

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**DEPOSIÇÃO MINERAL ÓSSEA EM FRANGOS DE CORTE
SUPLEMENTADOS COM FITASE DE *Citrobracter braakii***

DANIEL LUIS ANSCHAU
Zootecnista/UFSM

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Zootecnia

Área de Concentração Produção Animal Nutrição de Não-ruminantes

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Anschau, Daniel
Deposição mineral óssea em frangos de corte
suplementados com fitase / Daniel Anschau. -- 2015.
67 f.

Orientador: Sergio Vieira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2015.

1. fitase. 2. frango de corte. 3. enzima. 4.
Citrobacter braakii. 5. mineral. I. Vieira, Sergio,
orient. II. Título.

DANIEL LUIS ANSCHAU
Zootecnista

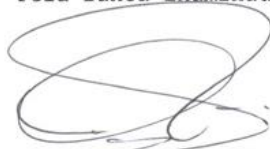
DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

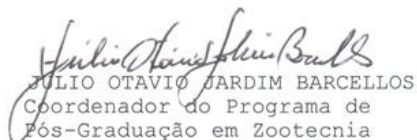
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 13.05.2013
Pela Banca Examinadora



SÉRGIO LUIZ VIEIRA
PPG ZOOTECNIA/UFRGS
Orientador

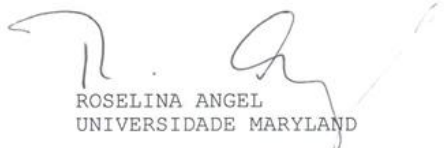
Homologado em: 17.09.2015
Por



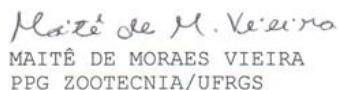
JULIO OTAVIO JARDIM BARCELLOS
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



LIRIS KINDLEIN
PPG VETERINÁRIA/UFRGS



ROSELINA ANGEL
UNIVERSIDADE MARYLAND



MAITÉ DE MORAES VIEIRA
PPG ZOOTECNIA/UFRGS



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

A minha família, aos meus pais, minha irmã por sempre estarem presentes na minha vida, me incentivando a seguir em frente.

A minha namorada Ana Gabriela, companheira e motivadora, que esteve presente em todos os bons e maus momentos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao carinho, educação, confiança, e dedicação de meus pais, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao meu amor Ana Gabriela Cavalheiro que é essencial na minha vida e o motivo pelo qual luto todos os dias, na tentativa de alcançar nossos sonhos.

Agradeço a meu orientador Professor Dr. Sergio Luiz Vieira, pela oportunidade de trabalho e pelos dois anos de convívio, tempo este, muito produtivo para meu crescimento técnico e teórico. Levarei para o campo profissional seu exemplo de liderança, obstinação e caráter.

Obrigado a UFRGS e ao Dep. de Zootecnia por toda qualidade e incentivo oferecido aos pós-graduandos.

Aos colegas do Aviação de Ensino e Pesquisa, que fizeram parte da minha passagem, e que colaboraram com meu trabalho e que me passaram muitos ensinamentos técnicos e de alguma forma equilíbrio emocional: André Favero, Diogo, Rafael Barros, Vanessa, Franciele Bess, Daniel Miranda, Liliane Borsatti, Rafael Abs, Henrique Cemin, Natacha Mascarello, Fúlvio, Natália Serafini, Guilherme Gehrardt, Silvana Rauber, Heitor Rios, Patricia Soster, Samanta Prunier, Raquel Galon e Daniel Goldenberg (membro ilustre).

Agradeço aos meus amigos que me deram muita força para estar aqui, em especial Jean Victor Savian. A minha família que está concentrada nas cidades de Cerro Largo/RS, Santa Maria/RS e Santo Augusto/RS.

E por fim, agradeço a Deus, que permitiu minha caminhada até aqui e que com certeza continuará a guiar meus passos por toda minha jornada.

DEPOSIÇÃO MINERAL ÓSSEA EM FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM FITASE DE *Citrobracter braakii*¹

Autor: Daniel Luis Anschau

Orientador: Sergio Luiz Vieira

Resumo: O fitato é um fator antinutricional conhecido que indisponibiliza a maior parte do fósforo (P). Fitases exógenas hidrolisam o fitato ofertando parcialmente o P desta molécula. Este trabalho teve por objetivo investigar a suplementação alimentar de uma fitase expressa pela bactéria *Citrobracter braakii* com diferentes níveis de Ca e P sobre o desempenho zootécnico, características esqueléticas e digestibilidade de Ca e P para frangos de corte. Foram utilizados 350 frangos machos, Cobb 500, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado em gaiolas composto por 7 tratamentos com 10 repetições de 5 aves cada. Uma dieta controle com 0,42 % de P disponível (Pd) e 0,84 % de Ca, e com reduções graduais de 0,32 %, 0,26 %, 0,20 %, 0,14 % de Pd e 0,80 % de Ca foram formuladas. A adição de fitase foi de (500 e 1.000 FTU / kg, respectivamente), em dietas de níveis deficientes de Pd. Coletas de tíbia, fêmur, e dedo médio direito, bem como do conteúdo ileal foram realizadas. As inclusões de fitase resultaram em melhoria no desempenho zootécnico, sendo que a adição no nível de 1000 FTU foi superior para todas as respostas medidas. Valores de equivalência para adição da fitase foram estimados por equação de regressão com níveis de Pd respectivamente de 0,094 % para (ganho de peso - GP), 0,137 % para (conversão alimentar - CA), 0,098 % (cinza da tíbia), 0,104 % (cinza do fêmur), 0,083 % (cinza do dedo médio), respostas para Ca de 0,094 %; 0,145 %; 0,084 % para (tíbia, fêmur e dedo médio) e respostas de P de 0,102 %; 0,111 %; 0,077 % para (tíbia, fêmur e dedo médio) para 500 FTU/Kg, e de 0,143 % (GP), 0,156 % (CA), 0,168 % (cinza da tíbia), 0,160 % (cinza do fêmur), 0,165 % (cinza do dedo médio), respostas para Ca de 0,172 %; 0,163 %; 0,195 % para (tíbia, fêmur e dedo médio) e respostas para P de 0,173 %; 0,157 %; 0,158 % para (tíbia, fêmur e dedo médio) para 1000 FTU/Kg.

Palavras-chave: *Citrobracter braakii*, fitase, frango de corte.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Nutrição Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (69p.), Maio, 2013.

BONE MINERAL ACCRETION IN BROILERS SUPPLEMENTED WITH PHYTASE *Citrobracter braakii*¹

Author: Daniel Luis Anschau

Adviser: Sergio Luiz Vieira

Abstract: The anti-nutritional factor phytate is known that most indisponibiliza phosphorus (P). Exogenous phytase hydrolyzes the phytate P offering part of this molecule. This study aimed to investigate the dietary supplementation of a phytase expressed by bacteria *Citrobracter braakii* with different levels of Ca and P on the performance, features and skeletal digestibility of Ca and P for broilers. We used 350 male chickens, Cobb 500, distributed in a completely randomized design in cages composed of seven treatments with 10 replicates of 5 chicks each. A control diet with 0.42% available P (Pd) and 0.84% Ca, and gradual reductions of 0.32%, 0.26%, 0.20%, 0.14% and Pd 0 80% Ca were formulated. The addition of phytase of (500 to 1000 FTU / kg, respectively) in diets deficient levels of Pd. Collections of the tibia, femur, and right middle finger, and the ileal content were performed. The inclusions phytase resulted in improvement in the performance, with the addition of 1000 FTU level was higher for all responses measured. Equivalency values for phytase addition were estimated by regression equation with phosphorus levels respectively to 0.094% (weight gain - GP) to 0.137% (feed - CA), 0.098% (gray tibia), 0.104% (gray femur), 0.083% (gray middle finger), responses to Ca 0.094%, 0.145%, 0.084% for (tibia, femur and middle finger) and answers P 0.102%, 0.111%, 0.077% for (tibia, femur and middle finger) to 500 FTU / kg, and 0.143% (GP), 0.156% (CA), 0.168% (gray tibia), 0.160% (gray femur), 0.165% (gray finger average), responses to Ca 0.172%, 0.163%, 0.195% for (tibia, femur and middle finger) and responses to P of 0.173%, 0.157%, 0.158% for (tibia, femur and middle finger) to 1000 FTU / Kg

Key words: *Citrobracter braakii*, phytase, broilers.

¹ Dissertação Masters in Animal Sciences - Animal Nutrition, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (69p.), March, 2013.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	9
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1.2 HIPÓTESES DE ESTUDO.....	11
1.3 OBJETIVOS.....	11
1.4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1.4.1 Ácido Fítico.....	12
1.4.2 Presença de fitato e ação da fitase.....	13
1.4.3 Classificação de 3-fitase e 6-fitase.....	17
CAPÍTULO II.....	19
2.1 INTRODUCTION.....	22
2.2 MATERIALS AND METHODS.....	23
2.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	26
2.4 CONCLUSION.....	28
2.5 REFERENCES.....	28
CAPÍTULO III.....	37
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
5 APÊNDICES.....	43
6 VITA.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descrição
%	Percentual
°C	Grau Célsius
CA	Conversão Alimentar
Ca	Cálcio
CP	Tratamento controle
CR	Consumo de Ração
CV	Coeficiente de variação
D	dia(s)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EB	Energia bruta
EC	European commission
EM	Energia metabolizável
FES	Fermentação Estado Sólido
FTU	Unidades de fitase
G	grama (s)
GP	Ganho de peso
Kg	Kilograma
m ²	Metro quadrado
Mm	Micromol
MS	Matéria seca
P	Fósforo
PB	Proteína bruta
Pd	Fósforo disponível
pH	Potencial de hidrogênio
SmF	Fermentação submersa
SSF	Fermentação em estado sólido

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A avicultura de corte é uma atividade de interesse zootécnico que evoluiu muito nos últimos anos, grande parte dessa evolução se deve ao melhoramento genético e melhores condições ambientais de criação das aves. Esse maior desenvolvimento da atividade vem chamando atenção dos ambientalistas e nutricionistas, principalmente no sentido de minimizar as quantidades de nutrientes excretados por essas aves, que são consideradas como a segunda que mais atinge o meio ambiente, ficando atrás apenas da suinocultura.

Devido ao acelerado ganho de peso, as aves tornam-se dependentes de uma estrutura óssea que suporte uma maior massa corporal, sendo com isso fundamental a suplementação de minerais que atendam às necessidades nutricionais, principalmente de Ca e P, que são os principais constituintes ósseos. Assim, a deficiência desses minerais, principalmente nas fases iniciais, está diretamente correlacionada à má formação óssea, comprometendo todo o processo de produção, levando a prejuízos econômicos, devido ao aumento das taxas de descarte em abatedouros por fraturas durante o carregamento.

Em meio a grande concorrência no mercado de produção da carne de frangos de corte, a suplementação de fitase ligada à redução da suplementação de P talvez possa ser uma estratégia nutricional interessante. Entretanto, apesar dos inúmeros fatores envolvidos, talvez os resultados encontrados nesse estudo e em recentes publicações nacionais e internacionais possam ser indícios de que a atenção dos nutricionistas deva se voltar a agressivas reduções do nível de fósforo.

Dentre as enzimas exógenas, a fitase é a de maior uso e possibilita o aproveitamento parcial do fósforo (P) fítico presente nos vegetais. A redução da suplementação de P inorgânico com a adição de fitase proporciona redução significativa dos custos de alimentação.

Pode-se considerar que a fitase na produção atual do frango, é considerada como uma excelente ferramenta no aproveitamento não só do fósforo, mas também de outros nutrientes. Entretanto, os benefícios da sua utilização dependem de uma série de fatores, dentre eles, o nível de Ca e P suplementado, a concentração de cada enzima, a origem da enzima (fúngica, bacteriana, leveduras), entre outros.

O P é um mineral essencial para os animais e vegetais, pois desempenha importantes funções no metabolismo. Aproximadamente, 98 % do Ca total do organismo e 80% do P estão presentes nos ossos (Andriquetto, 1884). Nos vegetais em torno de dois-terços do P encontrado está sob a forma de fitato (Denbow et al., 1995).

Apesar de ter sido descoberta em 1907 por Suzuki et al, apenas em 1968 Nelson et al, foram os primeiros a adicionar fitase em rações de frangos de corte. O custo das fontes de P, como fosfato bicálcico, tem crescido sistematicamente, isto aumenta e competitividade das fitases mais comuns nas rações para aves e suínos.

Entretanto, somente no final da década de 1980 a produção de fitase atingiu escala comercial. Atualmente a fitase é produzida, a partir de

vários microorganismos através de fermentações simples ou por meio de técnicas de recombinação do DNA, estas últimas popularmente conhecidas por fitases de terceira geração.

O presente trabalho foi conduzido com a adição de uma fitase de *Citrobacter braakii*, origem bacteriana, raras informações citam como uma espécie anteriormente chamado (*Citrobacter genomospecies 6*) encontrada na urina humana, fezes, e feridas, de outros animais e em alimentos (Brenner et al. 1993). Esta é ativa na faixa de pH de 2,0 a 7,0, com o ótimo em 4,5.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação de fitase de *Citrobacter braakii* em dietas milho – soja de forma a estabelecer um valor de equivalência de Pd quando esta enzima é usada nas concentrações de 500 e 1000 FTU's em frangos de corte até 25 dias de idade.

1.2 HIPÓTESES DE ESTUDO

- I. A adição da fitase de *Citrobacter braakii* em rações melhora o desempenho zootécnico e aumenta a disponibilidade de Ca e P em frangos de corte de 7 a 25 dias de idade;
- II. As respostas zootécnicas, digestibilidade de Ca e P, e mineralização esquelética de frangos de corte melhoram seus resultados quando aumentam de 500 FTU/Kg e 1000 FTU/Kg.

1.3 OBJETIVOS

- I. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão da enzima fitase bacteriana oriunda de *Citrobacter braakii* em dietas a base de farelo de soja e milho, sobre o desempenho zootécnico, mineralização dos ossos de frangos de corte.
- II. Estabelecer o valor de equivalências de Pd.

1.4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.4.1 Ácido Fítico

Ácido fítico ou *myo*-inositol hexafosfato ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) é um componente natural das sementes, constituindo de até 3 % do peso nas leguminosas e cereais, o que responde por 60 a 90 % do fósforo total (O'dell et al., 1972).

A quantidade de fitato é variável em função da espécie, idade e estágio de maturação e cultivar vegetal, clima, disponibilidade de água, grau de processamento e quantidade de fósforo no solo, o qual a planta absorve e armazena complexando-o com o inositol para formar o ácido fítico (Asada & Kasai, 1962).

O ácido fítico é uma estrutura, formada, por seis grupos fosfatos ligados a uma molécula com seis carbonos (Figura 1). Em pH neutro cada grupo fosfato apresenta um ou dois átomos de oxigênio carregados negativamente, conseqüentemente vários cátions podem ser fortemente quelatados entre dois grupos fosfatos ou fracamente com um grupo fosfato. Estes cátions, uma vez ligados à molécula do ácido fítico, tornam-se indisponíveis para serem absorvidos no intestino de aves e suínos (Silva, 2004).

Os complexos ácido fítico-mineral-proteína são de difícil digestão, reduzindo assim a utilização dos mesmos, e podem ser formados na porção inicial do trato gastrointestinal. Vários estudos demonstraram que proteínas da soja, milho, trigo, semente de colza, farelo de girassol e de arroz formam complexos com ácido fítico (Ravindran et al., 1999).

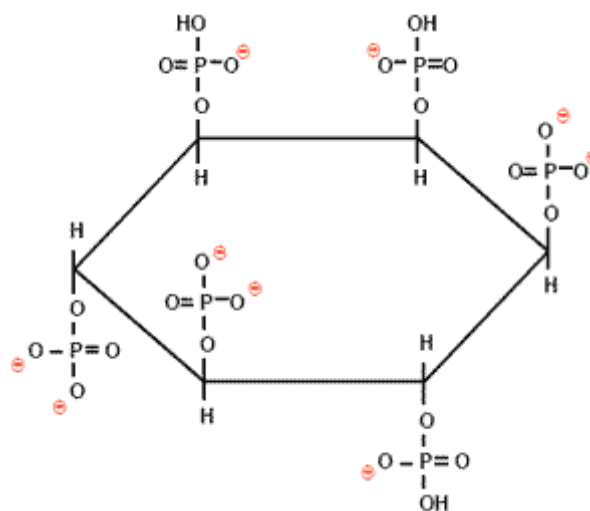


Figura 1 – Representação da molécula de fitato com os seis íons fosfato ligados a cada um dos seis carbonos do anel de inositol.

Fonte: www.engormix.com.br

1.4.2 Presença de fitato e ação da fitase

Três terminologias são utilizadas para descrever o substrato da enzima fitase: ácido fítico, fitato e fitina. O ácido fítico é a forma livre do mio-inositol hexakisfosfato, usualmente abreviado como IP6. O fitato é a forma aniônica do IP6, encontrado nas plantas. O termo fitina refere-se especificamente aos complexos de IP6 com potássio, magnésio e cálcio e podem estar ligado a proteínas e amidos (Angel et al., 2002; Selle & Ravindran, 2007).

A enzima fitase pode ser produzida por microorganismos como fungos, bactérias e leveduras. Como suplemento de enzima exógena em dietas esta é obtido usando cultura de microorganismos simples, ou através de técnicas de recombinação de DNA. Este processo envolve fermentação, extração, separação e muitas vezes a purificação do produto (Sebastian et al., 1998).

A tecnologia para a produção de enzimas exógenas para frangos de corte evoluiu muito, tanto referente às técnicas de obtenção, quanto à engenharia genética. Isso permitiu que fosse possível produzir enzimas a partir de microrganismos geneticamente modificados. Os métodos mais usuais para obtenção de fitase são por fermentação em estado sólido (SSF) e fermentação submersa (SmF). Silva et al., (2010) citam que os processos de produção primeiramente utilizavam o método de fermentação submersa, mas atualmente a fermentação no estado sólido vem sendo mais usual, em função dos bons rendimentos apresentados.

Em geral as fitases são mais potentes e estáveis em uma faixa de pH 2,5 a 5,5, faixa maior comparada com as fitases que ocorrem nas plantas (5 a 6,5). A atividade da fitase é expressa em unidade total de fitase ou FTU, que é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 micromol de fitato de fósforo inorgânico por minuto, proveniente de 1,5 mM de fitato de sódio em pH 5,5 à temperatura de 37°C. Sua atividade máxima, segundo Jongbloed et al. (1992), ocorre no estômago e na porção inicial do intestino delgado. A matriz nutricional da fitase é a quantidade de nutrientes liberados do ácido fítico contido nos ingredientes de origem vegetal quando a mesma é adicionada à dieta, pois as enzimas não possuem valor por si só, na verdade, elas atuam sobre os componentes da dieta (Dari, 2004).

A produção animal moderna vem sofrendo pressões crescentes com relação ao impacto no meio-ambiente. No ano de 2000 a Comunidade Européia implementou a diretiva 96/61/EC, que regulamenta o controle integrado de prevenção e controle da poluição ambiental (European Commission, 2010). A partir desta diretiva, as grandes integrações de aves e suínos só poderão emitir poluentes na água e no solo dentro de um limite máximo. Esta condição muitas vezes limita a expansão de uma empresa em determinadas regiões. Com isto, quanto menor a emissão de nutrientes não digeridos pelos animais, mais animais por m² poderão ser alojados.

A redução da suplementação de P inorgânico com o aumento de uso do P fítico pelo animal proporciona redução significativa dos custos de alimentação e pode resultar na diminuição de 20 a 30% na excreção do fósforo (Simons et al., 1990).

A digestibilidade ou retenção do P fítico da dieta com ou sem adição da fitase tem sido calculada mediante mensuração do teor do P na dieta e na excreta, e também, através da quantificação do fósforo presente em ossos, mais especificamente na tíbia e no fêmur.

Por outro lado, Snow et al. (2003), avaliando o efeito da fitase na digestibilidade de aminoácidos em aves de 78 semanas de idade alimentadas com três diferentes dietas baseadas em milho e farelo de soja; milho, farelo de soja e farinha de osso, farelo de soja e trigo, observaram que o efeito significativo sobre a digestibilidade ileal de aminoácidos dependeu também do tipo da dieta.

Qian et al. (1997), em experimento com frangos de corte de 1 a 21 dias de idade, alimentados com ração à base de milho e farelo de soja com 0,51% de fósforo total e suplementada com 600 FTU por kg, mostraram que a elevação da relação Ca:P da ração de 1,1:1 a 2,0:1 reduziu linearmente o ganho de peso, afetou de forma quadrática a deposição de cinzas, reduziu a absorção de fósforo e cálcio. Também a atividade da fitase foi reduzida linearmente, à medida que se elevou o nível de cálcio da ração com o mesmo nível de P total. Os níveis de P e Ca devem ser incluídos em níveis inferiores quando a fitase for empregada durante a formulação, para que não ocorra uma redução acentuada do efeito da fitase (Leeson, 1999). Aves consumindo rações com baixos níveis de fósforo e cálcio possui maior capacidade para hidrolizar o fitato do que aquelas que receberam níveis altos (Denbow et al., 1995).

Schoner et al. (1993), alimentando frangos de corte com dietas à base de milho e farelo de soja, deficientes em P (0,35%), com níveis crescentes de Ca (0,6; 0,75 e 0,9%), suplementados com 125, 250, 500 ou 1500 FTU/kg de fitase e P inorgânico da fonte fosfato monocálcio (0,6; 1,2 e 1,8% de P total), observaram um aumento no ganho de peso, consumo de ração e retenção de Ca e P quando a fitase ou o P inorgânico foram adicionados. A utilização do P do fitato foi significativamente aumentada pela fitase. A utilização de P do fosfato monocálcio aumentou após 14 dias e o P liberado pela fitase reduziu entre 14 e 40 dias. A utilização do Ca foi aumentada pela fitase e pelo P inorgânico. Os tratamentos com fitase contendo altos níveis de Ca nas dietas tiveram efeitos negativos significativos na utilização do P, P do fitato e Ca. Nos tratamentos de P inorgânico, os níveis de Ca afetaram somente a utilização de Ca, P e P do fitato após 14 dias. Usando como critério o ganho de peso e a retenção de P, concluíram que os resultados com P equivaleram a fitase.

Fritts & Waldroup (2006) testaram o fornecimento de vários níveis de Pd em 4 fases de alimentação (1 a 14, 14 a 35, 35 a 42 e 42 a 56 dias) com ou sem suplementação da fitase e concluiu que a suplementação enzimática das dietas aumentou o teor de cinzas nos ossos, permitiu também que mesmo com níveis reduzidos de cálcio e fósforo as aves tivessem um bom desempenho zootécnico e um adequado desenvolvimento do esqueleto. O autor também observou que diminuindo os níveis de P na dieta foi possível diminuir a taxa de P solúvel na cama e a suplementação com fitase não aumentou essa taxa.

Santos et al. (2004) estudaram a inclusão de níveis crescentes de farelo de arroz com redução nos níveis de Ca e P utilizando um complexo enzimático nas dietas, o autor observou que a diminuição dos níveis de Ca e P com suplementação enzimática não prejudicou o desempenho zootécnico.

Tejedor et al. (2001) estudaram o efeito de 3 diferentes fitases frente a 2 níveis de Ca e Pd. O autor observou que a diminuição dos níveis de Ca e P não afetou o ganho de peso e a conversão alimentar, mesmo com a melhora observada nos coeficientes de digestibilidade da matéria seca, proteína bruta, cálcio, fósforo e energia digestível ileal aparente nas rações com níveis normais de Ca e P.

Conduzindo um experimento com frangos de corte na fase de 1 a 49 dias de idade, Fernandes et al. (2003) adotaram uma matriz nutricional de fitase no nível de 500 FTU/kg de ração em rações à base de milho e sorgo e constataram que os níveis nutricionais adotados nas dietas com fitase, dentro da equivalência nutricional proposta, proporcionaram resultados de desempenhos iguais aos do tratamento controle.

Além de disponibilizar P e outros minerais a fitase tem sido citada como capaz de liberar outros nutrientes quelatados ao fitato, como aminoácidos, particularmente a treonina, a Proteína Bruta e Energia (Rutherford et al., 2004).

Os nutricionistas podem formular as rações com menores níveis nutricionais sem que ocorra prejuízo zootécnico, pois devido a essa melhora na disponibilidade dos nutrientes com a quebra da molécula de fitato a exigência nutricional dos animais continua sendo atendidas. Shelton et al. (2004), avaliando a matriz nutricional de uma fitase comercial em dietas a base de milho e farelo de soja, observaram que foi possível considerar a matriz completa da enzima, incluindo aminoácidos e energia, sem prejudicar o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. Em trabalho realizado por Payne et al. (2005), avaliando duas enzimas comerciais na forma líquida e sólida, com três diferentes níveis de inclusão, não observaram diferenças no desempenho em relação as fontes de fitase utilizadas e observaram melhora a medida que a inclusão de fitase aumentava; foram realizados 3 experimentos onde os níveis de suplementação variavam de 100 a 750 FTU/kg de alimento.

Fernandes (2002), utilizando 500 FTU/kg de fitase nas rações de frangos de corte alimentados com sorgo e milho, observou que a fitase foi capaz de aumentar a disponibilidade do P fítico, proteína, aminoácidos e energia.

Na mesma linha, Santos (2005), trabalhando com frangos de corte de 14 dias de idade, utilizando 500 e 750 FTU de fitase em dietas nutricionalmente deficientes, relata que essa adição permite restaurar o valor nutricional da dieta, indicado pelo aumento da digestibilidade dos nutrientes como minerais e aminoácidos com a adição da enzima.

Parece que os benefícios da liberação do P e dos aminoácidos são totalmente previsíveis com o uso de uma fitase. Porém, deve-se salientar que os produtos disponíveis no mercado têm características bastante distintas, ou seja, as enzimas são produzidas de forma distinta,

atuam de forma desigual, em pH diferentes, produzindo resultados também desuniformes na utilização da fitase pra degradação do fitato.

Bedford (2000) afirma que a atividade da fitase pode variar devido a diversos fatores, incluindo os ingredientes usados, a fonte de fitase, a idade dos animais, conteúdo de cálcio na dieta, fósforo e vitamina D, e o nível de atividade de fitase presente nos ingredientes usados.

A habilidade de uma enzima de resistir a diferentes temperaturas pode ser aumentada com tecnologia de recobrimento, através de uma cobertura hidrofóbica colocada sobre a enzima, que a protege das condições adversas da peletização (Wilson & Ward, 2002). Já segundo Igsaban (2000) as fitases bacterianas apresentam maior estabilidade térmica e maior estabilidade à ação proteolítica em relação às fitases fúngicas. O acesso das fitases exógenas aos cristais de fitina na célula da planta dependerá da resistência deste material à digestão que, por sua vez, dependerá da solubilização desse composto em ambiente ácido. É crítico que o fitato seja solubilizado principalmente em regiões ácidas como o estômago, pois algumas fitases possuem limitações para se manter estáveis em ambiente gástrico e com isso ao chegar na região média do intestino delgado em uma forma mais reativa, o fitato quelata os minerais, especialmente o Ca (Tamim et al., 2004).

Relação Cálcio e Fósforo para maximizar a eficiência da fitase

Tanto o nível de Ca como o de P na ração para frangos influenciam a utilização do fósforo fítico (Edward Jr & Veltmann, 1983; Ballam et al., 1984).

Sebastian et al. (1997) observaram bons resultados da fitase em dietas com níveis baixos de P e Ca. Mas, quando apenas o nível de P foi limitante e o nível de Ca estava adequado, a fitase não foi eficiente em melhorar o desempenho das aves.

Aves consumindo rações com baixos níveis de P e Ca possuem maior capacidade para hidrolizar o fitato do que aquelas que receberam níveis altos (Denbow et al., 1995).

Qian et al. (1997), em experimento com frangos de corte de 1 a 21 dias de idade, alimentados com ração à base de milho e farelo de soja com 0,51% de P total e suplementada com 600 FTU/Kg de fitase, mostraram que a elevação da relação Ca:P da ração de 1,1:1 a 2,0:1 (elevação do nível de cálcio de 0,56% a 1,02%) reduziu linearmente o ganho de peso, afetou de forma quadrática a deposição de cinzas, reduziu a absorção de P e Ca. Também a atividade da fitase foi reduzida linearmente, à medida que se elevou o nível de cálcio da ração com o mesmo nível de P total. Os níveis de P e Ca devem ser incluídos em níveis inferiores quando a fitase for empregada durante a formulação, para que não ocorra uma redução acentuada do efeito da fitase (Leeson, 1999).

Segundo Mitchel & Edwards Jr. (1996), para uma maior solubilização do fitato no trato digestivo da ave, é necessário manter os níveis de P e Ca nos limites mínimos necessários, o que confirma a afirmação de Ballam et al. (1984). O Ca parece ser o fator-chave que influencia a atividade da fitase na mucosa intestinal de frangos, e o efeito

provável mais importante é a representação direta da atividade da fitase, pela competição do Ca pelos sítios ativos da enzima (Wise, 1983).

Segundo McKnight (1997), níveis de Ca acima de 0,70% em pH 6,0 permitem a reação do Ca, que se precipita e não pode ser atacado pela fitase. Schoner et al. (1993), alimentando frangos de corte com dietas à base de milho e farelo de soja, deficientes em P (0,35%), com níveis crescentes de Ca (0,6; 0,75 e 0,9%), suplementados com 125, 250, 500 ou 1500 FTU/kg de fitase e P inorgânico da fonte P monocálcio (0,6; 1,2 e 1,8% de fósforo total), observaram um aumento no ganho de peso, consumo de ração e retenção de Ca e P quando a fitase ou o P inorgânico foram adicionados. A utilização do P do fitato foi significativamente aumentada pela fitase. A utilização de P do fosfato monocálcio aumentou após 14 dias e o P liberado pela fitase reduziu entre 14 e 40 dias. A utilização do Ca foi aumentada pela fitase e pelo P inorgânico. Os tratamentos com fitase contendo altos níveis de Ca nas dietas tiveram efeitos negativos significativos na utilização do P, fósforo do fitato e Ca. Nos tratamentos de P inorgânico, os níveis de Ca afetaram somente a utilização de Ca, P e fósforo do fitato após 14 dias. Usando como critério o ganho de peso e a retenção de P, concluíram que os resultados com P equivaleram a fitase. Sebastian et al. (1996) submeteram 240 pintos de corte de um dia de idade a rações práticas com diferentes níveis de Ca (0,6; 1,0 e 1,25%) e P disponível (0,35 e 0,45%), suplementadas ou não com 600 FTU/kg. Esses pesquisadores observaram que as rações com níveis 0,35% de P disponível e 0,6% de Ca, quando suplementadas com 600 FTU/kg, proporcionaram desempenho equivalente ao obtido com aves que receberam níveis adequados (0,45% de Pd e 1,0% de Ca). O desempenho não foi satisfatório quando a fitase foi adicionada em dietas contendo 0,35% de P disponível e 1,0% de Ca.

O ácido fítico quando presente nos alimentos dos animais reduz a absorção de P, Ca, zinco, ferro e outros nutrientes. A utilização do fitato depende da espécie, tipo e idade do animal, concentração de fitase, Ca e P na ração, vitamina D-3, ingredientes da ração e processamento dos alimentos (Sebastian et al., 1998).

1.4.3 Classificação de 3-fitase e 6-fitase

Há duas fitases classificadas pelo "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (NC-IUBMB) em consulta com a IUPAC-IUBMB "Joint Commission on Biochemical Nomenclature" (JCBN):

EC 3.1.3.8 Nome recomendado: *3-phytase* Nome sistemático: *myo-inositol-hexakisphosphate 3-phosphohydrolase* Outros nome(s): *phytase; phytate 3-phosphatase*

EC 3.1.3.26 Nome recomendado: *6-phytase* Nome sistemático: *myo-inositol-hexakisphosphate 6-phosphohydrolase* Outros nome(s): *phytase; phytate 6-phosphatase*

A reação catalisada pela fitase A 3-fitase (EC 3.1.3.8) primeiramente age sobre o fitato na posição 3. Assim a 6-fitase (EC 3.1.3.26) primeiramente age sobre o fitato na posição 6.

Reação sobre a fitase na posição 3:

Mio - inositol hexafosfato + H₂O = D-*mio* inositol 1 2 4 5 6 -pentafosfato + ortofosfato

Reação sobre a fitase na posição 6:

Mio - inositol hexafosfato + H₂O = D-*mio* inositol 1 2 3 4 5 -pentafosfato + ortofosfato

CAPÍTULO II

Deposição mineral óssea em frangos de corte suplementados com fitase de *Citrobacter braaki*¹

¹ Artigo elaborado de acordo com as normas da revista Journal of Applied Poultry Research (Apêndice 39)

PHYTASE AND BONE MINERAL

Bone mineral deposition of broilers fed diets supplemented with a *Citrobracter braakii* phytase

D. L. Anschau,* S. L. Vieira,*¹ C. Stefanello,* C. R. Angel, † L. Kindlein, ‡ G.
Gerhardt,* and J. O. B. Sorbara, §

* Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil 91540-000;

† Department of Animal and Avian Sciences, University of Maryland,
College Park 20742;

‡ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 91540-000, Brazil;

§ DSM Nutritional Products, São Paulo, SP, Brazil.

¹ Corresponding author: slvieira@ufrgs.br

S. L. Vieira

Departamento de Zootecnia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/Fax: +55 51 3308 6048

Scientific Section: Metabolism and Nutrition

ABSTRACT An experiment was conducted to evaluate the effects of phytase supplementation on growth performance, phosphorus availability and bone mineralization in broiler chickens. Three hundred and fifty Cobb x Cobb 500 slow feathering male broilers were placed in steel battery cages into 7 treatments with 10 replications of 5 chicks each. The treatments were: a positive control diet (PC - 0.42% nPP), four diets containing increases in non phytate P (nPP) from dicalcium phosphate (0.14, 0.20, 0.26, and 0.32%) and 2 phytase supplemental levels (500 and 1,000 FYT) on the diet having 0.14% nPP. All diets contained 0.8% calcium. Growth performance and bone data were regressed against the four diets having increased nPP. The equations generated were replaced by the corresponding performance obtained with the two phytase levels to estimate their nPP bioequivalences. An overall reduction in performance and bone mineralization was observed as diets had reductions in nPP. Linear fits were provided the best adjustments for for all responses with the exceptions of body weight gain (BWG) and feed intake (FI). Adding phytase to the 0.14% nPP diet alleviated the losses in growth performance and bone mineralization. Average bioequivalence nPP for each phytase level was dependent on the evaluated response with lowest and highest values at 500 FYT supplementation of 0.077 and 0.143 for toe P and femur Ca, respectively, whereas lowest and highest values at 1,000 FYT of 0.143 and 0.194 for BWG and toe ash, respectively. Averaging all values for 500 and 1,000 FYT provided estimations of nPP of 0.100 and 0.166 nPP, respectively.

Key words: bone mineralization, broiler, non-phytate phosphorus, phytase

2.1 INTRODUCTION

Phosphorus (P), an essential mineral for all living organisms is stored in plant seeds as phytate (myo-inositol hexaphosphate), in single-membrane protein bodies (Lott, 1984). Phytate and lower inositol phosphates can be hydrolyzed by the enzyme phytase (myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase), which have been widely used as a supplemental additive in poultry diets (Nelson et al., 1968; Józefiak et al., 2010; Cowieson et al., 2011).

Commercial phytase preparations are mainly derived from fungi or bacteria and have been shown varying degrees of efficacy in terms of P bioavailability as measured for poultry (Camden et al., 2001; Rutherford et al., 2004a; Cowieson and Adeola, 2005).

As with any enzyme utilized in feeds, conditions that affect substrate degradation also affect enzyme functionality under the conditions in the lumen of the gastrointestinal tract. It has been reported that phytases can start phytate P release from the 3 or 6 positions in the phytate molecule; however, efficacy differences between these different phytases have not been clearly established (Konietzny and Greiner, 2002). More important for phytase efficacy in broilers is its activity at gastric pH since phytate solubility decreases as pH increases from the proventriculus to the large intestine (Tamin and Angel 2003; Tamim et al., 2004; Greiner and Bedford, 2010).

Numerous phytase studies have been published in the last decade, with a majority of results demonstrating that phytases improve utilization of phytate P by poultry (Broz et al., 1994; Onyango et al., 2004; Cowieson and Ravindran, 2007; Liu et al., 2008; Olukosi and Adeola, 2008). Since phytases are primarily supplemented to increase availability of phytate P, phytase efficacy is generally determined as a relative bio-

equivalency in comparison to inorganic P sources (Yan et al., 2001; Augspurger et al., 2003; Angel et al., 2005; Adeola et al., 2006). However, relative P bioequivalence of phytase is an estimation of the P made available by phytase when compared to the amount of P from an inorganic source that results in similar performance or bone mineralization with the inorganic P source being given 100% nPP but where all of the non-phytate P (nPP) may not be available (Zhai and Adeola, 2012).

The decision on which is the adequate P concentration to formulate poultry diets is difficult due to a lack of clarity on P requirements as well as to the amount of phytate P liberated by different concentrations of the numerous phytases available commercially. Each phytase has specific chemical characteristics that are different in part depending on the source from which they are derived. These characteristics will influence where and how effectively they release phytate P in the gastrointestinal tract (Maenz and Classen, 1998).

The objective of the current work was to examine the effect of a 6-phytase from *Citrobacter braakii* on live performance and bone mineralization as well as estimate the bioequivalence relative to P added from dicalcium phosphate in a low-P corn-soybean diet in broiler chickens.

2.2 MATERIALS AND METHODS

All procedures used in this study avoided were approved by the Ethics and Research Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Animal Husbandry

A total of 350 one-day-old slow feathering Cobb × Cobb 500 male broiler chicks were randomly allocated to 70 wire cages (0.90 m × 0.40 m), 5 birds per cage, located in a temperature controlled room. Temperature at placement was 32 °C, which was adjusted to maintain bird comfort throughout the study. Water and feed were provided *ad libitum*. Lighting was continuous until 25 d of age.

Diets and Experimental Design

Diets were corn-soybean meal (SBM) based and formulated to meet or exceed Rostagno et al. (2011) nutrient recommendations, except for Ca and nPP. Corn, SBM, limestone and dicalcium phosphate were analyzed using the AOAC (2000) procedures for Ca (968.08) and P (946.06).

The experiment was a completely randomized arrangement of 7 treatments with 10 replications of 5 birds each. Treatments consisted of a positive control diet (PC - 0.42% nPP), and four other diets having graded concentrations of nPP: 0.32%, 0.26%, 0.20% nPP and 0.14% nPP. These graded P concentrations were accomplished by the addition of dicalcium phosphate. A fixed level of 0.80% Ca was used in all diets. Phytase was added to the 0.14% nPP diet at 500 and 1,000 FYT/kg (1 FYT is defined as the activity that releases 1 μmol of inorganic phosphate from 5.0 mM sodium phytate per minute at pH 5.5 and 37°C; Engelen et al., 1994). The phytase used was a 6-phytase produced by the expression of synthetic genes that have been incorporated in *Aspergillus oryzae*. Protein sequence genes of this phytase are synthesized by *Citrobacter braakii* (Lichtenberg et al., 2011) and a commercial product is available

under the name of Ronozyme HiPhos (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark). Diet samples were collected and analyzed in duplicates for the phytase content.

Measurements

Body weight gain (BWG), feed intake (FI), feed conversion ratio corrected for mortality (FCR) and mortality were determined on days 14, 21 and 25. At 25 d of age, all broilers (n=350) were killed by cervical dislocation. Tibia and femur of the right leg were removed, defatted such that cartilage was also removed. The middle toe from the right foot was removed at the first articulation. All tissues were dried at 105°C for 12h and defatted in a Soxhlet with petroleum ether. Defatted bones were then dried at 105°C for 12h, weighed and ashed in a muffle furnace at 600°C for 8h. Ash, total P and Ca concentration were determined according to AOAC (2000) for ash (930.15), Ca (968.08) and P (946.06).

Statistical Analysis

Data were analyzed based in a one-way analysis of variance using the GLM procedure of SAS Institute (2009). Significance was accepted at 5% and mean differences were separated using Tukey when the model effect was significant. A regression analysis was conducted with data from diets with decreasing nPP and an estimation of P availability was determined through the derivation of the linear and quadratic equations when they were significant (Tukey, 1991).

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

A good agreement occurred between formulated and analyzed Ca and total P in the experimental diets as can be seen in Table 1. Analyses of phytase in the feeds indicated that the supplemental enzyme had activities well-proportioned with the expected values (formulated 500 and 1,000 FYT/kg and analyzed 550 and 1,060 FYT/kg).

Effects of the various levels of nPP as well as phytase supplementation on broiler performance are presented in Table 2 whereas effects on bone mineralization are shown in Table 3. A significant decrease in BWG and FI in parallel with an increase in FCR ($P < 0.001$) occurred as nPP was reduced in the diets. Mortality was higher for birds fed 0.14% nPP and intermediate for those fed 0.20% nPP; there were no mortality for birds fed diets with 0.26% nPP or higher. Reducing the percentage of nPP in the feeds resulted in lower contents of bone ash as well as Ca and P in the tibia, femur and middle toe of birds at 25 d ($P < 0.0001$).

Phytase supplementation in the 0.14% nPP diet led to improvements in BWG, FI and FCR when compared to diets having 0.26% nPP or lower. Improvements obtained with the two doses of phytase were similar and without difference from the PC diet. Phytase supplementation, at both levels, reduced the mortality of birds as in the treatments with nPP at 0.20% nPP or lower; however, no difference was found when compared to diets without phytase having 0.26% nPP or higher or the PC diet. In general, bone ash as well as Ca and P contents in bones were highest when birds were fed the PC diet ($P < 0.0001$). Phytase improvements were observed when phytase was added to a diet having 0.14% nPP; however, adding 1,000 FYT led to an increased ash percentage as well as Ca and P contents.

Regression equations for live performance and bone mineral contents with increasing levels of P and the calculated bioequivalence as nPP of the studied phytase are presented in Table 4. Estimated nPP bioequivalence was done with the equations providing the best fit (higher R^2). Most measurements had best fits with linear adjustments and, with the exceptions of BWG and FCR, which had better quadratic adjustments.

In general, adding formulated 1,000 FYT/kg phytase provided nPP bioequivalence that averaged 40% higher when comparison is done with formulated 500 FYT/kg (Table 4). Average bioequivalence nPP for each phytase level was dependent on the evaluated response with lowest and highest values at 500 FYT supplementation of 0.077 and 0.143 for toe P and femur Ca, respectively, whereas lowest and highest values at 1,000 FYT of 0.143 and 0.194 for BWG and toe ash, respectively.

Estimates of the amount of P released by phytase vary. Nelson et al. (1971) indicated that from 50 to 100% of the phytate-bound P in corn-soybean meal diets could be released by phytase supplementation, depending upon the level of phytase used. Denbow et al. (1995) reported that P released by phytase ranged from 31 to 58% for 250 to 1,000 units of phytase/kg of feed. Simons et al. (1990) indicated that more than 60% of the P was released by addition of phytase. Yi et al. (1996) estimated that up to 37% of the phytate P in soybean meal was released by addition of 1,000 units of phytase/kg of diet. Waldroup et al. (2000) calculated that approximately 50% of the phytate-bound P in a corn-soybean meal diet was released by phytase. Thus, considerable variation exists among reported values for P release. Estimates in the present study fall among reported values.

In chicks, it has been extensively reported that phytase addition to corn–soybean-based diets permits total P levels to be reduced without impairing bone ash (Broz et al., 1994; Qian et al., 1996; Sebastian et al., 1996b; Leeson et al., 2000; Yan et al., 2001; Viveros et al., 2002; Brenes et al., 2003; Dilger et al., 2004; Onyango et al., 2004, 2005; Payne et al., 2005), and only Rama Rao et al. (1999) disagreed. Nevertheless, the level of total P reduction according to broiler age in phytase-supplemented diets lacks consensus.

2.4 CONCLUSION

The use of novel phytase from *Citrobacter sp braakii*. presented the benefits and dosages given different answers depending on their inclusion. Improvement in livestock performance data as GP, CA were significant. Ash in the tibia, femur and middle finger had a significant addition to the inclusions of phytase. Phytase increased the ash and P in the tibia and femur and middle finger.

2.5 REFERENCES

- Adeola, O., O. A. Olukosi, J. A. Jendza, R. N. Dilger, and M. R. Bedford. 2006. Response of growing pigs to *Peniophora lycii* and *Escherichia coli* derived phytases or varying ratios of calcium to total phosphorus. *Anim. Sci.* 82:637–644.
- Angel, R., W. W. Saylor, A. S. Dhandu, W. Powers, and T. J. Applegate. 2005. Effect of dietary phosphorus, phytase, and 25-hydroxycholecalciferol on performance of broiler chickens grown in floor pens. *Poult. Sci.* 84:1031–1044.
- AOAC International. 2000. *Official Methods of Analysis*. 17th ed. AOAC Int., Gaithersburg, MD.

- Augspurger, N. I., D. M. Webel, X. G. Lei, and D. H. Baker. 2003. Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. *J. Anim. Sci.* 81:474–483.
- Broz, J., P. Oldale, A. H. Perrin-Voltz, G. Rychen, J. Schulze, and C. S. Nunes. 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilization in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *Br. Poult. Sci.* 35:273–280.
- Cabahug, S., V. Ravindran, P. H. Selle, and W. L. Bryden, 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Br. Poult. Sci.* 40:660–666.
- Camden, B. J., P. C. H. Morel, D. V. Thomas, V. Ravindran, and M. R. Bedford. 2001. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soybean diets for broilers. *Anim. Sci.* 73:289–297.
- Catalá P. - Gregori, V. Garcia, F. Hernández, J. Madrid, and J.J. Cerón. 2006. Response of Broilers to Feeding Low-Calcium and Phosphorus Diets Plus Phytase Under Different Environmental Conditions: Body Weight and Tibiotarsus Mineralization. *Poult. Sci.* 85:1923-1931.
- Cowieson, A. J., and V. Ravindran. 2007. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *Br. J. Nutr.* 98:745–752.
- Cowieson, A. J., P. Wilcock, and M. R. Bedford. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poult. Sci. J.* 67:225–235.

- Eeckhout, W. and M. De Paepe. 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 47:19–29.
- Engelen, A. J., F. C. Van der Heeft, P. H. G. Randsdorp, and E. L. C. Smit. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77:760–764.
- Greiner, R. and M. R. Bedford. 2010. Recent advances in phytase development. Pages 14–26 in *Proc. Int. Phytase Summit*. Washington, DC.
- Jozefiak, D., A. Ptak, S. Kaczmarek, P. Maćkowiak, M. Sassek, and B. A. Slominski. 2010. Multi-carbohydrase and phytase supplementation improves growth performance and liver insulin receptor sensitivity in broiler chickens fed diets containing full-fat rapeseed. *Poult. Sci.* 89:1939–1946.
- Konietzny, U., and R. Greiner. 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.* 37:956–961.
- Lichtenberg, J., P. B. Pedersen, S. G. Elvig-Joergensen, L. K. Skov, C. L. Olsen, and L. V. Glitsoe. 2011. Toxicological studies on a novel phytase expressed from synthetic genes in *Aspergillus oryzae*. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60:401–410.
- Liu, N., Y. J. Ru, A. J. Cowieson, F. D. Li, and X. C. Cheng. 2008. Effects of phytate and phytase on the performance and immune function of broilers fed nutritionally marginal diets. *Poult. Sci.* 87:1105–1111.
- Lott J.N.A. 1984. Accumulation of seed reserves of phosphorus and other minerals, in *Seed Physiology*, ed. by Murray DR. Academic Press, New York, pp. 139–166.
- Maenz, D. D., and H. L. Classen. 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult. Sci.* 77:557–563.

- Nelson, T. S., T. R. Shieh, R. J. Wodzinski, and J. H. Ware. 1968. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poultry Sci.* 47:1842-1848.
- Olukosi, O. A., and O. Adeola. 2008. Whole body nutrient accretion, growth performance and total tract nutrient retention responses of broilers to supplementation of xylanase and phytase individually or in combination in wheat-soybean meal based diets. *J. Poult. Sci.* 45:192–198.
- Onyango, E. M., M. R. Bedford, and O. Adeola. 2004. The yeast production system in which *Escherichia coli* phytase is expressed may affect growth performance, bone ash, and nutrient use in broiler chicks. *Poult. Sci.* 83:421–427.
- Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, J. L. Donzele, P. C. Gomes, R. F. Oliveira, D. C. Lopes, A. S. Ferreira, S. L. T. Barreto, and P. F. Euclides. 2011. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais 3rd ed. UFV, Viçosa, MG, Brazil.
- Rutherford, S. M., T. K. Chung, P. C. H. Morel, and P. J. Moughan. 2004. Effect of microbial phytase on the ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus, and amino acids in a low phosphorus diet for broilers. *Poult. Sci.* 83:61–68.
- SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide: Release 9.2 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Sebastian, S., S. P. Touchburn, E. R. Chavez, and P. C. Lague. 1996. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. *Poult. Sci.* 75:1516–1523.

- Tamim, N. M., and R. Angel. 2003. Phytate phosphorus hydrolysis as influenced by dietary calcium and micro-mineral source in broiler diets. *J. Agric. Food Chem.* 51:4687–4693.
- Tamim, N. M., R. Angel, and M. Christman. 2004. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poult. Sci.* 83:1358–1367.
- Tukey, J. 1991. The philosophy of multiple comparisons. *Stat. Sci.* 6, 100–116.
- Yan, F., J. H. Kersey, and P. W. Waldroup. 2001. Phosphorus requirements of broiler chicks three to six weeks of age as influenced by phytase supplementation. *Poult. Sci.* 80:455–459.
- Zhai, H., O. Adeola, H. Zhai, and O. Adeola. 2012. True total-tract phosphorus digestibility of phosphorus in monocalcium phosphate by for 15-kg pigs. *J. Anim. Sci.* 90(Suppl. 4):98–100.

Table 1. Ingredient and nutrient composition of the experimental diets fed to broilers from 7 to 25 d.

Item	Non Phytate Phosphorus, nPP, %						
	0.14	0.20	0.26	0.32	0.42 (Positive control)	0.14 (500 FYT/kg)	0.14 (1,000 FYT/kg)
Ingredients, %							
Corn 7.8%	54.76	54.51	54.26	54.01	53.38	54.76	54.77
Soybean Meal 45%	38.87	38.92	38.97	39.02	39.14	38.87	38.87
Soybean Oil	3.41	3.49	3.57	3.66	3.87	3.41	3.41
Dicalcium Phosphate	0.08	0.40	0.72	1.05	1.59	0.08	0.08
Limestone	1.60	1.39	1.19	0.98	0.74	1.60	1.60
Salt	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
DL-Methionine (98%)	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
L-Lysine HCl (78%)	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
L-Threonine (98.5%)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Choline Chloride (60%)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Vitamin and Mineral Premix ¹	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Kaolin	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.010	0.005
Phytase ²	-	-	-	-	-	0.005	0.010
Formulated nutrient, % unless noted (analyzed) ³							
AME, kcal/kg	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050
CP	22.8 (22.7)	22.8 (23.0)	22.8 (22.7)	22.8 (22.8)	22.8 (23.0)	22.8 (22.8)	22.8 (23.0)
Calcium	0.80 (0.84)	0.80 (0.85)	0.80 (0.80)	0.80 (0.84)	0.84 (0.83)	0.80 (0.82)	0.80 (0.83)
Total phosphorus	0.38 (0.38)	0.44 (0.44)	0.50 (0.51)	0.56 (0.55)	0.66 (0.65)	0.38 (0.36)	0.38 (0.38)
Npp	0.14	0.20	0.26	0.32	0.42	0.14	0.14
Digestible Lys	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22
Digestible TSAA	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
Digestible Thr	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79

¹ Composition per kg of feed: Vitamin A 8,000 IU/g; Vitamin D₃ 2,000 IU/g; Vitamin E 30 IU/g; Vitamin K₃ 2 mg; Thiamine 2 mg; Riboflavin 6 mg; Pyridoxine 2.5 mg; Vitamin B₁₂ 0.012 mg; Pantothenic acid 15 mg; Niacin 35 mg; Folic acid 1 mg; Biotin 0.08 mg; Iron 40 mg; Zinc 80 mg; Manganese 80 mg; Copper 10 mg; Iodine 0.7 mg; Selenium 0.3 mg, Monensin sodium 100 mg (Coban 20%, Eli Lilly, São Paulo, Brazil).

² Ronozyme HiPhos (GT) with 10,000 FYT/g (Novozymes A/S, Bagavaerd, Denmark); analyzed values for feeds with formulated 500 and 1,000 FYT were, respectively, 550 and 1060.

³ Analyzed according to AOAC Official Method 954.01 (CP); AOAC 930.15 (ash); AOAC 968.08 (Ca); AOAC 946.06 (P).

Table 2. Live performance of broilers fed diets supplemented with phytase from 7 to 25 d.

Treatments	BW gain, g	Feed Intake, g	FCR	Mortality, %
0.14% nPP ¹	766 ^d	1,127 ^d	1.473 ^c	8.89 ^a
0.20% nPP	1,005 ^c	1,447 ^c	1.440 ^{bc}	2.22 ^b
0.26% nPP	1,180 ^{ab}	1,654 ^a	1.403 ^{bc}	0.00 ^c
0.32% nPP	1,243 ^a	1,681 ^a	1.352 ^a	0.00 ^c
Positive control	1,246 ^a	1,697 ^a	1.353 ^a	0.00 ^c
500 FYT/kg Phytase	1,114 ^b	1,550 ^b	1.391 ^{ab}	0.00 ^c
1,000 FYT/kg Phytase	1,211 ^a	1,663 ^a	1.374 ^a	0.00 ^c
SEM	0.0529	0.0638	0.017	0.031
<i>P</i> -value ²	0.001	0.001	0.001	0.001

^{a-d} Means with different superscript letters differ ($P < 0.05$) based on Tukey's significant difference test.

¹ Non phytate phosphorus

² From an ANOVA with all treatments.

Table 3. Bone mineral content of broilers fed diets supplemented with phytase from 7 to 25 d.

Treatment	Tibia				Femur				Middle Toe			
	Ash, g ³	Ash, %	Ca, %	P, %	Ash, g ³	Ash, %	Ca, %	P, %	Ash, mg ³	Ash, %	Ca, %	P, %
0.14% nPP ¹	1.06 ^f	30.4 ^e	10.1 ^e	4.73 ^d	0.57 ^f	26.9 ^e	8.8 ^d	4.22 ^d	21.4 ^e	8.5 ^d	2.35 ^e	1.11 ^d
0.20% nPP	1.72 ^e	35.2 ^d	11.9 ^d	5.63 ^c	1.12 ^e	32.4 ^d	11.0 ^c	5.43 ^c	36.8 ^d	10.0 ^c	3.13 ^d	1.48 ^c
0.26% nPP	2.56 ^c	38.8 ^c	14.1 ^{bc}	6.32 ^b	1.73 ^c	36.6 ^c	12.6 ^b	6.05 ^{bc}	57.9 ^b	11.5 ^b	3.84 ^{bc}	1.79 ^b
0.32% nPP	3.26 ^b	41.1 ^b	15.0 ^{ab}	6.95 ^a	2.16 ^b	39.0 ^b	13.6 ^{ab}	6.42 ^{ab}	62.0 ^b	11.8 ^b	4.10 ^b	1.85 ^b
Positive control	3.70 ^a	43.4 ^a	16.2 ^a	7.32 ^a	2.42 ^a	40.8 ^a	14.2 ^a	6.85 ^a	76.8 ^a	13.1 ^a	4.60 ^a	2.10 ^a
500 FYT/kg Phytase	2.27 ^d	37.6 ^c	13.2 ^{cd}	6.15 ^b	1.51 ^d	35.7 ^c	13.1 ^{ab}	6.02 ^{bc}	46.4 ^c	10.7 ^c	3.46 ^{cd}	1.59 ^c
1,000 FYT/kg Phytase	3.10 ^b	40.8 ^b	15.0 ^{ab}	6.88 ^a	1.99 ^b	38.4 ^b	13.4 ^{ab}	6.34 ^{ab}	64.5 ^b	12.0 ^b	4.23 ^{ab}	1.84 ^b
SEM	0.031	1.32	0.68	0.280	0.199	1.46	0.63	0.291	5.82	0.471	0.244	0.102
<i>P</i> -value ²	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

^{a-f} Means with different superscript letters differ ($P < 0.05$) based on Tukey's significant difference test.

¹ Non phytate phosphorus.

² From an ANOVA with all treatments.

³ Bone ash on a dry matter basis.

Table 4. Regression equations of the evaluated measurements relative to non phytate phosphorus concentration of diets fed to broilers from 7 to 25 d.

Item	Regression Equations ¹	R ²	P-value ²	Relative bioequivalence ³	
				500 FYT/kg	1,000 FYT/kg
BW gain, g	$Y = -1,785.41x^2 + 1,971x + 765.56$	0.9343	0.0001	0.094	0.143
Feed intake, g	$Y = -3,638.96x^2 + 2,870.2x + 1,124.9$	0.8977	0.0004	0.084	0.166
FCR	$Y = -0.317x + 1.48$	0.5304	0.0001	0.137	0.156
Tibia ash, g	$Y = 7.14x^2 + 3.47x + 1.07$	0.9685	0.0005	0.101	0.166
Tibia ash, %	$Y = 29.51x + 30.61$	0.9261	0.0001	0.098	0.168
Tibia Ca, %	$Y = 13.87x + 10.09$	0.8238	0.0001	0.094	0.172
Tibia P, %	$Y = 5.98x + 4.75$	0.8855	0.0001	0.102	0.173
Femur ash, g	$Y = 4.38x + 0.544$	0.9351	0.0001	0.098	0.156
Femur ash, %	$Y = 33.31x + 27.26$	0.9128	0.0001	0.104	0.160
Femur Ca, %	$Y = 13.21x + 8.92$	0.8245	0.0001	0.145	0.163
Femur P, %	$Y = 5.99x + 4.37$	0.7381	0.0001	0.111	0.157
Toe ash, g	$Y = 118.4x + 21.35$	0.8810	0.0001	0.084	0.194
Toe ash, %	$Y = 9.63x + 8.56$	0.8537	0.0001	0.083	0.165
Toe Ca, %	$Y = 4.94x + 2.39$	0.7979	0.0001	0.084	0.195
Toe P, %	$Y = 2.11x + 1.14$	0.8029	0.0001	0.077	0.158

¹Regression equations for nPP concentration levels of 0.14, 0.20, 0.26 and 0.32% and the coefficient of determination (r^2) was obtained using all data.

²Linear or quadratic effect ($P < 0.05$).

³Determined based on response of the means to graded addition of P from dicalcium phosphate for each parameter. Was used the difference between the levels of nPP (0, 0.06, 0.12 and 0.18%) to obtain this relative bioequivalence.

CAPÍTULO III

3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avicultura de corte é uma atividade de interesse zootécnico que evoluiu muito nos últimos anos, grande parte dessa evolução se deve ao melhoramento genético e melhores condições ambientais de criação das aves. Esse maior desenvolvimento da atividade vem chamando atenção dos ambientalistas e nutricionistas, principalmente no sentido de minimizar as quantidades de nutrientes excretados por essas aves, que são consideradas como a segunda que mais atinge o meio ambiente, ficando atrás apenas da suinocultura.

Devido ao acelerado ganho de peso, as aves tornam-se dependentes de uma estrutura óssea que suporte uma maior massa corporal, sendo com isso fundamental a suplementação de minerais que atendam as necessidades nutricionais, principalmente de Ca e P, que são os principais constituintes ósseos. Assim, a deficiência desses minerais, principalmente nas fases iniciais, está diretamente correlacionada à má formação óssea, comprometendo todo o processo de produção, levando a prejuízos econômicos, devido ao aumento das taxas de descarte em abatedouros por fraturas durante o carregamento.

Pode-se considerar que a fitase na produção atual do frango, é considerada como uma excelente ferramenta no aproveitamento não só do fósforo, mas também de outros nutrientes. Entretanto, os benefícios da sua utilização dependem de uma série de fatores, dentre eles, o nível de Ca e P suplementado, a concentração de cada enzima, a origem da enzima (fúngica, bacteriana, leveduras), entre outros.

Os ganhos em desempenho zootécnico com a suplementação da fitase de *Citrobacter braakii* sp foram evidentes no decorrer do crescimento avaliado. No entanto, neste estudo são verificados no período inicial, de 7 a 25 dias de idade uma melhor resposta de desempenhos zootécnicos e deposição mineral nos ossos. Entretanto, melhora nos dados zootécnicos com inclusões de fitase GP, CA foram significativos. Cinzas na tíbia, fêmur e dedo médio tiveram acréscimo significativo para as inclusões de fitase. A fitase aumentou o teor de Cinzas, Ca e P na tíbia, fêmur e dedo médio. Os resultados encontrados nas condições experimentais avaliadas da seguinte dissertação parecem estar de acordo com grande parte dos trabalhos.

Em meio a grande concorrência no mercado de produção da carne de frangos de corte, a suplementação de fitase ligada à redução da suplementação de P talvez possa ser uma estratégia nutricional interessante. Entretanto, apesar dos inúmeros fatores envolvidos, talvez os resultados encontrados nesse estudo e em recentes publicações nacionais e internacionais possam ser indícios de que a atenção dos nutricionistas deva se voltar a agressivas reduções do nível de fósforo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIGUETTO, J. M, et. al. NUTRIÇÃO animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal. São Paulo: Nobel, 1984. v. 1

ANGEL, R. et al. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v.11, p.471–480, 2002.

A.O.A.C. **Official methods of analysis**. EUA: Association of official analytical chemical, 2000.

ASADA. K.; KASAI, Z. Formation of myo-inositol and phytin in ripening rice grain. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 3, p. 397, 1962.

BEDFORD, M.R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 86, 2000. p.1-13.

BRENNER DON, J. et al. Classification of *Citrobacteria* by DNA Hybridization: Designation of *Citrobacter famzeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and Three Unnamed *Citrobacter* Genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 43, p. 645-658, Oct, 1993

DARI, R.L. A utilização de fitase na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, Campinas, 2004. [Anais]. Campinas, 2004. p.127-143

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

FERNANDES, E. A. et al. Avaliação da adição de fitase em dietas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, supl. 5, p. 33, 2003.

FRITTS, C. A.; WALDROUP, P. W. Modified phosphorus program for broilers based on commercial feeding intervals to sustain live performance and reduce total and Water-soluble phosphorus in litter. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 15, p. 207-218, 2006.

IGBASAN, F.A. et al. Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. **Arch Tierernahr**, [Berlin], v. 53, p. 353-373, 2000.

JONGBLOED, A.W.; MROZ, Z.; KEMME, P.A. The effect of supplementary *Aspergillus Niger* phytase in diet for pigs on P, and phytic acid in different sections of the alimentary tract. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n. 4, p. 1159-1168, 1992.

Konergay, E.T. et al. Response of broilers to graded levels of microbial Phytase added to maize-soybean-meal based diets containing three levels of non-phytate phosphorus. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 75, p. 839-852, 1996.

LESSON, S. Enzimas para aves. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO PARA AVES, 1999. Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1999. p. 173-185

NELSON, T.S. et al. The availability of phytase phosphorus in soybean meal before and after treatment with mold phytase. **Poultry Science**, Champaign, v. 47, n. 4-5, p. 1842-1848, 1968.

O'dell, B.L.; DeBolland, A.R.; KOIRTYOHANN, S.R. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 20, p. 718-721, 1972.

PAYNE, R.L.; LAVERGNE, T.K.; SOUTHERN, L.L. A comparison of two sources of phytase in liquid and dry forms in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v.8, p.265-272, 2005.

PETER, C.M.; BAKER, D.H. Microbial phytase does not improve protein-amino acid utilization in soybean meal fed to young chickens. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131. p. 1792- 1797, 2001.

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

RAVINDRAN, V. et al. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broiler. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, n. 5, p. 699-706, 1999.

RUTHERFURD, S.M.T.K. et al. Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus, and amino acids in a lowphosphorus diet for broilers. **Poultry Science**, Champaign, v.83, p.61-68, 2004.

SANTOS, R. et al. Decrease of the levels of calcium and phosphorus in diets with whole rice meal and enzymes on the performance of broilers. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 517-521, 2004.

SANTOS, F.R. Efeito da suplementação com fitase em dietas de frangos de corte sobre a digestibilidade de nutrientes. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, (supl.7), p,124, 2005.

SCHONER, V.F.J. Vergleich von mikrobieller phytase und anorganischem phosphat bei masthahnenkukun: Wirkungen auf die mastleistungen und die mineralstoffretention bei variiertes calcium-versorgung. **Journal of Animal physiology and animal nutrition**, Berlin, v.69, p.235-244, 1993.

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

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

SHELTON, J.L. et al. Evaluation of the nutrient matrix values for phytase in broilers. **Journal Applied Poultry Research**, Savoy, v. 13, n. 3, p. 213-221, 2004.

SILVA, Y.L. **Redução dos níveis de proteína e fósforo em rações com fitase para frangos de corte**: desempenho, digestibilidade e excreção de nutrientes. 2004. 210 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SILVA, A.R.Z. et al. **Produção de Fitase por Fermentação no Estado Sólido utilizando Biorresíduos Agrícolas para a Aplicação como Aditivo na Alimentação Animal**. Disponível em: <www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t338.doc>. Acesso em: 04 Jan. 2013.

SIMOSN, P.C.M. et al. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pig. **British Journal Nutrition**, London, v. 64, n. 2-3, p. 525-540, 1990.

SNOW, J.L.; DOUGLAS, M.W.; PARSONS, C.M. Phytase Effects on Amino Acid Digestibility in Molted Laying Hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, n. 7, p.474– 477, 2003.

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

TEJEDOR, A. A. et al. Efeito da adição da enzima fitase sobre o desempenho e a digestibilidade ileal de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n.3, p.802–808, 2001.

TEJEDOR, A.A. et al. Efeito da adição da enzima fitase em dietas de frangos de corte sobre o desempenho e digestibilidade ileal de nutrientes. In:

REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37. 2000, Viçosa. **Anais**. Viçosa, 2000. p.273

TEJEDOR, A.A. et al. Efeito da adição de enzimas em dietas de frangos de corte à base de milho e farelo de soja sobre a digestibilidade ileal de nutrientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 809-816, 2001.

ZHANG, X. et al. Effect of Natuphos® phytase supplementation to feed on performance and ileal digestibility of protein and amino acids of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, n. 11, p. 1567-1572, 1999.

5 APÊNDICES

Tabela 1. Peso vivo, g

Tratamentos	Idade (dias)			
	7	14	21	25
T1 – 0,14% Pd	181	409 e	722 e	947 d
T2 – 0,20% Pd	181	438 d	885 d	1.186 c
T3 – 0,26% Pd	179	474 bc	1.004 bc	1.359 ab
T4 – 0,32% Pd	181	503 a	1.060 a	1.424 a
T5 – 0,42% Pd	180	503 a	1.064 a	1.425 a
T6 – 0,14% Pd + HiPhos (500 FTU)	181	459 cd	959 c	1.295 b
T7 – 0,14% Pd + HiPhos (1.000 FTU)	179	487 ab	1.026 ab	1.390 a
Média	180	467	960	1.289
CV, %	2,00	3,41	3,40	3,58
P	0,5962	0,0001	0,0001	0,0001

Tabela 2. Consumo de Ração, g

Tratamentos	Idade (dias)				
	7-14	15-21	22-25	7-21	7-25
T1 – 0,14% Pd	321 c	457 c	351 c	777 c	1.127 d
T2 – 0,20% Pd	370 b	621 b	456 b	991 b	1.447 c
T3 – 0,26% Pd	403 ab	718 a	533 a	1.122 a	1.654 a
T4 – 0,32% Pd	413 a	733 a	535 a	1.146 a	1.681 a
T5 – 0,42% Pd	416 a	743 a	539 a	1.158 a	1.697 a
T6 – 0,14% Pd + HiPhos (500 FTU)	387 ab	659 b	503 a	1.047 b	1.550 b
T7 – 0,14% Pd + HiPhos (1.000 FTU)	410 ab	723 a	530 a	1.133 a	1.663 a
Média	388	665	492	1.053	1.545
CV, %	7,20	5,27	6,56	4,76	4,39
P	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Tabela 3. Ganho de Peso, g

Tratamentos	Idade (dias)				
	7-14	15-21	22-25	7-21	7-25
T1 – 0,14% Pd	228 e	313 d	225 c	540 e	766 d
T2 – 0,20% Pd	257 d	447 c	301 b	704 d	1.005 c
T3 – 0,26% Pd	295 bc	530 ab	354 a	825 b	1.180 ab
T4 – 0,32% Pd	322 a	558 a	363 a	880 a	1.243 a
T5 – 0,42% Pd	323 a	562 a	360 a	885 a	1.245 a
T6 – 0,14% Pd + HiPhos (500 FTU)	278 cd	500 b	336 ab	778 c	1.114 b
T7 – 0,14% Pd + HiPhos (1.000 FTU)	309 ab	539 ab	363 a	847 ab	1.211 a
Média	287	493	329	780	1.109
CV, %	5,60	5,89	8,68	4,18	4,11
P	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Tabela 4. Conversão alimentar.

Tratamentos	Idade (dias)				
	7-14	15-21	22-25	7-21	7-25
T1 – 0,14% Pd	1,401 a	1,466 a	1,576	1,440 a	1,473 a
T2 – 0,20% Pd	1,438 a	1,391 ab	1,516	1,408 ab	1,440 ab
T3 – 0,26% Pd	1,367 ab	1,358 b	1,504	1,361 cb	1,403 bc
T4 – 0,32% Pd	1,284 b	1,315 b	1,470	1,303 c	1,353 c
T5 – 0,42% Pd	1,288 b	1,322 b	1,507	1,309 c	1,363 c
T6 – 0,14% Pd + HiPhos (500 FTU)	1,394 ab	1,343 b	1,497	1,345 bc	1,391 bc
T7 – 0,14% Pd + HiPhos (1.000 FTU)	1,330 ab	1,319 b	1,460	1,338 c	1,374 c
Média	1,360	1,356	1,506	1,356	1,398
CV, %	5,74	4,12	6,03	3,49	2,62
P	0,0002	0,0001	0,2092	0,0001	0,0001

Tabela 5. Mortalidade, %

Tratamentos	Idade (dias)				
	7-14	15-21	22-25	7-21	7-25
T1 – 0,14% Pd	4,44	2,22	2,22	6,68	8,89
T2 – 0,20% Pd	0,00	2,22	0,0	2,22	2,22
T3 – 0,26% Pd	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T4 – 0,32% Pd	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T5 – 0,42% Pd	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T6 – 0,14% Pd + HiPhos (500 FTU)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T7 – 0,14% Pd + HiPhos (1.000 FTU)	2,22	0,0	0,0	2,22	2,22
Média	1,11	0,55	0,28	1,67	1,94
CV, %	30,02	20,10	14,45	33,62	38,34
P	0,6392	0,5450	0,4396	0,3790	0,3359

Tabela 6. Cinzas (g e %) da tíbia de frangos de corte aos 25 dias de idade.

Tratamentos	Cinzas, g	Cinzas, %
T1 – 0,14% Pd	1,06 f	30,37 e
T2 – 0,20% Pd	1,72 e	35,15 d
T3 – 0,26% Pd	2,56 c	38,84 c
T4 – 0,32% Pd	3,26 b	41,10 b
T5 – 0,42% Pd	3,70 a	43,44 a
T6 – 0,14% Pd + HiPhos (500 FTU)	2,27 d	37,60 c
T7 – 0,14% Pd + HiPhos (1.000 FTU)	3,10 b	40,77 b
Média	2,52	38,18
CV, %	7,02	2,78
P	0,0001	0,0001

Tabela 10. Efeito do % de Pd no peso vivo de frangos de corte dos 7 aos 25 dias, g

Pd, %	7	14	21	25
0,14	181	409 d	722 d	947 d
0,20	181	438 c	885 c	1.186 c
0,26	179	474 b	1.004 b	1.359 b
0,32	181	503 a	1.060 a	1.424 a
Média	180	456	918	1.229
CV, %	1,96	3,35	3,90	4,09
P	0,5266	0,0001	0,0001	0,0001

Tabela 11. Efeito do % de Pd no consumo de ração de frangos de corte dos 7 aos 25 dias, g

Pd, %	7-14	15-21	22-25	7-21	7-25
0,14	321 c	457 c	351 c	777 c	1.127 c
0,20	370 b	621 b	456 b	991 b	1.447 b
0,26	403 ab	718 a	533 a	1.122 a	1.654 a
0,32	413 a	733 a	535 a	1.146 a	1.681 a
Média	377	632	469	1.009	1.477
CV, %	7,76	6,42	7,92	5,39	5,16
P	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Tabela 12. Efeito do % de Pd no ganho médio de peso de frangos de corte dos 7 aos 25 dias, g

Pd, %	7-14	15-21	22-25	7-21	7-25
0,14	228 d	313 c	225 c	540 d	766 c
0,20	257 c	447 b	301 b	704 c	1.005 b
0,26	295 b	530 a	354 a	825 b	1.180 a
0,32	322 a	558 a	363 a	880 a	1.243 a
Média	275	462	311	737	1.048
CV, %	5,64	7,26	9,24	4,89	4,80
P	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Tabela 13. Efeito do % de Pd na conversão alimentar de frangos de corte dos 7 aos 25 dias.

Pd, %	7-14	15-21	22-25	7-21	7-25
0,14	1,401 b	1,466 b	1,576	1,440 c	1,473 c
0,20	1,438 ab	1,391 b	1,516	1,408 bc	1,440 bc
0,26	1,367 a	1,358 ab	1,504	1,361 ab	1,403 ab
0,32	1,284 a	1,315 a	1,47	1,303 a	1,353 a
Média	1,375	1,382	1,518	1,378	1,417
CV, %	6,12	4,71	5,83	4,20	2,89
P	0,0029	0,0002	0,1291	0,0001	0,0001

Tabela 14. Efeito do P disponível na mortalidade de frangos de corte dos 7 aos 25 dias, %

Pd, %	7-14	15-21	22-25	7-21	7-25
0,14	4,44	2,22	2,22	6,68	8,89
0,20	0,00	2,22	0,0	2,22	2,22
0,26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,32	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Média	1,11	1,11	0,55	2,22	2,78
CV, %	32,40	27,50	20,10	38,28	45,70
P	0,4055	0,5787	0,4055	0,2463	0,2474

Tabela 15. Efeito do P disponível no teor de cinzas (g e %) da tíbia de frangos de corte aos 25 dias.

Pd, %	Cinzas, g	Cinzas, %
0,14	1,06 d	30,37 d
0,20	1,72 c	35,15 c
0,26	2,56 b	38,84 b
0,32	3,26 a	41,10 a
Média	2,15	36,37
CV, %	7,07	6,21
P	0,0001	0,0001

Apêndice 19. Condições Ambientais dentro das instalações.

Dia	Data	Temperatura, °C		Umidade Relativa, %	
		Máx.	Mín.	Máx.	Mín.
1	25/07/2012	32,7	30,6	26	21
2	26/07/2012	32,6	31,0	18	16
3	27/07/2012	32,2	29,3	23	18
4	28/07/2012	29,9	27,8	21	17
5	29/07/2012	29,6	27,4	27	18
6	30/07/2012	29,8	27,6	33	17
7	31/07/2012	29,2	25,0	33	23
8	01/08/2012	28,8	27,3	26	33
9	02/08/2012	29,6	24,5	53	32
10	03/08/2012	28,5	24,3	51	31
11	04/08/2012	27,4	23,1	43	43
12	05/08/2012	26,8	24,2	66	38
13	06/08/2012	26,9	23,7	46	33
14	07/08/2012	26,0	24,2	47	32
15	08/08/2012	26,3	23,0	42	35
16	09/08/2012	25,9	21,7	61	53
17	10/08/2012	25,3	20,5	63	44
18	11/08/2012	26,0	23,1	62	48
19	12/08/2012	27,2	23,8	54	34
20	13/08/2012	26,0	24,8	58	50
21	14/08/2012	25,7	21,8	59	44
22	15/08/2012	25,3	24,6	56	51
23	16/08/2012	24,3	23,7	50	40
24	17/08/2012	28,1	24,0	50	40
25	18/08/2012	28,7	24,5	52	34

Apêndice 20. Análise Cálcio e Fósforo nos ingredientes.

Ingrediente	PB, %	Ca, %	P, %
Milho	8,59	0,04	0,25
Farelo de Soja	45,44	0,36	0,60
Fosfato Bicálcico	----	24,70	18,51
Calcário	----	38,72	----

Apêndice 21. Análise do efeito dos tratamentos sobre ganho de peso dos frangos de corte de 7 a 14 dias.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	67865.0498	11310.8416	43.67	<,0001
Erro	56	14503.47136	258.99056		
Total Corrigido	62	82368.52117			

CV, % = 5,60

Apêndice 22. Análise do efeito dos tratamentos sobre ganho de peso dos frangos de corte de 14 a 21 dias.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	422533.7036	70422.2839	80.50	<,0001
Erro	56	47230.7077	843.4055		
Total Corrigido	62	469764.4112			

CV, % = 5.89

Apêndice 23. Análise do efeito dos tratamentos sobre o ganho de peso dos frangos de corte de 21 a 25 dias.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	139860.9101	23310.1517	28.56	<,0001
Erro	56	45702.7654	810.1208		
Total Corrigido	62	185563.6755			

CV, % = 8.68

Apêndice 24. Análise do efeito dos tratamentos sobre o ganho de peso de 7 a 25 dias.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	1621996.221	270332.703	130.14	<,0001
Erro	56	116330.062	2077.323		
Total Corrigido	62	1738326.283			

CV, % = 4,11

Apêndice 25. Análise do efeito dos tratamentos sobre consumo dos frangos de corte de 7 a 14 dias.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	62801.7988	10466.9665	13.36	<,0001
Erro	56	43871.5366	783.4203		
Total Corrigido	62	106673.3354			

CV, % = 7.20

Apêndice 26. Análise do efeito dos tratamentos sobre consumo dos frangos de corte de 14 a 21 dias.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	560044.8655	93340.8109	75.95	<,0001
Erro	56	68823.4601	1228.9904		
Total Corrigido	62	628868.3256			

CV, % = 5.27

Apêndice 27. Análise do efeito dos tratamentos sobre a consumo dos frangos de corte de 21 a 25 dias.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	255164.2269	42527.3712	40.72	<,0001
Erro	56	58471.1217	1044.1272		
Total Corrigido	62	313635.3486			

CV, % = 6.56

Apêndice 28. Análise do efeito dos tratamentos sobre a consumo acumulado dos frangos de corte de 7 a 25 dias.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	2264691.353	377448.559	82.10	<,0001
Erro	56	257448.165	4597.289		
Total Corrigido	62	2522139.518			

CV, % = 4.39

Apêndice 29. Análise do efeito dos tratamentos sobre a conversão alimentar dos frangos de corte de 7 a 14 dias.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	0.19524345	0.03254057	5.35	0.0002
Erro	56	0.34064735	0.00608299		
Total Corrigido	62	0.53589080			

CV, % = 5.74

Apêndice 30. Análise do efeito dos tratamentos sobre conversão alimentar dos frangos de corte de 14 a 21 dias de idade.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	0.15797030	0.02632838	8.38	<,0001
Erro	56	0.17585663	0.00314030		
Total Corrigido	62	0.33382693			

CV, % = 4.12

Apêndice 31. Análise do efeito dos tratamentos sobre conversão alimentar dos frangos de corte de 21 a 25 dias de idade.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	0.07227982	0.01204664	1.46	0.2092
Erro	56	0.46248103	0.00825859		
Total Corrigido	62	0.53476086			

CV, % = 6.03

Apêndice 32. Análise do efeito dos tratamentos sobre conversão alimentar acumulada dos frangos de corte de 7 a 25 dias de idade.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	0.10124738	0.01687456	12.56	<,0001
Erro	56	0.07526295	0.00134398		
Total Corrigido	62	0.17651033			

Apêndice 33. Análise do efeito dos tratamentos sobre peso de cinza da tíbia,g.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	46.18371232	7.69728539	244.48	<,0001
Erro	56	1.76315609	0.03148493		
Total Corrigido	62	47.94686841			

Apêndice 34. Análise do efeito dos tratamentos sobre o percentual de peso da tíbia, %.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	1024.288786	170.714798	151.63	<,0001
Erro	56	63.046728	1.125834		
Total Corrigido	62	1087.335513			

CV, % = 2.77

Apêndice 35. Análise do efeito dos tratamentos sobre peso de cinza do fêmur, g.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	23.23510310	3.87251718	168.76	<,0001
Erro	56	1.28499788	0.02294639		
Total Corrigido	62	24.52010098			

CV, % = 9.14

Apêndice 36. Análise do efeito dos tratamentos sobre o percentual de cinza de fêmur, %.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	1231.184820	205.197470	136.93	<,0001
Erro	56	83.918064	1.498537		
Total Corrigido	62	1315.102884			

CV, % = 3.42

Apêndice 37. Análise do efeito dos tratamentos sobre peso de cinza do dedo médio, mg.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	18914.69136	3152.44856	84.70	<,0001
Erro	56	2084.27088	37.21912		
Total Corrigido	62	20998.96224			

CV, % = 11.69

Apêndice 38. Análise do efeito dos tratamentos sobre percentual de cinza do dedo médio.%.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	6	124.2938568	20.7156428	86.42	<,0001
Erro	56	13.4233886	0.2397034		
Total Corrigido	62	137.7172453			

Apêndice 39. Normas para Publicação para a Journal of Applied Poultry Research.

Editorial Policies and Procedures

The mission of *Journal of Applied Poultry Research* (JAPR) is to provide practical, reliable, and timely information to those whose livelihoods are derived from the commercial production of poultry and those whose research benefits this sector; address topics of near-term application based on appropriately designed studies and critical observations; encourage scientific approaches to practical problem solving; and present information comprehensible to a broad readership.

By submission of a manuscript, the authors guarantee to the journal that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, thesis, or dissertation); that it is not under consideration for publication elsewhere; and that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities at the institute where the work has been carried out. Appropriate identification of previously published preliminary reports should be provided in a title page footnote. Translations of an article into other languages for publication require approval by the editor-in-chief. Opinions or views expressed in papers published by JAPR are those of the authors and do not necessarily represent the opinion of the Poultry Science Association (PSA) or the editor-in-chief.

Before manuscripts are submitted, authors should have them read critically by others well versed in English to facilitate review; all co-authors should approve the manuscript before its submission to the journal.

Contact Information for Journal Staff

For information on the scientific content of the journal, contact the editor-in-chief, Dr. Jesse Grimes, North Carolina State University, Department of Poultry Science, Box 7608, Raleigh, NC 27695 (e-mail: jesse_grimes@ncsu.edu).

For assistance with ScholarOne Manuscripts, manuscript submission and copyright forms, or page charge and offprint orders, contact Shauna Miller, headquarters office, 1800 South Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820 (FAX: 217-378-4083; shaunam@assoqh.org).

For permissions or other information contact Susan Pollock, managing editor, Headquarters Office, Poultry Science Association, 1800 South Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820, (telephone: 217-356-7641; FAX: 217-378-4083; journals@assoqh.org).

Care and Use of Animals

Authors must make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments shall be conducted in accordance with the principles and specific guidelines presented in *Guidelines for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*, 3rd ed., 2010 (Federation of Animal Science Societies, 1800 South Oak St., Suite 100, Champaign, IL 61820); and, if applicable, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (United States Department of Human Health and Services, National Institutes of Health, Publication Number ISBN 0-309-05377-3, 1996); or *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, 2nd ed., Vol. 1, 1993 (Canadian Council on Animal Care). Methods of killing experimental animals must be described in the text. In describing surgical 2 JAPR: Instructions to Authors procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified. Intraabdominal or intrathoracic invasive surgery requires anesthesia. This includes castration. The editor-in-chief of JAPR may refuse to publish manuscripts that are not compatible with these guidelines. If rejected solely on that basis, however, the paper may be resubmitted for reconsideration when accompanied by a written verification that a committee on animal care in research has approved the experimental design and procedures involved.

Types of Articles

Research Reports. Most papers published in JAPR are research reports. The journal emphasizes the importance of good scientific writing and clarity in presentation of the concepts, apparatus, and sufficient background information that would be required for thorough understanding by scientists in other disciplines. The results of experiments published in JAPR must be replicated, either by replicating treatments within experiments or by repeating experiments.

In addition to research reports, other types of papers appear in the journal:

Field Reports. Field reports will be published when adequate background is available and conclusions can be supported by quantifiable laboratory or diagnostic results. The manuscript should follow the format outlined in the Style and Form. It should include a section titled Field Report in which the observations are explained and discussed under subheadings of Materials and Methods and Results and Discussion. Authors are encouraged to include subheadings for all major areas in this section.

Review Articles. Articles submitted to this section may cover new developments in a field, describe the evolution of a currently accepted management practice, propose changes in management based on current research, or describe procedures. Clear distinctions should be made between firmly established practices and unresolved questions. Articles should begin with a concise description of the topic, followed by a critical evaluation of the important references. Review articles, whether solicited or unsolicited, will be subject to a stringent review process.

Review articles should follow the general format outlined in the Style and Form when appropriate and include brief subheadings to separate main ideas. The title page should use the appropriate format and include a summary and statement of primary audience. Review articles may include tables, figures, and photographs. A Conclusions and Applications section should be included in most cases.

The use of copyrighted materials must be by permission of the copyright holders. Authors are responsible for obtaining copyright permissions and sending them to the managing editor.

Symposium and Workshop Articles. Manuscripts presented at the annual meeting as part of a symposium or workshop may be submitted with prior agreement by the editor-in-chief. These submissions will be subject to peer review and may be accepted or rejected in the same manner as other submissions. The format may be similar to reviews, research reports, or field reports, as outlined in the Style and Form.

Letters and Commentaries. The journal accepts letters, book reviews, and other free-form communications (used to correct errors, provide clarification, or offer other points of view on pertinent issues). Submissions may be edited in consultation with the author.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Authors should submit their papers online to our web-based submission and review system (<http://mc.manuscriptcentral.com/japr>). Detailed instructions for submitting electronically are provided online at that site. Authors who are unable to submit online should contact the editorial office (shaunam@assochq.org) for assistance.

Copyright Agreement

When a manuscript is accepted for publication, the authors agree to transfer copyright to the publisher, that the manuscript will not be published

elsewhere in any language without the consent of the copyright holders, that written permission of the copyright holder has been obtained by the authors for material used from other copyrighted sources (including tables, graphs, figures, and illustrations), and that any costs associated with obtaining this permission are the authors' responsibility.

The Manuscript Submission and Copyright Release Form (available on the JAPR Web site: <http://japr.fass.org/misc/ifora.dtl>) must be completed and filed with the editorial office for each paper submitted; faxed copies are acceptable. The copyright agreement is included in the Manuscript Submission and Copyright Release form and must be completed by all authors before publication can proceed. The corresponding author is responsible for obtaining the signatures of co-authors. Authors who are not permitted to release copyright, such as federal employees, must still sign and return the form with a statement of the reason for not releasing the copyright.

REVIEW OF MANUSCRIPTS

The journal uses a two-stage review process. All manuscripts will first receive a preliminary review to ensure appropriateness for the journal. The second review will be a more detailed scrutiny by individuals knowledgeable in the specific subject area of the paper. Additional examination of the manuscript will be made by the editors.

The review process will be stringent. Names of authors will be made known to reviewers; reviewers may contact the authors directly with questions, suggestions, and comments if such contact will improve the paper or streamline the review process. The subject editors will handle all initial correspondence with authors during the review process; the editor-in-chief will notify the author of the final decision to accept or reject.

PRODUCTION OF PROOFS

Accepted manuscripts are forwarded to the editorial department for preparation for typesetting. At this point, a technical editor may contact the authors for missing information or table or figure revisions. The manuscript is then typeset, figures are reproduced, and author proofs are prepared.

Proofs

Author proofs of all manuscripts will be sent to the corresponding author indicated on the title page of the manuscript. Proofs should be read carefully, because the responsibility for proofreading is with the authors.

Corrections to the proof should be made neatly and clearly in the margins of the proof or in the pdf by using the notes/comments and text insertion/strikeout features in Adobe Acrobat or Reader. Galley proofs should be faxed (217-378-4083) to PSA headquarters. Proofs should be corrected and returned within 3 working days.

Editor queries appear in the text, within brackets and in boldface type. Queries should be answered on the galley proofs; failure to do so may delay publication.

Publication Charges and Offprints

Two options are available for the publication of articles in this journal: conventional page charges and Open Access (**OA**).

Conventional Page Charges. The current charge for publication is \$60 per printed page (or fraction thereof) in the journal if at least one author is a current professional member of PSA. If no author is a member of PSA, the publication charge is \$85 per journal page.

OA. For authors who wish to publish their papers OA (freely available without subscription when the issue is posted online), authors will pay the OA fee when proofs are returned to the editorial office. Charges for OA are \$2,400 if at least one author is a current professional member of PSA; the charge is \$3,100 when no author is a professional member.

Offprints and Color Charges. Offprints may be ordered at an additional charge. Authors who submit articles containing color illustrations are responsible for paying the additional charge for color printing, including the printing of any reprints they order, and must agree in writing prior to publication to pay the additional charges (http://japr.fass.org/misc/JAPR_ColorChargeAgreement.pdf). When the galley proof is sent, the author is asked to complete an offprint order indicating the number of offprints desired and the name of the institution, agency, or individual responsible for publication charges.

MANUSCRIPT PREPARATION: STYLE AND FORM

Preparing the Manuscript File

Manuscripts should be submitted in Microsoft Word and should be double-spaced with lines and pages numbered consecutively using Times New Roman font at 12 points. All special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Complex math should be entered using MathType or another equation editor. Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscripts (not placed in the text). Failure to follow these instructions may result in immediate rejection of the manuscript.

Metric or English units (or both) are acceptable. Authors should use units appropriate for the intended audience. Energy content of feeds will be expressed as calories.

Headings

Major Headings. Major headings are centered, boldface, in all capital letters, and consist of SUMMARY, DESCRIPTION OF PROBLEM, MATERIALS AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSIONS AND APPLICATIONS, and REFERENCES AND NOTES.

Major headings in review articles, field reports, and symposium articles may vary from those listed here, but should include SUMMARY, CONCLUSIONS AND APPLICATIONS, and REFERENCES AND NOTES.

First Subheadings. First subheadings are boldface and italic, on a separate line beginning at the left margin, and have the first letter of each important word capitalized. Text that follows a first subheading should be in a new paragraph.

Second Subheadings. Second subheadings begin the first line of a paragraph. They are indented, boldface, italic, and followed by a period. The first letter of each important word is capitalized. The text follows immediately after the final period of the subheading.

Title Page

- The title should be indicative of the content. It should capture the interest of all who might benefit from information in the manuscript. However, the length of the title should be kept to a minimum.

- Address and affiliation of authors (listed by first name or initials, middle initial, and last name) should be included. Indicate to whom correspondence should be directed by means of a footnote, with the notation "Corresponding author: (e-mail address)" at the bottom of the title page.

- List 3 to 8 key words or phrases to identify the most important subjects covered by the paper.

- The running title should be 30 characters or less, including spaces.

- Statement of primary audience. To determine appropriateness for the journal and to assist in selecting reviewers, the author should indicate clearly what sector(s) within the poultry community (e.g., flock supervisors,

nutritionists, quality assurance personnel, researchers, plant managers, veterinarians) could benefit most from the content of this article.

Summary

The Summary (12 to 16 lines) is not an abstract. It is intended to give readers with diverse backgrounds a general appreciation of the manuscript contents. It should be written so that even those not directly interested in the topic will enjoy reading at least this section to keep abreast of areas other than their own. This section should not include details of materials and methods or a detailed review of the results. Keep the summary free-flowing, giving the reader a general, not specific, idea of what the study revealed. Do not include reference citations in the summary.

Description of Problem

This section will acquaint the reader with the problem, citing field experiences where appropriate. Readability is of utmost importance. Detailed literature reviews may not be appropriate for this section. A more extensive citation of references should be included in the Results and Discussion or References and Notes section. This section should end with a statement of the objective(s) of the study.

Materials and Methods

The author(s) should clearly establish in the Materials and Methods section why the problem was approached in a particular way. The rationale for including each treatment should be clearly stated. Detailed laboratory and bird management procedures should be described in the References and Notes section and not in the Materials and Methods section. Sources of stock, equipment, and materials should be listed in the References and Notes section and referred to in text by citation number.

A brief statement of the statistical methods should be included, with more detailed descriptions placed in the References and Notes section. In manuscripts using several treatments, a description of treatments should be included as Table 1.

Results and Discussion

This section begins with observed results and their interpretation. Descriptive subheadings may precede all major paragraphs and changes in subject emphasis. This section should discuss specifically how findings address the problem described in the Description of Problem section and how they are related to published works.

Statements regarding statistically significant differences between treatments in results should be included in the text, tables, and figures. Statements regarding differences should be avoided unless they are supported by statistical analyses and meet the stated level of probability (e.g., $P < 0.05$).

Conclusions and Applications

Conclusions and recommendations of the author(s) should be listed numerically. Each statement should be clear, concise, and without discussion. Authors are encouraged to summarize their significant findings, to identify further research needs, and to describe the constraints, economics, and other factors associated with using the results in scientific or commercial applications. Do not include references in this section.

References and Notes (with Acknowledgments)

References and notes should be cited in text, by number within an editorial bracket (e.g., [1]). In the References and Notes section, citations should be listed in the order they appear and are numbered in the text (not alphabetically). Authors are encouraged to use reference management software (e.g., EndNote or Reference Manager) to facilitate renumbering or inserting references by the editor or inserting references during the revision process. Manuscripts may be returned to authors *before review* for renumbering of references if not cited in numerical order. Include details such as statistical analysis; detailed procedures; sources of birds, instruments, or items; details of designed instruments; a literature review; and other tangential matters.

Cite acknowledgments at the end of this section in a subsection called *Acknowledgments*. These entries are not numbered.

Tables

Number tables consecutively according to the citation in the text. Tables must be created using the MS Word table feature and inserted in the manuscript after the references section. Each table must be placed on a separate page and must have a clear descriptive heading so that the meaning of the data will be understandable without reference to the text. Indicate footnotes to tables with numbers, beginning with 1. Statistical notation should be made with lowercase and uppercase superscript letters or with asterisks, as appropriate. Statistical notation should place the superscript "a" on the largest mean. Probability values may be indicated as follows: $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, and $\dagger P \leq 0.10$. Consult a recent issue of the journal for examples of tables.

Figures

- **Figure Size.** Prepare figures at the final size for publication. Figures should be created at the final publication size of 7 cm wide (2.75 inches) or 14 cm wide (5.5 inches).

- **Font Size.** Ensure that all type within the figure and axis labels is readable at the final publication size. A minimum type size of 8 points (after reduction) should be used.

- **Fonts.** Use Helvetica or Times New Roman. Symbols may be inserted using the Symbol palette in Times New Roman.

- **Line Weight.** For line graphs, use a minimum stroke weight of 1 point for all lines. If multiple lines are to be distinguished, use solid, long dash, short dash, and dotted lines. Avoid the use of color, gray, or shaded lines because these will not reproduce well. Lines with different symbols for the data points may also be used to distinguish curves.

- **Axis Labels.** Each axis should have a description and a unit. Units may be separated from the descriptor by a comma or parentheses, and should be consistent within a manuscript.

- **Shading and Fill Patterns.** For bar charts, use different fill patterns if needed (e.g., black, white, gray, diagonal stripes). Avoid the use of multiple shades of gray because they will not be easily distinguishable in print.

- **Symbols.** Identify curves and data points using the following symbols only: □, ■, ○, ●, ▲, ▼, △, ▽, ◇, ◆, +, or ×. Symbols should be defined in a key on the figure if possible.

- **File Formats.** Figures can be submitted in Word, PDF, EPS, TIFF, and JPEG. Avoid Power-Point files and other formats. For the best printed quality, line art should be prepared at 600 ppi. Grayscale and color images and photomicrographs should be at least 300 ppi.

- **Grayscale Figures.** If figures are to be reproduced in grayscale (black and white), submit in grayscale. Often color will mask contrast problems that are apparent only when the figure is reproduced in grayscale.

- **Color Figures.** If figures are to appear in color in the print journal, files must be submitted in CMYK color (not RGB).

- **Photomicrographs.** Photomicrographs must have their unmagnified size designated, either in the caption or with a scale bar on the figure. Reduction for publication can make a magnification power designation (e.g., 100×) inappropriate.

- **Caption.** The caption should provide sufficient information so that the figure can be understood without excessive reference to the text. All author-derived abbreviations used in the figure should be defined in the caption.

- **General Tips.** Avoid the use of 3-dimensional bar charts unless essential to the presentation of the data. Use the simplest shading scheme possible to present the data clearly. Ensure that data, symbols, axis labels, lines, and the key are clear and easily readable at the final publication size.

Color Charge. The cost to publish in color in the print journal is \$995 per page of color; a surcharge for offprints will also be assessed. At the time of submission on ScholarOne Manuscripts, authors will be asked to approve color charges for figures that they wish to have published in color in the print journal. Color versions of figures will be included in the online PDF and full-text article at no charge.

Sample References

NOTE: The headings that appear above the following sample references and notes are for clarification in these instructions, but they are not used in an actual paper, except for *Acknowledgments*.

Journal Article

Dansky, L. M., and F. W. Hill. 1952. Application of the chromic oxide indicator method to balance studies with growing chicks. *J. Nutr.* 47:449–459.

Snow, J. L., M. W. Douglas, and C. M. Parsons. 2003. Phytase effects on amino acid digestibility in molted laying hens. *Poult. Sci.* 82:474–477.

Witter, R. L., and I. M. Gimeno. 2006. Susceptibility of adult chickens, with and without prior vaccination, to challenge with Marek's disease virus. *Avian Dis.* 50:354–365. doi:10.1637/7498-010306R.1

Monograph

NRC. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Dissertation

Heskett, E. A. 2003. Efficacy of a recombinant herpes virus of turkeys vector vaccine, expressing genes to Newcastle disease virus and Marek's disease virus, in chickens and turkeys against exotic Newcastle disease virus challenge. PhD Diss. Univ. Florida, Gainesville.

Trade Publication

Wilgus, H. S. 1973. Temperature-programmed feeding schedules and other means of conserving protein in market turkey production. *Feedstuffs* 45(27):27–31.

Book or Chapter in Book

AOAC International. 2007. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th ed. Rev. 2.

AOAC Int., Gaithersburg, MD. Whittow, G. C. 1976. Regulation of body temperature. Pages 146–173 in *Avian Physiology*. P. D. Sturkie, ed. Springer-Verlag, New York, NY.

Proceedings

Hruby, M., J. C. Remus, and E. E. M. Pierson. 2004. Nutritional strategies to meet the challenge of feeding poultry without antibiotic growth promotants. Pages 3–5 in *Proc. 2nd Mid-Atlantic Nutr. Conf.*, Timonium, MD. Univ. Maryland, College Park.

Federal Register

USDA, Plant and Animal Health Inspection Service. 2004. Blood and tissue collections at slaughtering and rendering establishments, final rule. 9CFR part 71. *Fed. Regist.* 69:10137–10151.

Laboratory Procedure

The extract was added to 30 mL of hexane, made to 100 mL with 10% aqueous Na₂SO₄.

Personal Communication

Wilson, H. R. 2005. Univ. Florida, Gainesville. Personal communication.

Proprietary Product

Incubator, Petersime, Zulte, Belgium.
Avizyme TX, Finnfeed International, Marlborough, Wiltshire, UK.
Thymol, 99% purity, Acros Organics, Geel, Belgium.

Statistical Procedure

If a note has an embedded reference, the reference is cited by number (as in the text) or parenthetically within the note:

Data were analyzed by ANOVA with flock as the independent variable. When differences among flocks were significant, means were separated using Duncan's multiple range test (SAS User's Guide, 2001, Version 8 ed., SAS Institute Inc., Cary, NC). Pearson product-moment correlation coefficients were calculated between average percentage cracks from each flock recorded every week and average values for egg-specific gravity, breaking strength, percentage shell, shell thickness, and shell weight per unit of surface area. Significance implies $P < 0.05$.

Statistical Software

SAS User's Guide. 2001. Version 8 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

US Patent

El Halawani, M. E., and I. Rosenboim. 2004. Method to enhance reproductive performance in poultry. Univ. Minnesota, assignee. US Pat. No. 6,766,767.

Website

Dyro, F. M. 2005. Arsenic. WebMD. Accessed Feb. 2006. <http://www.emedicine.com/neuro/topic20.htm>.

Acknowledgments

The advice and technical assistance of Thomas Jones (affiliation, location) are acknowledged.

Abbreviations

The following abbreviations may be used without definition in the *Journal of Applied Poultry Research*. Plurals do not require “s”. Chemical symbols and 3-letter abbreviations for amino acids do not need definition. Other abbreviations should be defined at first use in the summary and the main text, as well as in each table or figure in which they appear. Abbreviations are boldface at first use in the main text. Abbreviations should not be used in the manuscript title, running title, or to begin a paragraph or sentence. They can be used in section headings if previously defined. This list appears inside the back cover of each issue of the journal.

ADF	acid detergent fiber
ADFI	average daily feed intake
ADG	average daily gain
AME	apparent metabolizable energy
AMEn	nitrogen-corrected apparent metabolizable energy
ANOVA	analysis of variance
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BSA	bovine serum albumin
BW	body weight
°C	Celsius
cDNA	complementary DNA
CF	crude fiber
cfu	colony-forming units (following a numeral)
CI	confidence interval
CP	crude protein
cpm	counts per minute
CV	coefficient of variation
d	day
df	degrees of freedom
DM	dry matter
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetate
EE	ether extract
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
°F	Fahrenheit
FCR	feed conversion ratio
FE	feed efficiency
ft	foot
g	gram
gal	gallon
G:F	gain-to-feed ratio
GLM	general linear model
h	hour
HEPES	<i>N</i> -(2-hydroxyethyl)piperazine- <i>N</i> -2-ethanesulfonic acid
HPLC	high-performance (high-pressure) liquid chromatography
ICU	international chick units

Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
i.m.	intramuscular
in.	inch
i.p.	intraperitoneal
IU	international units
i.v.	intravenous
kcal	kilocalorie
L	liter (also capitalized with any combination, e.g., mL)
lb	pound
L:D	hours of light:hours of darkness in a photoperiod
LSD	least significant difference
m	meter
μ	micro
M	molar
ME	metabolizable energy
ME _n	nitrogen-corrected metabolizable energy
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
min	minute
mo	month
MS	mean squares
n	number of observations
N	normal
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	reduced form of NAD
NDF	neutral detergent fiber
NRC	National Research Council
NS	not significant
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
ppm	parts per million
r	correlation coefficient
r ²	coefficient of determination, simple
R ²	coefficient of determination, multiple
RH	relative humidity
RIA	radioimmunoassay
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
s	second
SAS	Statistical Analysis System
s.c.	subcutaneous
SD	standard deviation
SE	standard error
SEM	standard error of the mean
SNP	single nucleotide polymorphism
SRBC	sheep red blood cells
TBA	thiobarbituric acid

T	cell thymic-derived cell
TME	true metabolizable energy
TME _n	nitrogen-corrected true metabolizable energy
TSAA	total sulfur amino acids
USDA	United States Department of Agriculture
UV	ultraviolet
vol/vol	volume to volume
vs.	versus
wt/vol	weight to volume
wt/wt	weight to weight
wk	week
yr	year

SNP Nomenclature

The increasing number of SNP association studies and the improvements in chicken genome annotation require a standardized SNP nomenclature for unequivocal and correct SNP identification. Additionally, information regarding the SNP investigated should be easily accessible in a publicly available database. Therefore, all relevant SNP included in a study should be listed with their unique RefSNP (rs) or submitted SNP (ss) number (if rs number is not yet available) as indicated in the public domain NCBI dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). If the SNP investigated do not yet have an entry in the NCBI dbSNP database, the authors of the manuscript are responsible for submitting all the required information to NCBI (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) for depositing the SNP into this database and obtaining a unique ss number for the SNP. In the text of the manuscript, use of the rs/ss number of the SNP or an alternative standardized nomenclature is recommended.

Supplemental Information (Online)

The following information is available online and is updated regularly. Please refer to these pages when preparing a manuscript for submission.

Journal Title Abbreviations. A list of standard abbreviations for common journal titles is available online (<http://japr.fass.org/misc/ifora.dtl>).

SI Units. The following site (National Institute of Standards and Technology) provides a comprehensive guide to SI units and usage: <http://physics.nist.gov/Pubs/SP811/contents.html>

ScholarOne Manuscripts Instructions. Manuscripts are submitted online (<http://mc.manuscriptcentral.com/psa>). Full user instructions for using the Manuscript Central system are available online; click the “Get Help Now” link on the top right of the main page (<http://mc.manuscriptcentral.com/psa>).

6 VITA

Daniel Luis Anschau, filho de Ademar Roque Anschau e Merice Maria Anschau, nascido em 22 de fevereiro de 1983, em Cerro Largo – RS. Estudou na Escola Municipal de Ensino Fundamental Padre José Schardong (Cerro Largo-RS) onde completou o primeiro grau. E no Colégio Marista Santo Ângelo (Santo Ângelo-RS) e Colégio La Salle Mediareira (Cerro Largo – RS) concluiu o segundo grau. Em 2006 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, Campus de Palmeira das Missões - RS), até o ano de 2011. Entre julho de 2010 e dezembro de 2010, realizou estágio curricular na Universidade Federal de Santa Maria - Laboratório de Avicultura – LAVIC. Em abril de 2011, sob orientação do Prof. Sergio Luiz Vieira, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como bolsista CAPES. Inserido no grupo de trabalho e pesquisa do Aviário de Ensino e Pesquisa. Foi submetido à banca de defesa de Dissertação em março de 2013.