

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**CONTRIBUIÇÃO FOSFÓRICA DO HUMOFOSFATO DE
CÁLCIO COM A SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE NA
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE**

Gabriel Oliveira Malta Varella

Médico Veterinário

2024

D
I
S
S.

/

V
A
R
E
L
L
A

G.
O.
M.

2
0
2
4

D
I
S
S.

/

V
A
R
E
L
L
A

G.
O.
M.

2
0
2
4

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**CONTRIBUIÇÃO FOSFÓRICA DO HUMOFOSFATO DE
CÁLCIO COM A SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE NA
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE**

Discente: Gabriel Oliveira Malta Varella

Orientadora: Profa. Dra. Nilva Kazue Sakomura

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre Ciência Animal.

2024

V293c

Varella, Gabriel Oliveira Malta

Contribuição fosfórica do humofosfato de cálcio com a suplementação de fitase na alimentação de frangos de corte / Gabriel Oliveira Malta Varella. -- Jaboticabal, 2024
61 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Nilva Kazue Sakomura

1. Nutrição animal. 2. Avicultura. 3. Fósforo. 4. Biodisponibilidade. 5. Requerimentos nutricionais.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

REGISTRO DO IMPACTO ESPERADO DA DISSERTAÇÃO NA SOCIEDADE

Os resultados demonstraram que o humofosfato de cálcio pode ser utilizado com êxito em dietas comerciais para frangos de corte, promovendo resultados de desempenho próximos ou superiores ao fosfato monocálcico. As análises demonstram ainda que o humofosfato pode melhorar parâmetros fisiológicos quando associado a fitases, melhorando a eficiência produtiva, diminuindo custos e garantindo maior sustentabilidade à produção animal.

REGISTRATION OF THE EXPECTED IMPACT OF THE DISSERTATION ON SOCIETY

The results demonstrated that calcium humophosphate can be successfully used in commercial diets for broiler chickens, promoting performance results close to or better than monocalcium phosphate. The analyzes also demonstrate that humophosphate can improve physiological parameters when associated with phytases, improving production efficiency, reducing costs, and ensuring greater sustainability in animal production.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CONTRIBUIÇÃO FOSFÓRICA DO HUMOFOSFATO DE CÁLCIO COM A SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

AUTOR: GABRIEL OLIVEIRA MALTA VARELLA

ORIENTADORA: NILVA KAZUE SAKOMURA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área: Nutrição Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. NILVA KAZUE SAKOMURA (Participação Presencial)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. LEILANE ROCHA BARROS DOURADO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / UFPI - Bom Jesus, PI

Documento assinado digitalmente
LEILANE ROCHA BARROS DOURADO
Data: 19/03/2024 19:24:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. MATHEUS DE PAULA REIS (Participação Virtual)
Departamento de Aves / Instituição Trouw Nutrition - Toledo/ES

Jaboticabal, 18 de março de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriel Oliveira Malta Varella, nascido em 17 de fevereiro de 1997 em Belo Horizonte, Minas Gerais. Filho de Eduardo Malta Varella e Vanessa Miranda Sá Oliveira Varella. É Técnico em Eletromecânica pelo Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Câmpus Juiz de Fora em 2015. No ano de 2016 ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), finalizando a graduação no ano de 2022. Neste período, foi bolsista de extensão e iniciação científica nos períodos de 2017 a 2022, sob orientação do professor Dr. Flávio Medeiros Vieites. Iniciou o curso de Mestrado em Ciência Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal, São Paulo, em agosto de 2022, sob orientação da Profa. Dra. Nilva Kazue Sakomura, defendendo sua dissertação no dia 18 de Março de 2024.

Vida Boa

Que vida boa
Ô, ô, ô, que vida boa
Sapo caiu na lagoa
Sou eu no caminho do meu sertão

Que vida boa
Ô, ô, ô, que vida boa
Sapo caiu na lagoa
Sou eu no caminho do meu sertão

Moro num lugar
Numa casinha inocente do sertão
De fogo baixo aceso no fogão
Fogão à lenha, ai, ai

Tenho tudo aqui
Um vaquinha leiteira, um burro bão
Uma baixada ribeira e um violão
E umas galinha, ai, ai

Tenho no quintal
Uns pés de fruta e de flor
E, no meu peito, por amor
Plantei alguém (plantei alguém)

Que vida boa
Ô, ô, ô, que vida boa
Sapo caiu na lagoa
Sou eu no caminho do meu sertão

Que vida boa
Ô, ô, ô, que vida boa
Sapo caiu na lagoa
Sou eu no caminho do meu sertão

Veze outra vou
Na venda do vilarejo pra comprar
Sal grosso, cravo e outras coisa que faltar
Marvada pinga, ai, ai

Pego o meu burrão
Faço na estrada poeira levantar
Qualquer tristeza que for não vai passar
Do mata-burro, ai, ai

Galopando vou
Depois da curva tem alguém
Que chamo sempre de meu bem
A me esperar (a me esperar)

Que vida boa
Ô, ô, ô, que vida boa
Sapo caiu na lagoa
Sou eu no caminho do meu sertão

(Victor e Léo)

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista aos meus avós, José Ramos e Zulma, por terem me criado e fornecido o apoio necessário para construir essa trajetória. Os levarei comigo eternamente em meu coração e gostaria que pudessem ter visto este momento em vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, José e Zulma, pois sem vocês eu não teria tido as oportunidades e facilidades que a vida me proporcionou.

Ao meu pai, Eduardo, por sempre se preocupar em passar os ensinamentos da vida.

Ao meu irmão, Samuel, e minha sobrinha, Sofia, por serem o suspiro de família que ainda possuo.

Ao meu amor, Monique, pelo apoio incondicional e incansável nesta fase tão inquietante. Foram tempos difíceis para nós, que contávamos os meses para finalmente nos ver, porém você sempre foi o pedacinho de conforto que me deu forças para ser paciente. Não há palavras que descrevem a gratidão por você ser tão companheira comigo. Eu amo você minha Xuxuzita.

À minha orientadora, Professora Nilva Kazue Sakomura, por me fornecer a oportunidade de integrar um dos grandes centros de pesquisas avícolas do nosso país. Ao meu orientador durante a graduação, Flávio Medeiros Vieites, por me iniciar a curiosidade quanto à pesquisa.

Aos membros do LAVINESP que me ajudaram em todos os processos de condução do estudo: Audasley, Raully, Bruno, Rosiane e Larissa, e em especial ao Rony, por todo o suporte e discussões. Também sou grato aos estagiários e funcionários do setor que colaboraram nas árduas tarefas.

Aos meus amigos de vida das Minas Gerais, senti e sinto eternas saudades de vocês e dos nossos rolês em Juiz de Fora.

À Phosphea, representada por Benjamin Ribeiro, pela confiança de conduzir o experimento da empresa em parceria com nosso laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo 131342/2022-3, ao qual também sou grato pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	PÁGINA
CONTRIBUIÇÃO FOSFÓRICA DO HUMOFOSFATO DE CÁLCIO COM A SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE . iii	iii
PHOSPHORUS CONTRIBUTION OF CALCIUM HUMOPHOSPHATE WITH PHYTASE SUPPLEMENTATION IN BROILER CHICKEN FEEDING	iv
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais.....	1
<i>Considerações Gerais</i>	<i>2</i>
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Metabolismo do Fósforo	4
2.2 Fontes fosfóricas.....	6
2.3 Valor fosfórico nos alimentos.....	8
2.4 Fitase	12
3. REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO 2 – Calcium Humophosphate supplemented with phytase on phosphorus digestibility and performance in broiler chickens¹.....	21
INTRODUCTION.....	23
MATERIALS AND METHODS	24
RESULTS	28
DISCUSSION.....	30
ACKNOWLEDGMENTS	35
DISCLOSURES	35
REFERENCES.....	36
CAPÍTULO 3 – Considerações Finais	46
<i>Considerações Finais</i>	<i>47</i>
1. IMPLICAÇÕES.....	47



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Contribuição fosfórica do humofosfato de cálcio com a suplementação de fitase sobre o desempenho e digestibilidade ileal de frangos de corte**", protocolo nº: 003386/23, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. NILVA KAZUE SAKOMURA, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

Vigência do Projeto	01/07/2023 a 01/07/2024
Espécie / Linhagem	Gallus Gallus domesticus / Ross Ap 308
Nº de animais	3.200
Peso / Idade	40 g / 1 dia
Sexo	Machos
Origem	Incubatório Pluma Agroavícola - Descalvado

Jaboticabal, 16 de maio de 2023.

Prof. Dra. Paola Castro Moraes
Vice-coordenadora em exercício – CEUA FCAV

CONTRIBUIÇÃO FOSFÓRICA DO HUMOFOSFATO DE CÁLCIO COM A SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO – O fósforo é um dos principais componentes para o crescimento e manutenção adequado dos seres vivos, contudo, em ingredientes vegetais a maior fatia deste nutriente se encontra na forma de fitatos indigestíveis pelas aves, o que acarreta na adição de fontes inorgânicas. O humofosfato de cálcio é um fosfato inovador que visa aliar alta biodisponibilidade a funções de modulação do ambiente intestinal. O objetivo com este estudo foi comparar o desempenho, a digestibilidade fosfórica, o pH intestinal e a porcentagem de cinzas nos ossos de frangos de corte alimentados com dietas formuladas a base de humofosfato de cálcio ou fosfato monocálcico, e suas interações com níveis crescentes de fitase. Foram utilizados 2800 frangos de corte machos de 1 dia distribuídos aleatoriamente em 8 tratamentos contendo 10 repetições de 35 aves cada, totalizando 80 parcelas. Os tratamentos consistiram em duas dietas controle utilizando humofosfato de cálcio ou fosfato monocálcico como única fonte de fósforo inorgânico, suplementadas com níveis crescente de fitase (0, 500 FTU, 1000 FTU e 2000 FTU). As dietas foram formuladas para atender os requerimentos nutricionais exceto pelo fósforo e cálcio, que foram reduzidos de acordo com a matriz da enzima em sua inclusão máxima (2000 FTU). As aves alimentadas com humofosfato de cálcio obtiveram estatisticamente ($P < 0,05$) maior ganho de peso, pH ileal mais ácido e melhor mineralização óssea que aquelas alimentadas com fosfato monocálcico. Não foram detectadas diferenças ($P > 0,05$) entre as fontes para a digestibilidade ileal aparente, consumo de ração e pH duodenal e jejunal. Os resultados sugerem que o humofosfato pode atuar junto das fitases comerciais para uma melhor eficiência destas. Como esperado, a fitase proporcionou ganhos significativos em todas as respostas analisadas. Novos estudos são importantes para avaliar e quantificar parâmetros mais específicos do metabolismo que possam esclarecer lacunas deixadas por esta pesquisa.

Palavras-chave: Avicultura, biodisponibilidade, fósforo, nutrição animal, requerimentos.

PHOSPHORUS CONTRIBUTION OF CALCIUM HUMOPHOSPHATE WITH PHYTASE SUPPLEMENTATION IN BROILER CHICKEN FEEDING

ABSTRACT - Phosphorus is one of the main components for the adequate growth and maintenance of living beings, however, in vegetable ingredients most of this nutrient is found in the form of phytates that are indigestible by birds, which leads to the addition of inorganic sources. Calcium humophosphate is an innovative phosphate that aims to combine high bioavailability with functions that modulate the intestinal environment. The objective of this study was to compare the performance, phosphoric digestibility, gut pH, and bone ash of broiler chickens fed diets formulated with calcium humophosphate or monocalcium phosphate, and their interactions with increasing levels of phytase. 2800 1-day-old male broilers were used, randomly distributed in 8 treatments containing 10 replications of 35 birds each, totaling 80 pens. The treatments consisted of two control diets using calcium humophosphate or monocalcium phosphate as the sole source of inorganic phosphorus, supplemented with increasing levels of phytase (0, 500 FTU, 1000 FTU and 2000 FTU). The diets were formulated to meet nutritional requirements except for phosphorus and calcium, which were reduced according to the enzyme matrix at its maximum inclusion (2000 FTU). Birds fed with calcium humophosphate had statistically ($P < 0.05$) greater body weight gain, more acidic ileal pH and better bone mineralization than those fed with monocalcium phosphate. No differences ($P > 0.05$) were detected between sources for apparent ileal digestibility, feed intake and duodenal and jejunal pH. The results suggest that humophosphate can act together with commercial phytases for better efficiency. As expected, phytase provided significant gains in all responses analyzed. New studies are important to evaluate and quantify more specific parameters of metabolism that can clarify gaps left by this research.

Keywords: Animal nutrition, bioavailability, phosphorus, poultry, requirements.

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A avicultura detém uma posição proeminente no panorama do agronegócio brasileiro, desempenhando um papel crucial na geração de mais de 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos em nosso país (Mélo, 2021). No ano de 2022, o consumo per capita atingiu a marca de 45,2 kg/ano, sendo geradas expressivas 14,52 milhões de toneladas de carne de frango. Tais cifras posicionam o Brasil como o principal exportador e o segundo maior produtor global dessa proteína. No segmento de ovos, a produção ultrapassou a marca de 52 bilhões de unidades em 2022, correspondendo a um consumo médio de 241 ovos por habitante ao ano (ABPA, 2023).

Na esfera produtiva, os avanços incessantes na nutrição assumem posição de destaque. Contudo, é imperativo destacar que esta área representa aproximadamente três quartos dos custos totais relacionados à produção de frangos de corte (Pessôa *et al.*, 2012). Diante desse cenário, os profissionais do setor se engajam numa incessante busca por produtos que não apenas impulsionem os índices produtivos, mas que também apresentem boa viabilidade econômica. Simultaneamente, os produtos devem atender a padrões de sustentabilidade, visando a redução da carga de resíduos poluentes gerados por essa atividade.

O fósforo (P) desempenha um papel crucial no metabolismo energético, na regulação enzimática, na síntese de ácidos nucleicos e membranas celulares, sendo ainda essencial para a manutenção da integridade esquelética de frangos de corte (Scholey *et al.*, 2018). A maior parte do fósforo presente nos ingredientes vegetais das rações encontra-se na forma de fitato, tornando-se indisponível ou inadequadamente utilizado pelos animais monogástricos devido à baixa atividade da fitase endógena em seus tratos digestivos. Para enfrentar esse desafio, as dietas de frangos de corte frequentemente recebem suplementação de fósforo inorgânico, visando

atender aos requerimentos nutricionais. No entanto, essa prática reconhecidamente eleva os custos de alimentação e contribui para a poluição ambiental, suscitando debates sobre como contornar essa problemática (Liu *et al.*, 2008).

Mekonnen e Hoekstra (2018) calculam que as atividades agropecuárias são responsáveis por 38% do fósforo lançado nos corpos d'água em todo o mundo, totalizando aproximadamente 616 mil toneladas de fósforo bruto. Os autores ressaltam que tais quantidades tornam a eutrofização dos corpos hídricos iminente, podendo causar um impacto ambiental significativo nos ecossistemas e tornar a água inadequada para consumo e uso em atividades humanas. Essa situação torna-se ainda mais proeminente ao considerarmos o esgotamento gradual das fontes de fosfatos inorgânicos em escala global (Van Vuuren *et al.*, 2010; Kilsinyo e Opala, 2020).

Algumas alternativas na formulação das dietas englobam o uso de fontes que tenham melhor biodisponibilidade fosfórica (consequentemente uma menor excreção), a adição de enzimas exógenas capazes de quebrar o fósforo fítico dos alimentos (com destaque para a fitase), ou mesmo a redução dos níveis de inclusão do mineral, sob a perspectiva de que as antigas exigências superestimam as reais necessidades das aves comerciais (Souza *et al.*, 2020).

O humofosfato de cálcio é uma fonte recém descoberta na alimentação das aves e, por se tratar de um ingrediente inédito para este fim, as respostas quanto a seus efeitos zootécnicos e metabólicos ainda não estão completamente elucidadas. Quando estamos diante de compostos inovadores, um passo-a-passo de testes afim de garantir a confiabilidade dos resultados é necessário, partindo pela determinação exata da composição, a padronização e garantia de qualidade do produto, para então analisar-se variáveis de digestibilidade e desempenho dos animais (Sakomura e Rostagno, 2016).

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho determinar a contribuição fosfórica do humofosfato de cálcio com a suplementação de

fitase sobre o desempenho e a digestibilidade ileal de frangos de corte.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabolismo do Fósforo

A taxa de crescimento dos frangos de corte aumentou significativamente nas últimas décadas, de acordo com Maharjan *et al.* (2021), em pouco menos de um século o peso médio destas aves saltou de aproximadamente 1,13 kg aos 112 dias de idade em 1925, para os surpreendentes 2,72 kg aos 42 dias em 2021. O rápido crescimento requer fornecimento nutricional adequado e, no caso do tecido ósseo, fornecimento adequado de cálcio (Ca) e fósforo. A oferta insuficiente destes minerais (ou mesmo seu excesso) interfere na homeostase do organismo, levando a diversas implicações metabólicas, como a redução da taxa de crescimento e mineralização óssea (Williams *et al.* 2000). Além disso, as deficiências de Ca e P em linhagens de crescimento rápido podem levar a anormalidades esqueléticas, como raquitismo e discondroplasia tibial, acarretando prejuízos advindos da mortalidade e perdas de performance (Fleming, 2008).

O Ca e o P são essenciais para todos os animais, desempenhando papéis fundamentais no metabolismo celular, nos mecanismos reguladores de expressão gênica e na já referida mineralização óssea, sendo os minerais mais abundantes no corpo das aves e demais vertebrados em geral (Suttle, 2022). O Ca e o P dietéticos são absorvidos no intestino delgado através de fluxos ativos e passivos após processos complexos de digestão, como solubilização, insolubilização e hidrólise (Duflos *et al.*, 1995). Essa dinâmica já foi descrita por modelos mecanicistas e equações empíricas (Létourneau-Montminy *et al.*, 2015).

As concentrações plasmáticas de Ca e P são controladas dentro de uma estreita faixa fisiológica através de mecanismos de feedbacks positivos e negativos envolvendo paratormônio (PTH), calcitriol [vitamina D3 ativa - 1,25 (OH)₂ D3] e calcitonina, além dos respectivos receptores destes, localizados no intestino delgado, ossos e rins (Vitti e Kebreab, 2010).

Quando Ca^{2+} ou P plasmático estão abaixo do ideal, PTH e calcitriol são liberados para aumentar a absorção intestinal, a reabsorção óssea e reduzir a excreção renal dos metabólitos. Por outro lado, quando Ca^{2+} ou P plasmático estão muito altos, a calcitonina reduz a absorção intestinal e a reabsorção óssea destes compostos, além de aumentar a excreção renal (Proszkowiec-Weglarz e Angel, 2013). No caso de aves alimentadas com dietas deficientes em fósforo, ocorre um aumento da absorção de calcitriol e Ca no tecido intestinal, bem como a diminuição do P plasmático e da mineralização óssea (Alvarenga *et al.*, 2011).

A absorção fosfórica se dá principalmente via enterócitos duodenais, envolvendo vias dependentes e independentes de sódio (Na), onde as primeiras não são afetadas pelas mudanças na concentração de Ca, ao passo que as seguintes parecem sofrer influência, apesar de ainda não estarem totalmente elucidadas (Tenehouse, 2005). Sugere-se que uma grande concentração de fosfato na digesta possa induzir o transporte paracelular (movimento de íons ao longo do gradiente através dos espaços intercelulares do lúmen ao sangue), o que poderia tornar a via pós-prandial predominante, todavia a parede epitelial intestinal não é facilmente permeável ao fosfato (Murer *et al.*, 2004).

Cerca de 99% do Ca e 80% do P estão armazenados no esqueleto como hidroxiapatita, de fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com ambos desempenhando um papel importante no desenvolvimento do sistema locomotor das aves (Veum, 2010). Logo, os principais constituintes das cinzas ósseas são Ca, PO_4 e minerais diversos (Crenshaw *et al.*, 2000), onde presume-se que estes outros não afetam os tecidos moles ou o crescimento ósseo (Létourneau-Montminy *et al.*, 2015). Os sais de hidroxiapatita são as principais estruturas nas quais o P e o Ca são depositados no osso, resultando em uma proporção fixa de 2:1 (Matuszewski *et al.*, 2020). Portanto, a cinza óssea é calculada como a soma de Ca, P e demais minerais no osso, com a retenção de Ca no osso impulsionando a deposição de todos os minerais e mantendo a proporção mineral do tecido ósseo.

Nas pesquisas avícolas, vários são os parâmetros passíveis de utilização para avaliar o metabolismo do fósforo e, dentre as diversas técnicas destacam-se o desempenho, a resistência óssea, a concentração de P e cinzas nos ossos, a composição corporal, a atividade enzimática (fosfatase alcalina) e as digestibilidades aparente e verdadeira (Moreira *et al.*, 2004).

2.2 Fontes fosfóricas

Com a indisponibilidade da maior parte da fatia fosfórica nos vegetais, fontes de P inorgânico são amplamente utilizadas, como fosfato monocálcico, fosfato bicálcico, fosfato monossódico, fosfato de cálcio e sódio, entre outros (Liu *et al.*, 2008). Em geral, esses compostos fornecem entre 18 e 20% de fósforo total e possuem como vantagem sua baixa variabilidade quando comparado com fontes orgânicas, sendo, no entanto, o terceiro componente mais oneroso para os custos finais nas dietas comerciais (Li *et al.*, 2016).

Na nutrição de monogástricos, fosfato monocálcico (MCP) e fosfato bicálcico (DCP) são as fontes mais utilizadas para a formulação de dietas e os níveis minerais fornecidos consistentemente se encontram dentro de uma faixa padrão já conhecida (Trairatapiwan *et al.*, 2018). Contudo, pesquisas que medem a digestibilidade destas fontes muitas vezes apresentam resultados contraditórios. Valores para digestibilidade ileal de P do MCP encontrados ocupam uma ampla faixa, variando a partir de 45% (Rodehutschord *et al.*, 2012), 64,6% (Trairatapiwan *et al.*, 2018), 78,3% (Bikker *et al.*, 2016), até valores de 88,5% (Van Harn *et al.*, 2017).

Há ainda fontes animais como farinhas de peixe e farinhas de carne, porém estas são preconizadas nas dietas de aves como fontes proteicas. Já a farinha de carne e ossos pode ser uma excelente fonte de Ca e P e outros minerais, sendo comumente utilizada. Entretanto, este componente sofre variações bruscas de acordo com a espécie abatida, nível tecnológico do frigorífico e processo de fabricação (Waldroup, 1999).

De maneira geral, fontes fosfóricas orgânicas são grupos de

ortofosfatos ligados a substâncias orgânicas e possuem absorvibilidade superior quando comparadas aos fosfatos inorgânicos (Andrade et al., 2003). Visto isto, diversos produtos comerciais visam mesclar moléculas de ambos os tipos, melhorando a disponibilidade de P do produto ao mesmo tempo em que mantém a padronização e qualidade necessárias para a utilização em larga escala (Domingos et al., 2003).

O humofosfato de cálcio é um exemplo recente de fonte fosfórica que visa combinar um fosfato inorgânico com organomoléculas, neste caso representadas por substâncias húmicas variadas. Segundo Poujol *et al.* (2022), este fosfato possui 21,6% de fósforo total e 15% de cálcio, valores inferiores a compostos tradicionais como o MCP, que possui respectivamente 22,7% e 15-17% de fósforo e cálcio totais. Entretanto, a pesquisadora pontua que o grande diferencial do humofosfato sobre os compostos tradicionais deve-se a biodisponibilidade relativa proporcionada por este, sobretudo quando em sinergia com fitases comerciais, podendo chegar a um nível de 113%, o que o torna bastante superior ao fosfato monocálcico (91%), ao fosfato bicálcico anidro (76%) e ao fosfato bicálcico hidratado (85%).

No que tange os aspectos de padronização e qualidade, apesar da comercialização ainda recente, o produto passou por estudos robustos em centros de pesquisa renomados pelo mundo (Phosphea, 2022). Nestes estudos preliminares, o humofosfato de cálcio vem apresentando a capacidade não apenas de fornecer quantidades satisfatórias de P e Ca totais nas dietas, mas também a aptidão para desfazer quelatos de Ca-fitado através da modulação do pH, permitindo assim que mais substrato esteja disponível para a ação enzimática das fitases exógenas e endógenas, ação traduzida pelos valores de biodisponibilidade maiores que 100% (Poujol *et al.*, 2022). Tal atributo torna o composto uma ótima possibilidade para reduzir os níveis de P nas formulações, o que contribui para uma menor excreção e consequente diminuição do impacto ambiental das atividades avícolas.

Do ponto de vista fisiológico, as substâncias húmicas presentes atuam na modificação do pH do trato gastrointestinal, reduzindo a quelagem

ocasionada pelos íons de Ca, estabilizando a população microbiana no trato gastrointestinal, melhorando a eficácia de fitases e proteases exógenas e reduzindo indiretamente as emissões de amônia (Phosphea, 2022). Com este impacto multifatorial considerável, indiretamente ocasiona-se uma maior eficiência de aproveitamento de outros nutrientes (como aminoácidos) e de energia, amplificando o desempenho dos lotes.

Vários estudos relataram respostas com a utilização de substâncias húmicas na ração de frangos de corte, como para o desempenho (Ozturk *et al.*, 2012; Nagaraju *et al.*, 2014), desenvolvimento ósseo (Eren *et al.*, 2000; Disetlhe *et al.*, 2017; Jadřutková 2019) e modulação do ambiente intestinal (Salah *et al.*, 2015; Teng e Kim, 2018). Além das respostas avaliadas neste estudo, a literatura também descreve os efeitos dessas moléculas na morfologia das vilosidades (Taklimi *et al.*, 2012), parâmetros sanguíneos (Ozturk *et al.*, 2012), imunomodulação e estado oxidativo (Kamel *et al.*, 2015; Mao, 2019), além da qualidade da carne e rendimento de carcaça (Domínguez-Negrete *et al.*, 2021). É importante levar em conta que a comparação direta entre os estudos publicados sobre frangos de corte suplementados com qualquer tipo de substância húmica ou compostos que os contenham é difícil de ser feita devido diferenças nos produtos testados, advindas de variações em sua origem, como matéria orgânica em decomposição, solos e composto de minhoca (Peña-Méndez *et al.*, 2005).

2.3 Valor fosfórico nos alimentos

Os requerimentos nutricionais para aves comerciais mudaram muito ao longo do tempo e continuam sendo atualizados visto a evolução das novas linhagens. Determinar os melhores níveis de cada nutriente envolve uma análise cuidadosa das necessidades da ave com base em fatores como idade, peso, sexo, fase de produção, instalações, entre outros (Emmans, 1991). As Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos determinam que frangos de corte de alto desempenho variam suas necessidades de fósforo em 0,446% de P digestível (1-7 dias) até 0,301% (35-42 dias) (Rostagno *et al.*, 2017).

Contudo, a necessidade real de P das aves é alvo de diversas discussões e diferentes pesquisadores possuem entendimentos distintos acerca destes valores. Rodehutschord *et al.* (2012) levantaram hipótese de que o início da excreção de P pela urina é um indicador de que as aves receberam P próximo às suas necessidades e, portanto, passaram a excretar as quantidades que foram absorvidas mas não necessárias para fins metabólicos. Entretanto, os pesquisadores pontuam que o estado metabólico, a idade, a linhagem e a dieta podem interferir para que essa excreção ocorra (ou não) mesmo em situações em que os requerimentos não foram fielmente atendidos.

Conceitualmente, a divisão do fósforo nos ingredientes inicia-se com o fósforo total, que representa todas as formas do elemento contidas na dieta, estejam estas ligadas a outras moléculas ou não. Já o fósforo disponível (AvP) trata-se da parcela fosfórica ao qual o animal possui meios fisiológicos para sua utilização, conceito que posteriormente foi acrescentado do P disponibilizado de outras maneiras, como pelo uso de enzimas exógenas. O fósforo digestível (Pd) seria aquele realmente absorvido pelo organismo, que passa a ser retido (Pr) ou utilizado nas demandas metabólicas. Temos ainda os conceitos de fósforo fítico e não fítico (nPP), que respectivamente representam a porção fosfórica ligada ao ácido fítico (fitatos) e a porção total não relacionada a essas moléculas (Ammerman *et al.*, 1995; Suttle, 2022; WPSA, 2013; Sakomura e Rostagno, 2016).

Nos últimos anos, Pd tem sido sugerido como o parâmetro de eleição para expressar a disponibilidade de P em ingredientes alimentares, sendo determinado pela digestibilidade ileal (WPSA, 2013). Todavia, na avicultura, a exigência de P ainda é considerada com base no AvP (Aviagen, 2018; Cobb, 2019). Essa discordância entre sugerido e utilizado é ainda mais acentuada quando se somam os conceitos de fósforo fítico e não fítico. Atualmente, o AvP nos alimentos é geralmente referido como sinônimo de nPP, logo, as parcelas disponíveis e não fíticas são usadas indistintamente, embora estudos tenham demonstrado que o nPP não está totalmente

disponível e o fitato não está totalmente indisponível para aves (Angel *et al.*, 2002; Coon *et al.*, 2002; Mutucumarana *et al.*, 2014).

Devido ao efeito inibitório do P sobre a atividade de fitases endógenas, níveis mais altos de P inorgânico na dieta incidem sobre a disponibilidade do fósforo fítico, reduzindo seu aproveitamento (Shastak e Rodehutsord, 2013). Um menor aproveitamento do fitato acarreta problemas nutricionais que excedem o fósforo, visto que por possuir uma forte carga negativa essa molécula possui a capacidade de se ligar a minerais como cálcio, magnésio, manganês, zinco, níquel, ferro, cobre e cobalto, formando complexos estáveis que não podem ser absorvidos e serão posteriormente excretados (Van der Klis e Versteergh, 1999; Angel *et al.*, 2006; Rodehutsord *et al.*, 2012). Não o bastante, também podem ser afetadas as atividades de algumas enzimas digestivas como pepsina, tripsina e α -amilase, através da quelação de íons Ca^{2+} , diminuindo a digestão proteica e amilácea (Bryden *et al.*, 2007). Os quelatos Ca-fitato são insolúveis no meio intestinal e formam ainda complexos ligantes com ácidos graxos, comprometendo a absorção dos lipídios e impedindo a hidrólise do fitato pela fitase (Ankra-Badu *et al.*, 2004).

É importante mencionar que a disponibilidade do fósforo é um parâmetro que inclui apenas as particularidades advindas do alimento ou dieta e, para lidar com isto foi forjado o termo “biodisponibilidade”, que trata da digestão, absorção e utilização fosfórica, levando em consideração a variável do animal (Li *et al.*, 2016). Em situações práticas, múltiplos fatores impedem que o animal atinja o consumo alimentar calculado ou obtenha absortivamente os nutrientes, como a capacidade do trato intestinal, as condições ambientais, o estado de saúde e deficiências de alguns nutrientes como o próprio P (Faridi *et al.*, 2015; Aderibigbe *et al.*, 2022).

Na tentativa de superar as dificuldades associadas às abordagens atuais para determinações de biodisponibilidade de P, o Grupo de Trabalho de Nutrição da World's Poultry Science Association (WPSA, 2013) desenvolveu um protocolo para determinar a digestibilidade ileal de P por análise de regressão. Duas a três dietas são formuladas para cada fonte de

P teste e uma dieta basal com baixo teor de P é usada com um mínimo de dois níveis da fonte teste adicionados. No nível mais elevado de inclusão, o fornecimento de P não deve exceder o requerimento nutricional. Com tais condições, o AvP da fonte de P sob teste pode ser determinado a partir das inclinações das equações de regressão linear. No entanto parece existir colinearidade entre as variáveis utilizadas na análise de regressão, o que pode levar a estimativas instáveis dos coeficientes de regressão (Li *et al.*, 2016).

Podemos notar que a baixa digestibilidade do P em fontes vegetais motivou diversos movimentos sobre qual parcela utilizada nas formulações refletiria melhor a disponibilidade de P das fontes alimentares. No entanto, não houve nenhum movimento expressivo em direção a um sistema de Ca digestível (dCa) (Walk *et al.*, 2021). Isto é terminantemente relevante devido ao uso extensivo de fitases nas dietas comerciais, somado ao efeito negativo do Ca na digestibilidade do fitato e sua ação prejudicial na eficácia de atuação da enzima, o que culminou em uma redução gradual também nos níveis calcíticos (David *et al.*, 2021). Como há poucos dados sobre a disponibilidade ou digestibilidade real em oposição à disponibilidade relativa de Ca nas fontes de ingredientes alimentares, assumimos uma digestibilidade de 100% em geral, o que evidentemente não está correto, visto a alta variação encontrada nos estudos realizados (Anwar *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2019).

A redução dos níveis de fósforo nas formulações é uma possibilidade muito debatida nos trabalhos recentes envolvendo este mineral, sob o pretexto que quando fornecido em níveis dietéticos baixos, ocorre aumento na eficiência de absorção e aproveitamento do mineral pelo organismo (Souza *et al.*, 2020). Souza *et al.* (2020) afirmam ainda que essa inclinação rumo a redução dos níveis dietéticos visa corrigir uma superestimação dos antigos requerimentos estabelecidos. Isto pode ser feito desde que o cálcio seja simultaneamente diminuído, levando a uma menor formação dos complexos Ca-Fitato que possuem capacidade de quelar minerais devido a sua alta carga negativa (Valable *et al.*, 2020). Essa estratégia é

particularmente de maior interesse na fase de terminação do ciclo produtivo, onde o pico do desenvolvimento ósseo já foi superado e o consumo de ração (e conseqüentemente excreção de fósforo) é superior que nas demais fases (Rousseau *et al.*, 2016).

2.4 Fitase

Suzuki *et al.* (1908) foram os responsáveis por descobrir a enzima que possuía a capacidade de disponibilizar o fósforo ligado aos fitatos, porém somente a partir da década de 1960 estudos começaram a ser realizados no campo da produção animal envolvendo a fitase. Comercialmente, o primeiro lançamento ocorreu em 1991, pela multinacional alemã BASF, sob a marca Natuphos® de origem fúngica (*Aspergillus niger*), que rapidamente se tornou um marco na nutrição animal (Engelen *et al.*, 1994; Selle e Ravindran, 2006).

Quimicamente as fitases são uma forma de mioinositol-hexafosfato fosfohidrolase, sendo classificadas como monoésteres fosfatases específicas (IUPAC/IUB, 1973). De acordo com a posição inicial de desfosforilação do fitato, ou seja, em qual carbono ligam-se primeiramente, podem ser divididas em 3-fitase e 6-fitase, e apesar de algumas sementes vegetais as produzirem, geralmente essas se referem, respectivamente, àquelas de origem fúngica e bacteriana (Pandey *et al.*, 2001). As fitases possuem sua própria unidade de medida, o FTU, que é definido pela quantidade de enzima capaz de liberar 1 micromol de fósforo inorgânico em 1 minuto em substrato de sódio-fitato a 37°C e pH 5,5. A enzima age hidrolisando o fitato em uma série de ésteres de mio-inositol fosfato (IP) inferiores, em uma sucessão de reações (IP6 > IP5 > IP4 > IP3 > IP2 > IP1) que facilita a metabolização dos compostos, produzindo seis moléculas de P e um inositol, liberando ainda outros minerais complexados à esta rede, como cálcio, ferro e zinco (Faridi *et al.*, 2015).

Atualmente seu uso na formulação de dietas para aves já está consolidado, sendo um ingrediente por vezes obrigatório nas rações comerciais, sendo a principal arma a qual os nutricionistas têm recorrido para

tratar a problemática do fósforo (Morgan *et al.*, 2015). A nova geração de fitases melhoradas têm o potencial de liberar fósforo suficiente do fitato para suprir as necessidades da ave, reduzindo ainda mais, ou mesmo eliminando, a necessidade de P inorgânico suplementar (Moura *et al.* 2023). Há no entanto grande variabilidade nas respostas à fitase devido a fatores como concentração de substrato, nível de fitase e as propriedades intrínsecas da enzima, bem como a formação de complexos Ca-fitato não susceptíveis à degradação da fitase (Amerah *et al.*, 2014).

Na alimentação de frangos de corte, a utilização de 500 a 1000 FTU/kg na ração já ocorre comumente em dietas comerciais (Sena *et al.* 2020), todavia, patamares ainda mais altos (superdosing) já foram exaustivamente estudados, apresentando resultados satisfatórios. Constatou-se que níveis de 1500 FTU/kg (Lima *et al.*, 2021), 3000 FTU/kg (Shirley e Edwards Jr., 2003) e 4500 FTU/kg (Meneghetti *et al.*, 2011) podem trazer consigo ganhos ainda maiores na conversão alimentar e ganho de peso, sendo importante avaliar a viabilidade do ponto de vista econômico. As superdosagens requerem uma atenção especial durante a definição dos níveis nutricionais da formulação, já que possuem benefícios extrafosfóricos, melhorando dieteticamente as eficiências energética e aminoacídica, que devem ser levadas em conta na matriz da fitase para fechamento dos cálculos (Broch *et al.*, 2020).

Ademais, apesar da alta confiabilidade e qualidade das enzimas exógenas atualmente, as margens de segurança para os requerimentos de P nas dietas de frangos de corte modernas são reduzidas, o que significa que há pouco espaço para variação no teor de fósforo, na biodisponibilidade via ácido fítico e no cálculo do P digestível (Świątkiewicz *et al.*, 2014). Visto este panorama restrito, confiar na fitase como única fonte de P expõe a formulação a riscos, como a deficiência em atender as necessidades diárias das aves, o que não é desejável.

3. REFERÊNCIAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal (2023) **Relatório Anual de 2022**. São Paulo: ABPA. 75p.

Aderibigbe AS, Ajuwon KM, Adeola O (2022) Dietary phosphorus level regulates appetite through modulation of gut and hypothalamic expression of anorexigenic genes in broiler chickens. **Poultry Science** 101:101591.

Alvarenga RR (2011) Adição de fitase em rações com diferentes níveis de energia metabolizável, proteína bruta e fósforo disponível para frangos de corte de 1 a 21 dias. **Ciência Animal Brasileira** 12:602-609.

Amerah AM, Plumstead PW, Barnard LP, Kumar A (2014) Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. **Poultry Science** 93:906-915.

Ammerman CB, Baker DH, Lewis AJ (1995) **Bioavailability of nutrient for animals**. Berkeley (Califórnia – EUA): Academic Press, 441p.

Andrade FV, Mendonça ES, Alvarez VH, Novais RF (2003) Adição de ácidos orgânicos e húmicos em Latossolos e adsorção de fosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 27:1003-1011.

Angel R, Saylor WW, Mitchell AD, Powers W, Applegate TJ (2006) Effect of dietary phosphorus, phytase, and 25-hydroxycholecalciferol on broiler chicken bone mineralization, litter phosphorus, and processing yields. **Poultry Science** 85:1200-1211.

Angel R, Tamim NM, Applegate TJ, Dhandu AS, Ellestad LE (2002) Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **Journal of Applied Poultry Research** 11:471-480.

Ankra-Badu GA, Aggrey SE, Pesti GM, Bakalli RI, Edwards-Jr HM (2004) Modeling of parameters affecting phytate phosphorus bioavailability in growing birds. **Poultry Science** 83:1083-1088.

Anwar MN, Ravindran V, Morel PCH, Ravindran G, Cowieson AJ (2017). Effect of calcium source and particle size on the true ileal digestibility and total tract retention of calcium in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology** 224:39-45.

Aviagen (2018) **Manual de Manejo – Ross 308**. Huntsville (Alabama – EUA): Aviagen, 148p.

Bikker P, Spek JW, Van Emous RA, Van Krimpen MM (2016) Precaecal phosphorus digestibility of inorganic phosphate sources in male broilers. **British Poultry Science** 57:810-817.

Broch J, Sangalli GG, Savaris VDL, Nunes RV (2020) Fitase e seus efeitos extrafosfóricos em dietas para frangos de corte: revisão. **Agropecuária Catarinense** 33:68-72.

Bryden WL, Selle PH, Ravindran V, Acamoivc T (2007) Phytate: an anti-nutritive factor in animal diets. In: **Poisonous plants: global research and solutions**. Wallingford (Reino Unido): CABI, p. 279-284.

Cobb-Vantress (2019) **Manual de Manejo – Cobb 500 (Male)**. Siloam Springs (Arkansas – EUA): Cobb, 112p.

Coon C, Leske K, Seo S (2002) **Poultry Feedstuffs: Supply, composition, and nutritive value**. Wallingford (Reino Unido): CABI, p. 151-179.

Crenshaw TD (2^aed.) (2000) Calcium, phosphorus, vitamin D, and vitamin K in swine nutrition. In: **Swine nutrition**. Boca Raton (Flórida – EUA): CRC Press, p.207-232.

David LS, Abdollahi MR, Bedford MR, Ravindran V (2021) Requirement of digestible calcium at different dietary concentrations of digestible phosphorus for broiler chickens (Broiler starters - d 1 to 10 post-hatch). **Poultry Science** 100:101439.

Disetlhe ARP, Marume U, Mlambo V, Dinev I (2017) Humic acid and enzymes in canola-based broiler diets: Effects on bone development, intestinal histomorphology and immune development. **South African Journal of Animal Science** 47:914-922.

Domingos JB, Longhinotti E, Machado VG, Nome F (2003) A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova** 26:745-753.

Domínguez-Negrete A, Gómez-Rosales S, Angeles ML, López-Hernández LH, Souza TCR, Latorre-Cárdenas JD, Téllez-Isaias G (2021) Addition of Different Levels of Humic Substances Extracted from Worm Compost in Broiler Feeds. **Animals** 11:3199.

Duflos C, Bellaton C, Pansu D, Bronner F (1995) Calcium solubility, intestinal sojourn time and paracellular permeability codetermine passive calcium absorption in rats **The Journal of nutrition** 125:2348-2355.

Emmans GC (1991) Diet selection by animals: theory and experimental design. **Proceedings of the Nutrition Society** 50:59-64.

Engelen AJ, Heeft VD, Ransdorp HGP, Smit LCE (1994) Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal AOAC International** 77:760-764.

Eren M, Deniz G, Gezen SS, Turkmen II (2000) Effects of humates supplemented to the broiler feeds on fattening performance, serum mineral concentration and bone ash. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi** 47:255-263.

Faridi A, Gitoe A, France J (2015) A meta-analysis of the effects of nonphytate phosphorus on broiler performance and tibia ash concentration. **Poultry Science** 94:2753-2762.

Fleming RH (2008) Nutritional factors affecting poultry bone health. **Proceedings of the Nutrition Society** 67:177-183.

IUPAC/IUB – International Union of Pure and Applied Chemistry / International Union of Biochemistry (1973) The nomenclature of cyclitols. **European Journal of Biochemistry** 51:196.

Jadřutková I, Marcinčáková D, Bartkovský M, Semjon B, Harčárová M, Nagyová A, Váczi P, Marcincak S (2019) The effect of dietary humic substances on the fattening performance, carcass yield, blood biochemistry parameters and bone mineral profile of broiler chickens. **Acta Veterinaria Brno** 88:307-313.

Kamel M, Elhady M, Iraqi K (2015) Biological Immune stimulants effects on immune response, behavioral and productive performance of broilers. **Egyptian Poultry Science Journal** 35:691-702.

Kilsinyo P, Opala P (2020) Depletion of phosphate rock reserves and world food crisis: Reality or hoax? **African Journal of Agricultural Research** 16:1223-1227.

Kim SW, Li W, Angel R, Plumstead PW (2019) Modification of a limestone solubility method and potential to correlate with in vivo limestone calcium digestibility. **Poultry Science** 98:6837-6848.

Létourneau-Montminy MP, Narcy A, Dourmad JY, Crenshaw JD, Pomar C (2015) Modeling the metabolic fate of dietary phosphorus and calcium and the dynamics of body ash content in growing pigs. **Journal of Animal Science** 93:1200-1217.

Li X, Zhang D, Yang TY, Bryden WL (2016) Phosphorus bioavailability: a key aspect for conserving this critical animal feed resource with reference to broiler nutrition. **Agriculture** 6:25.

Lima GS, Lima MR, Gomes GA, Cavalcante DT, Guerra RR, Da Silva JHV, Cardoso AS, Kaneko IN, Costa FGP (2021) Superdosing of bacterial phytase (EC 3.1. 3.26) in broiler diets with reduced levels of digestible amino acids. **Livestock Science** 253:104714.

Liu Y, Villalba G, Ayres RU, Schroder H (2008) Global phosphorus flows and environmental impacts from a consumption perspective. **Journal of Industrial Ecology** 12:229-247.

Maharjan P, Martinez DA, Weil J, Suesuttajit N, Umberson C, Mullenix G, Hilton KM, Beitia A, Coon CN (2021) Physiological growth trend of current meat broilers and dietary protein and energy management approaches for sustainable broiler production. **Animal** 15:100284.

Mao Y (2019) Modulation of the Growth Performance, Meat Composition, Oxidative Status, and Immunity of Broilers by Dietary Fulvic Acids. **Poultry Science** 10:4509-4513.

Matuszewski A, Łukasiewicz M, Niemiec J (2020) Calcium and phosphorus and their nanoparticle forms in poultry nutrition. **World's Poultry Science Journal** 76:328-345.

Mekonnen MM, Hoekstra A Y (2018) Global anthropogenic phosphorus loads to freshwater and associated grey water footprints and water pollution levels: A high-resolution global study. **Water Resources Research** 54:345-358.

Mélo B (2021) Avicultura Brasileira: uma indústria que produz proteína e divisas. Rio de Janeiro: SNA. Disponível em: <https://animalbusiness.com.br/negocios-e-mercado/avicultura-brasileira-uma-industria-que-produz-proteina-e-divisas/>. Acesso em: 21 set. 2023.

Meneghetti C, Bertechini AG, Rodrigues PB, Fassani EJ, Brito JAG, Reis MP, Garcia Jr. AAP (2011) Altos níveis de fitase em rações para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 63:624-632.

Moreira JA, Vitti DMS, Lopes JB, Trindade Neto MA (2004) Fluxo biológico do fósforo no metabolismo de suínos alimentados com dietas contendo fitase. **Revista Brasileira de Zootecnia** 33:2066-2075.

Morgan NK, Walk CL, Bedford ML, Burton EJ (2015) Contribution of intestinal- and cereal-derived phytase activity on phytate degradation in young broilers. **Poultry Science** 94:1577-1583.

Moura TF, Reis MP, Horna FAM, Nóbrega IPT, Bello A, Donato DCZ, White E, Li YD, Sakomura NK (2023) A novel consensus bacterial 6-phytase variant improves the responses of laying hens fed an inorganic phosphorus-free diet with reduced energy and nutrients from 23 to 72 weeks of age. **Poultry Science** 102:102949.

Murer H, Forster I, Biber J (2004) The sodium phosphate cotransporter family SLC34. **Pflügers Archiv** 447:763-767.

Mutucumarana RK, Ravindran V, Ravindran G, Cowieson AJ (2014) Measurement of true ileal digestibility and total tract retention of phosphorus in corn and canola meal for broiler chickens. **Poultry Science** 93:412-419.

Nagaraju R, Reddy BS, Gloridoss R, Suresh BN, Ramesh C (2014) Effect of dietary supplementation of humic acids on performance of broilers. **Indian Journal of Animal Science** 84:447-452.

Ozturk E, Ocak N, Turan A, Erener G, Altop A, Cankaya S (2012) Performance, carcass, gastrointestinal tract and meat quality traits, and selected blood parameters of broilers fed diets supplemented with humic substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 92:59-65.

Pandey A, Szkacks G, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Soccol VT (2001) Production, purification, and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology** 77: 203-214.

Peña-Méndez EM, Havel J, Patočka J (2005) Humic Substances — Compounds of Still Unknown Structure: Applications in Agriculture, Industry, Environment, and Biomedicine. **Journal of Applied Biomedicine** 3:13-24.

Pessôa, GBS, Tavernari FC, Vieira RA, Albino LFT (2012) Novos conceitos em nutrição de aves. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 13:755-774.

Phosphea (2022) HumIPHORA®: uma inovação revolucionária no mundo dos fosfatos. Dinard (França): Phosphea® leading and feeding. Disponível em: <https://www.phosphea.com/phosphea-announces-the-launch-of-humiphora/>. Acesso em: 14 out. 2023.

Poujol M, Biard C, Kwakernaak C, Davin R (2022) Effect of replacing MCP by calcium humophosphate on the growth performance of broiler chickens. In: **Word's Poultry Congress**. Paris (France): Phosphea, 39p.

Proszkowiec-Weglarz M, Angel R (2013) Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. **Journal of Applied Poultry Research** 22:609-627.

Rodehutsord M, Dieckmann A, Witzig M, Shastak Y (2012) A note on sampling digesta from the ileum of broilers in phosphorus digestibility studies. **Poultry Science** 91:965-971.

Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, Saraiva A, Abreu MLT, Rodrigues PB, Oliveira RF, Barreto SLT, Brito CO (4ªed.) (2017) **Brazilian Tables for Poultry and Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements**. Viçosa: UFV, 482p.

Rousseau X, Valable AS, Létourneau-Montminy MP, Mème N, Godet E, Magnin M, Nys Y, Duclos M, Narcy A (2016) Adaptive response of broilers to dietary phosphorus and calcium restrictions. **Poultry Science** 95:2849–2860.

Sakomura NK, Rostagno HS (2ª ed.) (2016) **Métodos de pesquisa em Nutrição de Monogástricos**. Jaboticabal: FUNEP, 262 p.

Salah H, Masour ES, Reham RR, El Hamid ESA (2015) Study on the effect of humic acid on growth performance, immunological, some blood parameters and control intestinal clostridium in broilers chickens. **Zagazig Veterinary Journal** 43: 102-109.

Scholey DV, Morgan NK, Riemensperger A, Hardy R, Burton EJ (2018) Effect of supplementation of phytase to diets low in inorganic phosphorus on growth performance and mineralization of broilers. **Poultry Science** 97:2435-2440.

Selle PH, Ravindran V (2006) Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science Technology** 135:1-41.

Sena TL (2020) Phytase Superdosing in the Diet of Lightweight Replacement Pullets: Performance, Organ Biometry and Bone Characteristics. **Brazilian Journal of Poultry Science** 22:4-9.

Shastak Y, Rodehutsord M (2013) Determination and estimation of phosphorus availability in growing poultry and their historical development. **World's Poultry Science Journal** 69:569–586.

Shirley RB, Edwards Jr. HM (2003) Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. **Poultry Science** 82:671-680.

Souza CS, Vieites FM, Nunes RV, Brusamarelo E, Reis TL, Lima CAR, Vargas Júnior JV (2020) Suplemento de 1, 25-dihidroxicolecalciferol e redução de cálcio e fósforo disponível para frangos de corte fêmeas. **Research, Society and Development** 9:e119973975.

Suttle NF (5^aed) (2022) **Mineral nutrition of livestock**. Wallingford (Reino Unido): CABI, 599p.

Suzuki U, Yoshimura K, Takaishi M (1908) Via of enzyme “phytase” that breaks down “anhydro-oxy-methylene diphosphoric acid”. **Journal of the Agriculture College of Tokyo Imperial University** 7:503-512.

Świątkiewicz S, Arczewska-Włosek A, Józefiak D (2014) The efficacy of organic minerals in poultry nutrition: review and implications of recent studies. **Worlds Poultry Science Journal** 70:475-486.

Taklimi SMSM, Ghahri H, Isakan MA (2012) Influence of different levels of humic acid and esterified glucomannan on growth performance and intestinal morphology of broiler chickens. **Agricultural Sciences** 3:663–668.

Tenehouse HS (2005) Regulation of phosphorus homeostasis by the type phosphate cotransporter. **Annual Review of Nutrition** 25:197-214.

Teng PY, Kim WK (2018) Review: Roles of Prebiotics in Intestinal Ecosystem of Broilers. **Frontiers in Veterinary Science** 5:245.

Trairatapiwan T, Ruangpanit Y, Songserm O, Attamangkune S (2018) True ileal phosphorus digestibility of monocalcium phosphate, monodicalcium phosphate and dicalcium phosphate for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology** 241:1-7.

Valable AS, Létourneau-Montminy MP, Klein S, Lardic L, Lecompte F, Metayer-Coustard S, Même N, Page G, Duclos MJ, Narcy, A (2020) Early-life conditioning strategies to reduce dietary phosphorus in broilers: underlying mechanisms. **Journal of Nutritional Science** 9:e28.

Van der Klis JD, Versteegh HAJ (1999) **Phosphorus nutrition of poultry**. In: Garnsworthy PC, Wiseman J (1999) **Recent Developments in Poultry Nutrition**. Nottingham (Reino Unido): Nottingham University Press p. 309–320.

Van Harn J, Spek JW, Van Vuuren CA, Van Krimpen MM (2017) Determination of pre-cecal phosphorus digestibility of inorganic phosphates and bone meal products in broilers. **Poultry Science** 96:1334-1340.

Van Vuuren DP, Bouwman AF, Beusen, AHW (2010) Phosphorus demand for the 1970–2100 period: a scenario analysis of resource depletion. **Global environmental change** 20:428-439.

Veum TL (2010) Phosphorus and calcium nutrition and metabolism. In: **Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals**. Wallingford (Reino Unido): CABI, p. 94-111.

Vitti DMSS, Kebreab E (2010) **Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals**. Wallingford (Reino Unido): CABI, 178p.

Waldroup PW (1999) Nutritional approaches to reducing phosphorus excretion by poultry. **Poultry Science** 78:683–691.

Walk CL, Romero LF, Cowieson AJ (2021) Towards a digestible calcium system for broiler chicken nutrition: A review and recommendations for the future. **Animal Feed Science and Technology** 276:114930.

Williams B, Waddington D, Solomon S, Farquharson C (2000) Dietary effects on bone quality and turnover, and Ca and P metabolism in chickens. **Research in Veterinary Science** 69:81-87.

World's Poultry Science Association (WPSA) (2013) Working Group Report: Determination of phosphorus availability in poultry. **World's Poultry Science Journal** 69:687-698.

**CAPÍTULO 2 – Calcium Humophosphate
supplemented with phytase on
phosphorus digestibility and
performance in broiler chickens¹**

¹Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Journal of Applied Poultry Research e encontra-se em avaliação para publicação.

Calcium Humophosphate supplemented with phytase on phosphorus digestibility and performance in broiler chickens

ABSTRACT – Phosphorus (P) is an essential nutrient for the growth and maintenance of animals. Calcium humophosphate stands as an innovative phosphate aiming to combine bioavailability with intestinal environment modulation functions. The objective of this study was to compare the performances, phosphorus digestibility, intestinal pH, and bone ash in broilers fed diets formulated with calcium humophosphate or monocalcium phosphate, along with their interactions with increasing levels of phytase. A total of 2800 one-day-old male broilers were randomly allocated to eight treatments with 10 replicates of 35 birds each, totaling 80 pens. Treatments consisted of two control diets using calcium humophosphate or monocalcium phosphate as the source of inorganic phosphorus, supplemented with increasing levels of phytase (0, 500 FTU, 1000 FTU, and 2000 FTU). Diets were formulated to meet nutritional requirements, except for phosphorus (0.53%) and calcium (0.75%), which were reduced according to the enzyme matrix in order not to exceed the animal needs in the 2000 FTU treatments. Birds fed with calcium humophosphate achieved statistically significant ($P < 0.05$) higher body weight gain, more acidic ileal pH, and better bone mineralization than those fed with monocalcium phosphate. No differences ($P > 0.05$) were detected between sources for P apparent ileal digestibility, feed intake, and duodenal and jejunal pH. Results suggest that humophosphate may synergize with commercial phytases to improve P efficiency. Further studies are essential to evaluate and quantify specific metabolism parameters that may address the gaps left by this research.

Keywords: Animal nutrition, bioavailability, phosphorus metabolism, poultry, requirements.

INTRODUCTION

Phosphorus (P) and calcium (Ca) are essential minerals for the proper skeletal development of growing chickens, in addition to being part of several metabolic pathways and cellular components. Dietary P sources are predominately the plant ingredients, such as grains and cereals, as well as from the inorganic phosphates. However, it is known that plant sources contain an important fraction of P in the form of phytates, which are unavailable to monogastric animals (Scholey *et al.*, 2018). Consequently, mineral phosphates are often incorporated as the main sources of available P (avP) in broiler diets due to their high digestibility (Li *et al.*, 2016). Nevertheless, the use of these sources can increase the costs for commercial diets and can rely on non-renewable resources. This operation is associated with environmental impacts from the exploitation of natural phosphate reserves, which include water contamination and soil erosion (Mekonnen and Hoekstra, 2018). Moreover, when used excessively or inappropriately in the manufacture of feed, P can be excreted in animal bedding, contributing to negative events such as eutrophication (Pagliari *et al.*, 2020). These concerns are increasingly pertinent in the context of a growing global emphasis on the sustainability of food production (Kilsinyo and Opala, 2020).

On this way, the inclusion of exogenous phytase is a common practice among nutritionists to increase dietary phosphorus availability, thereby reducing the need for mineral P supplementation and aiding in the reduction of P excretion. The efficacy of phytase extends beyond simply increasing avP in feed. It also mitigates the antinutritional effect of phytates and improves the absorption of other essential nutrients (Beeson *et al.*, 2017; Moura *et al.*, 2023). However, the effectiveness of phytase can be affected by alterations in the gut environment, such as the pH that is essential for enzyme activation, and by chemical interactions like Ca-phytate chelates in the intestinal lumen (Selle *et al.*, 2009). Phytate and Ca-Phytate chelates can also leads to the formation of binding complexes with fatty acids, amino acids, and other minerals, thus impairing their digestibility (Ankra-Badu *et al.*, 2004).

Calcium humophosphate (CHP) is a novel P source, that synergically combines the high bioavailability of phosphates with the metabolic attributes of humic substances. These substances may have properties that promote the modulation of the intestinal microbiome, consequently improving gut health and better use of nutrients (Salah *et al.*, 2015). Furthermore, these organic molecules can bind to antinutritional elements, such as Ca, thanks to their chelating properties against positive cations (Rath *et al.*, 2006). Given this context, CHP could provide a favorable environment for phytase activation and promote synergistic interactions with the enzyme. This potential synergy between phytase and CHP, however, remains to be fully elucidated and was the focal point of this study.

In terms of mineral composition, CHP exhibits of 21.6% P and 15% Ca, comparable to those found in dicalcium and monocalcium phosphates (MCP). Furthermore, when compared with MCP, CHP evidenced a higher relative bioavailability of approximately 113%, thereby providing increased P for growth and bone tissue formation (Poujol *et al.*, 2022). In this context, we hypothesized that CHP combined with phytase supplementation have a synergistic interaction, and act in complementary ways. Due to the existence of few studies in the literature that evaluate CHP as a source of P and Ca, the effect of this addition on the responses of broiler chickens was also evaluated.

The objective of this study was to evaluate the interaction between calcium humophosphate and increasing levels of phytase on mineral digestibility, intestinal pH, and bone mineralization and their impact on the performance of growing chickens.

MATERIALS AND METHODS

Ethical implications

All experiments procedure were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the São Paulo State University (CEUA) under protocol n. 33/23.

Animals and Housing

A total of 2,800 one-day-old male Ross 308 AP chicks were obtained from a local hatchery (Pluma Agroavícola, São Carlos, Brazil). Upon arrival, the birds were placed in an environmentally controlled poultry house and allocated into experimental units (wood shaved litter pens with dimensions of 1.5 x 3.0 m). The environmental conditions, including temperature and humidity, were automatically adjusted in accordance with the genetic guidelines (Aviagen, 2018). Fresh water and feed were available ad libitum, through nipple drinkers and tube feeders, respectively. The light program was initially set to continuous light (24 h) for the first week and, after, adjusted to provide 18L:6D during all experimental periods.

Experimental Design and Feed Program

The birds were allocated to eight treatments, each with ten replicates, and 35 birds per experimental unit. The treatments were randomly distributed among 80 experimental units, following a factorial arrangement of two phosphate sources (CHP and MCP) and four levels of phytase supplementation (0, 500, 1000, and 2000 FTU/kg of feed).

The experimental diets, mainly based on corn and soybean meal, were formulated to meet the nutritional requirements of growing chickens as recommended by Rostagno *et al.* (2017), with the exception of Ca and avP requirements. Two basal diets were formulated, one for each phosphate source. Those feeds contained a reduction on Ca and P (0.213 and 0.207 percentage points, respectively) according to phytase supplier recommendations (AextraPHY®, Barueri, Brazil), so that 2000FTU/kg of phytase treatments did not exceed the nutritional requirements. Phytase was incorporated into the basal feed at levels of 0.05, 0.1, and 0.02 g/Kg of feed, resulting in concentration of 500, 1000, and 2000 FTU/kg, respectively. Additionally, titanium dioxide (TiO₂) was added into the experimental diets at 5 g/kg of feed, serving as an indigestible marker for the digestibility trial. The feed was provided in a mash form, and the feeding program was maintained in a single phase (1 to 21 days) (Table1).

After the preparation of the experimental diets, a sample from each batch was collected, identified, and stored at -4°C for further analysis. These samples were analysed for chemical composition. The dry matter (DM) content was determined by drying the samples for 16 hours in a conventional oven at 105°C (AOAC Method 920.39). Subsequently, the dried samples were incinerated at 600°C for 6 hours (AOAC Method 924.05) to determine ash content. Ca and P was quantified using spectrophotometry (AOAC Method 965.17). The phytase activity was determined by a modified version of the AOAC 2000.12 (CBO Laboratory, Valinhos, Brazil). In this method, 1 FTU is defined as the amount of enzyme that releasing $1\ \mu\text{mol}$ of inorganic orthophosphate from a substrate of $0.0051\ \text{mol/L}$ sodium phytate at pH 5.5 and 37°C . Table 2 shows further analysis of the diet ingredients.

Performance responses collection

At 21-day-old, body weight (BW) and feed intake (FI) were recorded to calculate daily body weight gain (BWG) and feed conversion rate (FCR). Additionally, the mortality was daily recorded to correct the FI and FCR.

Gut pH and Ileal Digestibility trial

At 21-day-old, eight birds per experimental unit were euthanized in accordance with recommended procedures by CEUA. Two hours before the euthanasia, the birds were continuously stimulated to feed, aiming to guarantee adequate gut content for subsequent sampling and analyses. The birds were necropsied to expose the gut tract. The small intestine was isolated to delimit the duodenum, jejunum, and ileum sections for samples collection. Duodenum was collected 5 cm after the gizzard up to 5 cm before the pancreatic loop. Jejunum was located 10 cm after the pancreatic loop, up to 5 cm from Meckel's diverticulum. Ileum was defined as the segment that goes from Meckel's diverticulum to the ileocecal loops.

Subsequently, the pH of the content in each section was measured in situ (one reading per segment) using an Eco Titrator pH meter (Metrohm AG, Herisau, Switzerland) previously calibrated with buffer solutions (pH 4 and 7). The equipment was rinsed with distilled water after each measurement.

Concurrently, upon identifying the ileal segment, it was separated on the Meckel's diverticulum and ileocecal junction. The digesta was rinsed, using distilled water, and stored in labeled plastic containers. Post-collection, the samples were frozen at -80°C and later lyophilized under negative pressure for drying.

Ca and P in the digesta were analyzed using the same laboratory procedures as for diet analysis (DM, Ash, Ca, and P).

The apparent ileal digestibility coefficient (AIDC) was determined through titanium recovery analysis by the analytical procedure standardized by Myers et al. (2004). The minerals concentrations (Ca and P) were determined through atomic absorption using a Du-640 spectrophotometer (Beckman Coulter Diagnostics, Brea, USA). The equipment was calibrated with 410 nm working standards. The apparent ileal digestibility coefficient (AIDC%) was calculated using the formula:

$$AIDC (\%) = \left(1 - \frac{\text{dietary TiO}_2 \times \text{digesta } M}{\text{digesta TiO}_2 \times \text{dietary } M} \right) \times 100$$

Where dietary and digesta TiO₂ (g/kg DM) are the concentration of the indigestible marker in the diet and digest, and dietary and digest M (g/kg DM) are the concentration of the analyzed mineral in the diet and digest (Ca or P).

Tibia Bone Ash

At 21-day-old, from the same group of eight birds per experimental unit used for the digestibility, four birds were randomly selected for tibia bone sample collection. Both tibial bones were carefully disarticulated, ensuring no breakage, and soft and connective tissues were removed. The bones were identified and stored at -20°C for further analyses.

The bones underwent a defatted process by being immersed in an ether organic solvent for 24 h, followed by drying at 105°C for another 24 h. Subsequently, the bones were weighted to determine the defatted and dry weight. The bones were then subject to complete incineration in a muffle at 600°C for four hours to ascertain the ash content. The percentage of ash in the bone was calculated using the simple ratio between the dried and

defatted weight and the incinerated weight.

Statistical analyses

The data of performance, digestibility, pH, and bone ash were subject to a two-way analysis of variance (ANOVA) using the PROC GLM in SAS software (SAS On Demand for Academics, Version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, USA). Means were compared by Tukey test, with $P < 0.05$ considered statistically significant and $P < 0.10$ as indicative of a tendency. The analyses were according to model:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha_i \times \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

Where, Y_{ijk} is the response parameters, μ is the overall mean, α_i is the phosphate sources ($i = \text{MCP}$ and CHP), β_j is the levels of phytase inclusion ($j = 0, 500, 1000$ and 2000), $\alpha_i \times \beta_j$ is the interaction between the phosphate sources and the level of phytase, ε_{ijk} is the standard error.

Aiming to determine the bioequivalence of the phytase in reference to the phosphate sources, a non-linear regression analysis was performed using the PROC NLIN procedure of SAS software for the AICD of P for each phosphorus source. The model fit was the following:

$$Y = a - b * EXP(-c * X)$$

Where Y is the response variable, X is the level of phytase inclusion for each phosphate source, a represents the asymptotic value of the curve (maximum response), b is the difference between the maximum and minimum response, and c is the relative rate of phytase inclusion.

RESULTS

Performance

The performance responses are shown in Table 3. The results revealed no interaction between the phosphate sources and the levels of phytase inclusion for any of the response variables. Broilers consuming a feed with CHP had better BWG in comparison with broilers on MCP feeds ($P < 0.05$). Additionally, the levels of phytase significantly affected all

performance responses ($P < 0.05$), indicating an increase in BW, BWG, and FI starting from the level of 500 FTU, and remaining similar at the other levels. These results significantly impacted ($P < 0.05$) the improvement of FCR when phytase was included from 500 FTU/kg up to 2000 FTU/kg.

Digestibility of Phosphorus and Calcium

Phosphorus digestibility values ranged from 82.9% (without phytase) to 90.6% (2000 FTU/Kg) for CHP and from 84% to 90.7% for MCP (Table 4). No significant differences were found in the interaction between source and phytase. However, as expected, phytase levels influenced phosphorus digestibility, and birds fed diets without enzyme supplementation exhibited substantially lower digestibility.

Calcium digestibility ranged from 67.6% to 73.9% for CHP and from 67% to 73.2% for MCP. Again, no significant interactions were found between phosphates and phytase levels. However, a scenario opposite to what occurred with phosphorus was quantified, where the increasing enzyme supplementation led to a gradual reduction in apparent Ca ileal digestibility.

The non-linear regressions for phosphorus digestibility and their respective adjusted exponential models are presented in Figure 1. Both phosphoric sources demonstrated similar capabilities in this analysis, and we also noted the gradual action of phytase on apparent ileal digestibility.

Gut pH and Tibia Bone Ash

The results of pH measurements in the duodenum, jejunum and ileum, and the percentage of bone ash, are presented in Table 5. In the duodenum and jejunum, no statistical differences were observed for the interaction between phosphate and phytase. However, in the duodenum, a behavior similar to a quadratic response has been highlighted, presenting more acidic levels for 0 and 2000 FTU, while in the jejunum there is a tendency towards alkalinization ($P < 0.05$) as higher doses of enzymes are added. In the ileal segment it was found that the interaction between CHP and enzyme could promote lower pH values when compared to MCP. This was best demonstrated by the individual responses of phosphates, where

animals fed with calcium humophosphate had a more acidic pH, while phytase acted in an alkalinizing manner on this variable as it was increased.

In the evaluation of tibia bone ash, our investigation showed relevant differences, and although no significant relationships were identified for the interaction of phytase with phosphates, the addition of phytase linearly promoted superior bone mineralization (Figure 2). Furthermore, CHP guaranteed a higher percentage of ash compared to MCP.

DISCUSSION

In this study, exogenous phytase was supplemented in a diet with reduced levels of phosphorus and calcium, following the recommendations of the phytase producer. Thus, it is expected that exogenous phytase supplementation will enhance phosphorus utilization in corn and soybean meal-based diets, consequently leading to improved batch performance, as observed in our study where phytase levels directly impacted BW, BWG, FI, and FCR. This effect arises because approximately 70% of the phosphorus in feed ingredients is bound to phytic acid. Phytase can hydrolyze the myo-inositol hexaphosphate linkage, resulting in the release of free phosphates and inositol phosphate (Adeola & Cowieson, 2011). Under optimal conditions, additional doses of phytase can further hydrolyze inositol groups, potentially impacting the digestibility of energy and other nutrients, as the removal of phosphorus from inositol phosphates also releases other compounds, including calcium (Hamdi *et al.*, 2015).

Regarding phosphorus sources, calcium humophosphate demonstrated the ability to provide superior body weight gain (BWG) compared to monocalcium phosphate, especially in treatments with little or no phytase addition. This can be explained by the capacity of humic substances to modulate the pH of the upper gastrointestinal tract, through binding with antinutritional elements, decreasing the formation of Ca-phytate chelates, improving phytase action, and enhancing nutrient absorption (Akaichi *et al.*, 2022). This effect extends beyond phosphorus, as phytate and Ca-phytate chelates can bind fatty acids and amino acids, leading to their

loss (Selle *et al.*, 2009). CHP showed a statistical interaction with phytase ($P < 0.10$) for BWG, demonstrated by a more acute response at the 500 FTU/kg level. This suggests that the CHP is favorable for enzyme action until that phytate hydrolyzation equilibrium is reached, higher levels reaching the same plateau, as shown in the adjusted model (Figure 1). Particularly noteworthy is the observed efficiency of humophosphate, appears to be more pronounced under less favorable conditions (treatments with 0 and 500 FTU), where its positive impact is more evident than in situations with greater feed comfort (1000 and 2000 FTU).

In a general sense, broiler chickens increase feed intake when the limiting nutrient in the diet is reduced, aiming to obtain more of that nutrient, unless the dietary concentration leads to such restricted performance that feed consumption decreases (Gous, 2018). However, several studies indicate the opposite for dietary phosphorus, feed intake is reduced in formulations where phosphorus deficient (Rousseau *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021). This observation was confirmed in our study, birds fed diets reduced in phosphorus and without phytase supplementation exhibited significantly lower feed consumption. This phenomenon is attributed to the appetite-regulating properties of phosphorus, which modulate the intestinal and hypothalamic expression of anorexigenic genes in birds (Aderibigbe *et al.*, 2022).

In our study, phytase addition significantly influenced the pH of all analyzed intestinal segments, leading to an alkalization correlated with the supplemented enzyme level, except for a behavior in the duodenum, where the 2000 FTU/kg level resembled control treatments. The phytase-pH relationship is known to be crucial for the enzyme's efficacy, as it demonstrates higher activity at more acidic substrate levels (< 5.0) (Naves *et al.*, 2012). Specifically in the ileum, significant interactions for pH were found between the phosphorus source and the phytase level. These findings differ from Smulikowska *et al.* (2010), Akyurek *et al.* (2011), and Ptak *et al.* (2015); they did not find a statistically significant effect of phytase on ileal pH in broiler chickens but align with Aydin *et al.* (2010) and Walk *et al.* (2012), who

detected this same response in their studies. The alkalization of intestinal pH associated with high phytase levels may be directly related to breaking down the phytate molecule. By chelating, reducing digestibility, and increasing mineral excretion, phytate can indeed reduce the electrolytic balance of the diet, creating a more acidogenic environment in the gastrointestinal tract (Cowieson *et al.*, 2004). Thus, by demonstrating its acidifying ability without compromising digestibility, calcium humophosphate seems to have a potential positive effect in nutrient absorption and microbiome modulation. It is noteworthy that the intestinal microbiome is strongly affected by pH and plays a crucial role in the endogenous degradation of inositol phosphate (Rodehutscord *et al.*, 2022). Therefore, these potential effects underscore the relevance of CHP not only as a phosphorus source but also as a promising modulator of the intestinal environment in production birds, with a probable determining role of humic substances in this process. On the other hand, monocalcium phosphate appears to have little or no ability to effect intestinal pH, this result was corroborated by Smulikowska *et al.* (2010), who also found no evidence of this ability in their study. Finally, it is essential to bear in mind that significant variations in the pH of the digestive organs of broiler chickens may confound or mask pH differences associated with dietary treatments, especially when comparing different strains and feed ingredients (Woyengo *et al.*, 2009).

Regarding the apparent digestibility coefficient of phosphorus, it is not surprising that it increased gradually with the inclusion of phytase, as extensively demonstrated in the literature (Ingelmann *et al.*, 2019; Adejumo *et al.*, 2021; Kunzel *et al.*, 2021). Both CHP and MCP showed quite similar digestibility coefficients when not supplemented by phytase (83% and 84%, respectively). However, in our subsequent analyses, we detected that the calcium humophosphate presented lower levels than those considered in the formulation (20.45% instead of 21.90%). This difference may have limited the real results from this source, knowing that calcium humophosphate had a lower starting point in digestibility in the adjusted model (Figure 1). However, possibly due to its interaction with phytase it was able to equalize MCP

levels. Phosphorus digestibility values for monocalcium phosphate vary widely in the literature, with the common range being between 65-85% (Sauvant *et al.*, 2004; Bikker *et al.*, 2016; Van Harn *et al.*, 2017; Trairatapiwan *et al.*, 2018; Pavlović *et al.*, 2018; Lamp *et al.*, 2020). Several explanations can be provided for the variation in P digestibility among studies, including differences in origin, production process, composition (Ca and P), Ca:P ratio, and research methodology. Mutucumarana *et al.* (2015) compared two methodologies, differing in basal ingredients and the Ca:P ratio in experimental diets, to determine the true ileal digestibility of P in corn and soybean meal, finding significant differences related to test methodologies. The complex factors associated with P digestibility measurement were demonstrated in a test involving 17 international research stations (Rodehutschord *et al.*, 2017), conducted to determine the ileal digestibility of P in broiler chickens using the standard linear regression protocol of WPSA (2013). Despite eliminating errors associated with origin, blending, and analytical differences, extreme variations were observed in this collaborative test, with P digestibility estimates ranging from 45% to 82%, highlighting the considerable difficulty in extrapolating values for an innovative source like calcium humophosphate.

Regarding calcium digestibility, the results showed an antagonistic response compared to phosphorus, with phytase supplementation gradually reducing its digestibility, a surprising result considering that, in theory, more mineral would be available without the chelating action of phytates. However, understanding this response is challenging, as bone ash exhibited a linear increase with enzymatic supplementation. This finding indirectly contradicts calcitic digestibility, as calcium, along with phosphorus, are the basis of bone formation. Although intriguing, these results resemble those reported by Kunzel *et al.* (2021), who also found decreasing values (70% without phytase, 65% for 500 FTU, and 63% for 5000 FTU) for digestibility and increasing values for bone mineralization (36%, 37%, and 41%, respectively). Our results were nearly values for both sources without phytase (70%) fall within the range commonly found in other studies using MCP (Pavlović *et al.*,

2018; Lamp *et al.*, 2020; Zanu *et al.*, 2023). At a certain dietary Ca level, phytase may or may not increase ileal Ca digestibility (Ravindran *et al.*, 2006; Babatunde *et al.*, 2020). However, as the kidney is involved in Ca homeostasis, responses to phytase supplementation may differ between pre-cecal and total excretion levels in birds (Olukosi *et al.*, 2013). Calcium retention in the skeleton is closely linked to phosphorus retention, and thus, the effects of phytase addition on phosphorus release in the digestive tract may correlate with the observed effects (or lack thereof) on calcium retention. It is crucial to evaluate the Ca:P ratio as a predominant factor, which in our study was 1.41:1. Calcium sources in the form of limestone (as used in this study) can alter the intrinsic degradation of phosphates by broilers and influence the effects of added phytase (Sommerfeld *et al.*, 2018).

The primary industry concern is that digestibility data may overestimate the phytase matrix, resulting in the loss not only of animal live performance but also, more importantly, bone strength and mineralization (Rodehutsord *et al.*, 2022). The latter is obviously of significant concern from a health and welfare standpoint and becomes even more critical with the reduction of P values in poultry diet formulation and the increased performance of modern breeds. In our study, phytase was effective in ensuring a linear ash deposition in the tibia, an expected outcome similar to findings in studies such as that of Pieniasek *et al.* (2017). This observation has also been highlighted for broilers consuming a feed formulated with CHP, given the statistical difference compared with broilers consuming a feed with MCP. In the literature, most studies report a bone ash of around 38-40% (Shim *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018; Hofmann *et al.*, 2022), while in this study, for broilers consuming CHP, the bone ash ranged from 42% (without phytase) to 45% (2000 FTU). Considering the high accuracy of this analysis, bone ash serves as an excellent indirect measure for evaluating phosphorus bioavailability in birds (Shastak *et al.*, 2012), providing reliable evidence that CHP is a good P source.

Other studies also reported similar responses to those found by us when using humic substances in broiler chicken feed, such as for BWG, FCR

and FI (Ozturk *et al.*, 2012; Nagaraju *et al.*, 2014), bone development (Eren *et al.*, 2000; Disetlhe *et al.*, 2017; Jađuttová *et al.*, 2019), and modulation of the intestinal environment (Salah *et al.*, 2015; Teng and Kim, 2018). In addition to the responses evaluated in this study, the literature also describes the effects of these molecules on villus morphology (Taklimi *et al.*, 2012), blood parameters (Ozturk *et al.*, 2012), immunomodulation and oxidative status (Kamel *et al.*, 2015; Mao, 2019), in addition to meat quality and carcass yield (Domínguez-Negrete *et al.*, 2021). It is important to take into account that direct comparison between published studies on broiler chickens supplemented with any type of humic substances or compounds that contain them is difficult to make due to the differences in the products tested, as there are variations in the organic matter origin, such as decomposing plants and animals, soils, and earthworm compost (Peña-Méndez *et al.*, 2005).

In conclusion, the interaction between phosphorus source and phytase was not evident. Although, the calcium humophosphate was observed to be a better source of phosphorus for broilers when compared to monocalcium phosphate. The relationship between phytase and this new phosphate, although not fully elucidated by our study, proved to be quite promising, given the effects found on gut pH and bone ash, and others responses possibly affected but not quantified by us, such as the microbiome.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors would like to acknowledge to CNPq – Brazil, grant number 131342/2022-3 for the scholarship.

This study was financially supported by Phosphea, Dinard, France. All the authors declare that the funding source had no influence on the study design, analysis of the results, and their interpretation.

DISCLOSURES

The authors declare they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Adejumo IO, Bryson B, Olojede OC, Bedford MR, Adedokun SA (2021) Effect of sodium sources and exogenous phytase supplementation on growth performance, nutrient digestibility, and digesta pH of 21-day-old broilers. **Poultry Science** 100:101467.
- Adeola O, Cowieson AJ (2011) Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. **Journal of Animal Science** 89:3189-3218.
- Akaichi A, Jebali A, Benlarbi M, Mahjoub T, Kaboudi K, Chaouacha-Chekir RB, Haouas Z, Boudhrioua N (2022) Effects of humic acid and organic acids supplements on performance, meat quality, leukocyte count, and histopathological changes in spleen and liver of broiler chickens. **Research in Veterinary Science** 150:179-188.
- Akyurek H, Ozduven ML, Okur AA, Koc F, Samli HE (2011) The effects of supplementing an organic acid blend and/or microbial phytase to a corn-soybean based diet fed to broiler chickens. **African Journal of Agricultural Research** 6:642-649.
- Ankra-Badu GA, Aggrey SE, Pesti GM, Bakalli RI, Edwards-Jr HM (2004) Modeling of parameters affecting phytate phosphorus bioavailability in growing birds. **Poultry Science** 83:1083-1088.
- AOAC (2023) **Official Methods of Analysis**. Rockville (EUA): AOC International, 22nd ed.
- Aviagen (2018) **Broiler Pocket Guide – Ross 308 AP**. Huntsville – USA: Aviagen, 148p.
- Aydin A, Pekel AY, Issa G, Demirel G, Patterson PH (2010). Effects of dietary copper, citric acid, and microbial phytase on digesta pH and ileal and carcass microbiota of broiler chickens fed a low available phosphorus diet. **Journal of Applied Poultry Research** 19:422-431.
- Babatunde OO, Jendza JA, Ader P, Xue P, Adedokun SA, Adeola O (2020) Response of broiler chickens in the starter and finisher phases to 3 sources of microbial phytase. **Poultry Science** 99:3997–4008.
- Beeson LA, Walk CL, Bedford MR, Olukosi OA (2017) Hydrolysis of phytate to its lower esters can influence the growth performance and nutrient utilization of broilers with regular or super doses of phytase. **Poultry Science** 96:2243-2253.
- Bikker P, Spek JW, Van Emous RA, Van Krimpen MM (2016) Precaecal phosphorus digestibility of inorganic phosphate sources in male broilers. **British Poultry Science** 57:810-817

Cowieson AJ, Acamovic T, Bedford MR (2004) The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **British Poultry Science** 45:101-108.

Disetlthe ARP, Marume U, Mlambo V, Dinev I (2017) Humic acid and enzymes in canola-based broiler diets: Effects on bone development, intestinal histomorphology and immune development. **South African Journal of Animal Science** 47:914-922.

Domínguez-Negrete A, Gómez-Rosales S, Angeles ML, López-Hernández LH, Souza TCR, Latorre-Cárdenas JD, Téllez-Isaias G (2021) Addition of Different Levels of Humic Substances Extracted from Worm Compost in Broiler Feeds. **Animals** 11:3199.

Eren M, Deniz G, Gezen SS, Turkmen II (2000) Effects of humates supplemented to the broiler feeds on fattening performance, serum mineral concentration and bone ash. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi** 47:255-263.

Gous RM (2018) Nutritional and environmental effects on broiler uniformity. **World's Poultry Science Journal** 74:21-34.

Hamdi M, López-Vergé S, Manzanilla EG, Barroeta AC, Pérez JF (2015) Effect of different levels of calcium and phosphorus and their interaction on the performance of young broilers. **Poultry Science** 94:2144-2151.

Hofmann P, Krieg J, Francesch M, Feuerstein D, Rodehutschord M (2022) Effects of added phytase on growth performance, carcass traits, and tibia ash of broiler chickens fed diets with reduced amino acid, crude protein, and phosphorus concentration. **Journal of Applied Poultry Research** 31:100258.

Ingelmann CJ, Witzig M, Möhring J, Schollenberger M, Kühn I, Rodehutschord M (2019) Phytate degradation and phosphorus digestibility in broilers and turkeys fed different corn sources with or without added phytase. **Poultry Science** 98:912-922.

Jad'uttová I, Marcinčáková D, Bartkovský M, Semjon B, Harčárová M, Nagyová A, Váczi P, Marcincak S (2019) The effect of dietary humic substances on the fattening performance, carcass yield, blood biochemistry parameters and bone mineral profile of broiler chickens. **Acta Veterinaria Brno** 88:307-313.

Kamel M, Elhady M, Iraqi K (2015) Biological Immune stimulants effects on immune response, behavioral and productive performance of broilers. **Egyptian Poultry Science Journal** 35:691-702.

Kilsinyo P, Opala P (2020) Depletion of phosphate rock reserves and world food crisis: Reality or hoax? **African Journal of Agricultural Research** 16:1223-1227.

Künzel S (2021) Relative phytase efficacy values as affected by response traits, including ileal microbiota composition. **Poultry Science** 100:101133.

Lamp AE, Mereu A, Ascacibar IR, Moritz JS (2020) Inorganic feed phosphate type determines mineral digestibility, broiler performance, and bone mineralization. **Journal of Applied Poultry Research** 29:559-572.

Li T, Xing G, Shao Y, Zhang L, Li S, Lu L, Liu Z, Liao X, Luo X (2020) Dietary calcium or phosphorus deficiency impairs the bone development by regulating related calcium or phosphorus metabolic utilization parameters of broilers. **Poultry Science** 99:3207-3214.

Li X, Zhang D, Yang TY, Bryden WL (2016) Phosphorus bioavailability: a key aspect for conserving this critical animal feed resource with reference to broiler nutrition. **Agriculture** 6:25.

Li YD, Evans C, Kumar A (2018) Effect of phytase dose and reduction in dietary calcium on performance, nutrient digestibility, bone ash and mineralization in broilers fed corn-soybean meal-based diets with reduced nutrient density. **Animal Feed Science and Technology** 242:95-110.

Mao Y (2019) Modulation of the Growth Performance, Meat Composition, Oxidative Status, and Immunity of Broilers by Dietary Fulvic Acids. **Poultry Science** 10:4509-4513.

Mekonnen MM, Hoekstra A Y (2018) Global anthropogenic phosphorus loads to freshwater and associated grey water footprints and water pollution levels: A high-resolution global study. **Water resources research** 54:345-358.

Moura TF, Reis MP, Horna FAM, Nóbrega IPT, Bello A, Donato DCZ, White E, Li YD, Sakomura NK (2023) A novel consensus bacterial 6-phytase variant improves the responses of laying hens fed an inorganic phosphorus-free diet with reduced energy and nutrients from 23 to 72 weeks of age. **Poultry Science** 102:102949.

Mutucumarana RK, Ravindran V, Ravindran G, Cowieson AJ (2015) Measurement of true ileal phosphorus digestibility in maize and soybean meal for broiler chickens: Comparison of two methodologies. **Animal Feed Science and Technology** 206:76-86.

Myers WD, Ludden PA, Nayigihugu V, Hess BW (2004) Technical Note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. **Journal of Animal Science** 82:179-183.

Nagaraju R, Reddy BS, Gloridoss R, Suresh BN, Ramesh C (2014) Effect of dietary supplementation of humic acids on performance of broilers. **Indian Journal of Animal Science** 84:447-452.

Naves LP, Corrêa AD, Bertechini AG, Gomide EM, Santos CD (2012) Effect of pH and temperature on the activity of phytase products used in broiler nutrition. **Brazilian Journal of Poultry Science** 14:181-185.

Olukosi OA, Kong C, Fru-Nji F, Ajuwon KM, Adeola O (2013) Assessment of a bacterial 6-phytase in the diets of broiler chickens. **Poultry Science** 92:2101–2108.

Ozturk E, Ocak N, Turan A, Erener G, Altop A, Cankaya S (2012) Performance, carcass, gastrointestinal tract and meat quality traits, and selected blood parameters of broilers fed diets supplemented with humic substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 92:59-65.

Pagliari PH, Wilson M, Waldrip HM, He Z (2020) Nitrogen and phosphorus characteristics of beef and dairy manure. **Animal Manure** 67:45-62.

Pavlović M, Marković R, Petrujkić B, Jovanović D, Baltić MŽ, Šefer D (2018) Estimation of apparent and true total tract digestibility of phosphorus from monocalcium phosphate in broiler diets. **European Poultry Science** 82:225.

Peña-Méndez EM, Havel J, Patočka J (2005) Humic Substances — Compounds of Still Unknown Structure: Applications in Agriculture, Industry, Environment, and Biomedicine. **Journal of Applied Biomedicine** 3:13-24.

Pieniazek J, Smith KA, Williams MP, Manangi MK, Anon MV, Solbak A, Miller M, Lee JT (2017) Evaluation of increasing levels of a microbial phytase in phosphorus deficient broiler diets via live broiler performance, tibia bone ash, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. **Poultry Science** 96:370-382.

Poujol M, Biard C, Kwakernaak C, Davin R (2022) Effect of replacing MCP by calcium humophosphate on the growth performance of broiler chickens. In: **Word's Poultry Congress**. Paris (France): Phosphea, 39p.

Ptak A, Beford MR, Świątkiewicz S, Żyła K, Józefiak D (2015) Phytase modulates ileal microbiota and enhances growth performance of the broiler chickens. **PloS One** 10:e0119770.

Rath NC, Huff WE, Huff GR (2006) Effects of humic acid on broiler chickens. **Poultry Science** 85:410-414.

Ravindran V, Morel PC, Partridge GG, Hruby M, Sands JS (2006) Influence of an Escherichia coli-derived phytase on nutrient utilization in broiler starters fed diets containing varying concentrations of phytic acid. **Poultry Science** 85: 82–89.

Rodehutscord M, Adeola O, Angel R, Bikker P, Delezie E, Dozier III WA, Faruk MU, Francesch M, Kwakernaak C, Narcy A, Nyachoti CM, Okulosi OA, Preynat A, Renouf B, Saiz del Barrio A, Schedle K, Siegert W, Steinfeldt, Van Krimpen MM, Waititu SM, Witzig MB (2017) Results of an international phosphorus digestibility ring test with broiler chickens. **Poultry Science** 96:1679-1687.

Rodehutscord M, Sommerfeld V, Kühn I, Bedford MR (2022) Phytases: Potential and limits of phytate destruction in the digestive tract of pigs and poultry. In: **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. Wallingford (UK): CABI, p. 124-152.

Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, Saraiva A, Abreu MLT, Rodrigues PB, Oliveira RF, Barreto SLT, Brito CO (4^{ed.}) (2017) **Brazilian Tables for Poultry and Swine: Composition of Feedstuffs and Nutritional Requirements**. Viçosa: UFV, 482p.

Rousseau X, Valable AS, Létourneau-Montminy MP, Mème N, Godet E, Magnin M, Nys Y, Duclos M, Narcy A (2016) Adaptive response of broilers to dietary phosphorus and calcium restrictions. **Poultry Science** 95:2849–2860.

Salah H, Masour ES, Reham RR, El Hamid ESA (2015) Study on the effect of humic acid on growth performance, immunological, some blood parameters and control intestinal clostridium in broilers chickens. **Zagazig Veterinary Journal** 43: 102-109.

SAS – Analytics Software. SAS Institute Inc. (2023). SAS (Version 9.4). Available from: https://www.sas.com/en_us/software/university-edition.html

Sauvant D, Perez JM, Tran G (2004) **Tables of composition and nutritional value of feed materials: pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses, and fish**. Wageningen (NL): Wageningen Academic Publishers, 304p.

Scholey DV, Morgan NK, Riemensperger A, Hardy R, Burton EJ (2018) Effect of supplementation of phytase to diets low in inorganic phosphorus on growth performance and mineralization of broilers. **Poultry Science** 97:2435-2440.

Selle PH, Cowieson AJ, Ravindran V (2009) Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. **Livestock Science** 124:126-141.

Shastak Y, Witzig M, Hartung K, Bessei W, Rodehutscord M (2012) Comparison and evaluation of bone measurements for the assessment of mineral phosphorus sources in broilers. **Poultry Science** 91:2210-2220

Shim MY, Karnuah AB, Mitchell AD, Anthony NB, Pesti GM, Aggrey SE (2012) The effects of growth rate on leg morphology and tibia breaking strength, mineral density, mineral content, and bone ash in broilers. **Poultry Science** 91:1790-1795.

Smulikowska S, Czerwiński J, Mieczkowska A (2010) Effect of an organic acid blend and phytase added to a rapeseed cake-containing diet on performance, intestinal morphology, caecal microflora activity and thyroid status of broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 94:15–23.

Sommerfeld V, Schollenberger M, Kühn I, Rodehutscord M (2018) Interactive effects of phosphorus, calcium, and phytase supplements on products of phytate degradation in the digestive tract of broiler chickens. **Poultry Science** 97:1177–1188.

Taklimi SMSM, Ghahri H, Isakan MA (2012) Influence of different levels of humic acid and esterified glucomannan on growth performance and intestinal morphology of broiler chickens. **Agricultural Sciences** 3:663–668.

Teng PY, Kim WK (2018) Review: Roles of Prebiotics in Intestinal Ecosystem of Broilers. **Frontiers in Veterinary Science** 5:245.

Trairatapiwan T, Ruangpanit Y, Songserm O, Attamangkune S (2018) True ileal phosphorus digestibility of monocalcium phosphate, monocalcium phosphate and dicalcium phosphate for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology** 241:1-7.

Van Harn J, Spek JW, Van Vuuren CA, Van Krimpen MM (2017) Determination of pre-cecal phosphorus digestibility of inorganic phosphates and bone meal products in broilers. **Poultry Science** 96:1334-1340.

Walk CL, Bedford MR, McElroy AP (2012) Influence of limestone and phytase on broiler performance, gastrointestinal pH, and apparent ileal nutrient digestibility. **Poultry Science** 91:1371-1378.

World's Poultry Science Association (WPSA) (2013) Working Group Report: Determination of phosphorus availability in poultry. **World's Poultry Science Journal** 69:687-698.

Woyengo TA, Cowieson AJ, Adeola O, Nyachoti CM (2009) Ileal digestibility and endogenous flow of minerals and amino acids: responses to dietary phytic acid in piglets. **British Journal of Nutrition** 102:428-433.

Xu L, Li N, Farnell YZ, Wan X, Yang H, Zhong X, Farnell MB (2021) Effect of feeding a high calcium: Phosphorus ratio, phosphorous deficient diet on hypophosphatemic rickets onset in broilers. **Agriculture** 11:955.

Zanu HK (2023) Influence of two levels of phytic acid and particle size of oyster shell on the performance, calcium digestibility, gastrointestinal pH, and bone traits in broilers. **British Poultry Science** 64:658-669.

Table1. Basal diets formulas without phytase addition for each phosphorus sources (monocalcium phosphate – MCP and calcium humophosphate – CHP), and their respective calculated nutritional composition.

Ingredients	1-21	
	Diet 1	Diet 2
Corn, Grain – 7.86% CP	57.104	57.104
Soybean meal – 46% CP	36.076	36.076
Soybean oil	2.401	2.401
Limestone	1.219	1.283
Monocalcium Phosphate	0.788	-
Calcium Humophosphate	-	0.829
Salt	0.531	0.531
Lysine – HCl	0.301	0.301

DL-Methionine	0.337	0.337
Threonine	0.190	0.190
Valine	0.178	0.178
Choline Chloride – 70%	0.070	0.070
Mineral Premix ¹	0.100	0.100
Vitamin Premix ²	0.100	0.100
Inert ³	0.605	0.500
Total	100.00	100.00

Calculated nutritional composition

Metabolizable Energy, kcal/kg	3075
Crude Protein, %	22.0
Ca Total, %	0.746
Available P, %	0.250
Total P, %	0.529
K, %	0.843
Na, %	0.224
Cl, %	0.386
Lysine SID, %	1.347
Methionine SID, %	0.622
Methionine + Cystine SID, %	0.915
Threonine SID, %	0.872
Tryptophan SID, %	0.247
Arginine SID, %	1.342
Valine SID, %	1.028
Electrolytic Balance	204.123

¹Content/kg: Folic Acid 750.00 mg, Biotin 80.00 mg, Niacin 40.00 g, Pantothenic Acid 10.00 g, Vitamin A 8,000,000.00 IU, Vitamin B1 3,000.00 mg, Vitamin B12 18.00 mg, Vitamin B2 6,000.00 mg, Vitamin B6 3,250.00 mg, Vitamin D3 2,500,000.00 IU, Vitamin E 15,000.00 IU, Vitamin K 2,500.00 mg.

²Content/kg: Cooper 6,300.00 mg, Iron 52.50 g, Iodine 1,260.00 mg, Manganese 70.00 g, Zinc 63.00 g, Selenium 300.00 mg.

³Washed sand. Phytase was supplemented in substitution of the inert in the concentration of 50 g/ton for 500 FTU, 100 g/ton for 1000 FTU, and 200 g/ton for 2000 FTU per kg of feed.

Table 2. Dry matter (DM), mineral matter (MM), total calcium (Ca), total phosphorus (P), and phytase activity analyzed.

P source	Phytase level	DM (%)	MM (%)	Total Ca	Total P	Phytase (FTU/kg)
MCP	0	84.22	5.73	0.72	0.54	0
	500	84.19	5.87	0.73	0.52	485
	1000	84.78	5.73	0.70	0.52	950
	2000	84.14	5.56	0.71	0.53	1960
CHP	0	83.22	5.98	0.70	0.54	0
	500	84.60	5.76	0.74	0.55	490

1000	84.76	5.67	0.70	0.56	965
2000	83.08	5.69	0.72	0.55	1920

Table 3. Performance response parameters of body weight (BW), daily body weight gain (BWG), feed intake (FI) and feed conversion ratio (FCR) of broiler chickens of 1 to 21-days-old subject to phosphate sources and different levels of phytase enzyme.

P source	Phytase level	BW (g)	BWG (g/d)	FI (g)	FCR
MCP	0	945	42.99	55.33	1.29
	500	1011	46.11	57.76	1.25
	1000	1027	46.88	58.73	1.24
	2000	1048	47.86	59.14	1.23
CHP	0	953	43.35	55.81	1.28
	500	1048	47.89	58.66	1.22
	1000	1026	46.84	58.62	1.25
	2000	1033	47.15	59.57	1.26
SEM		34.65	1.65	1.72	0.041
P source	MCP	1008	45.96b	57.66	1.26
	CHP	1015	46.61a	58.19	1.26
Phytase level	0	949b	43.17b	55.57b	1.28b
	500	1030a	47.00a	58.24a	1.24ab
	1000	1027a	46.86a	58.48a	1.25ab
	2000	1041a	47.51a	59.38a	1.25ab
Probability					
P source		<0.10	<0.05	0.17	0.36
Phytase level		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Interaction		0.51	0.10	0.95	0.26

¹SEM is the standard error of mean.

²Means followed by the same letters do not differ from each other by Tukey's Test ($P>0.05$).

Table 4. Table 4. Apparent Ileal Digestibility Coefficient (%) of phosphorus and calcium of 21-day-old growing chickens fed with two phosphate sources and levels of phytase inclusion.

P source	Phytase level	P	Ca
MCP	0	84.03	73.21
	500	88.66	69.67
	1000	90.11	70.82
	2000	90.73	66.99
CHP	0	82.90	73.87
	500	88.90	70.37
	1000	88.83	69.63
	2000	90.56	67.58
SEM ¹		4.09	7.06
P source	MCP	88.38	70.17
	CHP	87.80	70.36

	0	83.46c	73.54b
Phytase level	500	88.78b	70.22ab
	1000	89.47ab	70.02ab
	2000	90.64a	67.28a
Probability ²			
	P source	0.24	0.89
	Phytase level	<0.05	<0.05
	Interaction	0.64	0.95

¹SEM is the standard error of mean.

²Means followed by the same letters do not differ from each other by Tukey's Test (P>0.05).

Table 5. pH of gut segments and tibia bone ash (%) of 21-day-old growing chickens fed with two phosphate sources and levels of phytase inclusion.

P source	Phytase level	Duodenum	Jejunum	Ileum	Ash (%)
MCP	0	6.47	6.23	6.24b	40.79
	500	6.50	6.25	6.27ab	42.41
	1000	6.43	6.24	6.30a	42.49
	2000	6.43	6.31	6.37a	43.88
CHP	0	6.45	6.22	6.24b	42.55
	500	6.54	6.27	6.25b	43.30
	1000	6.54	6.26	6.23b	44.35
	2000	6.48	6.28	6.25b	44.91
SEM ¹		0.10	0.06	0.16	3.98
P source	MCP	6.48	6.27	6.30a	42.39b
	CHP	6.50	6.26	6.24b	43.78a
Phytase level	0	6.46b	6.23b	6.24b	41.67b
	500	6.52a	6.27ab	6.28ab	42.85ab
	1000	6.53a	6.28a	6.27ab	43.42a
	2000	6.45b	6.29a	6.41a	44.39a
Probability ²					
	P source	0.34	0.36	<0.05	<0.05
	Phytase level	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	Interaction	0.71	0.87	<0.05	0.77

¹SEM is the standard error of mean.

²Means followed by the same letters do not differ from each other by Tukey's Test (P>0.05).

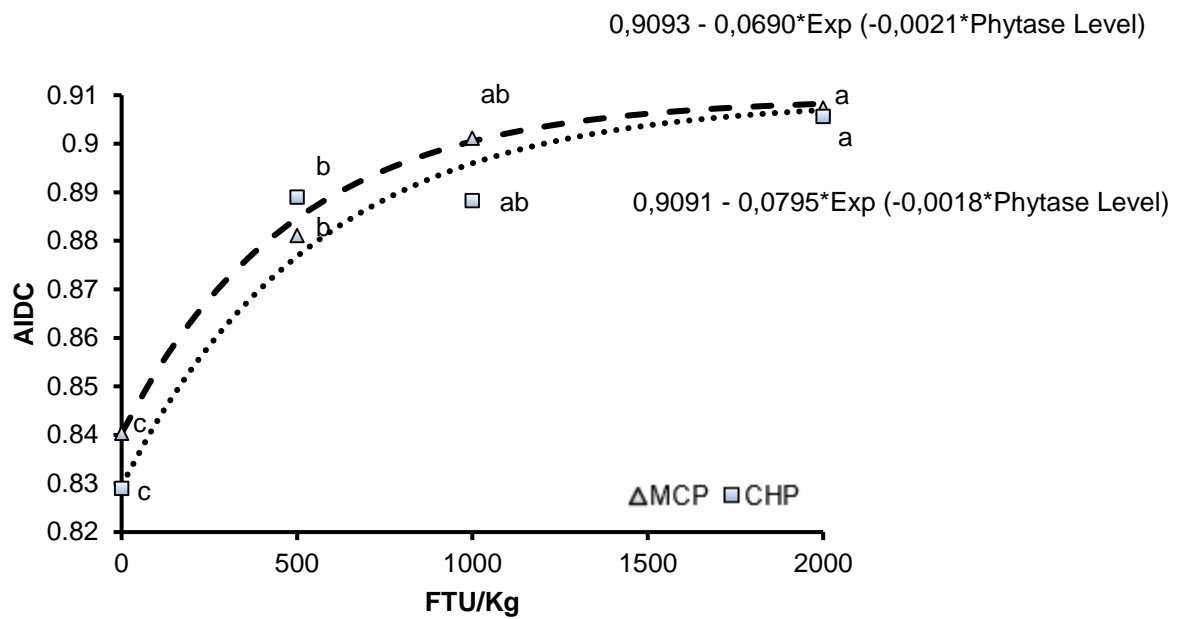


Figure 1. Apparent ileal digestibility coefficient of phosphorus exponential curves in function of the phytase supplementation levels of growing broiler chickens feed with two phosphate sources (monocalcium phosphate – MCP and calcium humophosphate – CHP).

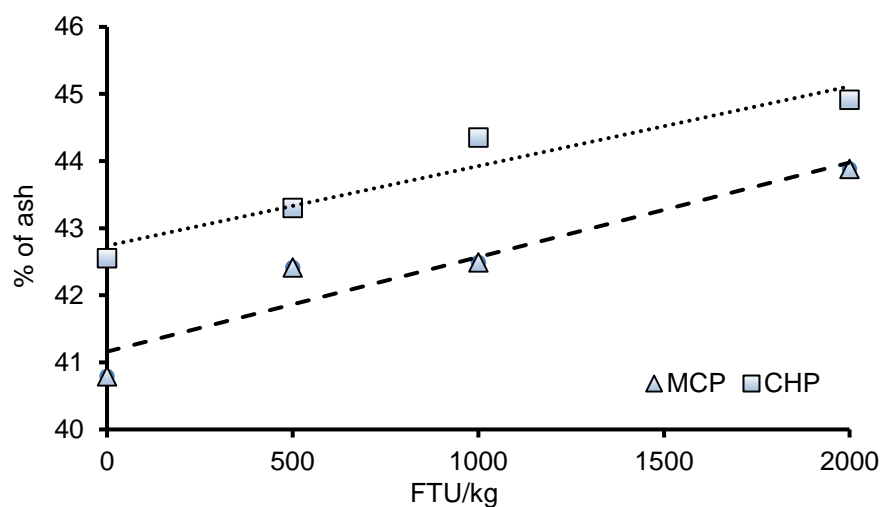


Figure 2. Linear adjustment of tibia bone ash (%) in function of the phytase supplementation levels of growing broiler chickens feed with two phosphate sources (monocalcium phosphate – MCP and calcium humophosphate – CHP).

CAPÍTULO 3 – Considerações Finais

Considerações Finais

1. IMPLICAÇÕES

A relação entre a fitase e este novo fosfato, embora não totalmente elucidada pelo nosso estudo, mostrou-se bastante promissora, dados os efeitos encontrados no pH intestinal e nas cinzas ósseas, e outras respostas possivelmente afetadas, mas não quantificadas por nós, como o microbioma e respostas moleculares.

Perante os resultados deste estudo, o humofosfato de cálcio pode ser utilizado como uma ótima fonte de fósforo em dietas comerciais para frangos de corte junto à suplementação de fitase. Por se tratar de uma fonte nova, é importante ainda que se avalie a interação desta com os demais componentes da fórmula. Com a adição do humofosfato é possível alcançar ganhos de desempenho, saúde intestinal e óssea, que uma melhor viabilidade econômica dos lotes.