



Níveis de cálcio e fósforo disponível em rações com fitase para frangos de corte nas fases pré-inicial e inicial¹

Luziane Moreira dos Santos², Paulo Borges Rodrigues³, Rilke Tadeu Fonseca de Freitas³, Antônio Gilberto Bertechini³, Elias Tadeu Fialho³, Elisângela Minati Gomide², Luciana de Paula Naves²

¹ Projeto financiado pelo CNPq e apoio da FAPEMIG (PPM).

² Pós-graduação em Zootecnia - UFLA, Lavras, MG.

³ Departamento de Zootecnia/UFLA, Lavras, MG. Bolsista do CNPq/Membro do INCT-CA.

RESUMO - Dois experimentos independentes, um na fase pré-inicial (1 a 7 dias) e outro na fase inicial (8 a 21 dias de idade), foram realizados com frangos de corte para avaliar níveis de cálcio e fósforo disponível (Pdisp) em rações suplementadas com 500 unidades de atividade de fitase/kg de ração. Cada experimento constou de um ensaio de desempenho e outro de metabolismo e foi conduzido em esquema fatorial (3 × 4) + 1, sendo três níveis de Pdisp (0,42; 0,37; 0,32% na fase pré-inicial e 0,39; 0,34; 0,29% na fase inicial), quatro níveis de cálcio (0,94; 0,84; 0,74; 0,64% na fase pré-inicial e 0,88; 0,78; 0,68; 0,58% na fase inicial) mais uma ração controle. O controle correspondeu à única ração sem fitase e continha 0,47% de Pdisp e 0,94% de cálcio (fase pré-inicial) ou 0,44% de Pdisp e 0,88% de cálcio (fase inicial). Nos ensaios de desempenho, aos 7 e aos 21 dias de idade, foram avaliados o consumo de ração, o ganho de peso, a conversão alimentar e o teor de cinzas na tíbia. Nos ensaios de metabolismo, determinaram-se a energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMAN) das rações e os coeficientes de digestibilidade da matéria seca (CMMS). Na fase pré-inicial, os níveis de cálcio influenciaram o consumo de ração, a EMAN e o CMMS e, na fase inicial, afetaram o conteúdo de cinzas ósseas, a EMAN e o CMMS. Os níveis de Pdisp influenciaram o teor de cinzas na tíbia, a EMAN e o CMMS na fase pré-inicial e as cinzas ósseas e o CMMS na fase inicial. Adicionando 500 unidades de atividade de fitase/kg de ração, é possível reduzir, respectivamente, os níveis de cálcio e Pdisp para 0,64% e 0,37% na fase pré-inicial e 0,58% e 0,29% na fase inicial, pois essa redução não tem efeito negativo sobre o desempenho e a mineralização óssea dos frangos de corte nessas fases.

Palavras-chave: cinza óssea, desempenho, enzima, exigência nutricional, metabolismo

Calcium and available phosphorus levels in diets with phytase for broilers in the pre-starter and starter phases

ABSTRACT - Two independent experiments, one in pre-starter phase (1 to 7 days) and the other in the starter phase (8 to 21 days of age), were carried out with broilers to evaluate levels of calcium and available phosphorus (aP) in diets supplemented with 500 units of phytase activity/kg of diet. Each experiment consisted of a performance and a metabolic assay, and was conducted in a factorial schedule (3 × 4) + 1, with three aP levels (0.42, 0.37, 0.32% in the pre-starter phase and 0.39, 0.34, 0.29% in the starter phase), four calcium levels (0.94, 0.84, 0.74, 0.64% in the pre-starter phase and 0.88; 0.78, 0.68, 0.58% in the starter phase) plus a control diet. The control corresponded to the only diet without phytase and contained 0.47% of aP and 0.94% of calcium (pre-starter phase) or 0.44% of aP and 0.88% of calcium (starter phase). In the performance assays, at 7 and 21 days of age the feed intake, weight gain, feed conversion and the ash content in the tibia were evaluated. In the metabolic assays the apparent metabolizable energy corrected for nitrogen balance (AMEn) of the feed, and dry matter digestibility coefficients (DMDC) were determined. Calcium levels influenced the feed intake, AMEn and DMDC in the pre-starter phase, and in the starter phase they influenced bone ash, AMEn and DMDC. The aP levels influenced the content of tibia ash, AMEn and DMDC in the pre-starter phase, and bone ash and DMDC in the starter phase. By adding 500 units of phytase activity/kg of diet, it is possible to reduce, respectively, the calcium and aP levels to 0.64% and 0.37% in the pre-starter phase, and to 0.58% and 0.29% in the starter phase, since this reduction does not cause a negative effect on performance or bone mineralization of broilers in the evaluated periods.

Key Words: bone ash, enzyme, metabolism, nutritional requirements, performance

Introdução

As rações formuladas para aves são constituídas principalmente de alimentos de origem vegetal, cuja composição em fósforo é parcialmente armazenada na forma de fitato. Entretanto, o fósforo fítico presente no alimento praticamente não é aproveitado pelas aves devido à ausência da enzima fitase no seu trato digestório. Além disso, o fitato pode atuar como fator antinutricional, pois pode complexar-se com nutrientes da dieta formando complexos insolúveis e, conseqüentemente, diminuir a biodisponibilidade dos nutrientes (Ravindran et al., 1999). Diante disso, fitases têm sido adicionadas às rações de frangos de corte com o propósito de disponibilizar parte do fósforo fítico e aumentar o aproveitamento de nutrientes da dieta (Selle & Ravindran, 2007), melhoria relatada por Assuena et al. (2009), Nagata et al. (2009) e Lelis et al. (2010).

Trabalhos recentes comprovam que, com o uso da fitase, é possível reduzir os níveis de nutrientes nas rações mantendo satisfatoriamente o desempenho das aves e reduzindo a excreção de alguns elementos minerais (Gomide et al., 2007; Nagata et al., 2009). Entretanto, para aproveitar os benefícios que o uso da fitase pode trazer para a avicultura, torna-se necessária a revisão dos níveis de inclusão de nutrientes que, além do fósforo, são comprovadamente afetados com o uso dessa enzima como o cálcio, por exemplo. Portanto, este trabalho foi conduzido para avaliar os níveis de cálcio e fósforo disponível em rações com fitase para frangos de corte nas fases pré-inicial (1 a 7 dias) e inicial (8 a 21 dias de idade) em experimentos independentes.

Material e Métodos

Dois experimentos foram realizados no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em dois ensaios cada. O primeiro experimento foi conduzido com pintos de 1 a 7 dias de idade (fase pré-inicial) e constou de ensaio de desempenho (ensaio 1) e de metabolismo (ensaio 2). O segundo experimento foi realizado no período de 8 a 21 dias de idade (fase inicial) e também foi dividido em ensaio de desempenho (ensaio 3) e de metabolismo (ensaio 4). Ambos os experimentos foram conduzidos isoladamente, ou seja, com aves diferentes para evitar possíveis efeitos residuais de uma fase sobre a outra.

Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial $(3 \times 4) + 1$, sendo três níveis de fósforo disponível (Pdisp) e quatro níveis de cálcio mais uma ração controle sem fitase, à base de milho e farelo de soja, e formulada para atender às exigências nutricionais específicas de cada fase, segundo

as recomendações de Rostagno et al. (2005). As demais rações experimentais foram suplementadas com 500 unidades de atividade da fitase (ftu) Ronozyme P5000[®]/kg de ração. Os níveis de cálcio e Pdisp nas rações foram ajustados por redução/aumento do calcário e fosfato bicálcico e respectivas substituições por caulim.

Na fase pré-inicial (ensaio 1), 1.560 pintos machos Cobb-500 foram pesados e distribuídos nos boxes, em galpão convencional para frangos de corte, em 4 repetições de 30 aves para cada ração avaliada. As rações foram fornecidas no período de 1 a 7 dias de idade e continham três níveis de Pdisp (0,42; 0,37 ou 0,32%), quatro níveis de cálcio (0,94; 0,84; 0,74 ou 0,64%) e um nível de suplementação da fitase (500 ftu/kg de ração) (Tabela 1). A ração controle não foi suplementada com fitase e foi formulada com 0,47% de Pdisp e 0,94% de cálcio, sendo utilizada como padrão de comparação para as demais rações avaliadas neste período.

No ensaio 3, 1.300 pintos machos receberam ração padrão (mesma ração controle do ensaio) até os 7 dias de idade. No 7^o dia, os animais foram pesados e distribuídos nos boxes, em 4 repetições de 25 aves cada. As rações fornecidas durante o período de 8 a 21 dias de idade foram constituídas de três níveis de fósforo disponível (0,39; 0,34 ou 0,29%), quatro níveis de cálcio (0,88; 0,78; 0,68 ou 0,58%) e suplementadas com 500 ftu/kg (Tabela 2). As rações deste ensaio também foram comparadas a uma ração controle, sem fitase, contendo 0,44% de Pdisp e 0,88% de cálcio.

Nos dois ensaios, as aves tiveram livre acesso à água e às dietas experimentais. Aos 7 e aos 21 dias de idade, em cada ensaio de desempenho, as rações e as aves foram pesadas para determinação do consumo de ração, do ganho de peso e da conversão alimentar.

Ao final de cada período experimental, três aves com peso médio da repetição foram abatidas por deslocamento cervical para retirada da tíbia esquerda e posterior determinação das cinzas ósseas. As tíbias, previamente identificadas com placas de alumínio, foram totalmente descarnadas e separadas da cartilagem proximal e fíbula. A quantificação das cinzas ósseas consistiu da incineração das tíbias (desengorduradas com éter, moídas e homogeneizadas) por 6 horas a 600 °C para determinação da porcentagem do resíduo.

Os ensaios de metabolismo foram conduzidos simultaneamente aos de desempenho. As aves foram alojadas em sala de metabolismo com controle da temperatura e luz artificial por 24 horas. Foram utilizadas gaiolas de arame galvanizado, com dimensões de 50 × 50 × 50 cm, providas de bandeja coletora de excretas. Os bebedouros utilizados foram do tipo infantil e comedouro tipo calha com borda para evitar desperdício.

Tabela 1 - Composição percentual e nutricional das rações experimentais (1 a 7 dias)

Ingredientes (kg)	Nível de fósforo disponível (%)			
	0,42	0,37	0,32	
Nível de cálcio (%)				
	Controle ⁴	0,94/0,84/0,74/0,64	0,94/0,84/0,74/0,64	0,94/0,84/0,74/0,64
Milho	57,60	57,60	57,60	57,60
Farelo de soja	35,50	35,50	35,50	35,50
Óleo de soja	1,94	1,94	1,94	1,94
Sal	0,44	0,44	0,44	0,44
L-lisina HCL 99%	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-metionina 99%	0,36	0,36	0,36	0,36
Premix mineral ¹	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix vitamínico ²	0,05	0,05	0,05	0,05
Anticoccidiano ³	0,02	0,02	0,02	0,02
Calcário calcítico	0,83	1,00/0,75/0,50/0,25	1,16/0,91/0,66/0,41	1,32/1,07/0,82/0,57
Fosfato bicálcico	1,93	1,66	1,39	1,12
Caulim (inerte)	0,88	0,97/1,22/1,47/1,72	1,08/1,33/1,58/1,83	1,19/1,44/1,69/1,94
Fitase	0,00	0,01	0,01	0,01
Composição nutricional calculada				
Energia metabolizável (kcal/kg)	2951	2951	2951	2951
Proteína bruta (%)	22,50	22,50	22,50	22,50
Lisina digestível (%)	1,34	1,34	1,34	1,34
Metionina + cistina digestível (%)	0,94	0,94	0,94	0,94
Triptofano digestível (%)	0,18	0,18	0,18	0,18
Treonina digestível (%)	0,60	0,60	0,60	0,60
Arginina digestível (%)	1,09	1,09	1,09	1,09
Valina digestível (%)	0,74	0,74	0,74	0,74
Isoleucina digestível (%)	0,68	0,68	0,68	0,68
Leucina digestível (%)	1,44	1,44	1,44	1,44
Histidina digestível (%)	0,45	0,45	0,45	0,45
Fenilalanina digestível (%)	0,81	0,81	0,81	0,81
Fenilalanina + tirosina (%)	1,36	1,36	1,36	1,36
Glicina + serina total (%)	1,65	1,65	1,65	1,65
Sódio (%)	0,20	0,20	0,20	0,20
Cálcio (%)	0,94	0,94/0,84/0,74/0,64	0,94/0,84/0,74/0,64	0,94/0,84/0,74/0,64
Fósforo disponível (%)	0,47	0,42	0,37	0,32

¹ Conteúdo/kg de ração: zinco - 55 mg; ferro - 48 mg; cobre - 10 mg; manganês - 78 mg; iodo - 0,7 mg; selênio - 0,18 mg.

² Conteúdo/kg de ração: vit. B2 - 6 mg; vit. A - 15.000 UI; vit. D3 - 3.000 UI; vit. B1 - 3 mg; vit B6 - 6 mg; vit. B12 - 30 µg; biotina - 0,12 mg; ácido fólico - 1,5 mg; ácido pantotênico - 15 mg; vit. K - 34 mg; vit. E - 30 mg.

³ Salinomicina 20%.

⁴ Segundo Rostagno et al. (2005).

No ensaio 2, 780 pintos machos foram distribuídos em 6 repetições de 10 aves cada e receberam as rações experimentais utilizadas no período de 1 a 7 dias de idade. O ensaio 4 foi realizado com 6 repetições de 5 pintos cada, totalizando 390 aves, alimentadas com ração padrão até os 7 dias de idade e do 8^o ao 21^o dia, com as rações experimentais. A água e as rações foram fornecidas à vontade e a coleta total das excretas foi realizada uma vez por dia durante os três últimos dias de cada fase experimental, de acordo com metodologia descrita por Rodrigues et al. (2005).

As excretas foram coletadas diariamente, acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas em *freezer* até o final do período de coleta. Para isso, foram utilizadas bandejas coletoras forradas com plásticos resistentes. O consumo de ração de cada unidade experimental foi registrado e, ao final do período de coleta, as excretas foram descongeladas, pesadas, homogêneas

e secas em estufas de circulação de ar a 60 °C até peso constante. Em seguida, as amostras foram moídas e encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia (UFLA) para determinação dos teores de matéria seca, nitrogênio e energia bruta (AOAC, 2005).

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, os valores da energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMAn) das rações foram calculados de acordo com as fórmulas descritas por Matterson et al. (1965) e os coeficientes de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$CMMS (\%) = \frac{(MS \text{ ingerida} - MS \text{ excretada}) \times 100}{MS \text{ ingerida}}$$

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o pacote computacional Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas - SAEG (UFV, 1993). A análise de variância global

Tabela 2 - Composição percentual e nutricional das rações experimentais (8 a 21 dias)

Ingredientes (kg)	Nível de fósforo disponível (%)			
	Nível de cálcio (%)			
	0,39	0,34	0,29	
	Controle ⁴	0,88/0,78/0,68/0,58	0,88/0,78/0,68/0,58	0,88/0,78/0,68/0,58
Milho	61,25	61,25	61,25	61,25
Farelo de soja	32,75	32,75	32,75	32,75
Óleo de soja	1,95	1,95	1,95	1,95
Sal	0,41	0,41	0,41	0,41
L-lisina HCL 99 %	0,24	0,24	0,24	0,24
DL-metionina 99 %	0,25	0,25	0,25	0,25
Premix mineral ¹	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix vitamínico ²	0,05	0,05	0,05	0,05
Anticoccidiano ³	0,02	0,02	0,02	0,02
Calcário calcítico	0,79	0,96/0,70/0,45/0,20	1,11/0,86/0,61/0,36	1,28/1,03/0,78/0,53
Fosfato bicálcico	1,78	1,50	1,24	0,95
Caulim (inerte)	0,46	0,56/0,82/1,07/1,32	0,67/0,92/1,17/1,42	0,79/1,04/1,29/1,54
Fitase	0,00	0,01	0,01	0,01
Composição nutricional calculada				
Energia metabolizável (kcal/kg)	2996	2996	2996	2996
Proteína bruta (%)	20,90	20,90	20,90	20,90
Lisina digestível (%)	1,15	1,15	1,15	1,15
Metionina + cistina digestível (%)	0,81	0,81	0,81	0,81
Triptofano digestível (%)	0,22	0,22	0,22	0,22
Treonina digestível (%)	0,68	0,68	0,68	0,68
Arginina digestível (%)	1,27	1,27	1,27	1,27
Valina digestível (%)	0,85	0,85	0,85	0,85
Isoleucina digestível (%)	0,79	0,79	0,79	0,79
Leucina digestível (%)	1,65	1,65	1,65	1,65
Histidina digestível (%)	0,51	0,51	0,51	0,51
Fenilalanina digestível (%)	0,92	0,92	0,92	0,92
Fenilalanina + tirosina (%)	1,56	1,56	1,56	1,56
Glicina + serina total (%)	1,83	1,83	1,83	1,83
Sódio (%)	0,19	0,19	0,19	0,19
Cálcio (%)	0,88	0,88/0,78/0,68/0,58	0,88/0,78/0,68/0,58	0,88/0,78/0,68/0,58
Fósforo disponível (%)	0,44	0,39	0,34	0,29

¹ Conteúdo/kg de ração: zinco - 55 mg; ferro - 48 mg; cobre - 10 mg; manganês - 78 mg; iodo - 0,7 mg; selênio - 0,18 mg.

² Conteúdo/kg de ração: vit. B2 - 6 mg; vit. A - 15.000 UI; vit. D3 - 3.000 UI; vit. B1 - 3 mg; vit B6 - 6 mg; vit. B12 - 30 µg; biotina - 0,12 mg; ácido fólico - 1,5 mg; ácido pantotênico - 15 mg; vit. K3 - 4 mg; vit. E - 30 mg.

³ Salinomicina 20%.

⁴ Segundo Rostagno et al. (2005).

foi realizada com todas as dietas a fim de obter o quadrado médio do resíduo e testar o fatorial. A ração controle foi comparada a cada uma das demais rações pelo teste de Dunnett a 5%. Para comparação no esquema fatorial, utilizou-se o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para os níveis de Pdisp e modelos polinomiais para os níveis de cálcio.

Resultados e Discussão

Em comparação à dieta controle, no período de 1 a 7 dias, apenas as rações contendo 0,94% de cálcio e 0,32% de Pdisp tiveram efeito significativo ($P < 0,05$) no consumo de ração (Tabela 3), e os pintos alimentados com a dieta controle (0,94% de cálcio e 0,47% de Pdisp) os que consumiram mais ração. Em contrapartida, os outros parâmetros de desempenho avaliados não foram afetados pelos níveis dietéticos de fósforo disponível e cálcio.

Não houve interação ($P > 0,05$) dos níveis de fósforo disponível e cálcio da dieta para nenhuma das características de desempenho avaliadas. O nível de cálcio na dieta teve efeito quadrático ($P < 0,05$) sobre o consumo de ração, cujo maior valor foi estimado em uma ração contendo 0,73% de cálcio. Todavia, os níveis de cálcio não acarretaram diferenças no ganho de peso e na conversão alimentar. Os níveis de fósforo disponível avaliados não influenciaram ($P > 0,05$) nenhuma das características de desempenho. Os resultados de desempenho obtidos neste ensaio (1 a 7 dias) sugerem que a fitase (500 ftu/kg de ração) foi eficiente em liberar parte do fósforo fítico presente nas rações. Isso concorda com vários autores que relataram a ação benéfica dessa enzima sobre os grupamentos fíticos (Ravindran et al., 2000; Kornegay, 2001; Choct, 2006). Contudo, é importante ressaltar que a determinação das exigências de cálcio e Pdisp não deve ser estabelecida apenas com base nos

Tabela 3 - Desempenho de frangos de corte, no período de 1 a 7 dias de idade, alimentados com rações contendo fitase e diferentes níveis de fósforo disponível e cálcio

Fósforo disponível (%)	Consumo de ração (g)				Média
	Cálcio (%)				
	0,94	0,84	0,74	0,64	
0,42	147,0	152,1	155,8	155,9	152,7
0,37	146,4	153,4	155,0	149,9	151,2
0,32	145,2*	151,0	155,8	153,4	151,4
Média ¹	146,2	152,2	155,5	153,1	
Controle (0,94% de cálcio e 0,47% de fósforo disponível)					156,2
Fósforo disponível	NS				
Cálcio	P<0,05				
Fósforo disponível × cálcio	NS				
Coefficiente de variação (%)	3,74				
			Ganho de peso (g)		
			Cálcio (%)		
Fósforo disponível (%)	0,94	0,84	0,74	0,64	Média
0,42	120,3	124,0	127,6	123,7	123,9
0,37	118,8	124,6	121,6	123,3	122,1
0,32	118,9	120,0	125,5	122,9	121,8
Média	119,3	122,8	124,9	123,3	
Controle (0,94% de cálcio e 0,47% de fósforo disponível)					125,1
Fósforo disponível	NS				
Cálcio	NS				
Fósforo disponível × cálcio	NS				
Coefficiente de variação (%)	4,50				
			Conversão alimentar (g/g)		
			Cálcio (%)		
Fósforo disponível (%)	0,94	0,84	0,74	0,64	Média
0,42	1,223	1,228	1,222	1,261	1,233
0,37	1,232	1,232	1,269	1,216	1,237
0,32	1,221	1,259	1,244	1,249	1,243
Média	1,225	1,240	1,245	1,242	
Controle (0,94% de cálcio e 0,47% de fósforo disponível)					1,249
Fósforo disponível	NS				
Cálcio	NS				
Fósforo disponível × cálcio	NS				
Coefficiente de variação (%)	3,22				

* Difere do controle pelo teste de Dunnet (P<0,05).

¹ Y = 42,21 + 308,2X - 210,18X² (R² = 0,99).

NS = não-significativo (P>0,05).

resultados de desempenho, pois é preciso considerar também a adequada mineralização óssea.

Se comparadas à ração controle sem fitase, as rações avaliadas não acarretaram diferença significativa (P>0,05) na porcentagem de cinzas ósseas (Tabela 4). Estes resultados estão de acordo com os reportados por Qian et al. (1996) de que rações com baixo teor de fósforo disponível, suplementadas com fitase, proporcionaram desenvolvimento ósseo similar ao determinado nas aves que receberam ração contendo fósforo inorgânico.

Posteriormente, Qian et al. (1997) e Schoulten et al. (2003) concluíram que a fitase respondeu de forma satisfatória quando os níveis de cálcio e fósforo disponível na dieta foram reduzidos mantendo-se a relação cálcio:Pdisp de 2:1. Entretanto, a fitase avaliada neste trabalho mostrou-se

efetiva em ampla razão cálcio:Pdisp (variou de 1,52:1 na ração com 0,64% de cálcio e 0,42% de Pdisp até 2,94:1 na ração com 0,94% de cálcio e 0,32% de Pdisp). Contudo, a fitase utilizada por Qian et al. (1997) e Schoulten et al. (2003) pertence à classe 3-fitase E.C. 3.1.3.8 (produzida por *Aspergillus niger* modificado geneticamente pela adição do gene que codifica fitase de *A. ficuum*), enquanto a utilizada neste trabalho pertence à classe 6-fitase E.C. 3.1.3.26 (sintetizada pelo microrganismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado pela adição do gene do fungo *Peniophora lycii*). Segundo Vats & Banerjee (2004), esses dois tipos de fitases diferem-se na estrutura e propriedades físico-químicas, resultando em mecanismos de catálise distintos, provável explicação para as diferentes relação cálcio:Pdisp observadas entre as pesquisas.

Tabela 4 - Teor de cinzas nas tíbias de frangos de corte aos 7 dias de idade recebendo rações com fitase e diferentes níveis de fósforo disponível e cálcio

Fósforo disponível (%)	Teor de cinzas (%)				Média
	Cálcio (%)				
	0,94	0,84	0,74	0,64	
0,42	47,19	46,26	46,44	45,64	46,38A
0,37	46,65	46,72	45,68	45,06	46,03A
0,32	45,16	45,15	45,33	45,18	45,21B
Média	46,33	46,04	45,82	45,29	
Controle (0,94% de cálcio e 0,47% de fósforo disponível)					46,50
Fósforo disponível	P<0,01				
Cálcio	NS				
Fósforo disponível × cálcio	NS				
Coefficiente de variação (%)	2,01				

Médias com letras distintas, na coluna, diferem (P<0,05) entre si pelo teste SNK. NS = não-significativo (P>0,05).

Não houve interação dos níveis de Pdisp e cálcio da dieta (P>0,05) nem efeito dos níveis de cálcio isoladamente (P>0,05) sobre o teor de cinzas nas tíbias das aves. Entretanto, os níveis de Pdisp influenciaram (P<0,01) este parâmetro ósseo. O menor teor médio de cinzas óssea foi determinado nas aves alimentadas com rações contendo 0,32% de Pdisp. Portanto, embora não tenha comprometido o desempenho das aves de 1 a 7 dias (Tabela 3), o nível de Pdisp de 0,32% não deve ser utilizado nesta fase, pois reduziu o teor de cinzas ósseas. No nível de suplementação da fitase avaliado (500 ftu/kg de ração), a redução do Pdisp segura para manter o desempenho e a porcentagem de cinzas óssea até os 7 dias de idade é 0,37%. O nível cálcio, por sua vez, pode ser reduzido a 0,64%.

Os resultados deste trabalho corroboram os de Shoener et al. (1993), de que a exigência nutricional de cálcio e Pdisp para frangos pode ser reduzida com a suplementação da ração com fitase. Isto acarreta redução do custo da ração, uma vez que provoca diminuição no uso de fosfato, associado ao fato de que o preço das fitases comerciais tem diminuído com o passar do tempo, devido ao avanço da biotecnologia e ao aperfeiçoamento das técnicas de fermentação (Kornegay, 2001).

Nas rações com 0,84% de cálcio e níveis de 0,42% e 0,37% de Pdisp e aquelas com 0,74% de cálcio, em todos os níveis de Pdisp, o conteúdo de energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMAn) foi inferior ao da ração controle (P<0,05), embora esse menor valor energético não tenha influenciado o desempenho das aves até os 7 dias de idade (Tabela 5).

Houve interação (P<0,01) entre os níveis de Pdisp e cálcio para a EMAn. No nível de 0,94% de cálcio, o uso de 0,42% de Pdisp propiciou maior EMAn. Contudo, quando utilizado 0,84% de cálcio na ração, houve aumento da

EMAn com 0,32% de Pdisp. Observou-se efeito quadrático (P<0,01) dos níveis de cálcio para a EMAn em todos os níveis de Pdisp avaliados (0,42; 0,37 e 0,32%), com a menor EMAn estimada em 0,78% de cálcio.

Apenas a ração com 0,64% de cálcio e 0,32% de Pdisp apresentou CMMS inferior (P<0,05) à dieta controle. Por outro lado, as rações contendo 0,94% de cálcio apresentaram CMMS superior (P<0,05) à ração controle em todos os três níveis de Pdisp. Houve interação (P<0,01) dos níveis de Pdisp e cálcio para o CMMS. Ao reduzir o Pdisp para 0,32%, nos níveis de 0,94% e 0,84% de cálcio, houve aumento do CMMS. No nível de 0,64% de cálcio o uso de 0,37% de Pdisp acarretou maior CMMS.

Quando utilizados os níveis de 0,42 ou 0,37% de Pdisp, observou-se resposta quadrática (P<0,01) do CMMS aos níveis de cálcio da ração, de modo que o menor CMMS foi estimado no nível 0,72% de cálcio. Todavia, o nível de 0,32% de Pdisp teve efeito linear (P<0,01) no CMMS. De modo geral, a redução do cálcio diminuiu o CMMS e provavelmente o aumento do teor de caulim (material inerte) na ração contribuiu para esse resultado. Segundo Pucci et al. (2003), o caulim é indisponível para as aves e a quantidade consumida é posteriormente depositada nas excretas, causando aumento no teor de matéria seca das excretas e piora no CMMS.

Na fase de 8 a 21 dias de idade, o desempenho das aves que receberam dietas com fitase e reduzidos níveis de Pdisp e cálcio não diferiu (P>0,05) daquele registrado para as aves alimentadas com a dieta controle (Tabela 6).

Não houve interação (P>0,05) dos níveis de Pdisp e cálcio da dieta sobre o consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar. Além disso, os níveis desses minerais também não influenciaram (P>0,05), isoladamente, o desempenho das aves que receberam rações contendo

Tabela 5 - Energia metabolizável e coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca em rações de fase pré-inicial contendo fitase e diferentes níveis de fósforo disponível e cálcio

Fósforo disponível (%)	Energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (kcal/kg de MS) ¹				Média
	Cálcio (%)				
	0,94	0,84	0,74	0,64	
0,42 ²	2.910a	2.688*b	2.765*	2.825	2.797
0,37 ³	2.843b	2.652*b	2.707*	2.803	2.751
0,32 ⁴	2.831b	2.810a	2.742*	2.865	2.812
Média	2.861	2.717	2.738	2.831	
Controle (0,94% de cálcio e 0,47% de fósforo disponível)					2.882
Fósforo disponível	NS				
Cálcio	P<0,01				
Fósforo disponível × cálcio	P<0,01				
Coeficiente de variação (%)	1,76				
	Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (%)				
	Cálcio (%)				
Fósforo disponível (%)	0,94	0,84	0,74	0,64	Média
0,42 ⁵	71,56*ab	67,94b	67,89	67,71ab	68,78
0,37 ⁶	70,50*b	68,68b	67,96	68,34a	68,87
0,32 ⁷	72,10*a	70,13a	69,22	66,57*b	69,51
Média	71,39	68,92	68,36	67,54	
Controle (0,94% de cálcio e 0,47% de fósforo disponível)	68,65				
Fósforo disponível	NS				
Cálcio	P<0,01				
Fósforo disponível × cálcio	P<0,01				
Coeficiente de variação (%)	1,56				

* Difere do controle pelo teste de Dunnet (P<0,05).

Médias com letras distintas, na coluna, diferem (P<0,05) entre si pelo teste SNK.

¹ MS = matéria seca.

² 0,42% fósforo disponível. Energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (EMAn) = 6967,67 - 10961,2X + 7050,78X² (R² = 0,81).

³ 0,37% fósforo disponível. EMAn = 7093,98 - 11289,1X + 7187,34X² (R² = 0,91).

⁴ 0,32% fósforo disponível. EMAn = 5056,87 - 5763,46X + 3625,96X² (R² = 0,65).

⁵ 0,42% fósforo disponível. Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (CMMS) = 112,223 - 124,322X + 86,0275X² (R² = 0,93).

⁶ 0,37% fósforo disponível. CMMS = 96,9566 - 80,0393X + 55,2058X² (R² = 0,99).

⁷ 0,32% fósforo disponível. CMMS = 55,6921 + 17,4867X (R² = 0,97).

NS = não-significativo (P>0,05).

fitase. Estes resultados estão de acordo com o reportado por Viveros et al. (2002) de que a suplementação de fitase em rações com reduzidos níveis de cálcio e Pdisp também é efetiva em evitar queda no desempenho de frangos no período de 9 a 21 dias de idade. Posteriormente, Schoulten et al. (2003) e Silva et al. (2006) também verificaram efeito positivo da fitase sobre o desempenho de frangos de corte alimentados com rações deficientes em cálcio e Pdisp no período de 1 a 21 dias de idade.

De forma semelhante ao observado no ensaio de desempenho da fase pré-inicial, a fitase também foi eficiente em liberar fósforo fítico da ração da fase inicial em ampla relação cálcio:Pdip (variando de 1,49:1 na ração com 0,58% de cálcio e 0,39% de Pdisp até 3,03:1 na ração com 0,88% de cálcio e 0,29% de Pdisp). Essa característica catalítica é atrativa para os formuladores de rações, pois indica que a fitase avaliada neste trabalho pode ser adicionada em dietas para frangos de corte contendo diferentes relação cálcio:Pdip, pois não afeta o desempenho das aves no período de 1 a 21 dias de idade.

Em relação à ração controle, não houve diferença (P>0,05) no teor de cinzas para as demais dietas avaliadas (Tabela 7), semelhante aos resultados obtidos por Qian et al. (1996).

Entretanto, analisando-se o fatorial, houve interação (P<0,05) dos níveis de Pdisp e cálcio da dieta. Esta interação ocorreu quando a ração continha 0,88% de cálcio, e o menor teor de cinzas ósseas foi determinado quando se reduziu o Pdisp para 0,29%. Além disso, o teor de cinzas ósseas diminuiu linearmente (P<0,01) à medida que se elevou os níveis de cálcio das rações contendo 0,29% de Pdisp, corroborando os resultados descritos anteriormente por Qian et al. (1997).

De acordo com Schoulten et al. (2003), a deposição máxima de minerais nas tíbias de frangos aos 21 dias de idade é de 51,5% (em ração com 0,55% de cálcio), valor próximo ao determinado neste trabalho (48,63%) para a ração contendo 0,58% de cálcio.

Qian et al. (1997) avaliaram frangos de corte aos 21 dias de idade e concluíram que as aves alimentadas com rações à base de milho e farelo de soja contendo 0,71% de cálcio,

Tabela 6 - Desempenho de frangos de corte no período de 8 a 21 dias de idade alimentados com rações contendo fitase e diferentes níveis de fósforo disponível e cálcio

Fósforo disponível (%)	Consumo de ração (g)				Média
	Cálcio (%)				
	0,88	0,78	0,68	0,58	
0,39	1.108	1.141	1.144	1.154	1.137
0,34	1.120	1.132	1.118	1.145	1.129
0,29	1.109	1.154	1.137	1.139	1.134
Média	1.112	1.142	1.133	1.146	
Controle (0,88% de cálcio e 0,44% de fósforo disponível)					1.118
Fósforo disponível	NS				
Cálcio	NS				
Fósforo disponível × cálcio	NS				
Coefficiente de variação (%)	2,80				
Fósforo disponível (%)	Ganho de peso (g)				Média
	Cálcio (%)				
	0,88	0,78	0,68	0,58	
0,39	732	740	738	736	736
0,34	717	707	730	721	719
0,29	691	710	725	729	713
Média	713	719	731	729	
Controle (0,88% de cálcio e 0,44% de fósforo disponível)					715
Fósforo disponível	NS				
Cálcio	NS				
Fósforo disponível × cálcio	NS				
Coefficiente de variação (%)	4,41				
Fósforo disponível (%)	Conversão alimentar (g/g)				Média
	Cálcio (%)				
	0,88	0,78	0,68	0,58	
0,39	1,514	1,546	1,551	1,569	1,545
0,34	1,564	1,601	1,536	1,590	1,573
0,29	1,606	1,628	1,571	1,562	1,592
Média	1,561	1,592	1,553	1,574	
Controle (0,88% de cálcio e 0,44% de fósforo disponível)					1,564
Fósforo disponível	NS				
Cálcio	NS				
Fósforo disponível × cálcio	NS				
Coefficiente de variação (%)	3,55				

NS = não-significativo (P>0,05).

Tabela 7 - Teor de cinzas nas tíbias de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com rações contendo fitase e diferentes níveis de fósforo disponível e cálcio

Fósforo disponível (%)	Teor de cinzas (%)				Média
	Cálcio (%)				
	0,88	0,78	0,68	0,58	
0,39	48,10a	47,40	48,23	47,35	47,77
0,34	47,14ab	47,19	48,53	48,19	47,76
0,29 ¹	46,56b	48,23	48,13	48,63	47,89
Média	47,26	47,61	48,30	48,07	
Controle (0,88% de cálcio e 0,44% de fósforo disponível)					47,20
Fósforo disponível	NS				
Cálcio	P<0,01				
Fósforo disponível × cálcio	P<0,05				
Coefficiente de variação (%)	1,76				

Médias com letras distintas, na coluna, diferem entre si pelo teste SNK (P<0,05).

¹ Cinzas ósseas = 52,3708 - 6,14750X (R² = 0,75).

NS = não-significativo (P>0,05).

0,51% de fósforo total e 600 ftu/kg apresentaram a melhor mineralização óssea. Já Mitchell & Edwards (1996) avaliaram o efeito de rações à base de milho e farelo de soja (contendo 0,55% de fósforo total e 600 ftu/kg) sobre o teor de cinzas da tibia de frangos no período de 1 a 21 dias e concluíram que o teor de cinzas foi maior quando o cálcio da ração aumentou de 0,63 para 0,99%, resultados contrários ao obtido neste experimento.

Na fase inicial (8 a 21 dias de idade), no nível de 0,88% de cálcio, independentemente do nível de fósforo disponível, a ração com 0,78% de cálcio e 0,39% de Pdisp e a ração com 0,68% de cálcio e 0,34% ou 0,29% de Pdisp apresentaram EMAN superior à ração controle ($P < 0,05$), com incremento de até 4,73% na EMAN (Tabela 8).

Estes resultados são semelhantes aos descritos por Lan et al. (2002), que avaliaram os valores de EMA de rações à base de milho e farelo de soja com reduzido nível de fósforo e observaram que a utilização de fitase nos níveis de 250 e 500 ftu/kg proporcionou valores de EMA superiores aos encontrados em uma ração sem suplementação de fitase e com nível normal de fósforo.

Não houve interação ($P > 0,05$) entre os níveis de cálcio e de Pdisp para a EMAN. A EMAN respondeu de forma linear

aos níveis de cálcio da dieta ($P < 0,01$), apresentando melhora crescente conforme aumentaram os níveis de cálcio da ração. Por outro lado, os níveis de fósforo disponível da ração não influenciaram a EMAN ($P > 0,05$).

Apenas a ração com os maiores níveis de cálcio e Pdisp (0,88% e 0,39%, respectivamente) promoveu CMMS superior ao controle ($P < 0,05$). Não houve interação ($P > 0,05$) entre os níveis de cálcio e Pdisp para o CMMS, porém houve redução linear do CMMS ($P < 0,01$) com a diminuição dos níveis de cálcio e aumento do teor de caulim de maneira semelhante ao observado na fase pré-inicial deste trabalho. Estes resultados estão de acordo com os observados por Schoulten et al. (2003), que reduziram os níveis de cálcio (1,30; 1,09; 0,88; 0,67 e 0,46%) em rações suplementadas com 600 ftu/kg e observaram prejuízo na digestibilidade da matéria seca.

O nível de fósforo disponível também influenciou o CMMS ($P < 0,05$), cujo melhor resultado foi obtido no nível de 0,34% de Pdisp. Esses resultados diferem dos reportados por Ibrahim et al. (1999) e Silva et al. (2008), que reduziram o teor de Pdisp em dietas suplementadas com fitase e não verificaram efeito sobre os valores de EMAN e CMMS. De modo geral, a EMAN e os CMMS das aves alimentadas com níveis mais baixos de cálcio e Pdisp foram satisfatórios, não diferindo do

Tabela 8 - Energia metabolizável e coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca em rações contendo fitase e diferentes níveis de fósforo disponível e cálcio para frangos de corte na fase inicial

Energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio (kcal/kg de MS) ¹					
Fósforo disponível (%)	Cálcio (%)				Média
	0,88	0,78	0,68	0,58	
0,39	3.460*	3.405*	3.392	3.290	3.387
0,34	3.455*	3.392	3.420*	3.321	3.397
0,29	3.475*	3.332	3.402*	3.298	3.377
Média ²	3.463	3.376	3.405	3.303	
Controle (0,88% de cálcio e 0,44% de fósforo disponível)					3.318
Fósforo disponível	NS				
Cálcio	P<0,01				
Fósforo disponível × cálcio	NS				
Coeficiente de variação (%)	1,41				
Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca (%)					
Fósforo disponível (%)	Cálcio (%)				Média
	0,88	0,78	0,68	0,58	
0,39	76,31*	74,14	74,49	73,24	74,55 B
0,34	76,13	75,43	75,14	74,33	75,26 A
0,29	75,37	74,17	74,50	73,80	74,46 B
Média ³	75,94	74,58	74,71	73,79	
Controle (0,88% de cálcio e 0,44% de fósforo disponível)					74,24
Fósforo disponível	P<0,05				
Cálcio	P<0,01				
Fósforo disponível × cálcio	NS				
Coeficiente de variação (%)	1,59				

* Difere do controle pelo teste de Dunnet ($P < 0,05$).

Médias com letras distintas, na coluna, diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste SNK.

¹ MS = matéria seca.

² Energia metabolizável aparente corrigida pelo balanço de nitrogênio = $3056,78 + 452,445X$ ($R^2 = 0,77$).

³ Coeficiente de metabolizabilidade da matéria seca = $69,3241 + 7,32408X$ ($R^2 = 0,74$).

NS = não-significativo ($P > 0,05$).

controle. Embora tenha sido constatada redução linear da EMAn e CMMS em relação aos níveis de cálcio da ração, este efeito não foi suficiente para afetar o desempenho ou a mineralização óssea das aves no período de 8 a 21 dias.

Conclusões

Os níveis nutricionais de cálcio e fósforo disponível da ração de frangos de corte podem ser reduzidos, respectivamente, em até 0,64% e 0,37% para a fase de 1 a 7 dias e até 0,58% e 0,29% para a fase de 8 a 21 dias de idade se as rações forem suplementadas com fitase no nível de 500 ftu/kg de ração.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto; e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro por meio do Programa Pesquisador Mineiro (PPM).

Referências

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST - AOAC. **Official methods of analysis**. 18.ed. Maryland, 2005. 1094p.
- ASSUENA, V.; JUNQUEIRA, O.M.; DUARTE, K.F. et al. Effect of dietary phytase supplementation on the performance, bone densitometry, and phosphorus and nitrogen excretion of broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.11, n.1, p.25-30, 2009.
- CHOCT, M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, v.62, n.1, p.5-15, 2006.
- GOMIDE, E.M.; RODRIGUES, P.B.; FREITAS, R.T.F. 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**, v.36, n.6, p.1769-1774, 2007.
- IBRAHIM, S.; JACOB, J.P.; BLAIR, R. Phytase supplementation to reduce phosphorus excretion of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v.8, n.4, p.414-425, 1999.
- KORNEGAY, E.T. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. In: BEDFORD, M.R.; PATRIDGE, G.G. (Eds.) **Enzymes in farm animal nutrition**. Wallingford: CABI, 2001. p.237-271.
- LAN, G.Q.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. et al. Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacterial culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. **Poultry Science**, v.81, n.10, p.1522-1532, 2002.
- LELIS, G.R.; ALBINO, L.F.T.; SILVA, C.R. et al. Suplementação dietética de fitase sobre o metabolismo de nutrientes de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p.1768-1773, 2010.
- MATTERSON, L.D.; POTTER, L.M.; STUTZ, N.W. et al. **The metabolizable energy of feed ingredients for chickens**. Storrs: University of Connecticut, 1965. v.11, p.11. (Agricultural Experiment Station Research Report).
- MITCHELL, R.D.; EDWARDS JR., H.M. Effects of phytase and 1,25-Dihydroxycholecalciferol on phytate utilization and quantitative requirement for calcium and phosphorus in young broiler chickens. **Poultry Science**, v.75, n.1, p.95-110, 1996.
- NAGATA, A.K.; RODRIGUES, P.B.; RODRIGUES, K.F. 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**, v.33, n.2, p.599-605, 2009.
- PUCCI, L.E.A.; RODRIGUES, P.B.; FREITAS, R.T.F. et al. Níveis de óleo e adição de complexo enzimático na ração de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.4, p.909-917, 2003.
- QIAN, H.; KORNEGAY, E.T.; DENBOW, D.M. Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium:total phosphorus ratio in broiler diets. **Poultry Science**, v.76, n.1, p.37-46, 1997.
- QIAN, H.; VEIT, H.P.; KORNEGAY, E.T. et al. Effects of supplemental phytase and phosphorus on histological and other tibial bone characteristics and performances of broilers fed semi-purified diets. **Poultry Science**, v.75, n.5, p.618-626, 1996.
- RAVINDRAN, V.; CABAHUG, S.; RAVINDRAN, G. et al. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. **Poultry Science**, v.78, n.5, p.699-706, 1999.
- RAVINDRAN, V.; CABAHUG, S.; RAVINDRAN, G. et al. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolizable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. **British Poultry Science**, v.41, n.2, p.193-200, 2000.
- RODRIGUES, P.B.; MARTINEZ, R.S.; FREITAS, R.T.F. et al. Influência do tempo de coleta e metodologias sobre a digestibilidade e o valor energético de rações para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.3, p.882-889, 2005.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 186p.
- SCHOULTEN, N.A.; TEIXEIRA, A.S.; FREITAS, R.T.F. et al. Níveis de cálcio em rações de frangos de corte na fase inicial suplementadas com fitase. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.5, p.1190-1197, 2003.
- SCHONER, F.J.; HOPPE, P.P.; SCHWARZ, G. et al. Comparison of microbial phytase and inorganic phosphate in male chickens – The influence on performance data, mineral retention and dietary calcium. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.69, n.5, p.235-244, 1993.
- SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v.135, n.1/2, p.1-41, 2007.
- SILVA, Y.L.; RODRIGUES, P.B.; FREITAS, R.T.F. 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**, v.37, n.3, p.469-477, 2008.
- SILVA, Y.L.; RODRIGUES, P.B.; FREITAS, R.T.F. et al. Redução de proteína e fósforo em rações com fitase para frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade. Desempenho e teores de minerais na cama. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.840-848, 2006.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 5.0. Viçosa, MG, 1993. 59p.
- VATS, P.; BANERJEE, U.C. Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n.1, p.3-14, 2004.
- VIVEROS, A.; BRENES, A.; ARIJA, I. et al. Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broiler chicks fed different levels of phosphorus. **Poultry Science**, v.81, n.8, p.1172-1183, 2002.