperação do P_{inorg} (KH_2PO_4) e do fitato (Sigma) retidos na resina AG[®] 1-X4 e concluíram que a etapa de eluição com NaCl 0,1 mol/L é desnecessária e que o uso de NaCl 0,7 mol/L para retirar o fitato adsorvido na resina é eficiente, com recuperação média entre 95 e 99%. Portanto, tudo indica que a metodologia colorimétrica utilizando a etapa de cromatografia preparativa seja eficiente para determinar os fosfatos de mio-inositol, entretanto, esta metodologia não discrimina as diferentes frações fosfatadas do mio-inositol e é preciso avaliar se isso pode ter importância principalmente nas excretas de aves alimentadas com ração suplementada com fitase exógena.

Em contrapartida, o uso de HPLC com detector de índice de refração (IR) mostrou-se eficiente para a quantificação de polifosfatos do mio-inositol (IP_6 , IP_5 , IP_4 e IP_3) em farelo de arroz estabilizado tratado com fitase exógena (CÚNEO; AMAYA-FARFAN; CARRARO, 2000). A detecção dessas frações é possível uma vez que os diferentes fosfatos de mio-inositol causam alterações no

efluente que sai da coluna (contendo componentes da amostra) qual é continuamente comparado ao ir da fase móvel pura.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Espera-se, com os resultados obtidos nos experimentos propostos, padronizar e disponibilizar para a comunidade científica uma metodologia adequada para a determinação de fitato nas rações e excreta de frangos de corte, contribuindo para o avanço nas pesquisas de nutrição do setor avícola. Além disso, os resultados desta pesquisa terão um impacto econômico na produção de frangos de corte, devido à redução do teor de inclusão de um oneroso ingrediente da ração: o fosfato bicálcico. Haverá também, uma contribuição ambiental relevante, pois a suplementação da ração com fitase reduz significativamente o teor de fósforo excretado no ambiente possibilitando a produção de carne de alto valor biológico considerando-se também a redução do impacto ambiental.

REFERÊNCIAS

- AKSAKAL, D. H.; BILAL, T. Effects of microbial phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on the absorption of minerals from broiler chicken diets containing different levels of calcium. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 50, n. 3, p. 307-313, July 2002.
- ALMEIDA, M. V. de et al. A cascata dos fosfoinosítídeos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 105-111, jan./fev. 2003.
- ALVES, A. P. de C. et al. Otimização da metodologia colorimétrica usada para a determinação do ácido fítico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 22., 2010, Salvador. **Anais...** Salvador: UFBA, 2010. p. 745.
- ANGEL, R. et al. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 11, n. 4, p. 471-480, 2002.
- 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. Phytase improves dietary calcium utilization in chicks, and oyster shell, carbonate, citrate, and citrate malate forms of calcium are equally bioavailable. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 24, n. 4, p. 293-301, Apr. 2004.
- 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: SBA, 2002. p. 6-22.
- CÚNEO, F.; AMAYA-FARFAN, J.; CARRARO, F. Distribuição dos fitatos em farelo de arroz estabilizado e tratado com fitase exógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 94-98, abr. 2000.
- DOST, K.; TOKUL, O. Determination of phytic acid in wheat and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 558, n. 1/2, p. 22-27, Feb. 2006.

- ENGELEN, A. J. et al. Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal of AOAC International**, Raleigh, v. 77, n. 3, p. 760-764, 1994.
- FU, S.; SUN, J.; QIAN, L. Effect of Ca²⁺ on beta-propeller phytases. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 15, n. 1, p. 39-42, Jan. 2008.
- GAUTHIER, R. Intestinal health, the key to productivity: the case of organic acids. In: CONVENCION ANECA-WPDC, 27., 2002, Puerto Vallarta. **Proceedings...** Puerto Vallarta: WPDC, 2002. p. 1-14.
- 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, MG, v. 36, n. 6, p. 1769-1774, nov./dez. 2007.
- GOSSELIN, R. E.; COGHLAN, E. R. The stability of complexes between calcium and orthophosphate, polymeric phosphate and phytate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 45, n. 2, p. 301-311, Aug. 1953.
- 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.
- GREINER, R.; CARLSSON, N. G.; ALMINGER, M. L. Stereospecificity of myo-Inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 53-62, Nov. 2000.
- 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.
- 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.
- KAAAY, J. van der; HAASTERT, P. J. M. van. Stereospecificity of inositol hexakisphosphate dephosphorylation by *Paramecium phytase*. **The Biochemical Journal**, London, v. 312, n. 3, p. 907-910, Dec. 1995.

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. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Cambridge: CABI, 2001. p. 237-271.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 28, n. 6, p. 1313-1315, Nov. 1980.

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.; SCHÖNER, 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, 1., 1993, Karthause Ittingen. **Proceedings...** Karthause Ittingen: EAN, 1993. p. 202-205.

LUTTRELL, B. M. The biological relevance of the binding of calcium ions by inositol phosphates. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 3, p. 1521-1524, Jan. 1993.

MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. 375 p.

MARTIN, C. J.; EVANS, W. J. Phytic acid-metal ion interactions: II., the effect of pH on Ca(II) binding. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 27, n. 1, p. 17-30, May 1986.

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.

NAGATA, A. K. et al. Uso do conceito de proteína ideal em rações com diferentes níveis energéticos, suplementadas com fitase para frangos de corte de

1 a 21 dias de idade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 599-605, mar./abr. 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of poultry**. 9th ed. Washington: National Academy of Science, 1994. 155 p.

OH, B. C. et al. Ca²⁺-inositol phosphate chelation mediates the substrate specificity of β -propeller phytase. **Biochemistry**, New York, v. 45, n. 31, p. 9531-9539, Aug. 2006.

_____. 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.

QUIRRENBACH, H. R. et al. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe(II) e Fe(III). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 24-32, jan./mar. 2009.

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.

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, 1995.

RAVINDRAN, V.; COWIESON, A. J.; SELLE, P. H. Influence of dietary electrolyte balance and microbial phytase on growth performance, nutrient utilization and excreta quality of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 677-688, Apr. 2008.

RAVINDRAN, V. et al. Influence of an *E. coli*-derived phytase on nutrient utilization in broiler starters fed diets containing varying concentrations of phytic acid. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, n. 1, p. 82-89, Jan. 2006.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2011. 252 p.

SANTOS, F. R. et al. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 17, n. 2, p. 191-201, 2008.

SCHÖNER, F. J. et al. Effect of microbial phytase on Ca-availability in broilers. In: CONFERENCE ON POULTRY AND SWINE NUTRITION, 3., 1994, Halle. **Proceedings...** Halle: CPSN, 1994. p. 147-150.

SCHOULTEN, N. A. et al. Efeito dos níveis de cálcio sobre a absorção de minerais em dietas iniciais para frangos de corte suplementadas com fitase. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1313-1321, nov./dez. 2002.

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**, Amsterdam, v. 135, n. 1/2, p. 1-41, May 2007.

SHIN, S. et al. Enzyme mechanism and catalytic property of β propeller phytase. **Structure**, Philadelphia, v. 9, n. 9, p. 851-858, Sept. 2001.

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, MG, v. 37, n. 3, p. 469-477, mar. 2008.

STEINER, T. et al. Distribution of phytase activity, total phosphorus and phytate phosphorus in legume seeds, cereals and cereal by-products as influenced by harvest year and cultivar. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 133, n. 3/4, p. 320-334, Feb. 2007.

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**, Easton, 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.

WU, P. et al. Determination of phytic acid in cereals: a brief review. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 9, p. 1671-1676, Sept. 2009.

YAN, F. et al. Effect of phytase supplementation on the calcium requirement of broiler chicks. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, 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**, Amsterdam, v. 117, n. 3/4, p. 295-303, Dec. 2004.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1****Metodologias para quantificar fósforo fítico em rações contendo fitase e em excretas de frangos de corte****Naves, L. de P.; Rodrigues, P. B. et al.****Artigo redigido conforme as normas da Revista Scientia Agricola – versão preliminar**

RESUMO - Um experimento de metabolismo foi realizado com frangos de corte, no período de 15 a 28 dias de idade, para comparar duas metodologias analíticas empregadas para quantificar o teor de fósforo fítico (P_{fit}) nas rações e nas excretas das aves e determinar a eficiência catalítica da fitase suplementada na dieta utilizando os resultados da metodologia que se mostrou mais apropriada. Um total de 120 frangos de corte foram distribuídos em esquema fatorial 5×2 , sendo quatro rações igualmente deficientes em P disponível (P_{disp}) suplementadas com níveis crescentes de fitase (0; 750; 1.500 e 2.250 unidades de atividade de fitase – FTU/kg de ração) mais uma ração controle positivo sem fitase, formulada para atender às exigências nutricionais dos frangos no período, fornecidas a aves machos e fêmeas. Três repetições de quatro aves foram utilizadas para cada tratamento avaliado. O teor de P_{fit} no milho, farelo de soja, rações e excretas foi determinado pela metodologia colorimétrica e por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração, sendo que a metodologia colorimétrica com a proporção de extração de 1:20 (massa de amostra em g:volume de solvente extrator em mL) mostrou-se a mais

adequada. Não houve interação entre os níveis de fitase e o sexo das aves para o consumo, excreção e coeficiente de hidrólise/retenção do P_{fit} . Os machos consumiram 12% mais P_{fit} que as fêmeas. O aumento do nível de fitase na ração reduziu linearmente a excreção de P_{fit} . A maior taxa de hidrólise do P_{fit} foi estimada em 87,85% quando a dieta continha 1.950 FTU/kg de ração, indicando ser possível reduzir o P inorgânico na formulação em quantidade equivalente a 87,85% do teor de P_{fit} presente na dieta, correspondendo à redução de 2,86 g de P/kg de ração formulada.

Palavras-chave: ácido fítico; enzima; fitato; formulação de ração; fosfato de mio-inositol

Introdução

Embora os benefícios econômicos e ambientais obtidos pelo uso da fitase em rações para frangos de corte sejam relatados na literatura (Nagata et al., 2011; Santos et al., 2011ab; Gomide et al., 2012), sua eficiência catalítica em disponibilizar o fósforo fítico (P_{fit}) da dieta ainda não está bem estabelecida e, segundo Angel et al. (2002), isto deve ser feito considerando-se o teor de P_{fit} determinado na ração e na excreta. Dentre os métodos analíticos para determinar fitato, destacam-se aqueles que utilizam princípios colorimétricos e de refração (Wu et al., 2009), todavia, essas metodologias ainda não foram comparadas entre si para amostras de rações e excretas, o que é importante para evitar o uso de uma metodologia inadequada o que pode levar à interpretações equivocadas da eficiência da fitase.

O método colorimétrico baseia-se na reação entre o íon férrico (Fe^{3+}) e o ácido sulfossalicílico (Reagente de Wade – RW) com formação de um complexo que pode ser monitorado em 500 nm. Na presença do fitato, o Fe^{3+} se liga preferencialmente ao P_{fit} reduzindo a intensidade da cor do RW. Entretanto,

como o Fe^{3+} não discrimina o P_{fit} do P inorgânico (P_{inorg}) presentes na amostra, é necessário que antes da dosagem colorimétrica a amostra percorra uma resina de troca aniônica para separar o P_{fit} do P_{inorg} (Latta & Eskin, 1980). Após a correlação com uma curva padrão de ácido fítico (IP_6) o resultado determinado é multiplicado por 0,282 para expressar o teor de P_{fit} na amostra, pois esta constante corresponde à proporção molar do P na molécula de IP_6 (Angel et al., 2002). Entretanto, é preciso avaliar se esta metodologia superestima o P_{fit} em amostras que apresentam ésteres de fosfato com menos de seis grupamentos fosfatos o que é esperado em excretas de frangos alimentados com rações contendo fitase, pois segundo Greiner et al. (2002), os produtos da degradação do IP_6 pela fitase podem incluir diferentes graus de fosforilação do mio-inositol (IP_5 a IP_1). Em contrapartida, a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração discriminou as frações de IP_3 a IP_6 em farelo de arroz tratado com fitase exógena (Cúneo et al., 2000), despertando o interesse de avaliá-la em experimentos com frangos de corte.

Portanto, este trabalho foi realizado para selecionar a metodologia analítica mais adequada para quantificar o P_{fit} em rações e excretas de frangos de corte machos e fêmeas, permitindo assim, estimar a hidrólise do P_{fit} ao utilizar rações suplementadas com níveis crescentes de fitase.

Material e Métodos

Um experimento de metabolismo foi conduzido em Lavras, Minas Gerais, Brasil (21°13'52" S; 44°58'16" O) com frangos de corte no período de 15 a 28 dias de idade para comparar duas metodologias analíticas empregadas para quantificar o fósforo fítico (P_{fit}) nas rações e nas excretas das aves e determinar a eficiência catalítica da fitase suplementada na dieta utilizando os resultados da metodologia que se mostrou mais apropriada.

Todos os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA (protocolo nº 004/11). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado disposto em esquema fatorial 5 x 2, sendo quatro rações igualmente deficientes em P disponível (P_{disp}) suplementadas com fitase (0; 750; 1.500 ou 2.250 unidades de atividade de fitase – FTU/kg de ração) mais uma ração controle positivo, sem fitase, formulada segundo as recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2005), fornecidas a aves machos e fêmeas. Três repetições de quatro aves foram utilizadas para cada tratamento avaliado.

Um total de cento e vinte pintos de corte (60 aves de cada sexo) da linhagem Cobb-500[®] foram adquiridos com um dia de idade, sexados e criados em galpão convencional para frangos de corte até os 14 dias de idade recebendo ração à base de milho e farelo de soja formulada para atender suas exigências nutricionais (Rostagno et al., 2005). No 15^o dia de idade, as aves foram pesadas individualmente, separadas por faixas de peso e transferidas para gaiolas (unidade experimental; com dimensões de 50 x 50 x 50 cm) em uma sala de metabolismo, de modo que as unidades experimentais apresentassem o peso médio inicial dos frangos semelhante entre si (0,465 kg \pm 0,002). A sala dispunha de iluminação constante e temperatura controlada, sendo cada gaiola metabólica provida de um bebedouro, um comedouro individual do tipo calha com borda para evitar desperdícios e uma bandeja coletora de excretas. As dietas experimentais (Tabela 1) e água foram fornecidas à vontade, no período de 15 a 28 dias de idade.

Tabela 1 - Composição (g/kg de matéria natural) e teor nutricional das dietas experimentais fornecidas a frangos de corte machos e fêmeas

Ingrediente	CP ¹	CN ²	CN suplementada com
			fitase ³ 750/ 1.500/ 2.250

Milho	596,20	604,86	604,86
Farelo de soja	335,29	333,71	333,71
Óleo de soja	31,61	28,68	28,68
Sal	4,82	4,82	4,82
L-lisina HCl 98%	1,67	1,70	1,70
DL-metionina 99%	2,29	2,28	2,28
L-Treonina 98,5%	0,35	0,35	0,35
Suplemento mineral ⁴	0,50	0,50	0,50
Suplemento vitamínico ⁵	0,40	0,40	0,40
Cloreto de colina 60%	0,45	0,45	0,45
Calcário calcítico	8,74	16,10	16,10
Fosfato bicálcico	17,19	5,65	5,65
Inerte (caulim)	0,500	0,500	0,425/ 0,350/ 0,275
Fitase ⁶	0	0	0,075/ 0,150/ 0,225
Composição nutricional calculada e determinada (g/kg de matéria natural)			
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.050	3.050	3.050
Proteína bruta calculada	201,2	201,2	201,2
Lisina digestível calculada	11,10	11,10	11,10
Met + cys digest. calculada	7,94	7,94	7,94
Sódio calculado	2,10	2,10	2,10
Cálcio calculado	8,55	8,55	8,55
Cálcio determinado	8,63	8,50	8,49
Fósforo total calculado	6,39	4,26	4,26
Fósforo total determinado	6,48	4,37	4,36
Fósforo disponível ⁷ calculado	4,26	2,13	2,13
Fósforo fítico ⁸ calculado	2,13	2,13	2,13
Atividade da fitase calculada ^{3,6}	0	0	750/ 1.500/ 2.250
Atividade da fitase determinada ^{3,6}	0	0	749/ 1.497/ 2.246

¹CP: dieta controle positivo formulada para atender as necessidades nutricionais de frangos de corte, no período de 15 a 28 dias de idade, segundo Rostagno et al. (2005). ²CN: dieta controle negativo deficiente em fósforo disponível.

³Suplementação enzimática expressa em FTU/kg de dieta, sendo que 1FTU corresponde a uma unidade de atividade da fitase.

⁴Conteúdo/kg de ração: 55 mg Zn; 48 mg Fe; 10 mg Cu; 78 mg Mn; 0,70 mg I; 0,18 mg Se. ⁵Conteúdo/kg de ração: 4,8 mg vit. B₂; 8.000 UI vit. A; 2.000 UI

vit. D₃; 1,2 mg vit. B₁; 2,4 mg vit B₆; 10,8 µg vit. B₁₂; 0,024 mg biotina; 0,64 mg ácido fólico; 11,6 mg ácido pantotênico; 1,92 mg vit. K₃; 16,2 UI vit. E. ⁶6-fitase (EC 3.1.3.26) sintetizada pelo microrganismo *Aspergillus oryzae* (DSM 17594). Enzima com atividade declarada de 10.000 FTU/g de produto e atividade determinada de 9.980 FTU/g de produto, segundo protocolo de Engelen et al. (1994). ⁷Considerando-se, no cálculo, que um terço do fósforo total presente no milho e farelo de soja correspondem a fósforo disponível e que o fósforo fornecido pelo fosfato bicálcico é 100% disponível (Rostagno et al., 2005). ⁸Considerando-se, no cálculo, que dois terços do fósforo total presente no milho e farelo de soja correspondem a fósforo fítico (Rostagno et al., 2005).

O ensaio de metabolismo compreendeu 13 dias, sendo 10 dias de adaptação às instalações e dietas experimentais seguidos de três dias (Rodrigues et al., 2005) de coleta total das excretas, por unidade experimental. As rações e as sobras foram pesadas e registradas no 25^o e 28^o dia de idade das aves para os posteriores cálculos do consumo de ração neste período. A coleta de excretas foi realizada uma vez ao dia, na parte da manhã, utilizando-se bandejas coletoras forradas com plásticos resistentes. As excretas coletadas diariamente foram reunidas por unidade experimental em sacos plásticos identificados e armazenadas em freezer até o último dia de coleta quando foram pesadas, homogeneizadas e pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. As excretas pré-secas foram moídas e o teor de matéria seca total foi obtido considerando-se a perda de umidade na etapa de pré-secagem e também à 105 °C até peso constante (método 934.01 da Association of Official Analytical Chemists, 2005).

O teor de P_{fit} foi determinado pela metodologia colorimétrica (de acordo com Frühbeck et al., 1995 com modificações) e também por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração – HPLC-IR (segundo Nappi et al., 2006 com adaptações), sendo ambas as metodologias utilizadas para analisar os extratos obtidos em duas proporções de extração massa de amostra:volume de solvente extrator (1:20 e 3:20, em g:mL).

Paralelamente, três amostras do milho, farelo de soja e das rações controle positivo e negativo foram coletadas, moídas e utilizadas para a realização das mesmas análises propostas para as excretas.

Portanto, 1 ou 3 g de amostra foi suspenso em 20 mL de HCl 0,66 mol/L seguido de agitação mecânica, à temperatura ambiente, por duas horas. Posteriormente, o extrato foi centrifugado (14.881 x g/ 30 minutos/15 °C) sendo o sobrenadante recolhido e filtrado em papel filtro (Qualy[®] 12,5 Ø e poros de 14 µm). Na extração de 1:20, o filtrado foi diluído em função da concentração de fitato presente na amostra e da curva padrão de ácido fítico (método colorimétrico). As diluições (v:v, em mL) utilizadas para o milho, farelo de soja e rações foram, respectivamente, 3:25; 1:25 e 2:25. Todavia, para as excretas a diluição variou de 1:25 até 2:25 em função do tratamento, pois quanto maior o nível de fitase na dieta menor o teor de P_{fit} na excreta e, conseqüentemente, menor a diluição do filtrado. Após a diluição, o pH foi ajustado com NaOH até 6,0. No caso da extração de 3:20, o filtrado recolhido após a centrifugação teve o pH ajustado para 6,0 sem passar pela etapa de diluição realizada na extração de 1:20.

A purificação das amostras para separar o P_{fit} do P inorgânico (P_{inorg}) foi realizada em colunas de vidro (0,7 x 15 cm) empacotadas com 0,5 g de resina de troca aniônica (AG[®] 1-X4, 100 – 200 dry mesh, Bio-Rad) e lavadas com 15 mL de NaCl 0,6 mol/L e 30 mL de água ultra pura. Após este processo de ativação da resina, 10 mL da amostra com o pH 6,0 foram aplicados à coluna, descartando-se o eluato. Posteriormente, 15 mL de NaCl 0,6 mol/L foram utilizados para eluir os polifosfatos retidos na resina, sendo o pH do eluato coletado ajustado para 3,0 com HCl, pois segundo Frühbeck et al. (1995) este pH favorece a reação do fosfato com o reagente de Wade.

Na sequência do método colorimétrico, uma alíquota do eluato coletado (3 mL para a extração de 1:20 e de 100 a 600 µL para a extração de 3:20, sendo

neste caso pipetado água ultra pura para manter o volume final de 3 mL) foi misturada à 1 mL de reagente de Wade (cloreto férrico hexahidratado 0,03% e ácido sulfossalicílico 0,3%) e os tubos foram agitados em vortex procedendo-se a leitura de absorbância à 500 nm, usando água para zerar o espectrofotômetro. A curva padrão de ácido fítico foi realizada pipetando-se volumes crescentes da solução estoque (200 mg/L) de ácido fítico (P0109, lote 057k0049, Sigma-Aldrich) de modo a obter concentrações variando de 0 a 150 µg, sendo adicionado em cada tubo 1 mL de reagente de Wade e com o volume final mantido em 4 mL. A conversão da concentração de fitato em P_{fit} foi feita considerando-se a proporção molar do P na molécula de ácido fítico de 28,2% (Angel et al., 2002).

O restante do eluato coletado (15 mL eluídos da resina menos a alíquota utilizada na quantificação por colorimetria) foi evaporado a 40 °C e o resíduo sólido foi re-suspenso em 2 mL de fase móvel, centrifugado duas vezes (15.000 x g/10 minutos/4 °C), filtrado em membrana GV hidrofílica (Durapore de 0,22 µm de poro e 25 mm de diâmetro) e armazenado à 4 °C até a quantificação dos fosfatos de mio-inositol por HPLC-IR.

A fase móvel consistiu de 900 mL de metanol, 900 mL de ácido fórmico 0,05 mol/L, 45 mL de EDTA 0,005 mol/L e 54 mL de hidróxido de tetrabutilamônio 20%, sendo o pH da fase móvel ajustado para 4,3 com ácido sulfúrico. Antes de ser injetada no cromatógrafo, a fase móvel foi filtrada a vácuo e sonicada (degaseificada) por 50 minutos. As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu equipado com detector de índice de refração (RID10Ai) e coluna C₁₈ CAPCELL PAK (5 µm x 4,6 mm x 150 mm), com fase móvel a um fluxo de 0,5 mL/min. A temperatura do forno foi mantida a 45 °C e o volume de injeção foi de 20 µL.

Para a identificação das frações fosforiladas, os tempos de retenção dos compostos padrão hexafosfato de mio-inositol (IP₆ – cod. P0109/lote 057k0049);

1,3,4,5,6-pentafosfato de mio-inositol (IP₅ – cód. I9261/lote 114K12831); 1,3,4,6-tetrafosfato de mio-inositol (IP₄ – cód. I9386/lote 60K17321) e 1,4,5-trifosfato de mio-inositol (IP₃ – cód. I8761/lote 21H84341), obtidos sob as mesmas condições de análise, foram comparados com os tempos de retenção dos picos obtidos nas amostras. O IP₅ foi utilizado como padrão interno para quantificação das frações fosforiladas (IP₃ a IP₆) presentes nas amostras (Sandberg & Ahderinne, 1986):

$$\text{Concentração de IP}_\gamma \text{ na amostra (em mg/mL)} = \frac{0,32 \text{ mg/mL} \times \text{área do pico do IP}_\gamma \text{ na amostra}}{\text{Área do pico do padrão interno}}$$

Em que IP_γ corresponde às frações IP₃, IP₄, IP₅ ou IP₆.

A conversão da concentração de IP₆ em P foi calculada considerando-se a proporção molar do P na molécula de IP₆ que é de 28,2%. Para as frações IP₅, IP₄ e IP₃ foram utilizadas as proporções molares de 26,7; 24,8 e 22,1%, respectivamente.

O balanço e coeficiente de retenção do P_{fit} foram calculados com base na matéria seca, para cada metodologia avaliada. O consumo de P_{fit} (g/ave) foi calculado multiplicando-se o consumo de ração (g/ave) pelo teor (%) de P_{fit} da ração. Para calcular a excreção absoluta do P_{fit} (g/ave), a quantidade de excreta (g/ave) foi multiplicada pelo teor (%) de P_{fit} da excreta. O coeficiente de hidrólise do P_{fit} foi calculado pela fórmula:

$$\text{Coeficiente de hidrólise do P}_{\text{fit}} (\%) = \frac{\text{consumo de P}_{\text{fit}} - \text{excreção de P}_{\text{fit}}}{\text{consumo de P}_{\text{fit}}} \times 100$$

O teor de proteína nos extratos (mg de proteína/mL de extrato) foi dosado usando a albumina sérica bovina como padrão (Bradford, 1976).

Cada gaiola foi considerada como uma unidade experimental sendo realizada uma análise estatística independente para cada metodologia analítica avaliada. Os dados referentes ao consumo, excreção e coeficiente de hidrólise do P_{fit} foram submetidos à análise de variância utilizando-se o General Linear Model do software SAS (2004) e quando significativa, utilizou-se modelos de regressão polinomial ($P < 0,05$) para avaliar o efeito da suplementação crescente de fitase sobre esses parâmetros. A significância do efeito do sexo das aves foi avaliada pelo próprio teste de F, a 5% de probabilidade. Além disso, a ração controle positivo foi comparada às demais rações experimentais pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

A proposta inicial da presente pesquisa foi comparar as duas metodologias analíticas (colorimétrica e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração – HPLC-IR) apenas na proporção de extração de 1:20 (massa de amostra em g:volume de solvente extrator em mL), pois Brito (2008) conseguiu quantificar fitato em rações e excretas de frangos de corte pelo método colorimétrico nesta proporção de extração. Todavia, com a extração de 1:20, verificou-se que para a maioria das amostras (principalmente para as excretas dos frangos alimentados com as dietas contendo os maiores níveis de fitase) não foi possível detectar no cromatograma todos os picos referentes às diferentes frações fosforiladas do mio-inositol por HPLC-IR e, além disso, os poucos picos identificados apresentaram-se com uma intensidade inferior ao limite de quantificação do analito nas condições de análise. Por esse motivo, o extrato foi concentrado para permitir que os analitos de interesse pudessem ser quantificados por HPLC-IR. Durante este procedimento de concentração do extrato, verificou-se que a maior proporção possível foi de 3:20, pois em

proporções superiores, a amostra tornava-se pastosa o que era indesejado por comprometer o processo de solubilização do analito.

Para o método colorimétrico, a extração na proporção de 3:20 resultou na determinação de menores concentrações de fitato (Tabela 2) e, conseqüentemente, menor teor de fósforo fitico (P_{fit}) (Tabela 3) provavelmente devido à interferência das proteínas presentes neste extrato. Segundo Frühbeck et al. (1995), o pH da alíquota diluída deve ser ajustado para 6,0 porque este valor está acima do ponto isoelétrico da maioria das proteínas vegetais, ou seja, em teoria elas apresentariam carga líquida negativa e haveria uma repulsão eletrostática com o fitato evitando a formação de complexos fosfato de inositol (IP)–proteína. Todavia, parece ter ocorrido a formação desses complexos mesmo ajustando o pH para 6,0.

Para investigar a formação desses complexos, amostras extraídas na proporção de 3:20 foram centrifugadas e verificou-se visualmente grande quantidade de precipitado (pellet) sendo determinado no sobrenadante apenas $52,07 \pm 2,32 \mu\text{g}$ de proteína/mL de extrato (havia sido determinado $109,41 \pm 1,30$ e $800,73 \pm 1,71 \mu\text{g}$ de proteína/mL, respectivamente, nos extratos não centrifugados resultantes das proporções de extração de 1:20 e 3:20). Além disso, nenhum traço de fitato foi dosado no sobrenadante centrifugado, reforçando a hipótese de que o fitato complexou-se com as proteínas da amostra e precipitou após a centrifugação devido ao alto peso molecular dos complexos.

Além disso, com a extração de 1:20, a amostra percorria naturalmente a resina de troca aniônica pela ação da gravidade, entretanto, com a extração de 3:20 a amostra apresentava-se turva e era necessário utilizar uma bomba de pressão para promover sua eluição pela resina. Portanto, na proporção de extração 3:20 a complexação com proteínas resulta na subestimação do teor de fitato, sendo que parte dos complexos IP–proteína provavelmente não percorrem a resina e aqueles que por ventura possam ser eluídos com a solução

Tabela 2 - Teores de fitato em ingredientes, rações e excretas de frangos de corte machos e fêmeas determinados segundo duas metodologias analíticas e duas proporções de extração

Amostras	g de fitato/100 g de MS, pelo método colorimétrico		g de IP _T ¹ /100 g de MS, por HPLC-IR ^{2,3}		
	Extração 1:20 (m:v)		Extração 3:20 (m:v)		
Milho	1,000 ± 0,049		0,107 ± 0,010		
Farelo de soja	2,230 ± 0,012		0,375 ± 0,018		
Ração CN ⁴	1,341 ± 0,050		0,112 ± 0,008		
Ração CP ⁵	1,348 ± 0,063		0,106 ± 0,005		

Tratamentos (excretas)	g de fitato/100 g de MS, pelo método colorimétrico						g de IP _T ¹ /100 g de MS, por HPLC-IR ^{2,3}		
	Extração 1:20 (m:v)			Extração 3:20 (m:v)			Extração 3:20 (m:v)		
	Machos	Fêmeas	Média	Machos	Fêmeas	Média	Machos	Fêmeas	Média
CN + 0 FTU/kg	1,519	1,566	1,543	0,244	0,118	0,181	3,840	4,527	4,184
CN + 750 FTU/kg	1,456	0,757	1,107	0,168	0,076	0,122	3,994	2,866	3,430
CN + 1.500 FTU/kg	0,458	0,809	0,634	0,066	0,070	0,068	2,750	2,212	2,481
CN + 2.250 FTU/kg	0,655	0,753	0,704	0,090	0,083	0,087	2,719	2,505	2,612
Média	1,022	0,971		0,142	0,087		3,326	3,028	
CP, sem fitase	2,425	3,004	2,715	0,316	0,344	0,330	3,784	4,480	4,132

FTU: unidades de atividade da fitase. (m:v): massa de amostra em g:volume de solvente extrator em mL. MS: matéria seca.

¹IP_T = fosfatos de mio-inositol totais (corresponde a soma das frações IP₃, IP₄, IP₅ e IP₆). ²HPLC-IR: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração. ³Na proporção de extração de 1:20 (m:v) a concentração dos fosfatos de mio-inositol na alíquota injetada no cromatógrafo ficou abaixo do limite de detecção/quantificação. ⁴Ração controle negativo (CN) formulada com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração. ⁵Ração controle positivo (CP) formulada com 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração.

Tabela 3 - Teores de fósforo fitico (P_{fit}) em ingredientes, rações e excretas de frangos de corte machos e fêmeas determinados segundo duas metodologias analíticas e duas proporções de extração

Amostras	g de $P_{fit}^1/100$ g de MS, pelo método colorimétrico		g de $P_{fit}^2/100$ g de MS, por HPLC-IR ^{3,4}		
	Extração 1:20 (m:v)		Extração 3:20 (m:v)		
Milho	0,282 ± 0,017		0,030 ± 0,006		
Farelo de soja	0,629 ± 0,003		0,106 ± 0,009		
Ração CN ⁵	0,378 ± 0,014		0,032 ± 0,002		
Ração CP ⁶	0,380 ± 0,018		0,030 ± 0,001		

Tratamentos	g de $P_{fit}^1/100$ g de MS, pelo método colorimétrico						g de $P_{fit}^2/100$ g de MS, por HPLC-IR ^{3,4}		
	Extração 1:20 (m:v)			Extração 3:20 (m:v)			Extração 3:20 (m:v)		
	Machos	Fêmeas	Média	Machos	Fêmeas	Média	Machos	Fêmeas	Média
CN + 0 FTU/kg	0,428	0,442	0,435	0,069	0,033	0,051	0,856	1,010	0,934
CN + 750 FTU/kg	0,411	0,213	0,312	0,047	0,021	0,034	0,888	0,640	0,764
CN + 1.500 FTU/kg	0,129	0,228	0,179	0,019	0,020	0,019	0,614	0,494	0,554
CN + 2.250 FTU/kg	0,185	0,212	0,199	0,025	0,023	0,024	0,608	0,560	0,584
Média	0,288	0,274		0,040	0,024		0,742	0,676	
CP, sem fitase	0,684	0,847	0,765	0,089	0,097	0,093	0,844	1,000	0,922

FTU: unidades de atividade da fitase. (m:v): massa de amostra em g:volume de solvente extrator em mL. MS: matéria seca.

¹Fósforo fitico (%) = teor de fitato determinado (%) x 0,282. ²Fósforo fitico (%) = (% de IP₃ x 0,221) + (% de IP₄ x 0,248) + (% de IP₅ x 0,267) + (% de IP₆ x 0,282). ³HPLC-IR: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração. ⁴Na proporção de extração de 1:20 (m:v) a concentração dos fosfatos de mio-inositol na alíquota injetada no cromatógrafo ficou abaixo do limite de detecção/quantificação. ⁵Ração controle negativo (CN) formulada com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração. ⁶Ração controle positivo (CP) formulada com 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração.

salina podem não ser corretamente dosados devido à reação inadequada destes com o reagente de Wade. Além das proteínas, o fitato também pode se complexar com minerais (Kornegay, 2001) os quais também podem ter interferido na dosagem do fitato, contudo, como o conteúdo de proteína na ração é muito superior ao de minerais é provável que o efeito das proteínas tenha sido mais pronunciado.

Quando o extrato na proporção de 1:20 foi dosado colorimetricamente, os teores determinados para o milho e farelo de soja neste trabalho foram aproximadamente 30 e 44% mais altos que os valores médios apresentados na última edição das Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: 0,217 e 0,437g de $P_{fit}/100g$ de MS de milho e farelo de soja, respectivamente (Rostagno et al., 2011), porém a metodologia utilizada para a determinação desses teores não foi divulgada. Além da metodologia, essas diferenças observadas também podem ser devido a variações ambientais, genéticas e/ou de cultivo que podem alterar a composição de P_{fit} nas sementes e grãos, conforme pode ser exemplificado pelo trabalho de Wadt et al. (2010), os quais recolheram 94 amostras de milho oriundos das regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste do país na safra de verão de 2009 e verificaram diferenças dentro da mesma região e também entre regiões de cultivo, com teores de P_{fit} determinados de 1,0 a 2,6 g/kg de milho o que representa uma variação de 160%. Portanto, a metodologia colorimétrica na proporção de extração de 1:20 se mostrou a mais adequada para quantificar o P_{fit} .

Os tempos de retenção (em minutos) para os padrões IP_3 , IP_4 , IP_5 e IP_6 foram de 6,793; 10,386; 15,113 e 18,791, respectivamente. Os teores de P_{fit} determinados no milho, farelo de soja e rações pela metodologia de HPLC-IR também foram inferiores aos determinados por colorimetria na extração de 1:20 (Tabela 3) devido a complexação do fitato com outras moléculas presentes no extrato, principalmente as proteínas. Por outro lado, isso não foi observado para

as excretas, o que pode ser justificado pelo perfil de ésteres de fosfatos de mio-inositol presentes nas amostras (Tabela 4).

De modo geral, quanto maior o grau de fosforilação do mio-inositol, maior é o seu poder de complexação porque quanto mais grupos fosfatos houver na molécula, maior será o número de cargas negativas resultantes da desprotonação destes grupos fosfatos (Kornegay, 2001). Neste sentido, Yu et al. (2012) avaliaram recentemente o efeito do grau de fosforilação do mio-inositol sobre o potencial da molécula para complexar-se com a proteína da soja e β -caseína bovina e concluíram, para ambas as proteínas, que o IP₆ possui alto poder quelante o qual é acentuadamente reduzido pela perda de um grupo fosfato (IP₅) se tornando praticamente nulo nas demais frações fosforiladas (IP₄ até IP₁). Portanto, devido a presença das frações com menos de cinco grupos fosfato nas excretas, a interferência das proteínas nessas amostras foi menor do que nos ingredientes e nas rações.

No milho, apenas a fração IP₆ foi detectada enquanto que no farelo de soja e nas rações os fosfatos de mio-inositol estavam distribuídos entre IP₅ e IP₆, mas com predomínio do IP₆. Consequentemente, é provável que tenha ocorrido altas taxas de complexação destas frações com outras moléculas ou íons e uma vez complexados, as propriedades físico-químicas destes complexos são diferentes das frações isoladas causando alterações nos tempos de retenção impedindo que estes complexos possam ser identificados no cromatograma, ocasionando a subestimação dos resultados. Essa interferência pela formação de complexos foi menor nas excretas devido ao predomínio de frações com baixa capacidade complexante como o IP₄ e IP₃ que são produtos da ação enzimática da fitase sobre o fitato.

Embora seja possível comparar as metodologias para quantificar o P_{fit} com base nos teores determinados, esses dados não são adequados para avaliar a eficiência da fitase em disponibilizar P_{fit} para frangos de corte. Para isso, é

Tabela 4 - Teores de fósforo (P) correspondentes às diferentes frações fosforiladas do mio-inositol determinadas em ingredientes, rações e excretas de frangos de corte utilizando-se a metodologia HPLC-IR^{1,2} e a proporção de extração de 3:20 (m:v)

Ingredientes e rações												
Amostras	g de P do IP ₃ /100 g de MS			g de P do IP ₄ /100 g de MS			g de P do IP ₅ /100 g de MS			g de P do IP ₆ /100 g de MS		
Milho	0,000			0,000			0,000			0,009 ± 0,004		
Farelo de soja	0,000			0,000			0,018 ± 0,002			0,136 ± 0,008		
Ração CN ³	0,000			0,000			0,008 ± 0,001			0,041 ± 0,003		
Ração CP ⁴	0,000			0,000			0,008 ± 0,001			0,042 ± 0,002		
Excretas												
Tratamentos	g de P do IP ₃ /100 g de MS			g de P do IP ₄ /100 g de MS			g de P do IP ₅ /100 g de MS			g de P do IP ₆ /100 g de MS		
	Macho	Fêmea	Média									
CN + 0 FTU	0,799	0,938	0,869	0,036	0,054	0,045	0,014	0,016	0,015	0,007	0,002	0,005
CN + 750 FTU	0,849	0,590	0,720	0,024	0,033	0,029	0,013	0,013	0,013	0,002	0,004	0,003
CN + 1.500 FTU	0,567	0,458	0,513	0,029	0,024	0,027	0,014	0,011	0,013	0,004	0,001	0,003
CN + 2.250 FTU	0,559	0,512	0,536	0,030	0,030	0,030	0,016	0,015	0,016	0,003	0,003	0,003
Média	0,694	0,625		0,030	0,035		0,014	0,014		0,004	0,002	
CP, sem fitase	0,782	0,921	0,852	0,043	0,059	0,051	0,015	0,018	0,017	0,004	0,002	0,003

FTU: unidades de atividade da fitase. MS: matéria seca.

¹HPLC-IR: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração. ²Na proporção de extração de 1:20 (m:v) a concentração de fosfatos de mio-inositol na alíquota injetada no cromatógrafo ficou abaixo do limite de detecção/quantificação.

³Ração controle negativo (CN) formulada com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração. ⁴Ração controle positivo (CP) formulada com 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração.

preciso levar em consideração não somente o teor de P_{fit} determinado nas rações e excretas como também o consumo de ração e a quantidade de excretas produzidas no período da coleta (todos os dados em matéria seca). Conforme discutido anteriormente, as metodologias colorimétrica e por HPLC-IR na proporção de extração de 3:20 apresentaram problemas na determinação do teor de P_{fit} , o que irá refletir no cálculo inadequado do balanço e retenção do P_{fit} (Tabelas 5 e 6) (APÊNDICES C, D, E e F).

Diante do exposto, a metodologia colorimétrica com a proporção de extração de 1:20, mostrou-se a mais adequada e, portanto, proporcionou os resultados mais confiáveis sobre o balanço e retenção do P_{fit} pelos frangos de corte (Tabela 7) (APÊNDICES A e B). Não houve interação ($P>0,05$) entre os níveis de fitase e o sexo para o consumo, excreção e coeficiente de hidrólise do P_{fit} . O sexo das aves afetou ($P<0,01$) apenas o consumo de P_{fit} , sendo que os machos consumiram 12% mais P_{fit} que as fêmeas. O aumento do nível de fitase na ração não influenciou ($P>0,05$) o consumo, mas reduziu linearmente ($P<0,01$) a excreção do P_{fit} em até 57,75% o que representa bons resultados, pois demonstra a possibilidade de se produzir frangos de corte com menor excreção de P no ambiente.

Verificou-se que nas rações sem fitase suplementada (exógena), houve aproveitamento de parte do P_{fit} presente na ração, semelhante ao observado por Han et al. (2009), que atribuíram esse resultado à ação da fitase endógena presente no epitélio intestinal das aves. Além disso, a redução do P_{disp} de 4,26 para 2,13 g/kg de ração aumentou o coeficiente de hidrólise/retenção do P_{fit} de 43,37 para 69,67%, assemelhando-se aos resultados reportados por Onyango et al. (2006) que avaliaram o efeito de dois níveis de P na ração (sem suplementação de fitase) sobre a atividade da fitase presente na mucosa intestinal (duodeno) de frangos de corte, no período de 8 a 20 dias de idade, e observaram que a atividade dessa enzima aumentou de 29,46 para 43,25 nmols

Tabela 5 - Balanço e retenção do fósforo fítico (em matéria seca) de frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase, utilizando-se a metodologia colorimétrica e a proporção de extração de 3:20 (m:v) para a determinação do teor de fósforo fítico nas rações e excretas.

Tratamentos	Consumo (g/ave)			Excreção (g/ave)			Coeficiente de hidrólise (%)		
	Machos	Fêmeas	Média ¹	Machos ²	Fêmeas	Média	Machos ³	Fêmeas	Média
Ração CN ⁴ + 0 FTU/kg de ração	0,110	0,098	0,104	0,045a	0,025b	0,035*	59,05b	74,46a	66,75*
Ração CN + 750 FTU/kg de ração	0,117	0,105	0,111	0,046a	0,019b	0,033*	60,38b	81,68a	71,03*
Ração CN + 1.500 FTU/kg de ração	0,116	0,103	0,110	0,019	0,017	0,018*	84,13	83,59	83,86*
Ração CN + 2.250 FTU/kg de ração	0,110	0,096	0,103	0,023	0,018	0,021*	79,05	80,59	79,82*
Média	0,113a	0,101b		0,033	0,020		70,65	80,08	
Ração CP ⁵ , sem fitase	0,116	0,106	0,111	0,093	0,092	0,093	19,83	12,88	16,35
Ração		P<0,05			P<0,01			P<0,01	
Sexo		P<0,01			P<0,01			P<0,01	
Ração x Sexo		NS			P<0,01			P<0,01	
Coeficiente de variação (%)		4,82			12,52			7,38	

FTU: unidades de atividade da fitase. Médias com letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de F (P<0,05). NS = não significativo (P>0,05). *Difere da ração controle positivo pelo teste de Dunnett (P<0,05).

¹Consumo de fósforo fítico = $(6,17 \times 10^{-9})x^2 + (1,33 \times 10^{-5})x + 0,104$ ($R^2 = 0,99$). ²Excreção de fósforo fítico dentro do sexo macho = $-0,00001251x + 0,04735$ ($R^2 = 0,68$). ³Coeficiente de hidrólise do fósforo fítico dentro do sexo macho = $0,01117x + 58,08799$ ($R^2 = 0,71$). ⁴Ração controle negativo (CN) formulada com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração. ⁵Ração controle positivo (CP) formulada com 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração.

Tabela 6 - Balanço e retenção do fósforo fítico (em matéria seca) de frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase, utilizando-se a metodologia HPLC-IR¹ e a proporção de extração de 3:20 (m:v) para a determinação do teor de fósforo fítico nas rações e excretas.

Tratamentos	Consumo (g/ave)			Excreção (g/ave)			Coeficiente de hidrólise (%) ⁵
	Machos	Fêmeas	Média ²	Machos ³	Fêmeas ⁴	Média	
Ração CN ⁶ + 0 FTU/kg de ração	0,180	0,159	0,170*	0,806	0,785	0,796	-370,8
Ração CN + 750 FTU/kg de ração	0,191	0,172	0,182	0,868a	0,568b	0,718*	-292,5*
Ração CN + 1.500 FTU/kg de ração	0,190	0,168	0,179	0,609a	0,425b	0,517*	-186,3*
Ração CN + 2.250 FTU/kg de ração	0,180	0,157	0,168*	0,550	0,440	0,495*	196,4*
Média	0,185a	0,164b		0,708	0,555		
Ração CP ⁷ , sem fitase	0,193	0,176	0,185	0,878	0,952	0,915	-396,7
Ração		P<0,05			P<0,01		P<0,01
Sexo		P<0,01			P<0,05		NS
Ração x Sexo		NS			P<0,05		NS
Coeficiente de variação (%)		4,80			15,14		-22,41

FTU: unidades de atividade da fitase. Médias com letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de F (P<0,05). NS = não significativo (P>0,05). *Difere da ração controle positivo pelo teste de Dunnett (P<0,05).

¹HPLC-IR: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração. ²Consumo de fósforo fítico = $(-1,00701 \times 10^{-8})x^2 + 0,00002179x + 0,17004$ ($R^2 = 0,99$). ³Excreção de fósforo fítico dentro do sexo macho = $-0,00013708x + 0,86252$ ($R^2 = 0,75$). ⁴Excreção de fósforo fítico dentro do sexo fêmea = $-0,00015678x + 0,73095$ ($R^2 = 0,83$). ⁵Coeficiente de hidrólise do fósforo fítico = $0,08392x - 355,88873$ ($R^2 = 0,87$). ⁶Ração controle negativo (CN) formulada com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração. ⁷Ração controle positivo (CP) formulada com 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração.

Tabela 7 - Balanço e retenção do fósforo fítico (em matéria seca) de frangos de corte alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase, utilizando-se a metodologia colorimétrica e a proporção de extração de 1:20 (g de amostra:mL de solvente extrator) para a determinação do teor de fósforo fítico nas rações e excretas.

Tratamentos	Consumo (g/ave)			Excreção (g/ave) ¹	Coeficiente de hidrólise (%) ²
	Machos	Fêmeas	Média		
Ração CN ³ + 0 FTU/kg de ração	1,394	1,235	1,315	0,400*	69,67*
Ração CN + 750 FTU/kg de ração	1,456	1,315	1,386	0,293*	79,17*
Ração CN + 1.500 FTU/kg de ração	1,467	1,299	1,383	0,157*	88,45*
Ração CN + 2.250 FTU/kg de ração	1,398	1,221	1,309	0,169*	86,88*
Média	1,429a	1,268b			
Ração CP ⁴ , sem fitase	1,468	1,341	1,405	0,794	43,37
Ração		NS		P<0,01	P<0,01
Sexo		P<0,01		NS	NS
Ração x Sexo		NS		NS	NS
Coeficiente de variação (%)		4,84		20,89	7,80

FTU: unidades de atividade da fitase. Médias com letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de F (P<0,05). NS = não significativo (P>0,05). *Difere da ração controle positivo pelo teste de Dunnett (P<0,05).

¹Excreção de fósforo fítico = $-0,00011024x + 0,37882$ ($R^2 = 0,87$). ²Coeficiente de hidrólise do fósforo fítico = $-0,00000492x^2 + 0,01919x + 69,14$ ($R^2 = 0,97$). ³Ração controle negativo (CN) formulada com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração. ⁴Ração controle positivo (CP) formulada com 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração.

de P_{inorg} /mg de proteína/min quando a concentração de P total na dieta foi reduzida de 7,0 para 3,6 g/kg de ração, o que foi justificado pelo mecanismo de inibição enzimática na presença do produto da catálise, ou ainda, pela possibilidade do aumento na concentração do P_{inorg} na dieta poder causar uma “down-regulation” na produção da fitase endógena.

O aumento da inclusão de fitase na dieta aumentou ($P < 0,01$) a retenção do P_{fit} (Tabela 7) corroborando com Han et al. (2009) que também verificaram melhora gradativa no aproveitamento do P_{fit} pelo aumento do nível de fitase na dieta. A maior taxa de hidrólise foi estimada em 87,85% quando a dieta continha 1.950 FTU/kg de ração (Coeficiente de hidrólise do fósforo fítico = $-0,00000492x^2 + 0,01919x + 69,14$; $R^2 = 0,97$). Assim, como o teor médio de P_{fit} determinado na ração foi 3,25 g de P_{fit} /kg de ração em matéria natural (considerando-se o valor médio determinado de 3,78 g de P_{fit} /kg de ração em matéria seca e o teor de unidade de $13,88\% \pm 0,45$), é possível reduzir o teor de P da dieta em 2,86 g de fósforo/kg com o uso de 1.950 FTU/kg de ração.

Conclusões

A combinação da proporção de extração de 1:20 (g:mL) e a metodologia colorimétrica mostrou-se mais adequada para determinar o teor de P_{fit} nas rações e nas excretas dos frangos. O sexo das aves não influenciou o aproveitamento do P fítico. O uso de 1.950 FTU/kg de ração permite reduzir o P inorgânico na formulação em quantidade equivalente a 87,85% do teor de P_{fit} presente na dieta, correspondendo à redução de 2,86 g de P/kg de ração formulada.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado e à FAPEMIG e ao

INCT-CA pelo apoio financeiro, à empresa DSM pelo fornecimento da fitase e à professora Rosane Freitas Schwan pela disponibilização do HPLC do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA.

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. *Journal of Applied Poultry Research* 11: 471-480.
- Association of Official Analytical Chemists – International [AOAC]. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brito, J.A. de. 2008. Vitamin D₃ (cholecalciferol) and 25-hydroxy-cholecalciferol (25-OHD₃) in broiler diets. Doctoral Thesis. Federal University of Lavras. Available at: <http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/PesquisaPeriodicoForm.jsp> [Accessed: Aug. 19, 2012] (in Portuguese).
- Cúneo, F.; Amaya-Farfan, J.; Carraro, F. 2000. Phytate distribution in stabilized rice bran treated with exogenous phytase. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 20: 94-98 (in Portuguese, with abstract in English).
- Engelen, A.J.; Van der Heeft, F.C.; Randsdorp, P.H.G.; Smit, E.L.C. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International* 77: 760-764.
- Frühbeck, G.; Alonso, R.; Marzo, F.; Santidrián, S. 1995. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. *Analytical Biochemistry* 225: 206-212.
- Gomide, E.M.; Rodrigues, P.B.; Naves, L. de P.; Bernardino, V.M.P.; Santos, L.M. dos; Garcia, A.A.P. 2012. Diets with reduced levels of nutrients supplemented with phytase and amino acids for broilers. *Ciência e Agrotecnologia* 36: 100-107.
- Greiner, R.; Farouk, A.; Alminger, M.L.; Carlsson, N.G. 2002. The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytate-degrading

- enzymes of different *Bacillus* spp. Canadian Journal of Microbiology 48: 986-994.
- 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. Journal of Applied Poultry Research 18: 707-715.
- Kornegay, E. T. 2001. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. p. 237-271. In: Bedford, M.R.; Partridge, G.G., eds. Enzymes in Farm Animal Nutrition. Finnfed International, Marlborough, Wiltshire, UK.
- Latta, M.; Eskin, M. 1980. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. Journal of Agricultural and Food Chemistry 28: 1313-1315.
- Nagata, A.K.; Rodrigues, P.B.; Alvarenga, R.R.; Zangerônimo, M.G.; Rodrigues, K.F.; Lima, G.F.R. 2011. Energy and protein levels in diets containing phytase for broilers from 22 to 42 days of age: performance and nutrient excretion. Revista Brasileira de Zootecnia 40: 1718-1724.
- Nappi, G.U.; Ribeiro-Cunha, M.R.; Coelho, J.V.; Jokl, L. 2006. Validation methods to determine phytic and oxalic acids in "multimisturas". Ciência e Tecnologia de Alimentos 26: 811-820 (in Portuguese, with abstract in English).
- Onyango, E.M.; Asem, E.K.; Adeola, O. 2006. Dietary cholecalciferol and phosphorus influence intestinal mucosa phytase activity in broilers chicks. British Poultry Science 47: 632-639.
- Rodrigues, P.B.; Martinez, R.S.; Freitas, R.T.F.; Bertechini, A.G.; Fialho, E.T. 2005. Effect of collection time and methodologies on the digestibility and energy value of poultry diets. Revista Brasileira de Zootecnia 34: 882-889 (in Portuguese, with abstract in English).
- Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Donzele, J.L.; Gomes, P.C.; Oliveira, R.F. de; Lopes, D.C.; Ferreira, A.S.; Barreto, S.L. de T. 2005. Brazilian Table for Poultry and Pigs: Food Composition and Nutritional Requirements. 2ed. Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. (in Portuguese).

- Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Donzele, J.L.; Gomes, P.C.; Oliveira, R.F. de; Lopes, D.C.; Ferreira, A.S.; Barreto, S.L. de T.; Euclides, R.F. 2011. Brazilian Table for Poultry and Pigs: Food Composition and Nutritional Requirements. 3ed. Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. (in Portuguese).
- Sandberg, A.S.; Ahderinne, R. 1986. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *Journal of Food Science* 51: 547-550.
- Santos, L.M. dos; Rodrigues, P.B.; Alvarenga, R.R.; Naves, L. de P.; Hespanhol, R.; Lima, G.F.R.; Lara, M.C.C.; Silva, L.R. 2011a. Calcium and available phosphorus levels in diets supplemented with phytase for broilers in the growing and finishing phases. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40: 2486-2495 (in Portuguese, with abstract in English).
- Santos, L.M. dos; Rodrigues, P.B.; Freitas, R.T.F.; Bertechini, A.G.; Fialho, E.T.; Gomide, E.M.; Naves, L. de P. 2011b. Calcium and available phosphorus levels in diets with phytase for broilers in the pre-starter and starter phases. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40: 2476-2485 (in Portuguese, with abstract in English).
- SAS Institute. 2004. Statistical Analysis System User's Guide, version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Wadt, G.; Santos, T.T.; Gomes, G.A.; Cowieson, A.; Bedford, M.R. 2010. Total and phytate phosphorus in corn samples collected from different regions of the Brazil. p. 7-8. In: IV Latin American Congresso of the Animal Nutrition. Anais... Estância de São Pedro, São Paulo, Brazil.
- Wu, P.; Tian, J-C.; Walker, C.E.C.; Wang, F-C. 2009. Determination of phytic acid in cereals – a brief review. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 1671-1676.
- Yu, S.; Cowieson, A.; Gilbert, C.; Plumstead, P.; Dalsgaard, S. 2012. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP₁₋₅) including IP₅ isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *Journal of Animal Science* 90: 1824-1832.

ARTIGO 2

Níveis crescentes de fitase em rações para frangos de corte, formuladas com reduzido teor de fósforo disponível

Naves, L. de P.; Rodrigues, P. B. et al.

Artigo redigido conforme as normas da Revista Ciência e Agrotecnologia – versão preliminar

RESUMO – A redução do teor de fósforo disponível (P_{disp}) na dieta deve ser acompanhada de adequada suplementação da fitase. Um experimento foi conduzido com frangos de corte, no período de 15 a 28 dias de idade para determinar o nível de fitase necessário quando a ração é formulada com 0,213% de P_{disp} para permitir resultados de desempenho, teor de cinzas na tíbia e aproveitamento do cálcio (Ca) semelhantes ao determinado para aves alimentadas com uma dieta formulada para atender suas exigências nutricionais. Um total de 120 frangos foram distribuídos em esquema fatorial 5 x 2 correspondendo a quatro rações deficientes em P_{disp} (0,213%) suplementadas com fitase (0; 750; 1.500 ou 2.250 FTU/kg de ração) mais uma ração controle positivo sem fitase (0,426% de P_{disp}), fornecidas a frangos machos e fêmeas, em três repetições de quatro aves cada. Os machos apresentaram maior consumo de ração, ganho de peso e balanço de Ca e P_{total} , além de melhor conversão alimentar e retenção do P_{total} . A redução do teor de P_{disp} da dieta sem o uso de fitase piorou o desempenho, o teor de cinzas ósseas e a retenção do Ca, todavia, esses parâmetros foram gradativamente melhorados com o aumento do nível de fitase na ração. Conclui-se que, independente do sexo, ao utilizar 2.250 FTU/kg de ração é possível reduzir o teor de P_{disp} para 0,213% sem prejudicar o

desempenho, teor de cinzas na tibia e a retenção do Ca, além de reduzir a excreção do P_{total} em 56,75% e melhorar seu aproveitamento em 38,58%.

Termos para indexação: cinzas ósseas, desempenho, enzima, fitato, metabolismo

INTRODUÇÃO

A idéia central do uso de fitase na dieta de frangos de corte baseia-se na redução do teor de fósforo disponível (P_{disp}) na ração, acompanhada da inclusão da enzima de maneira que o teor de P_{disp} presente na ração somado ao teor de P fítico (P_{fit}) disponibilizado pela ação catalítica da fitase atenda à exigência de P da ave (HAN et al., 2009).

Segundo Jendza et al. (2006), 500 unidades de atividade da fitase (FTU)/kg de ração são equivalentes à adição de 0,12% de P inorgânico na dieta. Já Shaw et al. (2011) relataram que é possível reduzir em 0,16 pontos percentuais o P_{disp} na formulação da ração utilizando 1.000 FTU/kg. Esses valores de equivalência representam bons resultados, entretanto, com o constante avanço das técnicas de produção comercial da fitase, o preço da enzima tem diminuído despertando o interesse dos nutricionistas em avaliar maiores taxas de inclusão da fitase na dieta de frangos de corte a fim de possibilitar reduzir ainda mais o teor de P_{disp} na ração, o que irá refletir em menor custo com a alimentação das aves associado à menor excreção de P no ambiente (MENEGHETTI et al., 2011).

Portanto, este trabalho foi realizado com frangos de corte machos e fêmeas, no período de 15 a 28 dias de idade, para determinar o nível de fitase que deve ser utilizado quando a ração é formulada com 0,213% de P_{disp} considerando-se, além da melhora na retenção do P da ração, resultados de desempenho, teor de cinzas na tibia e aproveitamento do Ca da dieta

semelhantes ao determinado para as aves alimentadas com uma dieta controle positivo formulada para atender suas exigências nutricionais no período avaliado.

MATERIAL E MÉTODOS

Um experimento de metabolismo foi conduzido no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com frangos de corte no período de 15 a 28 dias de idade. Todos os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA (protocolo nº 004/11). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado disposto em esquema fatorial 5 x 2, sendo quatro rações igualmente deficientes em fósforo disponível (P_{disp}) suplementadas com fitase (0; 750; 1.500 e 2.250 unidades de atividade de fitase – FTU/kg de ração) mais uma ração controle positivo, sem fitase, formulada segundo as recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2005), fornecidas a aves machos e fêmeas. Três repetições de quatro aves foram realizadas para cada tratamento.

Foram utilizados um total de 120 pintos de corte (60 aves de cada sexo) Cobb-500[®] os quais foram adquiridos com um dia de idade, sexados e criados em galpão de alvenaria até os 14 dias de idade com ração à base de milho e farelo de soja formulada para atender suas exigências nutricionais (Rostagno et al., 2005). No 15^o dia de idade, as aves foram pesadas individualmente, separadas por faixas de peso e transferidas para gaiolas (unidades experimentais; com dimensões de 50 x 50 x 50 cm) em uma sala de metabolismo, de modo que as unidades experimentais apresentassem o peso médio inicial dos frangos semelhante entre si ($0,465 \text{ kg} \pm 0,002$). A sala dispunha de iluminação constante e temperatura controlada, sendo cada gaiola provida de um bebedouro, um comedouro individual e uma bandeja coletora de excretas. As dietas

experimentais (Tabela 1) e água foram fornecidas à vontade no período de 15 a 28 dias de idade.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais.

Ingrediente (%)	CP ¹	CN ²	CN suplementada com fitase ³		
			750/	1.500/	2.250
Milho	59,620	60,486	60,486		
Farelo de soja	33,529	33,371	33,371		
Óleo de soja	3,161	2,868	2,868		
Sal	0,482	0,482	0,482		
L-lisina HCl 98%	0,167	0,170	0,170		
DL-metionina 99%	0,229	0,228	0,228		
L-treonina 98,5%	0,035	0,035	0,035		
Suplemento mineral ⁴	0,050	0,050	0,050		
Suplemento vitamínico ⁵	0,040	0,040	0,040		
Cloreto de colina 60%	0,045	0,045	0,045		
Calcário calcítico	0,874	1,610	1,610		
Fosfato bicálcico	1,719	0,565	0,565		
Inerte (caulim)	0,0500	0,0500	0,0425/ 0,0350/ 0,0275		
Fitase ⁶	0	0	0,0075/ 0,0150/ 0,0225		
Composição nutricional calculada e determinada					
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.050	3.050	3.050		
Proteína bruta (%) calculada	20,12	20,12	20,12		
Lisina digestível (%) calculada	1,110	1,110	1,110		
Met + cist digestível (%) calculada	0,794	0,794	0,794		
Sódio (%) calculado	0,210	0,210	0,210		
Cálcio (%) calculado	0,855	0,855	0,855		
Cálcio (%) determinado	0,863	0,850	0,849		
Fósforo total (%) calculado	0,639	0,426	0,426		
Fósforo total (%) determinado	0,648	0,437	0,436		
Fósforo disponível ⁷ (%) calculado	0,426	0,213	0,213		
Fósforo fítico ⁸ (%) calculado	0,213	0,213	0,213		
Atividade da fitase calculada ^{3,6}	0	0	750/ 1.500/ 2.250		
Atividade da fitase determinada ^{3,6}	0	0	749/ 1.497/ 2.246		

¹CP: dieta controle positivo formulada para atender as necessidades nutricionais de frangos de corte, no período de 15 a 28 dias de idade, segundo Rostagno et al. (2005).

²CN: dieta controle negativo deficiente em fósforo disponível. ³Suplementação enzimática expressa em FTU/kg de dieta, sendo que 1FTU corresponde a uma unidade de atividade da fitase.

⁴Conteúdo/kg de ração: 55 mg Zn; 48 mg Fe; 10 mg Cu; 78 mg Mn; 0,70 mg I; 0,18 mg Se.

⁵Conteúdo/kg de ração: 4,8 mg vit. B₂; 8.000 UI vit. A; 2.000 UI vit. D₃; 1,2 mg vit. B₁; 2,4 mg vit B₆; 10,8 µg vit. B₁₂; 0,024 mg biotina; 0,64 mg ácido fólico; 11,6 mg ácido pantotênico; 1,92 mg vit. K₃; 16,2 UI vit. E. ⁶Ronozyme[®]NP-(CT); 6-fitase (EC 3.1.3.26) sintetizada pelo microrganismo *Aspergillus oryzae* (DSM 17594). Enzima com atividade declarada de 10.000

FTU/g de produto e atividade determinada de 9.980 FTU/g de produto, segundo metodologia proposta por Engelen et al. (1994). ⁷Considerando-se, no cálculo, que um terço do fósforo total presente no milho e farelo de soja correspondem ao fósforo disponível e que o fósforo fornecido pelo fosfato bicálcico é 100% disponível (Rostagno et al., 2005). ⁸Considerando-se, no cálculo, que dois terços do fósforo total presente no milho e farelo de soja correspondem ao fósforo fítico (Rostagno et al., 2005).

O período experimental compreendeu 13 dias, sendo dez dias de adaptação às instalações e dietas experimentais seguidos de três dias (RODRIGUES et al., 2005) de coleta total das excretas, por unidade experimental. As rações e as sobras foram pesadas e registradas no 15^o, 25^o e 28^o dia de idade das aves para os posteriores cálculos do consumo de ração (CR) no período total e no período de coleta. As aves foram pesadas no 15^o e 28^o dia de idade para os cálculos do ganho de peso (GP) neste período. A conversão alimentar foi calculada dividindo-se o CR pelo GP.

A coleta total de excretas foi realizada diariamente na parte da manhã, sendo que as excretas de uma mesma unidade experimental foram reunidas em sacos plásticos identificados e armazenadas em freezer até o último dia de coleta quando foram pesadas, homogeneizadas e pré-secas em estufa à 55 °C por 72 horas. As excretas pré-secas foram moidas e a matéria seca total foi determinada considerando-se a perda de umidade na etapa de pré-secagem e também a 105 °C (método 934.01 da ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2005). Os teores de cálcio (Ca) e fósforo total (P_{total}) foram determinados, respectivamente, pelos métodos 935.13 e 965.17 da AOAC (2005). Paralelamente, os teores de matéria seca, Ca e P_{total} foram determinados nas rações.

O balanço e retenção do Ca e do P_{total} foram calculados com base na matéria seca. O consumo do nutriente (g/ave) foi calculado multiplicando-se o CR (g/ave) pelo teor (%) do nutriente na ração. Para calcular a excreção do nutriente (g/ave), a quantidade de excreta (g/ave) foi multiplicada pelo teor (%) do nutriente determinado na excreta. O coeficiente de retenção (C_{Ret}) foi

calculado pela fórmula: $C_{ret} (\%) = [(consumo\ do\ nutriente - excreção\ absoluta\ do\ nutriente)/consumo\ do\ nutriente] \times 100$.

Ao final do experimento, três aves por repetição foram abatidas para a retirada da tíbia esquerda que foi posteriormente descarnada, seca a 105 °C, desengordurada em éter etílico e incinerada a 600 °C, determinando-se o teor das cinzas (método 942.05 da AOAC, 2005).

Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o General Linear Model (GLM) do software SAS (2004) e quando significativa, modelos de regressão polinomial ($P < 0,05$) foram utilizados para avaliar o efeito do nível de suplementação da fitase. A significância do sexo das aves foi avaliada pelo próprio teste de F, a 5% de probabilidade. Além disso, a ração controle positivo foi comparada às demais rações experimentais pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve mortalidade durante todo o período experimental. Além disso, não houve interação ($P > 0,05$) entre o nível de fitase na ração e o sexo das aves para todos os parâmetros de desempenho avaliados (Tabela 2) (APÊNDICES G e H). Entretanto, houve efeito isolado ($P < 0,01$) do sexo sendo que os machos consumiram 10,26% mais ração, além de apresentarem 15,17% maior ganho de peso (GP) e 4,52% melhor conversão alimentar (CA), corroborando com Mendes et al. (2004) os quais relataram que frangos de corte machos normalmente apresentam melhor desempenho que as fêmeas quando criados sobre as mesmas condições.

O aumento do nível de fitase na ração influenciou de forma quadrática ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente) o consumo de ração (CR) e GP das aves, estimando-se maior CR e GP com o uso de 1.069 e 1.401 unidades de atividade

Tabela 2 – Desempenho de frangos de corte machos e fêmeas, no período de 15 a 28 dias de idade, alimentados com rações deficientes em fósforo disponível (P_{disp}) suplementadas com níveis crescentes de fitase.

Tratamentos	Consumo de ração (g/ave)			Ganho de peso (g/ave)			Conversão alimentar (g/g)		
	Machos	Fêmeas	Média ¹	Machos	Fêmeas	Média ²	Machos	Fêmeas	Média ³
0,213% de P_{disp} + 0 FTU/kg	1.496	1.365	1.431	979	856	917*	1,53	1,60	1,56*
0,213% de P_{disp} + 750 FTU/kg	1.530	1.400	1.465	1.036	892	964	1,48	1,57	1,52*
0,213% de P_{disp} + 1.500 FTU/kg	1.519	1.375	1.447	1.020	900	960	1,49	1,53	1,51
0,213% de P_{disp} + 2.250 FTU/kg	1.503	1.358	1.430	1.029	885	953	1,48	1,53	1,50
Média	1.515a	1.374b		1.025a	890b		1,48b	1,55a	
0,426% de P_{disp} sem fitase	1.529	1.373	1.451	1.072	915	994	1,43	1,50	1,46
P-valor									
Ração	P<0,05			P<0,01			P<0,05		
Sexo	P<0,01			P<0,01			P<0,01		
Ração x Sexo	NS			NS			NS		
Coefficiente de variação (%)	1,39			2,41			2,20		

FTU: unidades de atividade da fitase. NS: não significativo ($P>0,05$). Médias com letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de F ($P<0,05$). *Difere da ração controle positivo pelo teste de Dunnett ($P<0,05$).

¹Consumo de ração (0,213% de P_{disp}) = $-0,00002259x^2 + 0,04832x + 1433,3250$ ($R^2 = 0,82$).

²Ganho de peso (0,213% de P_{disp}) = $-0,00002430x^2 + 0,06809x + 919,65$ ($R^2 = 0,92$).

³Conversão alimentar (0,213% de P_{disp}) = $-0,00002520x + 1,55305$ ($R^2 = 0,84$).

da fitase – FTU/kg de ração, respectivamente (Tabela 2). Por outro lado, a CA dos frangos melhorou ($P < 0,05$) linearmente com a suplementação crescente de fitase na ração, sendo observada uma melhoria de até 3,85% neste parâmetro com o uso de 2.250 FTU/kg de ração. De modo semelhante, Fukayama et al. (2008) também verificaram efeitos quadráticos para o CR e GP e efeito linear decrescente para a CA em frangos de corte machos de 1 a 20 dias de idade alimentados com rações deficientes em fósforo disponível – P_{disp} (0,273%) sem fitase ou suplementadas com 500, 750 ou 1.000 FTU/kg de ração.

Em relação à ração controle positivo, não houve diferença ($P > 0,05$) para o CR, entretanto, houve diferença ($P < 0,05$) para o GP e a CA. Os frangos que receberam a ração contendo 0,213% de P_{disp} sem fitase apresentaram piora de 7,75% no GP, indicando que essa dieta não forneceu P em quantidade necessária para o desenvolvimento adequado das aves, mas ao utilizar a fitase em níveis a partir de 750 FTU/kg, o P fítico (P_{fit}) presente nos ingredientes vegetais da ração foi hidrolisado pela enzima em quantidade suficiente para evitar prejuízo no GP das aves. Contudo, apenas as rações deficientes em P_{disp} contendo 1.500 ou 2.250 FTU/kg proporcionaram CA semelhante ao observado para os frangos do grupo controle positivo. Todavia, segundo Sakomura & Rostagno (2007), a recomendação do nível de fitase na formulação da dieta também deve considerar uma adequada mineralização óssea.

Não houve interação ($P > 0,05$) entre os níveis de fitase e o sexo para o teor de cinzas na tíbia, nem efeito isolado ($P > 0,05$) do sexo para este parâmetro (Tabela 3) (APÊNDICE H). Por outro lado, houve melhoria linear ($P < 0,01$) no teor de cinzas na tíbia em função do aumento do nível de fitase na ração, corroborando com os resultados de Han et al. (2009) e Santos et al. (2008) que também observaram melhora na mineralização óssea de frangos alimentados com rações deficientes em P, porém, suplementadas com fitase.

Tabela 3 – Cinzas nas tíbias (g/100 g de matéria seca desengordurada) de frangos de corte, aos 28 dias de idade, alimentados com rações deficientes em fósforo disponível (P_{disp}) suplementadas com níveis crescentes de fitase.

Tratamentos	Teor de cinzas (%) ¹
0,213% de P_{disp} + 0 FTU/kg de ração	48,14*
0,213% de P_{disp} + 750 FTU/kg de ração	50,47*
0,213% de P_{disp} + 1.500 FTU/kg de ração	50,67*
0,213% de P_{disp} + 2.250 FTU/kg de ração	51,71
0,426% de P_{disp} sem fitase (controle positivo)	52,13
P-valor	
Ração	P<0,01
Sexo	NS
Ração x Sexo	NS
Coefficiente de variação (%)	1,68

FTU: unidades de atividade da fitase. NS: não significativo ($P>0,05$). Médias com letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de F ($P<0,05$). *Difere da ração controle positivo pelo teste de Dunnett ($P<0,05$). ¹Cinza óssea (0,213% de P_{disp}) = $0,00146x + 48,61169$ ($R^2 = 0,87$); em que x corresponde ao nível de fitase.

Observou-se ainda, que a deposição de matéria mineral na tíbia foi semelhante ao determinado nas aves do grupo controle positivo somente com o uso de 2.250 FTU/kg de ração. Em contrapartida, Fukayama et al. (2008) verificaram que apenas 750 FTU/kg foram suficientes para evitar prejuízo na mineralização óssea, entretanto, a redução de P_{disp} na formulação da ração era de apenas 36%, valor esse inferior ao avaliado nesta pesquisa (50% da exigência). Além disso, no experimento conduzido por Fukayama et al. (2008) as rações continham 5,5% de farelo de arroz desengordurado aumentando o teor de P_{fit} na dieta, o que pode ter aumentado a eficiência catalítica da fitase por haver mais substrato para ser catalisado.

Não houve interação ($P>0,05$) entre o nível de fitase e o sexo para o balanço e retenção do cálcio (Ca) (Tabela 4). Todavia, os machos consumiram e excretaram mais ($P<0,01$) Ca o que pode ser justificado pelo maior CR que

Tabela 4 – Balanço e retenção de cálcio (em matéria seca) de frangos de corte machos e fêmeas, no período de 25 a 28 dias de idade, alimentados com rações deficientes em fósforo disponível (P_{disp}) suplementadas com níveis crescentes de fitase.

Tratamentos	Consumo (g/ave)			Excreção (g/ave)			Coeficiente de retenção (%) ³
	Machos	Fêmeas	Média ¹	Machos	Fêmeas	Média ²	
0,213% de P_{disp} + 0 FTU/kg	3,708	3,246	3,477*	2,281	1,993	2,137*	38,38*
0,213% de P_{disp} + 750 FTU/kg	3,867	3,413	3,640	2,196	1,990	2,093*	42,49*
0,213% de P_{disp} + 1.500 FTU/kg	3,883	3,440	3,662	2,081	1,860	1,971	46,15*
0,213% de P_{disp} + 2.250 FTU/kg	3,747	3,319	3,533*	1,950	1,720	1,835	47,72
Média	3,816a	3,391b		2,075a	1,877b		
0,426% de P_{disp} sem fitase	3,874	3,539	3,707	1,867	1,823	1,845	50,11
P-valor							
Ração		P<0,01			P<0,01		P<0,01
Sexo		P<0,01			P<0,01		NS
Ração x Sexo		NS			NS		NS
Coeficiente de variação (%)		2,42			4,42		5,42

FTU: unidades de atividade da fitase. NS: não significativo ($P>0,05$). Médias com letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de F ($P<0,05$). *Difere da ração controle positivo pelo teste de Dunnett ($P<0,05$).

¹Consumo (0,213% de P_{disp}) = $(-1,29556 \times 10^{-7})x^2 + 0,00031672x + 3,47654$ ($R^2 = 1,0$).

²Excreção (0,213% de P_{disp}) = $-0,00013711x + 2,16317$ ($R^2 = 0,96$).

³Coeficiente de retenção (0,213% de P_{disp}) = $0,00422x + 38,929$ ($R^2 = 0,97$).

apresentaram (Tabela 2), associado ao fato do sexo não ter influenciado ($P>0,05$) no aproveitamento deste mineral (Tabela 4) (APÊNDICES I e K).

De modo semelhante ao verificado para o CR, o nível de fitase na ração exerceu ($P<0,01$) influência quadrática no consumo de Ca, com o maior valor estimado para a ração com 1.222 FTU/kg. A excreção de Ca foi reduzida ($P<0,01$) linearmente em até 14,13% com o aumento da inclusão da fitase o que está relacionado à melhora ($P<0,01$) linear no aproveitamento do Ca, proporcionada pelos níveis crescentes da enzima na ração.

Os frangos que receberam a dieta sem fitase, formulada com reduzido teor de P_{disp} apresentaram menor aproveitamento do Ca (38,38%) comparado com as aves alimentadas com a dieta controle positivo (50,11%). De acordo com Tamim et al. (2004), o Ca da dieta pode se ligar ao fitato formando fitato de cálcio ou ao P_{inorg} formando fosfatos de cálcio como o $Ca_3(PO_4)_2$. Assim, é provável que o aumento da relação Ca: P_{disp} de 2:1 (dieta controle positivo contendo 0,426% de P_{disp} , sem fitase) para 4:1 (dieta controle negativo contendo 0,213% de P_{disp} , sem fitase) piorou a absorção do Ca devido a uma maior taxa de complexação do Ca com o P_{disp} , já que a relação Ca: P_{fit} nas rações foi mantida a mesma (4:1). Por outro lado, o calcário tende a aumentar o pH do alimento principalmente durante sua passagem pelo intestino, favorecendo a complexação do Ca com o fitato (SELLE et al., 2009). Assim, pode ter ocorrido também um aumento na formação de fitato de cálcio nas aves alimentadas com ração contendo 0,213% de P_{disp} , pois esta dieta continha 84,2% mais calcário que a dieta controle positivo. Portanto, o aumento na taxa de formação desses complexos insolúveis no trato digestório dos frangos alimentados com a dieta controle negativo, sem fitase, resultou em maior excreção do Ca acompanhado da piora no seu coeficiente de retenção.

Embora a redução do P_{disp} na ração tenha diminuído a absorção do Ca, este parâmetro foi melhorado com o aumento do nível de fitase na ração,

indicando que quanto mais fitase na dieta maior é sua atuação catalítica sobre o ácido fítico (hexafosfato de mio-inositol) reduzindo, conseqüentemente, o poder de complexação dos seus produtos da catálise (fosfatos de mio-inositol com cinco ou menos grupos fosfatos) e permitindo assim que haja mais Ca livre para ser aproveitado pela ave. Com o uso de 2.250 FTU/kg de ração, o coeficiente de retenção do Ca foi semelhante ao determinado para os frangos alimentados com a dieta controle positivo.

Não houve interação ($P > 0,05$) entre o nível de fitase e o sexo para o balanço e retenção de P total (P_{total}) (Tabela 5) (APÊNDICES I, J e K). Entretanto, os machos apresentaram maior ($P < 0,01$) consumo e excreção de P_{total} , além de uma melhora de 5% no seu coeficiente de retenção. De maneira semelhante, Schoultzen et al. (2002) também verificaram que a absorção de P por frangos machos da linhagem Hubbard-MPK, no período de 1 a 21 dias de idade, foi superior ao determinado para as fêmeas.

Também seguindo a tendência verificada para o CR (Tabela 2), o consumo de P_{total} foi influenciado ($P < 0,05$) de modo quadrático pelo nível de fitase na dieta, com maior consumo de P_{total} estimado para a ração contendo 1.025 FTU/kg (Tabela 5). Além disso, conforme o esperado, as rações formuladas com 0,213% de P_{disp} proporcionaram menor consumo de P_{total} .

A redução do teor de P_{disp} na ração de 0,426% para 0,213% (sem a suplementação de fitase) reduziu a excreção de P_{total} em 45,04%, todavia este parâmetro foi melhorado ($P < 0,05$) ainda mais pelo aumento do nível de fitase na dieta, indicando que a maior suplementação dessa enzima proporciona maior hidrólise do fitato aumentando o aproveitamento do P_{fit} que, por sua vez, reduz a excreção do P_{total} . Assim, o uso de 2.250 FTU/kg de ração permite reduzir a excreção de P_{total} em 56,75%, quando comparada com o observado para as aves do grupo controle positivo.

Tabela 5 – Balanço e retenção de fósforo total (em matéria seca) de frangos de corte machos e fêmeas, no período de 25 a 28 dias de idade, alimentados com rações deficientes em fósforo disponível (P_{disp}) suplementadas com níveis crescentes de fitase.

Tratamentos	Consumo (g/ave)			Excreção (g/ave)			Coeficiente de retenção (%)		
	Machos	Fêmeas	Média ¹	Machos	Fêmeas	Média ²	Machos	Fêmeas	Média ³
0,213% de P_{disp} + 0 FTU	1,899	1,645	1,772*	0,865	0,787	0,826*	54,46	52,04	53,25*
0,213% de P_{disp} + 750 FTU	1,986	1,793	1,890*	0,754	0,746	0,750*	63,82	58,41	61,12*
0,213% de P_{disp} + 1.500 FTU	1,932	1,743	1,837*	0,760	0,702	0,731*	60,67	58,97	59,82*
0,213% de P_{disp} + 2.250 FTU	1,859	1,624	1,742*	0,673	0,627	0,650*	63,73	63,48	63,61*
Média	2,117a	1,893b		0,914a	0,870b		58,11a	55,37b	
0,426% de P_{disp} sem fitase	2,909	2,658	2,784	1,517	1,489	1,503	47,84	43,95	45,90
P-valor									
Ração	P<0,05			P<0,01			P<0,01		
Sexo	P<0,01			P<0,01			P<0,01		
Ração x Sexo	NS			NS			NS		
Coeficiente de variação (%)	4,29			3,77			2,76		

FTU: unidades de atividade da fitase. NS: não significativo ($P>0,05$). Médias com letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de F ($P<0,05$). *Difere da ração controle positivo pelo teste de Dunnett ($P<0,05$).

¹Consumo (0,213% de P_{disp}) = $(-9,48148 \times 10^{-8})x^2 + 0,00019431x + 1,77815$ ($R^2 = 0,94$).

²Excreção (0,213% de P_{disp}) = $-0,00007276x + 0,82110$ ($R^2 = 0,96$).

³Coeficiente de retenção (0,213% de P_{disp}) = $-0,00000181x^2 + 0,00805x + 53,9625$ ($R^2 = 0,83$).

O aproveitamento do P_{total} foi influenciado ($P < 0,01$) pelo nível de fitase na dieta (Tabela 5), com o maior coeficiente de retenção estimado para a dieta contendo 2.224 FTU/kg de ração. Essa melhora na retenção do P_{total} pode ser justificada pela atuação da fitase sobre o fitato da ração, conforme relatado por Han et al. (2009) que verificaram aumento gradativo no aproveitamento do P_{fit} em função do aumento do nível de fitase na dieta.

CONCLUSÃO

Os machos apresentam maior consumo de ração e ganho de peso, além de melhor conversão alimentar e aproveitamento do fósforo total. Independente do sexo, ao utilizar 2.250 FTU/kg de ração formulada para frangos de corte no período de 15 a 28 dias de idade, é possível reduzir o teor de fósforo disponível de 0,426% para 0,213% sem prejudicar o desempenho, o teor de cinzas na tibia e o coeficiente de retenção do cálcio, além de reduzir a excreção do fósforo total em 56,75% e melhorar seu aproveitamento pelas aves em 38,58%.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado, à FAPEMIG e ao INCT-CA pelo apoio financeiro e à empresa DSM pelo fornecimento da fitase.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**, 18th ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA. 2005.

ENGELEN, A.J.; Van der HEEFT, F.C.; RANDSDORP, P.H.G.; SMIT, E.L.C. Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal of AOAC International**, v.77, n.3, p.760-764, 1994.

FUKAYAMA, E.H.; SAKOMURA, N.K.; DOURADO, L.R.B.; NEME, R.; FERNANDES, J.B.K.; MARCATO, S.M. Efeito da suplementação de fitase sobre o desempenho e a digestibilidade dos nutrientes em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.4, p.629-635, abr. 2008.

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. Evaluation of equivalency values of microbial phytase to inorganic phosphorus in 22- to 42-day-old broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v.18, n.4, p.707-715, dec. 2009.

JENDZA, J.A.; DILGER, R.N.; SANDS, J.S.; ADEOLA, O. Efficacy and equivalency of an *Escherichia coli*-derived phytase for replacing inorganic phosphorus in the diets of broiler chickens and young pigs. **Journal of Animal Science**, v.84, p.3364- 3374, 2006.

MENDES, A.A.; NÄÄS, I. de A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. 1. ed. Campinas: FACTA, 2004. 256p.

MENEGHETTI, C.; BERTECHINI, A.G.; RODRIGUES, P.B.; FASSANI, E.J.; BRITO, J.A.G.; REIS, M.P.; GARCIA JR., A.A.P. Altos níveis de fitase em rações para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.3, p.624-632, mai./jun. 2011.

RODRIGUES, P.B.; MARTINEZ, R. de S.; FREITAS, R.T.F. de; BERTECHINI, A.G.; FIALHO, E.T. Influência do tempo de coleta e metodologias sobre a digestibilidade e o valor energético de rações para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.3, p.882-889, mai./jun. 2005.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F. de; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L. de T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2. ed. Viçosa:UFV, 2005. 186p.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Viçosa:UFV, 2007. 283p.

SANTOS, F.R.; HRUBY, M.; PIERSON, E.E.M.; REMUS, J.C.; SAKOMURA, N.K. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, v.17, n.2, p.191-201, 2008.

SAS – STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. System for Microsoft Windows, version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC; 2004.

SCHOULTEN, N.A.; TEIXEIRA, A.S.; CONTE, A.J.; SILVA, H.O.; BERTECHINI, A.G.; FIALHO, E.T. Efeito dos níveis de cálcio sobre a absorção de minerais em dietas iniciais para frangos de corte suplementadas com fitase. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.6, p.1313-1321, nov./dez. 2002.

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

SHAW, A.L.; HESS, J.B.; BLAKE, J.P.; WARD, N.E. Assessment of an experimental phytase enzyme product on live performance, bone mineralization, and phosphorus excretion in broiler chickens. **The Journal Applied Poultry Research**, v.20, p.561-566, 2011.

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

ARTIGO 3

Eficiência de fitases microbianas suplementadas em rações formuladas com diferentes relação cálcio:fósforo, fornecidas à frangos de corte no período de 22 a 33 dias de idade

Naves, L. de P.; Rodrigues, P. B. et al.

Artigo redigido conforme as normas da Revista Animal Feed Science and Technology – versão preliminar

Resumo

Um experimento foi conduzido com frangos de corte, no período de 22 a 33 dias de idade, para avaliar a eficiência de seis fitases microbianas suplementadas em rações (1.500 FTU/kg de ração) formuladas com três diferentes relação cálcio:fósforo disponível – Ca:P_{disp} (4,5:1,0; 6,0:1,0 e 7,5:1,0). Uma dieta controle positivo, sem fitase, formulada para atender as exigências nutricionais das aves no período foi utilizada para fins de comparação da eficiência da fitase. O teor de P na tíbia, o nível plasmático de magnésio, o desempenho, o consumo do P fítico (P_{fit}) e do nitrogênio (N), a energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio e o coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca não foram influenciados pelo tipo da fitase nem pela relação Ca:P_{disp} da dieta, mantendo-se semelhantes ao determinado para as aves do grupo controle. Houve interação entre os fatores avaliados para o coeficiente de retenção do P total, Ca e N. A fitase B proporcionou a maior deposição de Ca na tíbia. As fitases D, E e F diminuíram o teor de Ca na tíbia e no plasma. A fitase D elevou o nível de P no plasma. A fitase A reduziu a concentração de P no plasma, porém elevou o nível do Ca. As fitases A e D diminuíram a excreção do P total. As fitases E e F

resultaram na maior excreção de Ca enquanto que a fitase A reduziu a excreção deste nutriente. Independente do tipo de fitase, o aumento da relação Ca:P_{disp} da dieta reduziu a concentração de P no plasma, a excreção do P total e do N; contudo aumentou a concentração plasmática de Ca, além do consumo e a excreção do Ca. O uso da fitase na ração reduziu a excreção do P_{fit} melhorando seu aproveitamento pela ave. Portanto, no período de 22 a 33 dias de idade, é possível reduzir o teor de fósforo disponível da ração de frangos de corte para 1,0 g/kg, ao suplementá-la com 1.500 unidades de atividade da fitase A, C, D ou E/kg, devendo-se fixar o nível de cálcio em 7,5 g/kg para manter o desempenho e a adequada mineralização óssea das aves, além de melhorar o coeficiente de retenção do Ca e P_{fit}, otimizar o aproveitamento do P total e diminuir a excreção de N e P no ambiente.

Palavras-chave: aves, desempenho, enzima, fitato, metabolismo

Abreviações:

Ca, cálcio; CMMS, coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca; CP, controle positivo; CV, coeficiente de variação; DCP, dieta controle positivo; EMAn, energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio; FTU, unidades de atividade da fitase; Mg, magnésio; MS, matéria seca; MSD, matéria seca desengordurada; NS, não-significativo; P, fósforo; P_{disp}, fósforo disponível; P_{fit}, fósforo fítico; N, nitrogênio; R², coeficiente de determinação da regressão; relação Ca:P_{disp}, relação cálcio:fósforo disponível.

1. Introdução

O uso de fitase na dieta de frangos de corte é viável nutricionalmente, ambientalmente e economicamente (Gomide et al., 2007; Nagata et al., 2011; Santos et al., 2008; Silva et al., 2008). Diante disso, as rações utilizadas

atualmente têm sido formuladas com reduzido teor de fósforo disponível (P_{disp}) e suplementadas com fitase.

Embora a fonte inorgânica de cálcio (Ca) seja de custo relativamente baixo, é importante avaliar qual deve ser o nível deste nutriente quando se formula a ração com determinado teor de P e certa atividade de fitase suplementada. Se por um lado, o excesso de Ca na ração pode reduzir sua utilização e também a de outros nutrientes como o P (Schoulten et al., 2002), além de poder reduzir a atividade catalítica da fitase utilizada (Santos et al., 2008), sua deficiência nutricional pode comprometer a integridade óssea e prejudicar o desempenho dos frangos de corte (Selle et al., 2009)

Além disso, distintas fitases microbianas podem apresentar diferentes estruturas e variadas propriedades físico-químicas e catalíticas (Mullaney and Ullah, 2003) o que, conseqüentemente, pode acarretar em diferentes resultados quando adicionadas nas rações de frangos de corte.

Portanto, este trabalho foi conduzido com frangos de corte, no período de 22 a 33 dias de idade, com o objetivo de indicar quais fitases microbianas e qual teor de Ca na ração devem ser utilizados quando esta for formulada com 1,0 g de fósforo disponível/kg.

2. Material e Métodos

Um experimento foi conduzido com frangos de corte no período de 22 a 33 dias de idade, no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) para indicar quais fitases microbianas e qual teor de Ca na ração devem ser utilizados quando esta for formulada com 1,0 g de fósforo disponível/kg, considerando-se parâmetros ósseos, plasmáticos e de desempenho e avaliando-se também o balanço e retenção de nutrientes. Todos os

procedimentos utilizados na condução do experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA (protocolo nº 004/11).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado disposto em esquema fatorial (6 x 3) + 1 correspondendo à seis fitases microbianas adicionadas a rações formuladas com três diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}) mais uma dieta controle positivo (DCP), sem fitase, formulada segundo as recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2011), em quatro repetições de quatro aves para cada tratamento avaliado.

As seguintes fitases microbianas foram utilizadas na inclusão de 1.500 unidades de atividade da fitase (FTU)/kg de ração: fitase A (6-fitase expressa por *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado com dois genes sintéticos produzidos a partir do gene que codifica a fitase em *Citrobacter braakii* ATCC 51113); fitase B (6-fitase produzida por *A. oryzae* geneticamente modificado com o gene da fitase de *Peniophora lycii*); fitase C (6-fitase produzida por *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 5233 geneticamente modificado com o gene da fitase de *Escherichia coli*); fitase D (segunda geração de melhoramento genético da 6-fitase produzida por *E.coli*); fitase E (primeira geração de melhoramento genético da 6-fitase produzida por *E.coli*) e fitase F (“tipo selvagem” da 6-fitase produzida por *E.coli*). Por outro lado, as relações Ca:P_{disp} das rações foram definidas em 4,5:1,0; 6,0:1,0 e 7,5:1,0.

Portanto, 304 frangos de corte machos da linhagem Cobb-500[®] foram utilizados no experimento. Os pintos foram adquiridos com um dia de idade e criados em galpão convencional para frangos de corte até os 21 dias de idade recebendo ração à base de milho e farelo de soja formulada para atender suas exigências nutricionais (Rostagno et al., 2011). No 22^o dia de idade, as aves foram pesadas individualmente, separadas por faixas de peso e transferidas para gaiolas (com dimensões de 50 x 50 x 50 cm; unidade experimental) em uma sala de metabolismo, de modo que as unidades experimentais apresentassem o peso

médio inicial dos frangos semelhante entre si (1,046 kg \pm 0,010). A sala dispunha de iluminação constante e temperatura controlada, sendo cada gaiola metabólica provida de um bebedouro do tipo pressão, um comedouro individual do tipo calha com borda para evitar desperdícios e uma bandeja coletora de excretas.

As dietas experimentais (Tabela 1) e água foram fornecidas à vontade durante 11 dias, sendo oito dias de adaptação às instalações e dietas seguidos de três dias de coleta total das excretas (Rodrigues et al., 2005), por unidade experimental.

As rações e as sobras foram pesadas no 22^o, 30^o e 33^o dia de idade das aves para os posteriores cálculos do consumo de ração no período total e no período de coleta. Para os cálculos do ganho de peso, os frangos foram pesados no 22^o e 33^o dia de idade. A conversão alimentar foi calculada dividindo-se o consumo de ração pelo ganho de peso.

A coleta total de excretas foi realizada diariamente na parte da manhã, de modo que as excretas de uma mesma unidade experimental foram reunidas em sacos plásticos identificados e armazenadas em freezer até o último dia de coleta quando foram pesadas, homogeneizadas e pré-secas em estufa a 55 °C por 72 horas. Após a pré-secagem, as excretas foram moídas e armazenadas à temperatura ambiente até a realização das análises de matéria seca (MS), P total, Ca, nitrogênio (N) e energia bruta (Association of Official Analytical Chemists – AOAC, 2005). O teor de P fítico (P_{fit}) foi determinado pela metodologia colorimétrica com proporção de extração de 1:20 descrita detalhadamente no artigo 1 desta Tese. Paralelamente, três alíquotas homogêneas de todas as rações experimentais foram coletadas, moídas e armazenadas até a realização das mesmas análises químicas propostas para as excretas.

O balanço e retenção do P_{fit} , P total, Ca e N foram calculados com base na MS. O consumo do nutriente (g/ave) foi calculado multiplicando-se o

Tabela 1 Composição das dietas experimentais.

Ingrediente (g/kg de ração, em matéria natural)	DCP ^a	Fitases A, B e C			Fitases D, E e F		
		Relação Ca:P _{disp}			Relação Ca:P _{disp}		
		4,5:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	4,5:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0
Milho	623,89	623,89	623,89	623,89	623,89	623,89	623,89
Farelo de soja	304,92	304,92	304,92	304,92	304,92	304,92	304,92
Óleo de soja	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00
Fosfato bicálcico	11,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Calcário	7,66	7,89	11,61	15,32	7,89	11,61	15,32
Sal comum	4,30	4,30	4,30	4,30	4,30	4,30	4,30
DL-Metionina	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64	2,64
L-Lisina HCl	2,08	2,08	2,08	2,08	2,08	2,08	2,08
L-Treonina	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47
Suplemento mineral ^b	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Suplemento vitamínico ^c	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Cloreto de colina	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Bacitracina de zinco	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Fitase	0,00	0,15	0,15	0,15	0,30	0,30	0,30
Inerte (caulim)	9,02	20,27	16,56	12,85	20,12	15,41	12,70
Composição nutricional calculada e determinada (g/kg de ração, em matéria natural)							
EM ^d calculada (kcal/kg)	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100
Proteína bruta calculada	195,00	195,00	195,00	195,00	195,00	195,00	195,00
Proteína bruta determinada	196,20	197,80	196,10	195,30	195,84	197,20	196,80
Cálcio calculado	7,50	4,50	6,00	7,50	4,50	6,00	7,50

Cálcio determinado	7,73	4,62	6,19	7,69	4,58	6,12	7,65
Fósforo disponível calculado	3,40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fósforo total calculado	5,40	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Fósforo total determinado	5,75	3,39	3,42	3,45	3,37	3,48	3,41
Sódio calculado	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Cloro calculado	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25
Potássio calculado	7,39	7,39	7,39	7,39	7,39	7,39	7,39
Lisina calculada	10,78	10,78	10,78	10,78	10,78	10,78	10,78
Metionina + cistina calculada	7,87	7,87	7,87	7,87	7,87	7,87	7,87
Treonina calculada	7,01	7,01	7,01	7,01	7,01	7,01	7,01
Balanço eletrolítico (mEq/kg) ^c	184	184	184	184	184	184	184
Atividade da fitase calculada (FTU/kg) ^f	0,0	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500
Atividade da fitase determinada (FTU/kg) ^g	12	1.520	1.512	1.498	1.517	1.528	1.509

^aDieta controle positivo. ^bSuplementado por kg de ração: Zn, 55 mg; Se, 0,18 mg; I, 0,70 mg; Cu, 10 mg ; Mn, 78 mg; Fe, 48 mg. ^cSuplementado por kg de ração: ácido fólico, 0,64 mg; ácido pantotênico, 11,60 mg; biotina, 0,024 mg; butilhidroxi-tolueno (BHT), 2,0 mg; niacina, 14,8 mg; vitamina A, 8000 UI; vitamina B1, 1,2 mg; vitamina E, 16,20 UI; vitamina B12, 10,8 µg; vitamina B2, 4,8 mg; vitamina B6, 2,40 mg; vitamina D3, 2000 UI; vitamina K3, 1,92 mg. ^dEM: energia metabolizável. ^eBalanço eletrolítico calculado segundo a equação proposta por Mongin (1981), a qual correlaciona as concentrações de sódio, potássio e cloreto ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-$). ^fSuplementação enzimática expressa em FTU/kg de ração, sendo que 1FTU corresponde a uma unidade de atividade da fitase. Fitases A, B e C: Enzimas com atividade declarada de 10.000 FTU/g de produto. Fitases D, E e F: Enzimas com atividade declarada de 5.000 FTU/g de produto. ^gAtividade enzimática determinada segundo protocolo proposto por Engelen et al. (1994).

consumo de ração (g/ave) pelo teor (%) do nutriente determinado na ração. Para calcular a excreção absoluta do nutriente (g/ave), a quantidade de excreta (g/ave) foi multiplicada pelo teor (%) do nutriente determinado na excreta. O coeficiente de retenção do nutriente foi calculado pela equação: coeficiente de retenção (%) = [(consumo do nutriente - excreção absoluta do nutriente)/consumo do nutriente] x 100. A energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMAn) foi calculada utilizando-se a equação descrita por Matterson et al. (1965). Para os cálculos do coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS) das rações utilizou-se a equação: CMMS = [(g de matéria seca ingerida - g de matéria seca excretada)/g de matéria seca ingerida] x 100.

Ao final do experimento, duas aves por repetição foram abatidas para a retirada da tibia esquerda que foi posteriormente descarnada, seca a 105 °C, desengordurada em éter etílico e incinerada a 600 °C, determinando-se o teor de cinzas, P e Ca (AOAC, 2005). Além disso, o sangue das aves foi coletado em tubos contendo heparina sódica como anticoagulante e, em seguida, foi centrifugado (2.000 x g/15 minutos) sendo o plasma recolhido para a quantificação dos teores de Ca, P e magnésio (Mg) utilizando-se kits comerciais colorimétricos da Labtest®.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software SAS (2004) e para a comparação dos tratamentos no esquema fatorial, modelos de regressão ($P < 0,05$) foram utilizados para as diferentes relações Ca:P_{disp} enquanto que as fitases avaliadas foram comparadas entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Além disso, a DCP foi comparada às demais rações experimentais pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

3. Resultados

Não houve interação ($P > 0,05$) entre a fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração

nem efeito isolado ($P>0,05$) da relação $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ para os teores de P, Ca e cinzas na tíbia dos frangos de corte (Tabela 2) (APÊNDICES L e M). O tipo de fitase não afetou ($P>0,05$) as concentrações ósseas de P e cinzas, entretanto influenciou ($P<0,01$) o teor de Ca na tíbia de modo que a fitase B proporcionou a maior deposição deste mineral (19,91 g de Ca/100g de MSD) enquanto que as fitases D, E e F resultaram nos menores teores (18,89; 18,86 e 18,95 g de Ca/100g de MSD, respectivamente).

As dietas experimentais do esquema fatorial proporcionaram teores de P nos ósseos semelhantes ($P>0,05$) ao determinado nas aves que receberam a DCP sem fitase, formulada para atender as exigências nutricionais dos frangos, no período avaliado (Tabela 2). Por outro lado, o teor de Ca na tíbia foi reduzido ($P<0,05$) quando a ração continha relação $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ de 6,0:1,0 e as fitases D, E ou F e também quando a ração com relação $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ de 7,5:1,0 foi suplementada com a fitase E. Já a ração formulada com relação $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ de 4,5:1,0 suplementada com a fitase A e as rações contendo a fitase F, para as três relações $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ avaliadas, resultaram em teores de cinzas na tíbia inferiores ($P<0,05$) ao determinado nas aves do grupo controle positivo (CP).

Não houve interação ($P>0,05$) entre a fitase e a relação $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ da ração para todos os minerais plasmáticos avaliados (Tabela 3) (APÊNDICES N e O). Todavia, com o uso da fitase D na ração, determinou-se a maior ($P<0,01$) concentração de P no plasma (7,43 mg/dL) enquanto que com o uso da fitase A determinou-se a menor ($P<0,01$) (6,07 mg/dL). A suplementação da ração com a fitase A proporcionou o maior ($P<0,05$) nível de Ca plasmático (9,63 mg/dL), mas com o uso das fitases D, E ou F a concentração de Ca no sangue diminuiu ($P<0,05$) em até 4,78%. Por outro lado, independente do tipo de fitase microbiana, o aumento da relação $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ da dieta de 4,5:1,0 para 7,5:1,0 reduziu ($P<0,01$) linearmente a concentração de P no plasma em até 5,87% e, de

Tabela 2 Teores de fósforo, cálcio e cinzas na tíbia de frangos de corte aos 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Fósforo na tíbia (g/100g de MSD)				Cálcio na tíbia (g/100g de MSD)				Cinzas na tíbia (g/100g de MSD)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média
Fitase A	8,76	8,94	9,21	8,97	19,00	19,27	20,77	19,68ab	47,35*	48,58	49,45	48,46
Fitase B	8,83	8,97	8,71	8,84	20,04	20,36	19,33	19,91a	48,07	48,06	47,92	48,02
Fitase C	8,64	8,65	8,92	8,73	19,06	19,07	19,27	19,14ab	47,50	48,35	49,52	48,46
Fitase D	8,98	8,91	8,73	8,87	18,87	18,81*	18,99	18,89b	48,13	48,17	48,25	48,18
Fitase E	8,87	9,03	8,82	8,91	19,04	18,76*	18,78*	18,86b	47,90	47,88	47,70	47,83
Fitase F	8,87	8,62	8,78	8,76	19,14	18,78*	18,93	18,95b	46,80*	46,74*	46,79*	46,78
Média	8,83	8,85	8,86		19,19	19,18	19,34		47,63	47,96	48,27	
DCP ²				9,21				20,54				50,63
CV (%)		3,45				4,14				3,11		
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}			NS				NS				NS	
Fitase			NS				P<0,01				NS	
Ca:P _{disp}			NS				NS				NS	

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. MSD: matéria seca desengordurada. NS: não-significativo (P>0,05).

*Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett.

¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 7,5 g de cálcio/kg de ração e 3,4 g de fósforo disponível/kg de ração.

modo contrário, aumentou ($P < 0,05$) linearmente a concentração plasmática de Ca em até 3,02%.

Além disso, as rações contendo a fitase A nas três relações Ca:P_{disp} avaliadas, as rações com a fitase B e relações Ca:P_{disp} de 6,0:1,0 ou 7,5:1,0 e a ração com a fitase C e relação Ca:P_{disp} de 7,5:1,0 resultaram em teores de P plasmáticos menores ($P < 0,05$) do que o determinado nas aves do grupo CP. Contudo, comparadas à DCP, nenhuma ração contendo fitase diminuiu a concentração plasmática do Ca, para as três relação Ca:P_{disp} avaliadas.

O nível de Mg plasmático não foi alterado ($P > 0,05$) pela fitase nem pela relação Ca:P_{disp} da ração e permaneceu semelhante ($P > 0,05$) à concentração verificada quando as aves foram alimentadas com a DCP, com teor médio geral determinado em 2,04 mg de Mg/dL de plasma (Tabela 3).

Não houve interação nem efeito isolado ($P > 0,05$) do tipo de fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para o consumo de ração (1,610 kg/ave \pm 0,036; coeficiente de variação – CV = 4,16%), ganho de peso (0,938 kg/ave \pm 0,031; CV = 5,83%) e conversão alimentar (1,72 g/g \pm 0,03; CV = 3,74%) das aves, durante o período de 22 a 33 dias de idade (APÊNDICES P e Q). Além disso, todas as dietas experimentais do esquema fatorial resultaram em desempenho semelhante ($P > 0,05$) ao observado para as aves alimentadas com a DCP (consumo de ração de 1,584 kg/ave, ganho de peso de 0,968 kg/ave e conversão alimentar de 1,64 g/g).

Não houve interação nem efeito isolado ($P > 0,05$) do tipo de fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para o consumo, excreção e retenção do P_{fit} (Tabela 4) (APÊNDICES R e S). Entretanto, as aves alimentadas com as dietas contendo fitase resultaram em menor excreção ($P < 0,05$) e maior coeficiente de retenção ($P < 0,05$) do P_{fit}, comparadas com os frangos de corte alimentados com a DCP.

Não houve interação nem efeito isolado ($P > 0,05$) do tipo de fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para o consumo do P total (Tabela 5) (APÊNDICE T).

Tabela 3 Concentrações de fósforo, cálcio e magnésio no plasma de frangos de corte aos 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Fósforo (mg/dL de plasma)				Cálcio (mg/dL de plasma)				Magnésio (mg/dL de plasma)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média
Fitase A	6,09*	6,08*	6,03*	6,07d	9,24	9,50	10,16	9,63a	1,97	2,05	2,04	2,02
Fitase B	6,33	6,28*	6,26*	6,29cd	9,31	9,57	9,92	9,60ab	2,07	2,03	2,11	2,07
Fitase C	6,77	6,66	5,79*	6,41cd	9,58	9,49	9,47	9,51ab	1,99	1,95	2,00	1,98
Fitase D	7,51	7,45	7,33	7,43a	9,08	9,00	9,44	9,17b	2,09	2,05	2,05	2,06
Fitase E	7,09	6,60	6,34	6,68bc	9,15	9,58	9,06	9,26b	2,07	2,05	1,99	2,04
Fitase F	7,13	6,82	6,79	6,91b	9,32	9,32	9,29	9,31b	2,05	2,07	2,09	2,07
Média ^{3,4}	6,82	6,65	6,42		9,28	9,41	9,56		2,04	2,03	2,05	
DCP ²				7,20				9,59				2,01
CV (%)		6,56					6,83				6,23	
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}		NS				NS			NS			
Fitase		P<0,01				P<0,05			NS			
Ca:P _{disp}		P<0,01				P<0,05			NS			

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. NS: não-significativo (P>0,05). *Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett. ¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 7,5 g de cálcio/kg de ração e 3,4 g de fósforo disponível/kg de ração. ³Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a concentração de fósforo plasmático: $y = -0,13221x + 7,42376$ ($R^2 = 0,9945$). ⁴Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a concentração de cálcio plasmático: $y = 0,0933x + 8,8567$ ($R^2 = 0,9983$).

Tabela 4 Balanço e retenção do fósforo fitico em frangos de corte, no período de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

	Consumo de fósforo fitico (g/ave)				Excreção de fósforo fitico (g/ave)				Retenção do fósforo fitico (%)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
Fitase ¹	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média
Fitase A	0,909	0,950	0,915	0,925	0,040*	0,052*	0,051*	0,048	95,60*	94,52*	94,38*	94,84
Fitase B	0,996	0,963	0,897	0,952	0,059*	0,074*	0,071*	0,068	94,13*	92,38*	92,00*	92,83
Fitase C	0,959	0,956	0,955	0,956	0,047*	0,062*	0,065*	0,058	95,05*	93,51*	93,20*	93,92
Fitase D	0,927	0,916	0,956	0,933	0,072*	0,056*	0,065*	0,064	92,29*	93,95*	93,26*	93,17
Fitase E	0,964	1,006	0,981	0,984	0,073*	0,071*	0,063*	0,069	92,40*	92,93*	93,49*	92,94
Fitase F	0,966	0,922	0,969	0,953	0,051*	0,070*	0,096*	0,072	94,73*	92,40*	90,12*	92,42
Média	0,954	0,952	0,946		0,057	0,064	0,069		94,03	93,28	92,74	
DCP ²				0,914				0,588				35,69
CV (%)		6,28				14,15				2,63		
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}			NS				NS				NS	
Fitase			NS				NS				NS	
Ca:P _{disp}			NS				NS				NS	

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

NS: não-significativo (P>0,05).

*Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett.

¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 7,5 g de cálcio/kg de ração e 3,4 g de fósforo disponível/kg de ração.

Tabela 5 Balanço e retenção do fósforo total em frangos de corte, no período de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Consumo de fósforo total (g/ave)				Excreção de fósforo total (g/ave)				Retenção do fósforo total (%)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média
Fitase A ⁴	1,290*	1,348*	1,262*	1,300	0,142*	0,119*	0,080*	0,114b	89,03*a	91,19*abc	93,63*a	91,28
Fitase B	1,444*	1,366*	1,272*	1,361	0,164*	0,172*	0,164*	0,167a	88,65*a	87,39*bc	87,10*b	87,72
Fitase C ⁵	1,315*	1,373*	1,355*	1,347	0,192*	0,185*	0,097*	0,158a	85,39*ab	86,54*c	92,87*a	88,27
Fitase D ⁶	1,280*	1,300*	1,357*	1,312	0,169*	0,072*	0,070*	0,104b	86,80*ab	94,46*a	94,82*a	92,03
Fitase E ⁷	1,321*	1,394*	1,393*	1,369	0,217*	0,118*	0,086*	0,140ab	83,59*b	91,57*ab	93,86*a	89,67
Fitase F	1,359*	1,308*	1,365*	1,344	0,182*	0,129*	0,127*	0,146ab	86,64*ab	90,12*abc	90,72*a	89,16
Média ³	1,335	1,348	1,334		0,178	0,133	0,104		86,68	90,21	92,17	
DCP ²				2,064				1,082				47,56
CV (%)		6,88				10,41				3,67		
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}			NS				NS					P<0,01
Fitase			NS				P<0,01					P<0,01
Ca:P _{disp}			NS				P<0,01					P<0,01

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. NS: não-significativo (P>0,05). *Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett. ¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 7,5 g de cálcio/kg de ração e 3,4 g de fósforo disponível/kg de ração. ³Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a excreção de fósforo total: $y = -0,0247x + 0,2863$ ($R^2 = 0,9847$). ⁴Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a retenção do fósforo total, para a fitase A: $y = 1,53292x + 82,08343$ ($R^2 = 0,9988$). ⁵Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a retenção do fósforo total, para a fitase C: $y = 2,49164x + 73,31973$ ($R^2 = 0,8623$). ⁶Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a retenção do fósforo total, para a fitase D: $y = 2,67425x + 75,98267$ ($R^2 = 0,7837$). ⁷Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a retenção do fósforo total, para a fitase E: $y = 3,42300x + 69,13464$ ($R^2 = 0,9069$).

Embora não tenha ocorrido ($P>0,05$) interação entre os fatores para a excreção do P total, houve ($P<0,01$) efeito isolado do tipo de fitase (APÊNDICE T) sendo que as fitases A e D resultaram na menor excreção, as fitases B e C na maior e as fitases E e F resultaram em teores intermediários de P total excretado pelos frangos. Por outro lado, independente da fitase microbiana utilizada, o aumento da relação Ca:P_{disp} da ração de 4,5:1,0 para 7,5:1,0 reduziu ($P<0,01$) linearmente a excreção do P total em até 41,57%.

Houve ($P<0,01$) interação entre o tipo de fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para o coeficiente de retenção do P total (Tabela 5) (APÊNDICE U), sendo que o aumento da relação Ca:P_{disp} da ração de 4,5:1,0 para 7,5:1,0 aumentou ($P<0,01$) linearmente o aproveitamento do P total em 5,17; 8,76; 9,24 e 12,29% com a suplementação da ração com as fitases A, C, D e E, respectivamente. Para a relação 4,5:1,0 as fitases A e B apresentaram melhor resultado e a fitase E proporcionou a pior retenção do P total, todavia, para a relação 6,0:1,0 a fitase D se destacou e a fitase C causou a menor retenção do P total. Já para a relação 7,5:1,0 apenas a fitase B prejudicou a retenção do P total enquanto que as demais fitases microbianas proporcionaram semelhante melhora do aproveitamento do P total. Comparadas à DCP, todas as rações experimentais do esquema fatorial resultaram em menor ($P<0,05$) consumo e excreção do P total culminando no seu melhor ($P<0,05$) aproveitamento (Tabela 5).

Não houve ($P>0,05$) interação entre a fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para o consumo e excreção do Ca (Tabela 6) (APÊNDICE V). O tipo da enzima não influenciou ($P>0,05$) o consumo de Ca, porém o uso das fitases E e F resultaram em maior ($P<0,01$) excreção deste nutriente enquanto que o uso da fitase A proporcionou a menor excreção. O aumento da relação Ca:P_{disp} da ração de 4,5:1,0 para 7,5:1,0 aumentou ($P<0,01$) linearmente o consumo e excreção absoluta do Ca.

Já para o coeficiente de retenção do Ca, houve ($P < 0,05$) interação entre os fatores avaliados (Tabela 6) (APÊNDICE W). Para a relação 4,5:1,0 as fitases A e B apresentaram melhor resultado enquanto as enzimas E e F resultaram no menor aproveitamento do Ca; contudo, para a relação 6,0:1,0 a fitase A se destacou e as fitases B, E e F proporcionaram os piores resultados. Em contrapartida, para a relação 7,5:1,0 apenas a fitase A proporcionou melhoria na retenção do Ca. Por outro lado, para a fitase B, o aumento da relação Ca:P_{disp} da ração de 4,5:1,0 para 7,5:1,0 piorou ($P < 0,01$) o aproveitamento do Ca em 15,78%.

As rações formuladas com relação Ca:P_{disp} 4,5:1,0 suplementadas com qualquer uma das seis enzimas avaliadas, proporcionaram menor ($P < 0,05$) consumo e excreção de Ca comparadas à DCP (Tabela 6). Além disso, as rações com relação 6,0:1:0 suplementadas com as fitases A, C ou D e a ração com relação 7,5:1,0 contendo a fitase A também proporcionaram menor excreção deste nutriente. De modo geral, as rações experimentais do esquema fatorial proporcionaram melhor aproveitamento da Ca em relação à DCP, exceto para a ração com relação 4,5:1,0 suplementada com a fitase E; as rações com relação 6,0:1,0 contendo as fitases B, E ou F e as rações com relação 7,5:1,0 na qual foi adicionada a fitase B ou F.

Não houve ($P > 0,05$) interação nem efeito isolado do tipo de fitase e da relação Ca:P_{disp} da ração para o consumo de N (APÊNDICE X), o qual apresentou média geral determinada em 15,375 g/ave, no período de 30 a 33 dias de idade (Tabela 7). Em contrapartida, observou-se redução ($P < 0,01$) de 6,94% na excreção de N pelos frangos de corte quando a relação Ca:P_{disp} da ração foi aumentada de 4,5:1,0 para 7,5:1,0. Todavia, houve ($P < 0,01$) interação entre o tipo de fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para o coeficiente de retenção do N (APÊNDICE Y), sendo que o aumento da relação Ca:P_{disp} da ração de 4,5:1,0 para 7,5:1,0 aumentou ($P < 0,01$) linearmente o aproveitamento deste nutriente

Tabela 6 Balanço e retenção do cálcio em frangos de corte, no período de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Consumo de cálcio (g/ave)				Excreção de cálcio (g/ave)				Retenção do cálcio (%)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média
Fitase A	2,973*	3,916	4,377	3,755	0,876*	1,184*	1,271*	1,110c	70,54*a	69,77*a	70,98*a	70,43
Fitase B ⁵	3,329*	3,967	4,160	3,819	0,980*	1,562	1,692	1,411ab	70,48*a	60,63b	59,36b	63,49
Fitase C	3,135*	3,972	4,431	3,846	1,010*	1,340*	1,613	1,321b	67,80*ab	66,19*ab	63,65*b	65,88
Fitase D	3,025*	3,776	4,438	3,746	1,006*	1,299*	1,565	1,290b	66,68*ab	65,63*ab	64,79*b	65,70
Fitase E	3,152*	4,147	4,553	3,951	1,195*	1,561	1,667	1,475a	62,12b	62,33b	63,35*b	62,60
Fitase F	3,160*	3,800	4,497	3,819	1,154*	1,492	1,786	1,477a	63,35*b	60,77b	60,30b	61,47
Média ^{3,4}	3,129	3,930	4,409		1,037	1,406	1,599		66,83	64,22	63,74	
DCP ²				4,103				1,775				56,76
CV (%)		5,86				9,95				4,79		
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}			NS				NS					P<0,05
Fitase			NS				P<0,01					P<0,01
Ca:P _{disp}			P<0,01				P<0,01					P<0,01

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

NS: não-significativo (P>0,05).

*Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett.

¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 7,5 g de cálcio/kg de ração e 3,4 g de fósforo disponível/kg de ração. ³Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre o consumo de cálcio: $y = 0,42681x + 1,26185$ ($R^2 = 0,9794$). ⁴Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a excreção de cálcio: $y = 0,18742x + 0,22289$ ($R^2 = 0,9683$). ⁵Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a retenção do cálcio, para a fitase B: $y = -3,70698x + 85,72976$ ($R^2 = 0,8347$).

Tabela 7 Balanço e retenção do nitrogênio em frangos de corte, no período de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Consumo de nitrogênio (g/ave)				Excreção de nitrogênio (g/ave)				Retenção do nitrogênio (%)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média	4,50:1,0	6,0:1,0	7,5:1,0	Média
Fitase A	14,695	15,354	15,003	15,017	4,805	5,317	4,859	4,994	67,24a	65,34b	67,62	66,73
Fitase B	15,638	15,172	15,033	15,281	5,348	5,379	4,820	5,182	65,86ab	64,52b	67,94	66,09
Fitase C	15,242	15,450	15,434	15,375	4,990	5,405	5,036	5,144	67,24a	65,09b	67,47	66,60
Fitase D ⁴	15,392	15,233	15,877	15,501	5,497	4,961	5,011	5,023	64,26ab	67,43a	68,40	67,60
Fitase E ⁵	15,372	16,281	15,809	15,821	5,869	5,348	5,130	5,449	61,82b	67,16a	67,52	65,50
Fitase F ⁶	15,193	14,903	15,666	15,254	5,480	4,881	4,907	5,089	63,92ab	67,17a	68,68	66,59
Média ³	15,256	15,399	15,470		5,331	5,148	4,961		65,06	66,57	67,94	
DCP ²				15,625				5,533				64,59
CV (%)		5,64				9,00				3,58		
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}			NS				NS					P<0,01
Fitase			NS				NS					NS
Ca:P _{disp}			NS				P<0,01					P<0,01

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. NS: não-significativo (P>0,05). *Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett. ¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 7,5 g de cálcio/kg de ração e 3,4 g de fósforo disponível/kg de ração. ³Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a excreção de nitrogênio: $y = -0,1233x + 5,8867$ ($R^2 = 0,9999$). ⁴Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a retenção do nitrogênio, para a fitase D: $y = 0,13800x + 58,4167$ ($R^2 = 0,9140$). ⁵Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a retenção do nitrogênio, para a fitase E: $y = 1,89780x + 54,11383$ ($R^2 = 0,7970$). ⁶Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a retenção do nitrogênio, para a fitase F: $y = 1,5867x + 57,0700$ ($R^2 = 0,9574$).

em 6,44; 9,22 e 7,45% com a suplementação da ração com as fitases D, E e F, respectivamente. Por outro lado, para a relação 4,5:1,0 as fitases A e C apresentaram melhor resultado e a fitase E proporcionou a pior retenção do N enquanto que para a relação 6,0:1,0 as fitases D, E e F resultaram nos maiores coeficientes de aproveitamento do N. Além disso, todas as rações experimentais do esquema fatorial resultaram em balanço e retenção do N semelhantes ($P>0,05$) ao observado quando as aves receberam a DCP.

Não houve ($P>0,05$) interação, nem efeito isolado do tipo de fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para a EMAn e o CMMS (APÊNDICE Z), cujas médias foram 3367,9 kcal/kg de ração \pm 48,6 (CV = 2,78%) e 75,11% \pm 1,14 (CV = 2,66%), respectivamente. Além disso, todas as dietas experimentais do esquema fatorial proporcionaram resultados semelhantes ($P>0,05$) ao verificado para os frangos de corte do grupo CP.

4. Discussão

Mesmo alterando a relação Ca:P_{disp} da ração de 4,5:1,0 para 7,5:1,0 todas as fitases microbianas avaliadas mostraram-se eficientes em atuar sobre o fitato da dieta liberando P_{fit} em quantidade suficiente para que ele pudesse ser utilizado pelo tecido ósseo sem causar prejuízo na deposição de P na tíbia dos frangos de corte, o que provavelmente ocorreria na ausência da suplementação da ração com fitase já que nenhuma fonte de P inorgânico foi incluída nestas rações que foram formuladas com apenas 1,0 g de P_{disp}/kg de ração.

A fitase B proporcionou a maior deposição de Ca na tíbia, porém quando a ração foi suplementada com as fitases D, E ou F a absorção do Ca foi menor, conforme comprovado pelos menores teores de Ca determinados no plasma e na tíbia dos frangos. Embora as fitases D e E sejam resultantes do

melhoramento da fitase F, os resultados deste trabalho demonstram que essas três enzimas ainda mantêm semelhante eficiência quanto ao aproveitamento do Ca da ração.

Apesar da porção inorgânica do osso ser majoritariamente constituída por Ca e P, os teores de cinzas na tíbia observados neste trabalho não puderam ser estritamente correlacionados à deposição óssea do Ca e P, pois as rações que prejudicaram este parâmetro não, necessariamente, resultaram na pior deposição de P e Ca na tíbia. Portanto, para compreender melhor o efeito da dieta sobre a formação do osso da ave é necessário determinar em experimentos futuros outros elementos que também participam desta estrutura como o Mg, potássio, flúor, zinco, sódio e até mesmo o cobre (Rath et al., 2000; Santos et al., 2008).

O teor médio de P plasmático determinado nas aves que receberam a ração contendo a fitase C foi inferior (6,41 mg/dL) ao reportado por Liu et al. (2010) para a mesma fitase (7,41 mg/dL), entretanto, a dieta avaliada neste trabalho foi formulada com menor nível de P (1,0 g versus 2,8 g de P_{disp} /kg de ração) o que pode justificar a menor concentração circulante de P.

De modo semelhante ao observado anteriormente por Ansar et al. (2004), a concentração de P no plasma das aves diminuiu gradativamente à medida que a relação Ca: P_{disp} da dieta aumentou, o que pode ser justificado pelo fato do Ca poder complexar-se com o P no intestino dificultando sua absorção (Runho et al., 2001). Além disso, há a hipótese de que esses dois minerais competem entre si pelo sítio de absorção no intestino, apesar desses mecanismos de transporte ainda não estarem completamente elucidados (Maiorka and Macari, 2002).

Os frangos de corte alimentados com a dieta contendo 1.500 FTU da fitase C/kg de ração apresentaram teor plasmático de Ca superior (9,51 mg/dL) à concentração sérica registrada por Liu et al. (2010) (7,08mg/dL) para a mesma fitase, todavia os referidos autores utilizaram a enzima com inclusão de apenas

1.000 FTU/kg de ração formulada com 7,8 g de Ca/kg, o que pode explicar a diferença entre os trabalhos.

Apesar do aumento do nível de Ca da dieta ter favorecido um maior teor de Ca no sangue, nenhuma das rações contendo diferentes relação Ca:P_{disp} suplementadas com as distintas fitases avaliadas alteraram a concentração de Ca no plasma, comparado ao nível determinado para as aves do grupo CP. Isso pode ser explicado pelo eficiente mecanismo de controle da homeostase do Ca pelo organismo que procura manter limites estreitos da calcemia. Assim, em casos de deficiência de Ca, o organismo induz um aumento na absorção intestinal deste mineral acompanhada da redução na sua excreção pelos rins além de mobilizar, caso necessário, parte do Ca armazenado no osso para outros tecidos através da corrente sanguínea. Por outro lado, em situação de excesso de Ca, sua absorção intestinal é reduzida pela saturação das proteínas de membrana transportadoras de Ca associado ao aumento na sua excreção (Maiorka and Macari, 2002).

Segundo Selle et al. (2009), a fitase atua sobre o fitato diminuindo sua capacidade de complexar-se com minerais catiônicos, entretanto, os resultados deste trabalho sugerem que o uso desta enzima na ração não altera o aproveitamento do magnésio, cujo teor médio determinado no plasma (2,04 mg/dL) foi semelhante ao reportado por Brenes et al. (2003) (2,10 mg/dL), porém inferior ao descrito por Viveros et al. (2002) (2,89 mg/dL).

Para todas as fitases e relações Ca:P P_{disp} avaliadas, verificou-se que é possível reduzir o teor de P_{disp} da dieta para 1,0 g/kg sem prejudicar o desempenho dos frangos de corte no período de 22 a 33 dias de idade, ao incluir 1.500 FTU/kg de ração. Este resultado é importante, pois representa a possibilidade de se utilizar ração a base de milho e farelo de soja sem a inclusão de qualquer fonte de P inorgânico, no período avaliado.

A manutenção do desempenho das aves observada neste trabalho pode ser justificada pela melhora no aproveitamento do P_{fit} promovida pelo uso de

qualquer uma das fitases avaliadas. Considerando que o teor médio de P_{fit} determinado na ração foi de 2,37 g/kg e que seu coeficiente de retenção médio foi de 93,35%, conclui-se que a fitase liberou 2,21 g de P/kg de ração, os quais somados ao fornecido pelo milho e farelo de soja (1,0 g de P_{disp} /kg de ração) representam um total de 3,21 g de P/kg de ração, indicando que esse nível foi suficiente para atender a exigência de P das aves. Segundo Rostagno et al. (2011) a exigência de P para frangos de corte machos de desempenho médio é de 3,42 g de P/kg de ração, todavia, de acordo Slominski (2011) é provável que a exigência de P para frangos de corte estabelecida atualmente esteja superestimada.

Os resultados deste trabalho indicam que o aproveitamento do P total não pode ser exclusivamente correlacionado à relação Ca:P da ração, pois também deve-se considerar os valores absolutos do Ca e P presentes na dieta. Isso quer dizer que embora a ração contendo 7,5 g de Ca/kg e 1,0 g de P_{disp} /kg esteja formulada com uma relação Ca: P_{disp} aproximadamente 3,5 vezes maior do que o recomendado por Rostagno et al. (2011) (relação Ca: P_{disp} de 2,13:1), esta dieta proporcionou de modo geral maior retenção do P total provavelmente por não estar deficiente em Ca.

Quanto ao aproveitamento do Ca pelas aves, a fitase A foi a enzima que tolerou a maior variação na relação Ca: P_{disp} da dieta, pois proporcionou os maiores coeficientes de retenção nas três relações avaliadas. Já para a fitase B mostrou-se a enzima mais sensível à alteração da relação Ca: P_{disp} na dieta, corroborando com Han et al. (2009) que relataram que distintas fitases microbianas podem apresentar diferente eficiência catalítica numa mesma situação fisiológica do animal.

De modo semelhante ao observado neste trabalho, Teixeira et al. (2003) também verificaram, para frangos de corte de 22 a 42 dias de idade, que a redução do nível de Ca na ração reduz o coeficiente de retenção do N, embora

não tenham indicado os motivos pelos quais isso ocorre. Contudo, a suplementação da dieta com fitase não melhorou o aproveitamento do N, nem os valores de EMAn e o CMMS da rações, corroborando com os resultados de Gomide et al. (2012) obtidos para frangos de corte no período de 22 a 35 dias de idade.

5. Conclusões

No período de 22 a 33 dias de idade, é possível reduzir o teor de fósforo disponível da ração de frangos de corte para 1,0 g/kg, ao suplementá-la com 1.500 unidades de atividade das fitases A, C, D ou E/kg, devendo-se fixar o nível de cálcio em 7,5 g/kg para manter o desempenho e a adequada mineralização óssea das aves, além de melhorar o coeficiente de retenção do cálcio e fósforo fítico, otimizar o aproveitamento do fósforo total e diminuir a excreção de nitrogênio e fósforo no ambiente.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA) pelo apoio financeiro. Às empresas DSM, Nutron e ABVista pelo fornecimento das fitases.

Referências

- Ansar, M., Khan, S.A., Chaudhary, Z.I., Mian, N.A., Tipu, M.Y., Rai, M.F. 2004. Effects of high dietary calcium and low phosphorus on urinary system of broiler chicks. *Pak Vet J*, 24, 113–116.
- Association of Official Analytical Chemists – International [AOAC]. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

- Brenes, A., Viveros, A., Arija, I., Centeno, C., Pizarro, M., Bravo, C. 2003. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 110, 201–219.
- Engelen, A.J., Van der Heeft, F.C., Randsdorp, P.H.G., Smit, E.L.C. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J AOAC Int.*, 77, 760–764.
- Gomide, E.M., Rodrigues, P.B., Freitas, R.T.F. de, Fialho, E.T. 2007. Nutritional plans with use of amino acids and phytase for broiler chickens maintaining the ideal protein profile in the diets. *R. Bras. Zootec.*, 36, 1769–1774.
- Gomide, E.M., Rodrigues, P.B., Naves, L. de P., Bernardino, V.M.P., Santos, L.M. dos, Garcia, A.A.P. 2012. Diets with reduced levels of nutrients supplemented with phytase and amino acids for broilers. *Ciênc. agrotec.*, 36, 100–107.
- 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.
- Liu, N., Ru, Y.J., Li, F.D. 2010. Effect of dietary phytate and phytase on metabolic change of blood and intestinal mucosa in chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 94, 368–374.
- Maiorka, A.; Macari, M. Absorption of minerals. In: Macari, M.; Furlan, R.L.; Gonzales, E. *Avian physiology applied to broilers*. 2nd ed. Jaboticabal:FUNEP. 2002,167–173.
- Matterson, L.D., Potter, L.M., Stutz, M.W., Singsen, E.P. 1965. The metabolizable energy of feed ingredients for chickens. (Research Report, 7). University of Connecticut, p. 11.
- Mongin, P. 1981. Recent advances in dietary anion-cation balance: application in poultry. *Proc Nutr Soc*, 40, 285–294.
- Mullaney, E.J., Ullah, A.H.J. 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312, 179–184.
- Nagata, A.K., Rodrigues, P.B., Alvarenga, R.R., Zangerônimo, M.G., Rodrigues, K.F., Lima, G.F.R. 2011. Energy and protein levels in diets containing phytase for broilers from 22 to 42 days of age: performance and nutrient excretion. *R. Bras. Zootec.*, 40, 1718–1724.
- Rath, N.C., Huff, W.E., Balog, J.M. 2000. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poult Sci*, 79, 1024–1032.
- Rodrigues, P.B., Martinez, R.S., Freitas, R.T.F., Bertechini, A.G., Fialho, E.T., 2005. Effect of collection time and methodologies on the digestibility and energy value of poultry diets. *Rev. Bras. Zootec.* 34, 882–889.
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F. de, Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L. de T. Euclides, R.F. 2011. Brazilian

- Tables for Poultry and Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements, 3ed. Federal University of Viçosa, Viçosa, p. 252.
- Runho, R.C.; Gomes, P.C.; Rostagno, H.S.; Albino, L.F.T.; Lopes, P.S.; Pozza, P.C. 2001. Available phosphorus requirement of male and female broilers from 1 to 21 days of age. *Rev. Bras. Zootec.* 30, 187–196.
- Santos, F.R., Hruby, M., Pierson, E.E.M., Remus, J.C., Sakomura, N.K. 2008. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks. *J. Appl. Poultry Res.*, 17, 191–201.
- SAS Institute, 2004. System for Microsoft Windows, version 9.1, Cary, NC.
- Schoulten, N.A., Teixeira, A.S., Bertechini, A.G., Freitas, R.T.F. de, Conte, A.J., Silva, H.O. 2002. Effect of the levels of calcium on the uptake of minerals in starter diets for broiler chickens supplemented with phytase. *Ciênc. agrotec.*, 26, 1313–1321.
- 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.
- Silva, Y. L. da., Rodrigues, P. B., Freitas, R. T. F. de.; Zangeronimo, M. G.; Fialho, E. T. 2008. Protein and phosphorus levels in diets with phytase for broilers chicken from 14 to 21 days-old. Energy values and nutrient digestibility. *Rev. Bras. Zootec.*, 37, 469–477.
- Slominski, B.A. 2011. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poul Sci*, 90, 2013–2023.
- Teixeira, A.S., Schoulten, N.A., Silva, H.O., Conte, A.J., Bertechini, A.G., Fialho, E.T. 2003. Performance and nitrogen retention in broilers from 22 to 42 days old fed diets with different levels in calcium supplement with fitase. *Ciênc. agrotec.*, 27, 192–198.
- Viveros, A., Brenes, A., Arija, I., Centeno, C. 2002. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broiler chicks fed different levels of phosphorus. *Poult Sci*, 81, 1172–1183.

ARTIGO 4

Eficiência de fitases microbianas suplementadas em rações formuladas com diferentes relação cálcio:fósforo, fornecidas à frangos de corte no período de 35 a 42 dias de idade

Naves, L. de P.; Rodrigues, P. B. et al.

**Artigo redigido conforme as normas da Revista Journal of Animal
Physiology and Animal Nutrition – versão preliminar**

Resumo

Um experimento foi conduzido com frangos de corte, no período de 35 a 42 dias de idade, para avaliar a eficiência de seis fitases microbianas suplementadas em rações (1.500 FTU/kg de ração) formuladas com três diferentes relação cálcio:fósforo disponível – Ca:P_{disp} (3,5:1,0; 5,0:1,0 e 6,5:1,0). Uma dieta controle positivo, sem fitase, formulada para atender as exigências nutricionais das aves no período foi utilizada para fins de comparação da eficiência da fitase. Os teores de P e Ca na tíbia, o nível plasmático de cálcio, a conversão alimentar, o consumo do P fítico (P_{fit}), o consumo e a excreção do nitrogênio (N), a energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio e o coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca não foram influenciados pelo tipo da fitase nem pela relação Ca:P_{disp} da dieta, mantendo-se semelhante ao determinado para as aves do grupo controle. A fitase D elevou os níveis de P e magnésio no plasma. As aves alimentadas com a ração suplementada com a fitase B apresentaram menor consumo de ração e ganho de peso enquanto que os frangos que receberam a ração contendo a fitase E consumiram mais ração, ganharam mais peso e excretaram menos P total. O maior coeficiente de retenção do Ca

foi determinado quando a ração continha as fitases C, D ou E, porém o melhor aproveitamento do N foi observado quando a ração foi suplementada com a fitase D ou E. Independente do tipo de fitase, o aumento da relação Ca:P_{disp} da dieta aumentou o teor de cinzas na tíbia, além do consumo e excreção do Ca. O uso da fitase na ração reduziu a excreção do P_{fit} melhorando seu aproveitamento pela ave. Portanto, no período de 35 a 42 dias de idade, é possível reduzir o teor de P_{disp} da ração de frangos de corte para 1,0 g/kg, ao suplementá-la com 1.500 unidades de atividade das fitases A, B, C, D ou E/kg, devendo-se fixar o nível de Ca em 6,5 g/kg para manter o desempenho e otimizar a mineralização ósseas das aves, além de melhorar o coeficiente de retenção do Ca, P_{fit}, P total e N e diminuir a excreção de P.

Palavras-chave: aves, desempenho, enzima, fitato, metabolismo

1. Introdução

O fitato é a principal forma de armazenamento de fósforo (P) em sementes e grãos comumente presentes nas rações de frangos de corte. Entretanto, apenas uma pequena fração do P fítico (P_{fit}) da dieta é naturalmente aproveitada por esses animais, devido à baixa atividade da fitase endógena.

Além disso, o ácido fítico pode complexar-se com nutrientes da dieta durante sua passagem pelo trato digestório, diminuindo a biodisponibilidade desses nutrientes podendo comprometer o desempenho zootécnico das aves. Associado a isso, outros fatores favorecem o uso de fitase exógena na nutrição avícola: (1) o P inorgânico é um recurso natural não-renovável e representa um dos ingredientes mais caros da ração, (2) há atualmente forte apelo ambiental pela redução da deposição de P no ambiente e (3) o preço das fitases comercializadas tem reduzido em função do avanço das técnicas de biotecnologia e fermentação (Selle et al., 2009).

Diante disso, as rações utilizadas atualmente têm sido formuladas com reduzido teor de fósforo disponível (P_{disp}) e suplementadas com fitase. Embora a fonte inorgânica de cálcio (Ca) seja de custo relativamente baixo, é importante avaliar qual deve ser o nível deste nutriente quando se formula a ração com determinado teor de P e certa atividade de fitase suplementada. Se por um lado, o excesso de Ca na ração pode reduzir sua utilização e também a de outros nutrientes como o P (Schoulten et al., 2002), além de poder reduzir a atividade catalítica da fitase utilizada (Santos et al., 2008), sua deficiência nutricional pode comprometer a integridade óssea e prejudicar o desempenho dos frangos de corte (Selle et al., 2009)

Além disso, distintas fitases microbianas podem apresentar diferentes estruturas e variadas propriedades físico-químicas e catalíticas (Mullaney and Ullah, 2003) o que, conseqüentemente, pode acarretar em diferentes resultados quando adicionadas nas rações de frangos de corte.

Portanto, este trabalho foi conduzido com frangos de corte, no período de 35 a 42 dias de idade, com o objetivo de indicar quais fitases microbianas e qual teor de Ca na ração devem ser utilizados quando esta for formulada com 1,0 g de fósforo disponível/kg.

2. Material e Métodos

Um experimento foi conduzido com frangos de corte no período de 35 a 42 dias de idade, no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) para indicar quais fitases microbianas e qual teor de cálcio (Ca) na ração devem ser utilizados quando esta for formulada com 1,0 g de fósforo disponível (P_{disp})/kg, considerando-se parâmetros ósseos, plasmáticos e de desempenho e avaliando-se também o balanço e retenção de nutrientes. Todos os procedimentos utilizados na condução do experimento

foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA (protocolo nº 004/11).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado disposto em esquema fatorial (6 x 3) + 1 correspondendo à seis fitases microbianas adicionadas a rações formuladas com três diferentes relação Ca:P_{disp} mais uma dieta controle positivo (DCP), sem fitase, formulada segundo as recomendações nutricionais de Rostagno et al. (2011), em quatro repetições de três aves para cada tratamento avaliado.

As seguintes fitases microbianas foram utilizadas na inclusão de 1.500 unidades de atividade da fitase (FTU)/kg de ração: fitase A (6-fitase expressa por *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado com dois genes sintéticos produzidos a partir do gene que codifica a fitase em *Citrobacter braakii* ATCC 51113); fitase B (6-fitase produzida por *A. oryzae* geneticamente modificado com o gene da fitase de *Peniophora lycii*); fitase C (6-fitase produzida por *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 5233 geneticamente modificado com o gene da fitase de *Escherichia coli*); fitase D (segunda geração de melhoramento genético da 6-fitase produzida por *E.coli*); fitase E (primeira geração de melhoramento genético da 6-fitase produzida por *E.coli*) e fitase F (“tipo selvagem” da 6-fitase produzida por *E.coli*). Por outro lado, as relações Ca:P_{disp} das rações foram definidas em 3,5:1,0; 5,0:1,0 e 6,5:1,0.

Portanto, 228 frangos de corte machos da linhagem Cobb-500[®] foram utilizados no experimento. Os pintos foram adquiridos com um dia de idade e criados em galpão convencional para frangos de corte até os 34 dias de idade recebendo ração à base de milho e farelo de soja formulada para atender suas exigências nutricionais (Rostagno et al., 2011).

No 35^o dia de idade, as aves foram pesadas individualmente, separadas por faixas de peso e transferidas para gaiolas (com dimensões de 50 x 50 x 50 cm; unidade experimental) em uma sala de metabolismo, de modo que as

unidades experimentais apresentassem o peso médio inicial dos frangos semelhante entre si ($2,204 \text{ kg} \pm 0,080$). A sala dispunha de iluminação constante e temperatura controlada, sendo cada gaiola metabólica provida de um bebedouro do tipo pressão, um comedouro individual do tipo calha com borda para evitar desperdícios e uma bandeja coletora de excretas.

As dietas experimentais (Tabela 1) e água foram fornecidas à vontade durante sete dias, sendo quatro dias de adaptação às instalações e dietas seguidos de três dias de coleta total das excretas (Rodrigues et al., 2005), por unidade experimental.

As rações e as sobras foram pesadas no 35o, 39o e 42o dia de idade das aves para os posteriores cálculos do consumo de ração no período total e no período de coleta. Para os cálculos do ganho de peso, os frangos foram pesados no 35o e 42o dia de idade. A conversão alimentar foi calculada dividindo-se o consumo de ração pelo ganho de peso.

A coleta total de excretas foi realizada diariamente na parte da manhã, de modo que as excretas de uma mesma unidade experimental foram reunidas em sacos plásticos identificados e armazenadas em freezer até o último dia de coleta quando foram pesadas, homogeneizadas e pré-secas em estufa a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 horas. Após a pré-secagem, as excretas foram moídas e armazenadas à temperatura ambiente até a realização das análises de matéria seca (MS), P total, Ca, nitrogênio (N) e energia bruta (Association of Official Analytical Chemists – AOAC, 2005). O teor de P fítico (Pfit) foi determinado pela metodologia colorimétrica com proporção de extração de 1:20 descrita detalhadamente no artigo 1 desta Tese. Paralelamente, três alíquotas homogêneas de todas as rações experimentais foram coletadas, moídas e armazenadas até a realização das mesmas análises químicas propostas para as excretas.

O balanço e retenção do Pfit, P total, Ca e N foram calculados com base na MS. O consumo do nutriente (g/ave) foi calculado multiplicando-se o consumo de

Tabela 1 Composição das dietas experimentais.

Ingrediente (g/kg de ração, em matéria natural)	DCP ^a	Fitases A, B e C			Fitases D, E e F		
		Relação Ca:P _{disp}			Relação Ca:P _{disp}		
		3,5:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	3,5:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0
Milho	669,17	669,17	669,17	669,17	669,17	669,17	669,17
Farelo de soja	263,73	263,73	263,73	263,73	263,73	263,73	263,73
Óleo de soja	30,73	30,73	30,73	30,73	30,73	30,73	30,73
Fosfato bicálcico	9,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Calcário	6,60	5,69	9,41	13,12	5,69	9,41	13,12
Sal comum	4,19	4,19	4,19	4,19	4,19	4,19	4,19
DL-Metionina	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47
L-Lisina HCl	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47	2,47
L-Treonina	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
Suplemento mineral ^b	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Suplemento vitamínico ^c	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Cloreto de colina	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Fitase	0,00	0,15	0,15	0,15	0,30	0,30	0,30
Inerte (caulim)	9,30	19,85	16,13	12,41	19,70	15,98	12,26
Composição nutricional calculada e determinada (g/kg de ração, em matéria natural)							
EM ^d calculada (kcal/kg)	3.150	3.150	3.150	3.150	3.150	3.150	3.150
Proteína bruta calculada	180,00	180,00	180,00	180,00	180,00	180,00	180,00
Proteína bruta determinada	179,80	181,20	179,95	181,50	180,75	181,06	181,49
Cálcio calculado	6,50	3,50	5,00	6,50	3,50	5,00	6,50
Cálcio determinado	6,65	3,69	5,06	6,75	3,74	5,13	6,48

Fósforo disponível calculado	3,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fósforo total calculado	5,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Fósforo total determinado	5,25	3,15	3,25	3,17	3,07	3,14	3,21
Sódio calculado	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85
Cloro calculado	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03
Potássio calculado	6,77	6,77	6,77	6,77	6,77	6,77	6,77
Lisina calculada	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10
Metionina + cistina calculada	7,37	7,37	7,37	7,37	7,37	7,37	7,37
Treonina calculada	6,56	6,56	6,56	6,56	6,56	6,56	6,56
Balanço eletrolítico (mEq/kg) ^e	168	168	168	168	168	168	168
Atividade da fitase calculada (FTU/kg) ^f	0,0	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500	1.500
Atividade da fitase determinada (FTU/kg) ^g	22	1.518	1.492	1.509	1.502	1.487	1.510

^aDieta controle positivo. ^bSuplementado por kg de ração: Zn, 55 mg; Se, 0,18 mg; I, 0,70 mg; Cu, 10 mg ; Mn, 78 mg; Fe, 48 mg. ^cSuplementado por kg de ração: ácido fólico, 0,48 mg; ácido pantotênico, 8,70 mg; biotina, 0,018 mg; butilhidroxi-tolueno (BHT), 1,5 mg; niacina, 11,1 mg; vitamina A, 6000 UI; vitamina B1, 0,8 mg; vitamina E, 12,15 UI; vitamina B12, 8,10 µg; vitamina B2, 3,6 mg; vitamina B6, 1,80 mg; vitamina D3, 1500 UI; vitamina K3, 1,44 mg. ^dEM: energia metabolizável. ^eBalanço eletrolítico calculado segundo a equação proposta por Mongin (1981), a qual correlaciona as concentrações de sódio, potássio e cloreto ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-$). ^fSuplementação enzimática expressa em FTU/kg de ração, sendo que 1FTU corresponde a uma unidade de atividade da fitase. Fitases A, B e C: Enzimas com atividade declarada de 10.000 FTU/g de produto. Fitases D, E e F: Enzimas com atividade declarada de 5.000 FTU/g de produto. ^gAtividade enzimática determinada segundo protocolo proposto por Engelen et al. (1994).

ração (g/ave) pelo teor (%) do nutriente determinado na ração. Para calcular a excreção absoluta do nutriente (g/ave), a quantidade de excreta (g/ave) foi multiplicada pelo teor (%) do nutriente determinado na excreta. O coeficiente de retenção do nutriente foi calculado pela equação: coeficiente de retenção (%) = $[(\text{consumo do nutriente} - \text{excreção absoluta do nutriente})/\text{consumo do nutriente}] \times 100$. A energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMAn) foi calculada utilizando-se a equação descrita por Matterson et al. (1965). Para os cálculos do coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS) das rações utilizou-se a equação: $\text{CMMS} = [(\text{g de matéria seca ingerida} - \text{g de matéria seca excretada})/\text{g de matéria seca ingerida}] \times 100$.

Ao final do experimento, duas aves por repetição foram abatidas para a retirada da tibia esquerda que foi posteriormente descarnada, seca a 105 °C, desengordurada em éter etílico e incinerada a 600 °C, determinando-se o teor de cinzas, P e Ca (AOAC, 2005). Além disso, o sangue das aves foi coletado em tubos contendo heparina sódica como anticoagulante e, em seguida, foi centrifugado (2.000 x g/15 minutos) sendo o plasma recolhido para a quantificação dos teores de Ca, P e magnésio (Mg) utilizando-se kits comerciais colorimétricos da Labtest®.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software SAS (2004) e para a comparação dos tratamentos no esquema fatorial, modelos de regressão ($P < 0,05$) foram utilizados para as diferentes relações Ca:P_{disp} enquanto que as fitases avaliadas foram comparadas entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Além disso, a DCP foi comparada às demais rações experimentais pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade.

3. Resultados

Não houve interação ($P > 0,05$) entre a fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração

nem efeito isolado ($P > 0,05$) destes fatores para o teor de P e Ca na tíbia dos frangos de corte (APÊNDICES AA e AB), cujas concentrações médias determinadas foram 7,76 g de P/100g de MSD \pm 0,16 (coeficiente de variação – CV = 3,25%) e 17,56 g de Ca/100g de MSD \pm 0,93 (CV = 4,67%). Além disso, não houve interação ($P > 0,05$) entre a fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração nem efeito isolado ($P > 0,05$) do tipo de enzima para a deposição de minerais totais na tíbia, contudo, o aumento da relação Ca:P_{disp} de 3,5:1,0 para 6,5:1,0 aumentou ($P < 0,05$) linearmente o teor de cinzas na tíbia dos frangos, com melhoria de até 2,65% (Tabela 2) (APÊNDICE AA).

As dietas experimentais do esquema fatorial proporcionaram teores de P, Ca e cinzas semelhantes ($P > 0,05$) ao determinado nas aves que receberam a DCP, sem adição de fitase, formulada para atender as exigências nutricionais dos frangos no período avaliado (7,99; 18,35 e 43,41 g/100g de MSD, respectivamente).

Não houve interação ($P > 0,05$) entre a fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração nem efeito isolado ($P > 0,05$) da relação Ca:P_{disp} para as concentrações plasmáticas de P e magnésio (Mg) (Tabela 2) (APÊNDICES AC e AD). Todavia, a suplementação da ração com a fitase D elevou os níveis de P ($P < 0,01$) e Mg ($P < 0,05$) no plasma enquanto que o uso das fitases B e E reduziu ($P < 0,01$) o teor de P no sangue. Não houve interação nem efeito isolado ($P > 0,05$) do tipo de fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração (APÊNDICE AC) para a concentração de Ca sanguíneo (10,46 mg/dL \pm 0,25; CV = 4,53%). Comparadas à DCP (9,98 mg de Ca/dL, 6,68 mg de P/dL e 2,04 mg/dL), nenhuma ração contendo fitase alterou a concentração plasmática do Ca, P e Mg, para as três relações Ca:P_{disp} avaliadas.

Não houve interação nem efeito isolado ($P > 0,05$) da relação Ca:P_{disp} da dieta para o consumo de ração e ganho de peso das aves, no período de 35 a 42

Tabela 2 Teor de cinzas na tibia e concentração de fósforo e magnésio no plasma de frangos de corte aos 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Cinzas na tibia (g/100g de MSD)				Fósforo (mg/dL de plasma)				Magnésio (mg/dL de plasma)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média
Fitase A	41,62	42,74	43,99	42,79	7,23	7,30	7,22	7,25ab	2,11	2,04	2,15	2,10b
Fitase B	41,12	42,39	43,04	42,18	6,79	6,79	6,78	6,78b	2,08	2,03	2,08	2,06b
Fitase C	41,13	42,14	42,93	42,07	7,10	6,98	7,05	7,04ab	2,12	2,11	2,12	2,11b
Fitase D	42,46	42,48	42,31	42,42	7,55	7,46	7,40	7,47a	2,25	2,25	2,18	2,23a
Fitase E	42,37	42,53	42,34	42,41	6,82	7,02	6,98	6,94b	2,04	2,04	2,04	2,04b
Fitase F	42,17	42,40	42,90	42,49	7,16	7,09	7,36	7,20ab	2,11	2,12	2,10	2,11b
Média ³	41,81	42,44	42,92		7,11	7,10	7,13		2,12	2,10	2,11	
DCP ²				43,41				6,68				2,04
CV (%)		3,15				6,05				6,24		
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}			NS				NS					NS
Fitase			NS				P<0,01					P<0,05
Ca:P _{disp}			P<0,05				NS					NS

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. MSD: matéria seca desengordurada. NS: não-significativo (P>0,05).

*Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett.

¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 6,5 g de cálcio/kg de ração e 3,0 g de fósforo disponível/kg de ração. ³Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre o teor de cinzas na tibia: $y = 0,36805x + 40,55209$ ($R^2 = 0,9933$).

dias de idade (Tabela 3) (APÊNDICE AE). Os frangos alimentados com a ração contendo a fitase B apresentaram o menor ($P < 0,05$) consumo de ração e menor ($P < 0,01$) ganho de peso, porém, com o uso da fitase E as aves consumiram mais ração e ganharam mais peso.

Não houve interação nem efeito isolado ($P > 0,05$) da fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para a conversão alimentar (Tabela 3) (APÊNDICE AF). Além disso, de modo geral, todas as dietas experimentais do esquema fatorial resultaram em desempenho dos frangos semelhante ($P > 0,05$) ao observado para as aves alimentadas com a DCP.

Não houve interação nem efeito isolado ($P > 0,05$) do tipo de fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para o consumo, excreção e retenção do P_{fit} (Tabela 4) (APÊNDICES AG e AH). Entretanto, as dietas contendo fitase resultaram em menor excreção e maior coeficiente de retenção do P_{fit} ($P < 0,05$) quando comparadas à DCP.

O consumo de P total pelos frangos de corte não foi alterado ($P > 0,05$) pelo tipo de fitase e relação Ca:P_{disp} da ração, nem pela interação desses fatores, verificando-se um consumo geral de 1,370 g/ave \pm 0,074 (Tabela 5). Não houve interação ($P > 0,05$) entre a fitase e a relação Ca:P_{disp} nem efeito isolado ($P > 0,05$) da relação Ca:P_{disp} da ração para a excreção e retenção do P total, todavia a fitase E resultou na menor ($P < 0,05$) excreção e no maior ($P < 0,01$) aproveitamento do P total (APÊNDICES AI e AJ).

Comparadas à DCP, todas as rações experimentais do esquema fatorial resultaram em menor ($P < 0,05$) consumo e excreção do P total possibilitando seu melhor ($P < 0,05$) aproveitamento pelas aves (Tabela 5).

Não houve ($P > 0,05$) interação entre a fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para o balanço e retenção do Ca (Tabela 6) (APÊNDICES AK e AL). O tipo da enzima não influenciou ($P > 0,05$) o consumo do Ca, mas o uso da fitase D resultou na menor ($P < 0,01$) excreção deste mineral. Além disso, os frangos que

Tabela 3 Desempenho de frangos de corte, no período de 35 a 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Consumo de ração (kg/ave)				Ganho de peso (kg/ave)				Conversão alimentar			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média
Fitase A	1,048	1,099	1,097	1,081ab	0,372	0,401	0,394	0,389bc	2,85	2,75	2,79	2,80
Fitase B	1,088	1,052	1,038	1,059b	0,369	0,347	0,352	0,356c	2,96	3,11	2,95	3,01
Fitase C	1,036	1,099	1,132	1,089ab	0,379	0,371	0,384	0,378bc	2,75	2,97	2,97	2,90
Fitase D	1,083	1,069	1,132	1,095ab	0,399	0,397	0,380	0,392bc	2,72	2,71	3,00	2,81
Fitase E	1,201	1,125	1,199	1,175a	0,428	0,453	0,454	0,445a	2,81	2,51	2,64	2,66
Fitase F	1,158	1,115	1,095	1,123ab	0,430	0,414	0,409	0,418ab	2,74	2,72	2,69	2,72
Média	1,102	1,093	1,116		0,396	0,397	0,395		2,81	2,80	2,84	
DCP ²				1,098				0,413				2,66
CV (%)		5,59				7,37				3,02		
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}			NS				NS					NS
Fitase		P<0,05				P<0,01						NS
Ca:P _{disp}			NS				NS					NS

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. NS: não-significativo (P>0,05). *Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett. ¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 6,5 g de cálcio/kg de ração e 3,0 g de fósforo disponível/kg de ração.

Tabela 4 Balanço e retenção do fósforo fítico em frangos de corte, no período de 39 a 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Consumo de fósforo fítico (g/ave)				Excreção de fósforo fítico (g/ave)				Retenção do fósforo fítico (%)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média
Fitase A	0,856	0,923	0,951	0,910	0,068*	0,058*	0,077*	0,068	91,98*	93,53*	91,92*	92,48
Fitase B	0,932	0,870	0,865	0,889	0,057*	0,075*	0,071*	0,068	93,82*	91,12*	91,88*	92,28
Fitase C	0,928	0,873	0,827	0,876	0,073*	0,087*	0,068*	0,076	92,29*	90,19*	92,54*	91,67
Fitase D	0,867	0,897	0,920	0,894	0,050*	0,078*	0,058*	0,062	94,28*	91,28*	93,76*	93,11
Fitase E	0,984	0,924	0,928	0,945	0,087*	0,066*	0,065*	0,073	91,07*	92,74*	92,95*	92,25
Fitase F	0,923	1,060	0,975	0,986	0,057*	0,056*	0,044*	0,052	93,88*	94,76*	95,37*	94,67
Média	0,915	0,924	0,911		0,065	0,070	0,064		92,89	92,27	93,07	
DCP ²				0,989				0,513				48,13
CV (%)		11,68				17,07				3,85		
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}		NS				NS				NS		
Fitase		NS				NS				NS		
Ca:P _{disp}		NS				NS				NS		

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. NS: não-significativo (P>0,05).

*Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett.

¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 6,5 g de cálcio/kg de ração e 3,0 g de fósforo disponível/kg de ração.

Tabela 5 Balanço e retenção do fósforo total em frangos de corte, no período de 39 a 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Consumo de fósforo total (g/ave)				Excreção de fósforo total (g/ave)				Retenção do fósforo total (%)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média
Fitase A ⁴	1,282*	1,382*	1,425*	1,363	0,034*	0,089*	0,085*	0,069bc	97,35*	93,56*	94,04*	94,98ab
Fitase B	1,396*	1,303*	1,295*	1,331	0,120*	0,096*	0,098*	0,105a	91,40*	92,63*	92,43*	92,15b
Fitase C ⁵	1,390*	1,322*	1,239*	1,317	0,098*	0,096*	0,117*	0,104a	92,95*	92,74*	90,56*	92,10b
Fitase D	1,298*	1,343*	1,378*	1,340	0,129*	0,086*	0,103*	0,106a	90,06*	93,60*	92,52*	92,08b
Fitase E ⁶	1,474*	1,384*	1,390*	1,416	0,037*	0,071*	0,052*	0,053c	97,49*	94,87*	96,26*	96,21a
Fitase F ⁷	1,383*	1,550*	1,423*	1,452	0,036*	0,098*	0,089*	0,074b	97,40*	93,68*	93,75*	94,90ab
Média	1,370	1,381	1,358		0,076	0,089	0,091		94,45	93,56	93,26	
DCP ²				2,518				1,240				50,75
CV (%)		12,48					19,00				4,36	
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}			NS				NS					NS
Fitase			NS				P<0,05					P<0,01
Ca:P _{disp}			NS				NS					NS

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. NS: não-significativo (P>0,05). *Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett.

¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 6,5 g de cálcio/kg de ração e 3,0 g de fósforo disponível/kg de ração.

Tabela 6 Balanço e retenção do cálcio em frangos de corte, no período de 39 a 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Consumo de cálcio (g/ave)				Excreção de cálcio (g/ave)				Retenção do cálcio (%)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média
Fitase A	1,928*	2,684	3,384*	2,665	1,016*	1,432	1,778	1,409ab	47,32*	46,67*	47,48*	47,16b
Fitase B	2,101*	2,734	3,226	2,687	1,120*	1,472	1,724	1,439a	46,68*	46,14*	46,69*	46,50b
Fitase C	2,116*	2,669	3,127	2,637	0,969*	1,273*	1,536	1,259bc	54,17*	52,22*	50,80*	52,40a
Fitase D	1,953*	2,440	3,274	2,555	0,928*	1,165*	1,638	1,244c	52,45*	52,53*	49,92*	51,63a
Fitase E	2,218*	2,687	3,301	2,735	1,109*	1,342*	1,618	1,356bc	50,10*	49,93*	50,80*	50,28a
Fitase F	2,080*	2,749	3,292	2,707	1,120*	1,496	1,846	1,487a	46,23*	45,40	43,83	45,15b
Média ^{3,4}	2,066	2,660	3,267		1,044	1,363	1,690		49,49	48,81	48,25	
DCP ²				2,777				1,677				39,67
CV (%)		9,30				10,38				5,93		
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}			NS				NS					NS
Fitase			NS				P<0,01					P<0,01
Ca:P _{disp}			P<0,01				P<0,01					NS

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. NS: não-significativo (P>0,05).

*Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett.

¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 6,5 g de cálcio/kg de ração e 3,0 g de fósforo disponível/kg de ração.

³Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre o consumo de cálcio: $y = 0,40038x + 0,66267$ ($R^2 = 0,9999$).

⁴Efeito da relação Ca:P_{disp} da ração sobre a excreção de cálcio: $y = 0,21547x + 0,28819$ ($R^2 = 0,9999$).

receberam ração suplementada com 1.500 FTU da fitase C, D ou E/kg aumentaram ($P < 0,01$) o aproveitamento do Ca da dieta em aproximadamente 29,66%, comparado ao observado para os frangos do grupo CP. Por outro lado, independente do tipo da enzima, o aumento da relação Ca:P_{disp} de 3,5:1,0 para 6,5:1,0 aumentou ($P < 0,01$) linearmente o consumo e a excreção absoluta do Ca. Em relação à DCP, todas as rações experimentais do esquema fatorial proporcionaram melhoria ($P < 0,05$) do coeficiente de retenção do Ca.

Não houve ($P > 0,05$) efeito isolado do tipo de fitase e da relação Ca:P_{disp} da ração, nem interação entre esses fatores, para o consumo e excreção do N (APÊNDICES AL e AM), cujas médias determinadas foram 41,377 g/ave \pm 1,456 e 16,882 g/ave \pm 0,813, respectivamente (Tabela 7). Em contrapartida, independente da relação Ca:P_{disp} da ração, as fitases D e E melhoraram ($P < 0,05$) o aproveitamento do N ao passo que a fitase F piorou este parâmetro. Contudo, todas as rações experimentais do esquema fatorial resultaram em coeficiente de retenção do N superior ($P < 0,05$) ao observado quando as aves foram alimentadas com a DCP.

Não houve ($P > 0,05$) interação, nem efeito isolado ($P > 0,05$) do tipo de fitase e a relação Ca:P_{disp} da ração para a EMAN e o CMMS (APÊNDICE AN), cujas médias determinadas foram 3.369,7 kcal/kg de ração \pm 51,72 (CV = 3,49%) e 74,85% \pm 1,05 (CV = 2,43%), respectivamente. Além disso, todas as dietas experimentais do esquema fatorial proporcionaram resultados semelhantes ($P > 0,05$) aos observados para os frangos de corte do grupo CP (3.302,6 kcal/kg de ração e 73,78% de CMMS).

4. Discussão

Mesmo alterando a relação Ca:P_{disp} da ração de 3,5:1,0 para 6,5:1,0 todas as fitases microbianas avaliadas mostraram-se eficientes em atuar sobre o fitato

Tabela 7 Balanço e retenção do nitrogênio em frangos de corte, no período de 39 a 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:P_{disp}).

Fitase ¹	Consumo de nitrogênio (g/ave)				Excreção de nitrogênio (g/ave)				Retenção do nitrogênio (%)			
	Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração				Relação Ca:P _{disp} na ração			
	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média	3,50:1,0	5,0:1,0	6,5:1,0	Média
Fitase A	41,517	41,549	42,816	40,961	17,324	17,002	17,170	17,165	58,27*	59,07*	59,92*	58,00ab
Fitase B	41,962	39,648	38,918	40,176	17,233	16,291	15,883	16,469	59,05*	58,69*	59,14*	58,96ab
Fitase C	41,774	42,599	41,302	41,892	16,707	17,136	16,793	16,879	59,93*	59,68*	58,93*	59,51ab
Fitase D	39,005	40,366	41,422	40,265	16,095	15,767	15,963	15,942	58,75*	60,88*	61,47*	60,37a
Fitase E	44,310	41,593	41,764	42,556	18,165	16,265	16,409	16,946	59,11*	60,87*	60,64*	60,21a
Fitase F	43,185	41,686	39,365	41,412	18,735	17,844	17,085	17,888	56,56*	57,02*	56,58*	56,72b
Média	41,459	41,240	40,931		17,376	16,718	16,550		58,07	59,37	59,45	
DCP ²				37,763				18,888				50,19
CV (%)		9,74					10,62				4,65	
P-valor												
Fitase x Ca:P _{disp}			NS				NS				NS	
Fitase			NS				NS				P<0,05	
Ca:P _{disp}			NS				NS				NS	

CV: coeficiente de variação. Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls. NS: não-significativo (P>0,05).

*Difere da dieta controle positivo pelo teste de Dunnett.

¹1.500 unidades de atividade de fitase (FTU)/kg de ração. ²DCP: dieta controle positivo, sem fitase suplementar, formulada com 6,5 g de cálcio/kg de ração e 3,0 g de fósforo disponível/kg de ração.

da dieta liberando P_{fit} em quantidade suficiente para que ele pudesse ser utilizado pelo tecido ósseo sem causar prejuízo na deposição de P na tíbia dos frangos de corte, o que provavelmente ocorreria na ausência da suplementação da ração com fitase já que nenhuma fonte de P inorgânico foi incluída nestas rações que foram formuladas com apenas 1,0 g de P_{disp}/kg . Além disso, os teores ósseos de Ca e cinzas não foram reduzidos pela maior relação $Ca:P_{disp}$ avaliada reforçando a hipótese de que o maior teor de Ca na ração não comprometeu a eficácia catalítica das fitases. Esses resultados contrariam o reportado por Shoulten et al. (2002) que relataram que elevados alta relação $Ca:P$ na ração normalmente reduzem a atividade da fitase pela maior taxa de formação do complexo fitato de cálcio no trato digestório das aves, o qual apresenta resistência à hidrólise enzimática.

Os teores de cinzas na tíbia determinados neste trabalho não puderam ser correlacionados à deposição óssea do Ca e P, pois a ração contendo relação $Ca:P_{disp}$ de 6,5:1,0 não causou correspondente aumento na deposição destes minerais. Portanto, é importante conduzir novos experimentos a fim de avaliar outros elementos que também participam da formação óssea como, por exemplo, o Mg, potássio, flúor, zinco, sódio e até mesmo o cobre (Rath et al., 2000; Santos et al., 2008).

O teor médio de P plasmático determinado nas aves alimentadas com a ração contendo a fitase C foi inferior (7,04 mg/dL) ao reportado por Liu et al. (2010) para a mesma fitase (7,41 mg/dL), todavia, a dieta avaliada neste trabalho foi formulada com menor nível de P (1,0 g versus 2,8 g de P_{disp}/kg de ração) o que pode justificar a menor concentração circulante de P.

Segundo Ansar et al. (2004), a concentração de P no plasma das aves diminui à medida que a relação $Ca:P_{disp}$ da dieta aumenta, entretanto, isto não foi observado neste trabalho que avaliou frangos de corte na fase final de criação (35 a 42 dias de idade).

Nenhuma das rações contendo diferentes relação $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ suplementadas com as distintas fitases avaliadas alteraram a concentração de Ca no plasma, comparado ao nível determinado para as aves do grupo CP. Isso pode ser explicado pelo eficiente mecanismo de controle da homeostase do Ca pelo organismo que procura manter limites estreitos da calcemia (McDowell, 1992). Assim, em casos de deficiência de Ca, o organismo induz um aumento na absorção intestinal deste mineral acompanhada da redução na sua excreção pelos rins além de mobilizar, caso necessário, parte do Ca armazenado no osso para outros tecidos através da corrente sanguínea. Por outro lado, em situação de excesso de Ca, sua absorção intestinal é reduzida pela saturação das proteínas de membrana transportadoras de Ca associado ao aumento na sua excreção (Maiorka and Macari, 2002).

Independente da relação $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ da ração, apenas a fitase D foi capaz de aumentar simultaneamente os níveis sanguíneos do P e Mg, corroborando com Han et al. (2009) que relataram que distintas fitases microbianas podem apresentar diferente eficiência catalítica numa mesma situação. Essa melhoria na absorção do Mg, baseada na elevação do seu nível no plasma, pode ser justificada pela ação da fitase sobre o fitato diminuindo sua capacidade de complexar-se com minerais catiônicos como, por exemplo, o Mg (Selle et al., 2009).

A conversão alimentar das aves não foi alterada pelo tipo de fitase suplementada na ração porque, de modo geral, o aumento do ganho de peso foi resultado do maior consumo de ração. Para todas as fitases e relações $\text{Ca:P}_{\text{disp}}$ avaliadas, verificou-se que é possível reduzir o teor de P_{disp} da dieta para 1,0 g/kg sem prejudicar o desempenho dos frangos de corte no período de 35 a 42 dias de idade, ao incluir 1.500 FTU/kg de ração. Este resultado é importante, pois representa a possibilidade de se utilizar ração a base de milho e farelo de soja sem a inclusão de qualquer fonte de P inorgânico.

A manutenção do desempenho das aves observada neste trabalho pode ser justificada pela melhora no aproveitamento do P_{fit} promovida pelo uso de qualquer uma das fitases avaliadas. Considerando que o teor médio de P_{fit} determinado na ração foi de 2,02 g/kg e que seu coeficiente de retenção médio foi de 92,74%, conclui-se que a fitase liberou 1,87 g de P/kg de ração, os quais somados ao fornecido pelo milho e farelo de soja (1,0 g de P_{disp} /kg de ração) representam um total de 2,87 g de P/kg de ração, indicando que esse nível foi suficiente para atender a exigência de P das aves. Segundo Rostagno et al. (2011) a exigência de P para frangos de corte machos de desempenho médio de 34 a 42 dias de idade é de 2,98 g de P/kg de ração, todavia, de acordo Slominski (2011) é provável que a exigência de P para frangos de corte estabelecida atualmente esteja superestimada.

Os coeficientes de retenção do P total, Ca e N foram influenciados pelo tipo de fitase, reforçando a consideração anteriormente relatada de que distintas fitases microbianas podem apresentar diferentes estruturas e variadas propriedades físico-químicas e catalíticas (Mullaney and Ullah, 2003) o que, conseqüentemente, pode acarretar em diferentes resultados quando adicionadas nas rações de frangos de corte. Apesar disso, de modo geral, a suplementação da ração com as fitases A, B, C, D ou E, para as três relação Ca: P_{disp} avaliadas, e também a suplementação da ração formulada com relação Ca: P_{disp} de 3,5:1,0 com a fitase F melhoraram o aproveitamento do P total, Ca e N, em relação à DCP.

Por fim, verificou-se que a suplementação da dieta com fitase não alterou os valores da EMAn e o CMMS da rações, corroborando com os resultados de Gomide et al. (2012) obtidos para frangos de corte de 22 a 35 dias de idade e também, assemelhando-se ao observado para frangos de corte de 22 a 33 dias de idade (artigo 3 desta Tese).

5. Conclusões

No período de 35 a 42 dias de idade, é possível reduzir o teor de fósforo disponível da ração de frangos de corte para 1,0 g/kg, ao suplementá-la com 1.500 unidades de atividade das fitases A, B, C, D ou E/kg, devendo-se fixar o nível de cálcio em 6,5 g/kg para manter o desempenho e otimizar a mineralização ósseas das aves, além de melhorar o coeficiente de retenção do cálcio, fósforo fítico, fósforo total e nitrogênio e diminuir a excreção de fósforo no ambiente.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal (INCT-CA) pelo apoio financeiro. Às empresas DSM, Nutron e ABVista pelo fornecimento das fitases.

Referências

- Ansar, M., Khan, S.A., Chaudhary, Z.I., Mian, N.A., Tipu, M.Y., Rai, M.F. 2004. Effects of high dietary calcium and low phosphorus on urinary system of broiler chicks. *Pak Vet J*, 24, 113–116.
- Association of Official Analytical Chemists – International [AOAC]. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Engelen, A.J., Van der Heeft, F.C., Randsdorp, P.H.G., Smit, E.L.C. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J AOAC Int.*, 77, 760–764.
- Gomide, E.M., Rodrigues, P.B., Naves, L. de P., Bernardino, V.M.P., Santos, L.M. dos, Garcia, A.A.P. 2012. Diets with reduced levels of nutrients supplemented with phytase and amino acids for broilers. *Ciênc. agrotec.*, 36, 100–107.

- 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.
- Liu, N., Ru, Y.J., Li, F.D. 2010. Effect of dietary phytate and phytase on metabolic change of blood and intestinal mucosa in chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 94, 368–374.
- Maiorka, A.; Macari, M. Absorption of minerals. In: Macari, M.; Furlan, R.L.; Gonzales, E. *Avian physiology applied to broilers*. 2nd ed. Jaboticabal:FUNEP. 2002,167–173.
- Matterson, L.D., Potter, L.M., Stutz, M.W., Singsen, E.P. 1965. The metabolizable energy of feed ingredients for chickens. (Research Report, 7). University of Connecticut, p. 11.
- McDowell, L.R. Calcium and phosphorous. In: McDowell, L.R. *Minerals in animal nutrition*.1992. 26–73.
- Mongin, P. 1981. Recent advances in dietary anion-cation balance: application in poultry. *Proc Nutr Soc*, 40, 285–294.
- Mullaney, E.J., Ullah, A.H.J. 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312, 179–184.
- Rath, N.C., Huff, W.E., Balog, J.M. 2000. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. *Poult Sci*, 79, 1024–1032.
- Rodrigues, P.B., Martinez, R.S., Freitas, R.T.F., Bertechini, A.G., Fialho, E.T., 2005. Effect of collection time and methodologies on the digestibility and energy value of poultry diets. *Rev. Bras. Zootec*. 34, 882–889.
- Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., Gomes, P.C., Oliveira, R.F. de, Lopes, D.C., Ferreira, A.S., Barreto, S.L. de T. Euclides, R.F. 2011. *Brazilian Tables for Poultry and Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements*, 3ed. Federal University of Viçosa, Viçosa, p. 252.
- Santos, F.R., Hruby, M., Pierson, E.E.M., Remus, J.C., Sakomura, N.K. 2008. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks. *J. Appl. Poultry Res.*, 17, 191–201.
- SAS Institute, 2004. *System for Microsoft Windows*, version 9.1, Cary, NC.
- Schoulten, N.A., Teixeira, A.S., Bertechini, A.G., Freitas, R.T.F. de, Conte, A.J., Silva, H.O. 2002. Effect of the levels of calcium on the uptake of minerals in starter diets for broiler chickens supplemented with phytase. *Ciênc. agrotec.*, 26, 1313–1321.
- 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.
- Slominski, B.A. 2011. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poult Sci*, 90, 2013–2023.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resumo da análise de variância do consumo de fósforo fítico por frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase, utilizando-se a metodologia colorimétrica e a proporção de extração de 1:20 (m:v) para a determinação do teor de fósforo fítico nas rações e excretas.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	PROB
Ração	4	0,0468	0,0117	2,70	NS
Sexo	1	0,1786	0,1786	41,23	P<0,01
Ração x Sexo	4	0,0025	0,0006	0,14	NS
Erro	20	0,0867	0,0043		
Coeficiente de variação (%)			4,84		

NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE B – Resumo da análise de variância da excreção e coeficiente de hidrólise do fósforo fitico por frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase, utilizando-se a metodologia colorimétrica e a proporção de extração de 1:20 (m:v) para a determinação do teor de fósforo fitico nas rações e excretas.

Fonte de variação	GL	Excreção				Coeficiente de hidrólise			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Ração	4	1,6319	0,4080	71,11	P<0,01	8142,71	2035,68	61,94	P<0,01
Rações com NCF ¹	3	0,2355	0,0785	13,68	P<0,01	1330,77	443,59	13,50	P<0,01
1 ^o grau	1	0,2051	0,2051	35,75	P<0,01	1113,25	1113,25	33,87	P<0,01
2 ^o grau	1	0,0209	0,0209	3,65	NS	183,60	183,60	5,59	P<0,05
3 ^o grau	1	0,0094	0,0094	1,64	NS	33,92	33,92	1,03	NS
Ração controle positivo ²	1	1,3964	1,3964	243,39	P<0,01	6811,94	6811,94	207,28	P<0,01
Sexo	1	0,0124	0,0124	2,16	NS	0,0087	0,0087	0,00	NS
Ração x Sexo	4	0,0653	0,0163	2,84	NS	346,38	86,60	2,64	NS
Erro	20	0,1148	0,0057			657,27	32,86		
Coeficiente de variação (%)				20,89				7,80	

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

¹Rações com níveis crescentes de fitase (NCF), formuladas com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração.

²Ração controle positivo, sem fitase, formulada com 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração.

APÊNDICE C – Resumo da análise de variância do consumo de fósforo fítico por frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase, utilizando-se a metodologia colorimétrica e a proporção de extração de 3:20 (m:v) para a determinação do teor de fósforo fítico nas rações e excretas.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	PROB
Ração	4	0,000371	0,000093	3,44	P<0,05
Rações com NCF ¹	3	0,000297	0,000099	3,68	P<0,05
1º grau	1	0,000005	0,000005	0,18	NS
2º grau	1	0,000289	0,000289	10,72	P<0,01
3º grau	1	0,000003	0,000003	0,13	NS
Ração controle positivo ²	1	0,000074	0,000074	2,74	NS
Sexo	1	0,001130	0,001130	41,97	P<0,01
Ração x Sexo	4	0,000015	0,000004	0,14	NS
Erro	20	0,000539	0,000027		
Coeficiente de variação (%)		4,82			

NS: não significativo (P>0,05).

¹Rações com níveis crescentes de fitase (NCF), formuladas com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração.

²Ração controle positivo, sem fitase, formulada com 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração.

APÊNDICE D – Resumo da análise de variância da excreção e coeficiente de hidrólise do fósforo fitico por frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase, utilizando-se a metodologia colorimétrica e a proporção de extração de 3:20 (m:v) para a determinação do teor de fósforo fitico nas rações e excretas.

Fonte de variação	GL	Excreção				Coeficiente de hidrólise			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Ração	4	0,0223	0,0056	224,67	P<0,01	17824,99	4456,25	202,24	P<0,01
Sexo	1	0,0009	0,0009	35,92	P<0,01	283,77	283,77	12,88	P<0,01
Ração x Sexo ¹	4	0,0009	0,0002	8,72	P<0,01	829,49	207,37	9,41	P<0,01
Efeito do NF ² para machos	3	0,0019	0,0006	25,41	P<0,01	1476,82	492,27	22,34	P<0,01
1 ^o grau	1	0,0013	0,0013	53,29	P<0,01	1052,36	1052,36	47,76	P<0,01
2 ^o grau	1	0,00001	0,00001	0,39	NS	30,76	30,76	1,40	NS
3 ^o grau	1	0,0006	0,0006	22,56	P<0,01	393,70	393,69	17,87	P<0,01
Efeito do NF ² para fêmeas	3	0,0001	0,000036	1,14	NS	140,04	46,68	2,12	NS
Efeito do sexo para 0 FTU	1	0,0006	0,0006	25,15	P<0,01	356,32	356,32	16,17	P<0,01
Efeito do sexo para 750 FTU	1	0,0011	0,0011	44,03	P<0,01	680,54	680,54	30,89	P<0,01
Efeito do sexo para 1.500 FTU	1	0,00004	0,00004	1,44	NS	3,5228	3,52	0,16	NS
Efeito do sexo para 2.250 FTU	1	0,000004	0,000004	0,15	NS	0,4375	0,4375	0,02	NS
Erro	20	0,0005	0,000025			440,69	22,03		
Coeficiente de variação (%)				12,52				7,38	

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

¹Os desdobramentos das fontes de variação (efeito do nível de fitase dentro de cada sexo e vice-versa) foram realizados para as dietas formuladas com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração, excluindo-se neste momento da análise o efeito da ração controle positivo (contendo 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração, sem fitase).

²NF: nível de fitase.

APÊNDICE E – Resumo da análise de variância do consumo e coeficiente de hidrólise do fósforo fítico por frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase, utilizando-se a metodologia HPLC-IR¹ e a proporção de extração de 3:20 (m:v) para a determinação do teor de fósforo fítico nas rações e excretas.

Fonte de variação	GL	Consumo				Coeficiente de hidrólise			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Ração	4	0,001282	0,000320	4,46	P<0,01	224528,35	56132,09	13,43	P<0,01
Rações com NCF ²	3	0,000792	0,000264	3,67	P<0,05	136775,12	45591,71	10,91	P<0,01
1º grau	1	0,000013	0,000013	0,18	NS	118845,35	118845,35	28,44	P<0,01
2º grau	1	0,000770	0,000770	10,71	P<0,01	11702,08	11702,08	2,80	NS
3º grau	1	0,000009	0,000009	0,13	NS	6227,70	6227,70	1,49	NS
Ração controle positivo ³	1	0,000490	0,000490	6,81	P<0,05	87753,22	87753,22	21,00	P<0,01
Sexo	1	0,003035	0,003035	42,21	P<0,01	2208,37	2208,37	0,53	NS
Ração x Sexo	4	0,000037	0,000009	0,13	NS	42719,86	10679,96	2,56	NS
Erro	20	0,001438	0,000072			83581,67	4179,08		
Coeficiente de variação (%)			4,80				-22,41		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

¹HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração.

²Rações com níveis crescentes de fitase (NCF), formuladas com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração.

³Ração controle positivo, sem fitase, formulada com 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração.

APÊNDICE F – Resumo da análise de variância da excreção de fósforo fítico por frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase, utilizando-se a metodologia cromatográfica HPLC-IR¹ e a proporção de extração de 3:20 (m:v) para a determinação do teor de fósforo fítico nas rações e excretas.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	PROB
Ração	4	0,7815	0,1954	18,01	P<0,01
Sexo	1	0,0877	0,0877	8,08	P<0,05
Ração x Sexo ²	4	0,1247	0,0312	2,87	P<0,05
Efeito do nível de fitase para machos	3	0,2101	0,0700	6,45	P<0,01
1º grau	1	0,1586	0,1586	14,61	P<0,01
2º grau	1	0,0109	0,0109	1,01	NS
3º grau	1	0,0406	0,0406	3,74	NS
Efeito do nível de fitase para fêmeas	3	0,2485	0,0828	7,63	P<0,01
1º grau	1	0,2074	0,2074	19,11	P<0,01
2º grau	1	0,0400	0,0400	3,69	NS
3º grau	1	0,0011	0,0011	0,10	NS
Efeito do sexo para 0 FTU	1	0,0007	0,0007	0,07	NS
Efeito do sexo para 750 FTU	1	0,1347	0,1347	12,41	P<0,01
Efeito do sexo para 1.500 FTU	1	0,0506	0,0506	4,66	P<0,01
Efeito do sexo para 2.250 FTU	1	0,0181	0,0181	1,67	NS
Erro	20	0,217005	0,010850		
Coeficiente de variação (%)		15,14			

¹HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração. NS: não significativo (P>0,05).

²Os desdobramentos das fontes de variação (efeito do nível de fitase dentro de cada sexo e vice-versa) foram realizados para as dietas formuladas com 2,13 g de fósforo disponível/kg de ração, excluindo-se neste momento da análise o efeito da ração controle positivo (contendo 4,26 g de fósforo disponível/kg de ração, sem fitase).

APÊNDICE G – Resumo da análise de variância do consumo de ração e ganho de peso de frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase.

Fonte de variação	GL	Consumo de ração				Ganho de peso			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Ração	4	5121,87	1280,47	3,16	P<0,05	18067,67	4516,92	8,50	P<0,01
Rações com NCF ¹	3	4830,46	1610,15	3,97	P<0,05	8166,83	2722,28	5,13	P<0,01
1 ^o grau	1	106,41	106,41	0,26	NS	3040,13	3040,13	5,72	P<0,05
2 ^o grau	1	3876,04	3876,04	9,55	P<0,01	4482,67	4482,67	8,44	P<0,01
3 ^o grau	1	848,01	848,01	2,09	NS	644,03	644,03	1,21	NS
Ração CP ²	1	291,41	291,41	0,72	NS	9900,83	9900,83	18,64	P<0,01
Sexo	1	149389,63	149389,63	368,17	P<0,01	137769,63	137769,63	259,39	P<0,01
Ração x Sexo	4	680,53	170,13	0,42	NS	1447,53	361,88	0,68	NS
Erro	20	8115,33	405,77			10622,67	531,13		
Coefficiente de variação (%)			1,39				2,41		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

¹Rações com níveis crescentes de fitase (NCF), formuladas com 0,213% de fósforo disponível.

²Ração controle positivo (CP), sem fitase, formulada com 0,426% de fósforo disponível.

APÊNDICE H – Resumo da análise de variância da conversão alimentar e do teor de cinzas na tíbia de frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase.

Fonte de variação	GL	Conversão alimentar				Cinzas na tíbia			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Ração	4	0,0305	0,0076	6,88	P<0,01	57,91	14,48	20,06	P<0,01
Rações com NCF ¹	3	0,0127	0,0042	3,82	P<0,05	40,94	13,65	18,91	P<0,01
1º grau	1	0,0107	0,0107	9,67	P<0,01	35,76	35,76	49,54	P<0,01
2º grau	1	0,0019	0,0019	1,73	NS	2,52	2,52	3,49	NS
3º grau	1	0,0001	0,0001	0,06	NS	2,67	2,67	3,70	NS
Ração controle positivo ²	1	0,0178	0,0178	16,06	P<0,01	16,97	16,97	23,51	P<0,01
Sexo	1	0,0328	0,0328	29,61	P<0,01	0,2038	0,2038	0,28	NS
Ração x Sexo	4	0,0026	0,0007	0,59	NS	4,0799	1,0200	1,41	NS
Erro	20	0,0222	0,0011			14,44	0,7218		
Coeficiente de variação (%)				2,20				1,68	

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

¹Rações com níveis crescentes de fitase (NCF), formuladas com 0,213% de fósforo disponível.

²Ração controle positivo, sem fitase, formulada com 0,426% de fósforo disponível.

APÊNDICE I – Resumo da análise de variância do consumo de cálcio e fósforo total de frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase.

Fonte de variação	GL	Consumo de cálcio				Consumo de fósforo total			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Ração	4	0,2181	0,0545	7,17	P<0,01	4,6274	1,1568	156,40	P<0,01
Rações com NCF ¹	3	0,1382	0,0461	6,05	P<0,01	0,0792	0,0264	3,57	P<0,05
1º grau	1	0,0107	0,0107	1,41	NS	0,0061	0,0061	0,83	NS
2º grau	1	0,1275	0,1275	16,75	P<0,01	0,0683	0,0683	9,23	P<0,01
3º grau	1	0,00003	0,00003	0,00	NS	0,0048	0,0048	0,65	NS
Ração controle positivo ²	1	0,0799	0,0799	10,50	P<0,01	4,5482	4,5482	614,92	P<0,01
Sexo	1	1,3526	1,3526	177,73	P<0,01	0,3779	0,3779	51,09	P<0,01
Ração x Sexo	4	0,0161	0,0040	0,53	NS	0,0060	0,0015	0,20	NS
Erro	20	0,1522	0,0076			0,1479	0,0074		
Coeficiente de variação (%)			2,42				4,29		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

¹Rações com níveis crescentes de fitase (NCF), formuladas com 0,213% de fósforo disponível.

²Ração controle positivo, sem fitase, formulada com 0,426% de fósforo disponível.

APÊNDICE J – Resumo da análise de variância da excreção de cálcio e fósforo total de frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase.

Fonte de variação	GL	Excreção de cálcio				Excreção de fósforo total			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Ração	4	0,4596	0,1149	15,06	P<0,01	2,8947	0,7237	639,92	P<0,01
Rações com NCF ¹	3	0,3311	0,1104	14,47	P<0,01	0,0935	0,0312	27,57	P<0,01
1º grau	1	0,3172	0,3172	41,58	P<0,01	0,0893	0,0893	78,99	P<0,01
2º grau	1	0,0126	0,0126	1,65	NS	0,00003	0,00003	0,03	NS
3º grau	1	0,0013	0,0013	0,17	NS	0,0042	0,0042	3,69	NS
Ração controle positivo ²	1	0,1284	0,1284	16,84	P<0,01	2,8011	2,8011	2476,98	P<0,01
Sexo	1	0,2928	0,2928	38,39	P<0,01	0,0141	0,0141	12,49	P<0,01
Ração x Sexo	4	0,0501	0,0125	1,64	NS	0,0043	0,0011	0,96	NS
Erro	20	0,1526	0,0076			0,0226	0,0011		
Coefficiente de variação (%)				4,42				3,77	

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

¹Rações com níveis crescentes de fitase (NCF), formuladas com 0,213% de fósforo disponível.

²Ração controle positivo, sem fitase, formulada com 0,426% de fósforo disponível.

APÊNDICE K – Resumo da análise de variância do coeficiente de retenção do cálcio e fósforo total de frangos de corte machos e fêmeas alimentados com rações deficientes em fósforo disponível suplementadas com níveis crescentes de fitase.

Fonte de variação	GL	Coeficiente de retenção do cálcio				Coeficiente de retenção do fósforo total			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Ração	4	510,23	127,56	21,47	P<0,01	1233,47	308,37	125,86	P<0,01
Rações com NCF ¹	3	311,65	103,88	17,48	P<0,01	351,75	117,25	47,86	P<0,01
1º grau	1	301,12	301,12	50,67	P<0,01	265,82	265,82	108,49	P<0,01
2º grau	1	9,7155	9,7155	1,63	NS	25,01	25,01	10,21	P<0,01
3º grau	1	0,8118	0,8118	0,14	NS	60,92	60,92	24,86	P<0,01
Ração controle positivo ²	1	198,58	198,58	33,42	P<0,01	881,73	881,73	359,88	P<0,01
Sexo	1	12,6620	12,6620	2,13	NS	56,12	56,12	22,90	P<0,01
Ração x Sexo	4	11,1936	2,7984	0,47	NS	23,75	5,9368	2,42	NS
Erro	20	118,85	5,9425			49,00	2,4500		
Coeficiente de variação (%)			5,42				2,76		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

¹Rações com níveis crescentes de fitase (NCF), formuladas com 0,213% de fósforo disponível.

²Ração controle positivo, sem fitase, formulada com 0,426% de fósforo disponível.

APÊNDICE L – Resumo da análise de variância do teor de cinzas na tíbia de frangos de corte aos 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	PROB
Fitase	5	23,5585	4,7117	2,12	NS
Relação Ca:Pdisp	2	5,0304	2,5152	1,13	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	12,2854	1,2285	0,55	NS
Controle x fatorial	1	0,0181	0,0181	0,01	NS
Erro	57	126,4716	2,2188		
Coeficiente de variação (%)		3,11			

NS: não significativo ($P > 0,05$).

APÊNDICE M – Resumo da análise de variância dos teores de fósforo e cálcio na tíbia de frangos de corte aos 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Fósforo na tíbia				Cálcio na tíbia			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	0,4918	0,0984	1,06	NS	12,1310	2,4262	3,82	$P < 0,01$
Relação Ca:Pdisp	2	0,0183	0,0092	0,10	NS	0,4171	0,2086	0,33	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	1,0974	0,1097	1,19	NS	9,6528	0,9653	1,52	NS
Controle x fatorial	1	0,2589	0,2589	2,80	NS	0,0098	0,0098	0,02	NS
Erro	57	5,2725	0,0925			36,1779	0,6347		
Coeficiente de variação (%)		3,45				4,14			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo ($P > 0,05$).

APÊNDICE N – Resumo da análise de variância dos teores de fósforo e cálcio no plasma de frangos de corte aos 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Fósforo no plasma				Cálcio no plasma			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	14,4864	2,8973	15,80	P<0,01	5,4591	1,0918	2,60	P<0,05
Relação Ca:Pdisp	2	1,8982	0,9491	5,18	P<0,01	4,0428	2,0214	4,81	P<0,05
1º grau	1	1,8877	1,8877	10,29	P<0,01	4,0350	4,0350	9,60	P<0,01
2º grau	1	0,0105	0,0105	0,06	NS	0,0077	0,0077	0,02	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	1,9296	0,1930	1,05	NS	2,9477	0,2948	0,70	NS
Controle x fatorial	1	7,7661	7,7661	42,35	P<0,01	0,4415	0,4415	1,05	NS
Erro	57	10,4538	0,1834			23,9685	0,4205		
Coeficiente de variação (%)		6,56				6,83			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE O – Resumo da análise de variância do teor de magnésio no plasma de frangos de corte aos 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	PROB
Fitase	5	0,0807	0,0161	1,00	NS
Relação Ca:Pdisp	2	0,0042	0,0021	0,13	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,0532	0,0053	0,33	NS
Controle x fatorial	1	0,0081	0,0081	0,50	NS
Erro	57	0,9177	0,0161		
Coeficiente de variação (%)		6,23			

NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE P – Resumo da análise de variância do consumo de ração de frangos de corte, no período de 22 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	0,0449	0,0090	2,01	NS
Relação Ca:Pdisp (RCa:P)	2	0,0029	0,0015	0,33	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,0828	0,0083	1,86	NS
Controle x fatorial	1	0,0135	0,0135	3,03	NS
Erro	57	0,2565	0,0045		
Coeficiente de variação (%)			4,16		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE Q – Resumo da análise de variância do ganho de peso e conversão alimentar de frangos de corte de 22 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Ganho de peso				Conversão alimentar			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	0,0319	0,0064	2,14	NS	0,0143	0,0029	0,69	NS
Relação Ca:Pdisp	2	0,0059	0,0029	0,99	NS	0,0093	0,0046	1,13	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,0567	0,0057	1,90	NS	0,0496	0,0050	1,20	NS
Controle x fatorial	1	0,0001	0,0001	0,04	NS	0,0110	0,0110	2,66	NS
Erro	57	0,1710	0,0030			0,2337	0,0041		
Coeficiente de variação (%)				5,83		3,74			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE R – Resumo da análise de variância do consumo e excreção de fósforo fítico por frangos de corte de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Consumo de fósforo fítico				Excreção de fósforo fítico			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	0,0254	0,0051	1,44	NS	0,0050	0,0010	1,74	NS
Relação Ca:Pdisp	2	0,0009	0,0004	0,12	NS	0,0016	0,0008	1,42	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,0363	0,0036	1,03	NS	0,0049	0,0005	0,86	NS
Controle x fatorial	1	0,0081	0,0081	2,29	NS	0,0321	0,0321	56,35	P<0,01
Erro	57	0,1995	0,0035			0,0342	0,0006		
Coeficiente de variação (%)		6,28				14,15			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE S – Resumo da análise de variância da retenção do fósforo fítico por frangos de corte de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	PROB
Fitase	5	46,50	9,30	1,57	NS
Relação Ca:Pdisp	2	20,15	10,08	1,70	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	52,07	5,21	0,88	NS
Controle x fatorial	1	405,50	405,50	68,53	P<0,01
Erro	57	337,44	5,92		
Coeficiente de variação (%)		2,63			

NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE T – Resumo da análise de variância do consumo e excreção do fósforo total por frangos de corte de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Consumo de fósforo total				Excreção de fósforo total			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	0,0444	0,0089	0,99	NS	0,0488	0,0098	4,50	P<0,01
Relação Ca:Pdisp	2	0,0030	0,0015	0,17	NS	0,0658	0,0329	15,16	P<0,01
1º grau	1					0,0653	0,0653	30,10	P<0,01
2º grau	1					0,0005	0,0005	0,21	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,1136	0,0114	1,27	NS	0,0271	0,0027	1,25	NS
Controle x fatorial	1	0,8674	0,8674	97,11	P<0,01	1,2430	1,2430	573,12	P<0,01
Erro	57	0,5073	0,0089			0,1254	0,0022		
Coefficiente de variação (%)				6,88				10,41	

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE U – Resumo da análise de variância do coeficiente de retenção do fósforo total por frangos de corte, no período de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	170,40	34,08	5,47	P<0,01
Relação Ca:Pdisp (RCa:P)	2	370,47	185,24	29,71	P<0,01
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	242,44	24,24	3,89	P<0,01
Efeito da RCa:P para a fitase A	2	42,35	21,18	3,40	P<0,05
1 ^º grau	1	42,30	42,30	6,78	P<0,05
2 ^º grau	1	0,05	0,05	0,01	NS
Efeito da RCa:P para a fitase B	2	5,45	2,72	0,44	NS
Efeito da RCa:P para a fitase C	2	129,60	64,80	10,39	P<0,01
1 ^º grau	1	111,75	111,75	17,93	P<0,01
2 ^º grau	1	17,85	17,85	2,86	NS
Efeito da RCa:P para a fitase D	2	164,25	82,13	13,17	P<0,01
1 ^º grau	1	128,73	128,73	20,65	P<0,01
2 ^º grau	1	35,53	35,53	5,70	P<0,05
Efeito da RCa:P para a fitase E	2	232,54	116,27	18,65	P<0,01
1 ^º grau	1	210,90	210,90	33,83	P<0,01
2 ^º grau	1	21,64	21,64	3,47	NS
Efeito da RCa:P para a fitase F	2	38,71	19,36	3,10	NS
Efeito da fitase para RCa:P = 4,5	5	82,56	16,51	2,65	P<0,05
Efeito da fitase para RCa:P = 6,0	5	169,19	33,84	5,43	P<0,01
Efeito da fitase para RCa:P = 7,5	5	161,09	32,22	5,17	P<0,01
Controle x fatorial	1	2157,32	2157,32	346,04	P<0,01
Erro	57	355,11	6,23		
Coeficiente de variação (%)			3,67		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE V – Resumo da análise de variância do consumo e excreção de cálcio por frangos de corte, no período de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Consumo de cálcio				Excreção de cálcio			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	0,3282	0,0656	1,29	NS	1,1682	0,2336	11,86	P<0,01
Relação Ca:Pdisp	2	20,0865	10,0433	196,84	P<0,01	3,9177	1,9589	99,40	P<0,01
1º grau	1	19,6736	19,6736	385,58	P<0,01	3,7936	3,7936	192,50	P<0,01
2º grau	1	0,4129	0,4129	8,09	P<0,01	0,1241	0,1241	6,30	P<0,05
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,7135	0,0713	1,40	NS	0,2244	0,0224	1,14	NS
Controle x fatorial	1	0,6090	0,6090	11,94	P<0,01	2,8672	2,8672	145,49	P<0,01
Erro	57	2,9070	0,0510			1,1229	0,0197		
Coeficiente de variação (%)		5,86				9,95			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE W – Resumo da análise de variância do coeficiente de retenção do cálcio por frangos de corte, no período de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	614,31	122,86	13,25	P<0,01
Relação Ca:Pdisp (RCa:P)	2	132,64	66,32	7,15	P<0,01
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	233,84	23,38	2,52	P<0,05
Efeito da RCa:P para a fitase A	2	3,0063	1,5032	0,16	NS
Efeito da RCa:P para a fitase B	2	296,35	148,17	15,98	P<0,01
1º grau	1	247,35	247,35	26,68	P<0,01
2º grau	1	49,00	49,00	5,28	P<0,05
Efeito da RCa:P para a fitase C	2	34,97	17,49	1,89	NS
Efeito da RCa:P para a fitase D	2	7,1821	3,5911	0,39	NS
Efeito da RCa:P para a fitase E	2	3,4359	1,7180	0,19	NS
Efeito da RCa:P para a fitase F	2	21,53	10,77	1,16	NS
Efeito da fitase para RCa:P = 4,5	5	249,22	49,84	5,38	P<0,01
Efeito da fitase para RCa:P = 6,0	5	260,00	52,00	5,61	P<0,01
Efeito da fitase para RCa:P = 7,5	5	338,93	67,79	7,31	P<0,01
Controle x fatorial	1	1222,34	1222,34	131,84	P<0,01
Erro	57	528,39	9,27		
Coeficiente de variação (%)			4,79		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE X – Resumo da análise de variância do consumo e excreção de nitrogênio por frangos de corte, no período de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Consumo de nitrogênio				Excreção de nitrogênio			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	4,2600	0,8520	1,15	NS	2,3840	0,4768	2,21	NS
Relação Ca:Pdisp	2	0,8263	0,4132	0,56	NS	2,7065	1,3532	6,28	P<0,01
1º grau	1					2,6624	2,6624	12,36	P<0,01
2º grau	1					0,0441	0,0441	0,20	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	12,1306	1,2131	1,63	NS	4,2103	0,4210	1,96	NS
Controle x fatorial	1	0,3740	0,3740	0,50	NS	1,2597	1,2597	5,85	P<0,05
Erro	57	42,2940	0,7420			12,2721	0,2153		
Coefficiente de variação (%)			5,64				9,00		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE W – Resumo da análise de variância do coeficiente de retenção do nitrogênio por frangos de corte, no período de 30 a 33 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	48,48	9,70	1,72	NS
Relação Ca:Pdisp (RCa:P)	2	95,53	47,77	8,48	P<0,01
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	167,54	16,75	2,98	P<0,01
Efeito da RCa:P para a fitase A	2	17,57	8,79	1,56	NS
Efeito da RCa:P para a fitase B	2	4,06	2,03	0,36	NS
Efeito da RCa:P para a fitase C	2	13,76	6,88	1,22	NS
Efeito da RCa:P para a fitase D	2	72,60	36,30	6,45	P<0,01
1º grau	1	34,15	34,15	6,06	P<0,05
2º grau	1	38,45	38,45	6,83	P<0,05
Efeito da RCa:P para a fitase E	2	81,34	40,67	7,22	P<0,01
1º grau	1	64,83	64,83	11,51	P<0,01
2º grau	1	16,51	16,51	2,93	NS
Efeito da RCa:P para a fitase F	2	73,74	36,87	6,55	P<0,01
1º grau	1	73,61	73,61	13,07	P<0,01
2º grau	1	0,13	0,13	0,02	NS
Efeito da fitase para RCa:P = 4,5	5	90,18	18,04	3,20	P<0,05
Efeito da fitase para RCa:P = 6,0	5	85,02	17,00	3,02	P<0,05
Efeito da fitase para RCa:P = 7,5	5	40,82	8,16	1,45	NS
Controle x fatorial	1	37,20	37,20	6,61	P<0,05
Erro	57	320,91	5,63		
Coeficiente de variação (%)			3,58		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE Z – Resumo da análise de variância da EMAn¹ e CMMS² de rações suplementadas com distintas fitases e formuladas com diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp), fornecidas a frangos de corte no período de 30 a 33 dias de idade.

Fonte de variação	GL	EMAn				CMMS			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	35879,14	7175,83	0,82	NS	25,14	5,03	1,25	NS
Relação Ca:Pdisp	2	35706,02	17853,01	2,03	NS	50,02	25,01	6,21	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	66903,18	6690,32	0,76	NS	31,57	3,16	0,78	NS
Controle x fatorial	1	4,45	4,45	0,00	NS	3,50	3,50	0,87	NS
Erro	57	500896,62	8787,66			229,71	4,03		
Coeficiente de variação (%)		2,78				2,66			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05). ¹EMAn: energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio. ²CMMS: coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca.

APÊNDICE AA – Resumo da análise de variância do teor de cinzas e fósforo na tíbia de frangos de corte aos 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Cinzas na tíbia				Fósforo na tíbia			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	3,7777	0,7555	0,42	NS	0,7739	0,1548	2,43	NS
Relação Ca:Pdisp	2	14,7285	7,3643	4,14	P<0,05	0,2336	0,1168	1,83	NS
1 ^o grau	1	14,6300	14,6300	8,23	P<0,01				
2 ^o grau	1	0,0985	0,0985	0,06	NS				
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	11,9044	1,1904	0,67	NS	0,6268	0,0627	0,98	NS
Controle x fatorial	1	1,3279	1,3279	0,75	NS	0,0172	0,0172	0,27	NS
Erro	57	101,3650	1,7784			3,6309	0,0637		
Coeficiente de variação (%)		3,15				3,25			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AB – Resumo da análise de variância do teor de cálcio na tíbia de frangos de corte aos 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	8,9278	1,7856	2,67	NS
Relação Ca:Pdisp (RCa:P)	2	2,1512	1,0756	1,61	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	7,7735	0,7774	1,16	NS
Controle x fatorial	1	0,2006	0,2006	0,30	NS
Erro	57	38,1803	0,6698		
Coeficiente de variação (%)			4,67		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AC – Resumo da análise de variância dos teores de fósforo e cálcio no plasma de frangos aos 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Fósforo plasmático				Cálcio plasmático				
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB	
Fitase	5	3,5609	0,7122	3,99	P<0,01	1,2257	0,2451	1,08	NS	
Relação Ca:Pdisp	2	0,0097	0,0049	0,03	NS	0,6035	0,3017	1,33	NS	
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,3339	0,0334	0,19	NS	2,4975	0,2498	1,10	NS	
Controle x fatorial	1	12,2425	12,2425	68,65	P<0,01	0,5092	0,5092	2,25	NS	
Erro	57	10,1646	0,1783			12,8910	0,2262			
Coeficiente de variação (%)			6,05				4,53			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AD – Resumo da análise de variância do teor de magnésio no plasma de frangos aos 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases microbianas e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	PROB
Fitase	5	0,2529	0,0506	2,95	P<0,05
Relação Ca:Pdisp	2	0,0055	0,0028	0,16	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,0463	0,0046	0,27	NS
Controle x fatorial	1	0,0439	0,0439	2,56	NS
Erro	57	0,9788	0,0172		
Coeficiente de variação (%)		6,24			

NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AE – Resumo da análise de variância do consumo de ração e ganho de peso dos frangos, no período de 35 a 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Consumo de ração				Ganho de peso			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	0,0984	0,0197	2,82	P<0,05	0,0583	0,0117	5,74	P<0,01
Relação Ca:Pdisp	2	0,0090	0,0045	0,65	NS	0,000034	0,000017	0,01	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,1353	0,0135	1,94	NS	0,0068	0,0007	0,33	NS
Controle x fatorial	1	0,0036	0,0036	0,51	NS	0,00001	0,00001	0,00	NS
Erro	57	0,3984	0,0070			0,1226	0,0020		
Coeficiente de variação (%)		5,59				7,37			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AF – Resumo da análise de variância da conversão alimentar dos frangos, no período de 35 a 42 dias de idade, alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	PROB
Fitase	5	0,9114	0,1823	2,31	NS
Relação Ca:Pdisp	2	0,0377	0,0188	0,24	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	1,3561	0,1356	1,72	NS
Controle x fatorial	1	0,0525	0,0525	0,67	NS
Erro	57	4,4895	0,0788		
Coeficiente de variação (%)		3,02			

NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AG – Resumo da análise de variância do consumo e excreção do fósforo fítico em frangos de corte (39 a 42 dias de idade) alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Consumo de fósforo fítico				Excreção de fósforo fítico			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	0,1031	0,0206	1,81	NS	0,0042	0,0008	0,77	NS
Relação Ca:Pdisp	2	0,0023	0,0011	0,10	NS	0,0005	0,0002	0,22	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,1016	0,0102	0,89	NS	0,0050	0,0005	0,45	NS
Controle x fatorial	1	0,0031	0,0031	0,27	NS	0,1948	0,1948	176,81	P<0,01
Erro	57	0,6502	0,0114			0,0628	0,0011		
Coeficiente de variação (%)		11,68				17,07			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AH – Resumo da análise de variância do coeficiente de retenção do fósforo fítico em frangos de corte (39 a 42 dias de idade) alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	PROB
Fitase	5	66,16	13,23	1,08	NS
Relação Ca:Pdisp	2	8,42	4,21	0,34	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	60,69	6,07	0,50	NS
Controle x fatorial	1	2506,13	2506,13	204,58	P<0,01
Erro	57	698,25	12,25		
Coeficiente de variação (%)		3,85			

NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AI – Resumo da análise de variância do consumo e excreção do fósforo total em frangos de corte (39 a 42 dias de idade) alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Consumo de fósforo total				Excreção de fósforo total			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	0,1691	0,0338	1,11	NS	0,0881	0,0176	2,63	P<0,05
Relação Ca:Pdisp	2	0,0060	0,0030	0,10	NS	0,0514	0,0257	3,83	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,2027	0,0203	0,67	NS	0,0805	0,0081	1,20	NS
Controle x fatorial	1	0,5473	0,5473	18,00	P<0,01	0,7974	0,7974	119,05	P<0,01
Erro	57	1,7329	0,0304			0,3818	0,0067		
Coeficiente de variação (%)		12,48				19,00			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AJ – Resumo da análise de variância do coeficiente de retenção do fósforo total em frangos de corte (39 a 42 dias de idade) alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	124,11	24,82	4,93	P<0,01
Relação Ca:Pdisp (RCa:P)	2	87,37	43,68	8,67	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	195,38	19,54	3,88	NS
Controle x fatorial	1	943,04	943,04	187,15	P<0,01
Erro	57	287,21	5,04		
Coeficiente de variação (%)			4,36		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AK – Resumo da análise de variância do consumo e excreção do cálcio em frangos de corte (39 a 42 dias de idade) alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Consumo de cálcio				Excreção de cálcio			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	0,2398	0,0480	0,76	NS	0,5789	0,1158	5,23	P<0,01
Relação Ca:Pdisp	2	17,3131	8,6566	136,73	P<0,01	5,0144	2,5072	113,25	P<0,01
1º grau	1	17,3125	17,3125	273,45	P<0,01	5,0142	5,0142	226,50	P<0,01
2º grau	1	0,0006	0,0006	0,01	NS	0,0002	0,0002	0,01	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	0,3969	0,0397	0,63	NS	0,1511	0,0151	0,68	NS
Controle x fatorial	1	1,1961	1,1961	18,89	P<0,01	3,3688	3,3688	152,17	P<0,01
Erro	57	3,6088	0,0633			1,2619	0,0221		
Coeficiente de variação (%)		9,30				10,38			

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AL – Resumo da análise de variância do coeficiente de retenção do cálcio e consumo de nitrogênio por frangos (39 a 42 dias de idade) alimentados com rações contendo distintas fitases e relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Coeficiente de retenção do cálcio				Consumo de nitrogênio			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	532,94	106,59	13,51	P<0,01	52,09	10,42	0,65	NS
Relação Ca:Pdisp	2	18,46	9,23	1,17	NS	3,38	1,69	0,11	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	38,11	3,81	0,48	NS	119,21	11,92	0,75	NS
Controle x fatorial	1	1617,82	1617,82	205,12	P<0,01	28,89	28,89	1,81	NS
Erro	57	449,58	7,89			910,30	15,97		
Coeficiente de variação (%)				5,93				9,74	

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AM – Resumo da análise de variância da excreção e coeficiente de retenção do nitrogênio por frangos (39 a 42 dias de idade) alimentados com rações contendo distintas fitases e diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp).

Fonte de variação	GL	Excreção de nitrogênio				Coeficiente de retenção do nitrogênio			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	25,80	5,16	1,59	NS	117,28	23,46	3,16	P<0,05
Relação Ca:Pdisp	2	9,15	4,58	1,41	NS	28,63	14,31	1,93	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	9,92	0,99	0,31	NS	53,01	5,30	0,72	NS
Controle x fatorial	1	7,32	7,32	2,25	NS	15,96	157,96	21,31	P<0,01
Erro	57	185,45	3,25			425,51	7,41		
Coeficiente de variação (%)				10,62				4,65	

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

APÊNDICE AN – Resumo da análise de variância da EMAn¹ e CMMS² de rações suplementadas com distintas fitases microbianas e formuladas com diferentes relação cálcio:fósforo disponível (Ca:Pdisp), fornecidas a frangos de corte no período de 39 a 42 dias de idade.

Fonte de variação	GL	EMAn				CMMS			
		SQ	QM	F	PROB	SQ	QM	F	PROB
Fitase	5	82016,11	16403,22	1,19	NS	23,98	4,80	1,45	NS
Relação Ca:Pdisp	2	12233,44	6116,72	0,44	NS	19,83	9,91	3,00	NS
Fitase x Relação Ca:Pdisp	10	83498,14	8349,81	0,61	NS	30,64	3,06	0,93	NS
Controle x fatorial	1	4,70	4,70	0,00	NS	0,95	0,95	0,29	NS
Erro	57	786547,24	13799,07			188,37	3,30		
Coeficiente de variação (%)			3,49				2,43		

GL: grau de liberdade. SQ: soma dos quadrados. QM: quadrado médio. NS: não significativo (P>0,05).

¹EMAn: energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio.

²CMMS: coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca.