

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE AGRONOMIA

**CALIDAD NUTRICIONAL DEL FOSFORO
ALIMENTARIO:**

*Efecto del origen de la fuente, procesamiento y
estado fisiológico sobre la biodisponibilidad del P
alimentario en modelos aviares*

Por

Marta del Puerto Di Landro

Tesis presentada como uno de los
Requisitos para obtener el título de
Ingeniero Agronomía
(orientación granjera)

MONTEVIDEO
URUGUAY
2002

Tesis aprobada por:

Director:.....
Cristina Cabrera

.....
Ali Saadoun

.....
Laura Astigarraga

Fecha:

Autor:
Marta del Puerto

AGRADECIMIENTOS

En el transcurso de este trabajo he recibido la invaluable colaboración de compañeros y amigos a quienes quiero hacer llegar mis mas sinceros agradecimientos ya que sin ellos hubiera sido imposible realizarlo.

En especial quiero mencionar a:

A la Ing. M. Cristina Cabrera por su dedicación en la dirección y conducción de este trabajo, y por su permanente apoyo en lo personal.

Al Dr Ali Saadoun por su valiosa colaboración, asesoramiento e información brindada.

A la Sra Clelia Delgado por su colaboración en la toma de datos de campo y análisis de muestras.

Al Sr Germán Acosta por su dedicación en el mantenimiento de los animales y locales.

A la Sra Alicia Marchesoni por su responsabilidad en la realización de los análisis solicitados.

Al Laboratorio de Nutrición y Ciencia de los Alimentos y a la Unidad de Avicultura de la facultad de Agronomía en su totalidad.

A todos aquellos que de una u otra forma han hecho posible la culminación del presente trabajo.

INDICE GENERAL

PAGINA DE APROBACION.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	
I REVISION BIBLIOGRAFICA.....	6
A. EL FOSFORO (P):RECURSO NATURAL, NUTRIENTE, PARTICIPANTE DE LOS PROCESOS METABOLICOS Y CONTAMINANTE DEL MEDIO AMBIENTE.....	6
1. <u>El fósforo como nutriente</u>	6
a. El fósforo de origen mineral.....	7
b. El fósforo de origen animal	8
c. El fósforo de origen vegetal	9
2. <u>Rol del fósforo</u>	9
3. <u>Absorción, digestión y metabolismo del fósforo</u>	11
B. ABSORCION.....	11
C. MECANISMOS DE ABSORCION.	12
D. FACTORES QUE AFECTAN LA ABSORCION.	13
1. <u>Metabolismo</u>	15
a. excreción.	16
b. Control de la homeostasisdel calcio y del fósforo	16
c. Efectos en el intestino	16
d.. efecto en el hueso.	16
E. CONCEPTO DE BIODISPONIBILIDAD.....	17
1. Metodos de evaluación de la biodisponibilidad.	18
a. Criterios para evaluar la biodisponibilidad in vivo	19
b. Formas de expresar la biodisponibilidad	20
c. Técnicas analíticas para medir fósforo	21
II. MATERIALES Y METODOS.	22
A. ESTUDIOS DE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y FÍSICAS DE LAS FUENTES DE FÓSFORO UTILIZADAS.....	22
B. ESTUDIO DE LA BIODISPONIBILIDAD IN VIVO DE LAS FUENTES DE FOSFORO UTILIZADAS.....	24
1. Determinación de la biodisponibilidad del fósforo de fuentes orgánicas e inorgánicas a través de un bioensayo	24
2. Determinación de la biodisponibilidad del fósforo a través de un balance digestivo modificado.	25
C. DETERMINACIONDE LOS REQUERIMIENTOS DE FOSFORO.....	26
D. DETERMINACION DE LA BIODISPONIBILIDAD DEL FOSFORO Y EFECTO DEL TAMAÑO.....	27
E. ANALISIS ESTADISTICOS	28
III RESULTADOS Y DISCUSION	29
A. CARACTERÍSTICAS QUIMICASY FISICAS DE DE LAS FUENTES DE FOSFORO. ORGANICAS E INORGANICAS UTILIZADAS.....	29
B. DETERMINACION DE LOS REQUERIMIENTOS DE FOSFORO PARA EL CRECIMIENTO HASTA LA EDAD DE 30 Y 37 DÍAS.....	29
C. EFECTO DE LA FUENTE Y TAMAÑO DE LA PARTICULA SOBRE LOS PARAMETROS OSEOS Y DE CRECIMIENTO CORPORAL DE LAS AVES EN CRECIMIENTO.....	31
D. BIODISPONIBILIDAD DEL FOSFORO DE LAS FUENTES ORGANICAS E INORGANICAS UTILIZANDO UN BIOENSAYO	33
E. DETERMINACION DE LOS REQUERIMIENTOS DE FOSFORO EN EL MODELO AVES EN POSTURA.....	38
F. EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTICULA Y DE LA DOSIS SOBRE LA DISPONIBILIDAD DE LA DOSIS SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE FOSFORO ORGANICO EN UN BALANCE DIGESTIVO.....	40
a . <u>A dosis inferiores a los requerimientos</u>	40

b. A dosis próximas a los requerimientos.....	41
IV. CONCLUSIONES.....	44
A. REQUERIMIENTOS DE FOSFORO PARA CRECIMIENTO.....	44
B. BIODISPONIBILIDAD DEL FOSFORO DE FUENTES ORGANICAS E INORGANICAS	44
a. Efecto del origen del fosfato.	44
b Efecto de los parámetros utilizados como respuesta	44
c. Efecto de la partícula	44
C. APLICACIÓN PRACTICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA ELABORACION DE UNA TABLA DE BIODISPONIBILIDAD DE LAS FUENTES DE FOSFORO.....	45
VI. BIBLIOGRAFIA.....	47

I. INTRODUCCION

A. El fósforo (P): recurso natural, nutriente, participante de los procesos metabólicos y contaminante del medio ambiente.

El fósforo elemento tiene peso atómico 30,97 y número atómico 15 y presenta un isótopo natural P^{31} . Constituye el 0,12% de la corteza terrestre, pero dada su alta reactividad no aparece como elemento simple, sino formando compuestos. La mayoría de los compuestos son los fosfatos que aparecen en la superficie de la tierra como ortofosfatos. La fuente principal de fósforo en la naturaleza es la roca ígnea, formada por la solidificación de la lava volcánica depositada según cuatro rocas. Apatitas, fosforitas marinas, roca fosfatada y guano.

Como integrante de los procesos metabólicos, es un elemento esencial, por lo cual debe ser suministrado externamente en la dieta de los animales. Es integrante de las estructuras óseas, plásticas y metabólicas.

Por otra parte, por falta de conocimientos más exactos sobre la utilización del fósforo en la dieta de animales, gran parte del mismo es excretado por los mismos constituyendo no solo un gasto innecesario sino también una fuente de contaminación al medio ambiente.

En esta revisión bibliográfica, en una primera parte haremos énfasis en el origen de las fuentes de fósforo que se destina a la alimentación de los animales, en el rol fisiológico del fósforo, en los mecanismos de absorción y en la regulación de la homeostasis. En una segunda parte abordaremos el concepto de biodisponibilidad y los criterios de evaluación y de las metodologías que permiten determinar en forma ajustada el valor de biodisponibilidad.

1. EL FOSFORO COMO NUTRIENTE

Existe una amplia variedad de alimentos usados como fuentes de fósforo en la elaboración de raciones. Estas incluyen las fuentes de origen mineral, como los depósitos de roca fluorite, otros de origen animal como los depósitos de guano, fosfatos coloidales, harina de carne y hueso, cenizas de hueso, etc. y fuentes de origen vegetal, tales como los afrechillos, etc.

a. El fósforo de origen mineral.

En alimentación animal la mayoría de los fosfatos usados en las especies monogástricas son de origen industrial, pertenecen a dos grupos característicos. El primer grupo, los fosfatos bicálcicos se obtienen por reacción del ácido fosfórico con la roca (limestone) y neutralizado con carbonato de calcio, para obtener fosfatos mono y bicálcicos. Estos fosfatos no se consideran químicamente puros, debido a que la cantidad de fosfatos mono y bicálcicos, el ácido fosfórico, carbonato de calcio e impurezas dependen del origen de la roca fosfatada y del proceso industrial al que fue sometido. (Lima, F.R. et al. 1995). Los fosfatos monoamónicos se obtienen en igual forma pero haciendo reaccionar el ácido fosfórico con el amonio anhidro.

El segundo grupo lo constituyen los fosfatos defluorinados, éstos se producen haciendo reaccionar la roca fosfatada con ácido fosfórico y carbonato de sodio y luego calcinados a temperaturas de 1250 °C. Debido a que el control de este proceso es muy difícil, el producto obtenido tiende a ser mas variable que el del grupo anterior, en cuanto a la disponibilidad del fósforo aportado. Lima et al (1995) estudiaron 9 fuentes de fosfatos bicálcicos de diferente origen y encontraron valores de humedad que variaron entre 0,15 a 2,17% valores concordantes con los encontrados por Potter (1988) y Sullivan et al (1994). Los mismos autores reportaron que los valores de residuo insoluble en ácido fueron bajos variando entre 5,14% (fosfato brasilero) a 0,77% en el estándar USP (brasileño) a 2,88% en el estándar USP (USA). El valor de pérdida por ignición varía entre 13,7% a 24,1% en el grado USP, esta pérdida se determinó a 1000°C y significa pérdida por agua cristalizada CO₂ de los carbonatos y minerales volátiles tipo As, Hg, y halógenos.

En ensayos comparativos con gallinas, en iguales condiciones de manejo y producción, Singser y col (1969), encontraron menor disponibilidad del fósforo en las fuentes provenientes de las rocas blandas, algo mayor en las rocas defluorinadas y en los fosfatos bicálcicos. En ensayos posteriores, las gallinas demostraron tener mayor producción y menor mortalidad cuando se alimentaron con fosfatos bicálcicos, en comparación con aquellas alimentadas con roca poco defluorinada. Según Ridel, Helmbolt y Singser, citados por MC. Dowel (1992) la alta mortalidad se debía principalmente a problemas de fatiga de jaula.

Wilcox y col. (1955) trabajando con pollos en crecimiento concluyeron que la mayoría de los fosfatos defluorinados y los fosfatos dicálcicos parecen tener disponibilidad aceptable en aves de hasta cuatro semanas de edad. Algunos de estos fosfatos no se mostraron satisfactorios en cuanto a la osificación valorada a través del contenido de ceniza del hueso, estas variaciones pueden ser debidas al material original o a los procesos a que

fue sometida la roca, sin embargo el fosfato monocálcico se mostró como una fuente altamente aprovechable.

b. El fósforo de origen animal.

Los suplementos proteicos de origen animal, tales como la harina de carne y hueso, harina de subproductos de la industria avícola, harina de ceniza de hueso, etc., han sido muy utilizados en dietas para animales por su buen aporte de proteína de alta calidad y su contenido en fósforo. Estudios realizados por Waldroup y col (1965) y por Spandorf y Leong (1965) determinaron que el fósforo proveniente de la harina de carne y hueso, de la harina de subproductos de la industria avícola y de la harina de pescado eran muy bien utilizados por las aves.

En 1955 Wilcox y col reportaron que la biodisponibilidad del fósforo de las harinas de hueso era del 95% respecto al fósforo bicálcico USP, estimados por ganancia de peso, y ceniza de tibia en pavos en crecimiento, esto no concuerda con lo encontrado por el mismo autor en 1954, quien confirmó que la disponibilidad de la harina de hueso bajaba 75% cuando se usaba en dietas purificadas. Estos resultados obtenidos permiten inferir que la composición de la dieta tiene influencia sobre la disponibilidad del fósforo. Sin embargo la gran cantidad de datos obtenidos indica que en condiciones normales la harina de hueso es buena fuente de fósforo para las aves.

En 1994 Waldroup y Adams obtuvieron informaciones que corroboraron lo antes expuesto: estos autores probaron 11 harinas de carne y hueso en pollos en crecimiento, dando valores equivalentes al fosfato monocálcico. Por su parte Sell y Jeffrey (1996), trabajando con pavos en crecimiento probaron la influencia del tamaño de partícula sobre la disponibilidad del fósforo entre las harinas de carne y hueso, demostrando que no existe diferencia respecto al fosfato bicálcico, variando la disponibilidad entre 97,3% y 101% para tamaño de partícula 10 y 12 respectivamente.

En 1986, Sauveur presenta un review en el cual hace mención de pocos trabajos que demuestran que la disponibilidad del fósforo en la harina de carne y hueso puede incrementarse desde 83% hasta 98% mediante la molienda fina. En el mismo año Mc. Naughton observó mayor eficiencia de utilización del fósforo en pollitos de 3 semanas cuando se alimentaban con minerales molidos a 30 ó 60 U.S.B.S. (United States Bureau Standards) comparado con moliendas de 16 a 20 ó de 120 a 200 U.S.B.S. En 1979, Mongin y Sauveur demostraron que los efectos de deficiencia de fósforo (fósforo disponible 2,5 g/Kg) en pollos en crecimiento puede reducirse alimentándolos con conchilla marina en lugar de polvo de roca.

C. El fósforo de origen vegetal

La forma principal en que el fósforo aparece en los vegetales es como fitato. Estos fitatos combinados con elementos tales como Ca, Zn, Mg, Mn, son moléculas de muy baja digestibilidad. La disponibilidad del fósforo de los fitatos varía según la edad y la especie de que se trate pero generalmente es de muy baja disponibilidad, especialmente en animales en crecimiento y particularmente en los monogástricos. En 1930 Common reportó que el fósforo vegetal pasaba a través del tracto digestivo del ave sin ser hidrolizado. Gillis, Harris y Hensen (1953) demostraron que el fósforo presente en los fitatos era sólo 50% menos disponible que aquel presente en los fitatos dicálcicos o en las rocas defluorinadas, tal cual era indicado por la alta mortalidad, baja producción de huevos y la composición ósea de las aves. Normalmente se admite que el 70% del fósforo presente en los vegetales está bajo forma de fitato siendo disponible solamente el 30% restante (Nys INRA); sin embargo Sauveur (1989) determinó valores variables de disponibilidad en diferentes plantas.

O'Dell y de Donald (1976) determinaron que los fitatos son una mezcla de sales de K y Mg del ácido inositol hexafosfórico y que representa entre el 55 y el 70% del total del fósforo fítico. Este compuesto puede variar desde 0% en la alfalfa, 20% en el maíz, menos del 30% en el sorgo, 50% en trigo y hasta 90% en los afrechillos de arroz. En 1967, Nott, Norris y Taylor citados por Peeler (1972) reportaron que la utilización del fósforo fítico era altamente dependiente del nivel de calcio en la dieta y que cuando el nivel de calcio en la dieta era adecuado para la óptima calidad de cáscara, la gallina era incapaz de utilizar al fósforo fítico de la dieta.

Por otro lado, la fitasa natural contenida en cantidades variables en los granos es muy sensible a los procesos térmicos que implican temperaturas mayores a 72°C, como por ejemplo, la granulación, disminuyendo de esta forma el fósforo que eventualmente pudiera hidrolizarse en forma natural (Nys y col, 1995). Por lo tanto el fósforo fítico puede ser utilizado por las aves sólo después que el compuesto ha sido hidrolizado. Por lo tanto la disponibilidad del fósforo fítico depende de la presencia de fitasa o de los tratamientos químicos que disminuyen el contenido de fitatos. (Singsen 1972).

2. ROL DEL FOSFORO

El cuerpo está constituido en el 96% de su peso por 4 elementos principales, carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno y en su 35% por los principales cationes y aniones. Del total de minerales presentes el calcio representa el 46%, el fósforo el 29%, el sodio,

potasio, cloro y magnesio el 255 mientras que el restante 0,3% lo constituyen los minerales traza.

Si bien la distribución mineral en el cuerpo no es homogénea, sino que hay tejidos que contienen mayor cantidad de minerales que otros, la relación peso corporal y mineral del cuerpo se mantiene constante entre las diferentes especies desde el hombre hasta las aves (Scott et al 1982). Durante el desarrollo animal, minerales tales como el sodio, cloro y potasio permanecen constantes mientras que otros tales como el fósforo, calcio y magnesio se reducen a más de la mitad durante la vida embrionaria. El principal reservorio mineral del cuerpo lo constituye el tejido óseo con entre el 85 y 80% del calcio, magnesio y fósforo y por la glándula tiroides almacenando el 80% del yodo (Mc. Dowel 1992)

El fósforo es el segundo mineral más abundante en el organismo. Cerca del 80% del contenido del fósforo está en el esqueleto y el resto se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo. Está involucrado en casi la totalidad de las reacciones del cuerpo y es considerado el más versátil de los elementos minerales.

Actúa como:

a.- componente estructural de órganos y tejidos

Es esencial para la formación del esqueleto y forma parte del tejido muscular. Según Mc. Dowel (1992) el fósforo y el calcio se van depositando en la matriz ósea, acompañando los vasos sanguíneos y formando así la trama ósea y permitiendo el crecimiento en longitud del hueso. Este mecanismo está regulado por la $1,25(OH)_2D_3$. Esta hormona fue localizada en el núcleo de células óseas por Weber y col en (1971). Según Mc. Dowel (1991) el fósforo no esquelético está mayormente concentrado en los glóbulos rojos de la sangre, el músculo y el tejido nervioso. También se encuentra formando parte de los compuestos orgánicos como fosfoproteínas, fosfolípidos, fosfocreatinas y hexafosfatos. Según Postner (1973) la matriz mineralizada del hueso consiste en dos fases, una amorfa y otra cristalizada. La fase amorfa contiene fosfato tricálcico hidrolizado y fosfato de calcio. La fase cristalina se asemeja a la hidroxiapatita pero contiene 3% de carbonato y 1% de citrato más otros iones adosados a la superficie de los cristales de apatita.

b.- constituyente de fluidos orgánicos y tejidos

Interviene en el metabolismo nutricional y es esencial para la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia, es responsable de la transmisión genética y del control del

metabolismo celular al formar parte de los ácidos ribonucleicos y desoxiribonucleicos (ADN y ARN) (Oser, 1965, citado por Mc Dowel 1991)

Colabora en el mantenimiento del balance ácido – base del cuerpo y de la presión osmótica. Tiene relación directa con el metabolismo energético, formando parte, junto a otros elementos traza (hierro, cromo, níquel, magnesio y zinc) de compuestos ADP y ATP, dadores de energía. Constituye fosfolípidos de reserva del organismo e interviene en el metabolismo de proteínas y aminoácidos.

c.- actúa como catalítico en los sistemas hormonales

Según Miller (1985) está relacionado en la totalidad de las reacciones del metabolismo y en la utilización de las grasas, carbohidratos y proteínas. Forma parte de algunas enzimas o actúa como activador de otras, por ejemplo, con el selenio en la glutatona peroxidasa, con el hierro en la hemoglobina, con el cobalto en la B12, con el yodo en la hormona tiroxina y con el zinc y azufre en la insulina.

En los poligástricos es esencial para el normal desarrollo de los microorganismos ruminales especialmente los relacionados a la digestibilidad de la celulosa (Mc Dowel 1985).

3. ABSORCION, DIGESTION Y METABOLISMO DEL FOSFORO

El fósforo, como la mayoría de los minerales es absorbido desde el tracto gastrointestinal a nivel del intestino delgado y se asume que una vez en el torrente sanguíneo se vuelve disponible para ser almacenado o utilizado en los procesos fisiológicos.

B. Absorción.

Cualquiera sea el origen de la fuente, la mayoría del P es hidrolizado enzimáticamente en el lumen del intestino delgado, en la porción duodenal, liberándose fósforo inorgánico que es absorbido como ion Pi (Wasserman 1981; Braithwaite, 1984, citados por Mc Dowell 1992). En dietas normales, la absorción de fósforo varía entre 50 y 70% mientras que en consumos mayores la absorción aumenta hasta el 70% del fósforo ingerido, esto permite concluir que la absorción del fósforo no está determinado por las necesidades orgánicas del elemento, es así que las dietas ricas en fósforo elevan su absorción aumentando su concentración en el plasma sanguíneo y en la orina.

De acuerdo a ensayos realizados con fósforo radioactivo se pudo constatar que en la rata el fósforo es absorbido a nivel del duodeno y yeyuno y que está presente a partir de los 10 minutos de ingerido presentando un pico de concentración a la hora de la ingesta. Las dos enzimas que actúan en este proceso son la fosfatasa alcalina y la fitasa las cuales activan la hidrólisis de los compuestos, liberando el fósforo inorgánico.

C. Mecanismos de absorción.

Los mecanismos que intervienen en la absorción del fósforo no han sido bien estudiados hasta el momento, aunque se sabe que existen dos mecanismos:

- a. Un mecanismo de difusión pasivo resultante de una diferencia de 5mV entre el medio interior y la luz intestinal, la primera electropositiva respecto de la segunda.(Barlet y col, 1995).

En condiciones experimentales se ha podido determinar que este pasaje si bien existe es muy débil probablemente debido a las cargas negativas de los iones $H_2PO_4^-$ y HPO_3^{2-} que inhibirían la difusión de los iones. (Fuchs y Peterlink 1979, citados por Barlet y col 1995). En efecto la diferencia de 5mV es el límite equivalente de la difusión de los iones fosfato por lo cual la concentración intraluminal de los iones HPO_3^{2-} deberá ser quince veces superior a la citoplasmática para que exista difusión pasiva, mientras que la concentración de los iones $H_2PO_4^-$ deberá ser cuatro veces superior. Dado el perfil del intestino grueso la difusión de los iones fosfato tiene lugar en el duodeno proximal donde el pH ligeramente ácido favorece la presencia de los iones $H_2PO_4^-$, por el contrario a nivel de yeyuno e íleon a un pH apro a 7,5 los iones HPO_3^{2-} representan el 80% del fósforo iónico, la absorción del P alimentario no puede ocurrir en forma pasiva.

- b. Un mecanismo activo de difusión a través de la pared intestinal dependiente de la concentración de sodio y activado por la vitamina D y la hormona calcitriol, realizado a nivel duodenal principalmente.

Los trabajos de Harrison y Harrison (1961) fueron los primeros en sugerir la existencia de este transporte debido a que la diferencia de concentraciones de fósforo encontradas entre el interior y la luz intestinal eran demasiado alta para ser explicadas por una diferencia de potencial solamente. Un transfer epitelial puede ser primaria o secundariamente activado, en el primer caso el transporte es directamente ligado al metabolismo celular por intermedio de las ATPasa, mientras que en el segundo caso el transporte está asociado a otra sustancia que permite la activación secundaria, Barlet y col (1995).

Una vez en el plasma, el fósforo puede aparecer bajo dos formas principalmente. Un 70% del fósforo está formando parte de los fosfolípidos plasmáticos. Del 30% restante, 10% forma parte de las proteínas, 5% aparece unido al calcio o al magnesio y el 85% restante aparece como fosfatos inorgánicos preferentemente HPO_4^{2-} y en menor cantidad H_2PO_4^- . Este fósforo inorgánico es identificado muchas veces como ultrafiltrable. Independientemente de la forma en que se ingiera la absorción del fósforo depende de su solubilidad en el punto de contacto con las membranas de absorción (Maynard y col. 1979).

D. Factores que afectan la absorción.

a. Relación Ca:P:

Según Schultz y Oslage (1972, citados por Mc. Dowell (1992), un alto contenido de calcio en la ración tiene un efecto negativo sobre la hidrólisis de la fitina y provoca una disminución en la asimilación del fósforo. Estos datos concuerdan con los encontrados por Al-Marsi (1995) donde la disponibilidad del fósforo bajó de 66,57% a 30% cuando la relación Ca/P se incrementó de 1:1 a 2,1:1 respectivamente.

Dawron y col (1975), concluyeron que la excreción de calcio y fósforo se incrementaba al incrementarse la ingesta de estos minerales. Por otro lado, Hermes y col 1983 reportaron que la absorción de fósforo decrece al incrementarse la relación calcio-fósforo de la ración en pollos en crecimiento. Según ensayos realizados por Shaffey y col. ,1990, determinaron que dietas con altos contenidos de calcio disminuían la disponibilidad del fósforo debido a la formación de un complejo de calcio – fósforo insoluble en el tracto digestivo con la consecuente reducción de la asimilabilidad de ambos.

Estos datos concuerdan con los encontrados por Al-Marsi (1995), donde la disponibilidad del fósforo bajó de 66,5% a 30% cuando la relación Ca: P se incrementó de 1:1 a 2,1:1 respectivamente, quien concluye que la disponibilidad del fósforo disminuye con la relación calcio-fósforo debido a una disminución en la excreción de fósforo endógeno y a un incremento en la retención del calcio del alimento, causada por la acción renal con el fin de mantener la homeostasis corporal.

a. Otros minerales

Según Mc. Dowell (1992) las altas ingestas de hierro, aluminio y magnesio interfieren con la absorción del fósforo probablemente por la formación de complejos insolubles. Por otro lado, la absorción del fósforo puede verse reducida por el consumo de dietas con elevada cantidad de magnesio y viceversa, bajas contenidos de magnesio dietéticos o baja proporción de magnesio en el lumen intestinal favorecen la absorción de

FACULTAD DE AGRONOMIA



DEPARTAMENTO DE
DOCUMENTACIÓN Y
BIBLIOTECA

fósforo iónico en el intestino (Groff y col, 1995). Ambos minerales son capaces de formar compuestos a nivel del tracto gastro intestinal que los hace no disponibles para la absorción. Groff y col (1995) mostraron que el uso prolongado de hidrógeno de aluminio en la dieta reduce la absorción de fósforo de 70 a 35%. Por esto el uso prolongado de hidróxido de aluminio o de magnesio en la dieta puede resultar en una hipofosfatemia. Estos compuestos presentes en los antiácidos son utilizados satisfactoriamente en los tratamientos de hiperfosfatemia asociados al mal funcionamiento renal.

b. fósforo fítico

El fósforo proveniente de los granos de cereales se encuentra principalmente bajo forma de ácido fítico, el cual no es disponible para los monogástricos ya que estos no disponen de la enzima fitasa. Esta enzima es una estearasa capaz de romper la molécula de ácido fítico y liberar el fósforo para ser absorbido. Las levaduras del pan, que poseen esta enzima, pueden digerir el ácido fítico y absorber cerca del 50% del fósforo de los granos.

c. vitamina D

La vitamina D es sabido que estimula la absorción de calcio y fósforo por su intervención en el mecanismo activo de absorción a través de la pared intestinal. Hurwitz y Bar (1972) determinaron que el suministro de vitamina D exógena a pollos en crecimiento con déficit vitamínico mejoró la absorción de fósforo. Según los mismos autores la vitamina D incrementa la absorción de fósforo y su reabsorción en el riñón.

La actividad de esta vitamina está regulada por la hormona PTH la cual se secreta cuando hay concentraciones altas de calcio en sangre.

d. edad y estado fisiológico

Los animales jóvenes, en activo crecimiento, presentan mayor aprovechamiento del fósforo que los animales viejos y de igual forma las ponedoras en producción activa, con mayor demanda son más eficientes en la utilización del calcio y fósforo que las no activas (Cabrera y col, 1982).

Un alto número de investigadores sugiere que los requerimientos de fósforo disminuyen al aumentar la edad del animal sin que exista depleción en la producción (Crowley y col, 1963; Rodriguez y col, 1984; Sullivan y col, 1985; citados por Kershavarz y Nakagima, 1993).

1. METABOLISMO.

Una vez absorbido, el fósforo inorgánico pasa a integrar complejos en el plasma sanguíneo, desde donde es suministrado a otras partes del organismo. En el plasma sanguíneo, el fósforo puede aparecer de dos formas principalmente, el 70% está formando parte de los fosfolípidos plasmáticos y el restante 30% aparece en las proteínas (10%), unido al calcio y al magnesio (5%) y en los fosfatos inorgánicos (85%) preferentemente como HPO_4^{2-} y en menor cantidad $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$. El fósforo circulante en la sangre está en equilibrio con el del esqueleto y con el fósforo orgánico a nivel celular, y con el fósforo orgánico formado como producto intermediario en el metabolismo.

El fósforo si bien está presente en todas las células del cuerpo se encuentra mayoritariamente en el hueso y en el músculo. En el hueso, el fósforo, forma parte del fosfato de calcio $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ y de los cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ los cuales se ubican formando capas intercaladas con el colágeno en los procesos de osificación. El hueso está constantemente en proceso de absorción y reabsorción e involucra varios tipos de células óseas.

Los osteoblastos secretan el colágeno para la formación de la matriz ósea la cual se va depositando en capas sucesivas alrededor de ellos, y se calcifica para la formación del hueso. A medida que se calcifica con calcio y fósforo, los osteoblastos quedan embebidos en la matriz mineralizada y luego de cambios morfológicos y funcionales se transforman en osteocitos. La actividad de los osteoblastos esta regulada por las hormonas PTH, calcitriol y los estrógenos. Asociada a los osteoblastos se encuentra la fosfatasa alcalina, una enzima que hidroliza los ésteres de fósforo para formar fósforo libre. Se ha comprobado que los niveles de esta hormona aumentan cuando aumenta la actividad de los osteoblastos.

Los osteoclastos constituyen lisosomas que liberan hidrolasas ácidas, capaces de disolver el fosfato de calcio y atacar la matriz ósea. Los osteoclastos están gobernados por la PTH, el calcitriol y la calcitonina y juegan importante papel en mantener los niveles cálcicos de la sangre.

De todo el fósforo del cuerpo el 85% se encuentra en el hueso, combinado con el calcio en una proporción de 2:1 Ca:P formando un complejo fosfato de calcio que integra los cristales de hidroxiapatita los que se disponen entre las capas de colágeno para permitir la osificación.

El fósforo que no forma parte del hueso se encuentra en el medio tanto intra como extracelular. En la célula se encuentra involucrado en varios procesos, siendo de vital

importancia como intermediario en los procesos de metabolismo de alimentos energéticos, donde forma compuestos ricos en energía ATP y ADP y a través de la fosforilación oxidativa.

A. Excreción.

La excreción del fósforo se realiza principalmente por vía urinaria, dos terceras partes del fósforo se excreta por esta vía, mientras que el tercio restante es eliminado por vía fecal. La principal hormona que regula la excreción es la PTH, actuando a nivel de los túbulos renales donde provoca la disminución de la reabsorción. Otras hormonas que regulan la reabsorción son los estrógenos y las hormonas de la glándula tiroides.

B. Control de la homeostasis del calcio y del fósforo.

Las dos hormonas que controlan los niveles de calcio y fósforo en la sangre, son la calcitonina y la hormona paratiroidea (PTH), actuando con la forma activa de la vitamina D (dihidroxicolecalciferol). La calcitonina actúa frente a niveles altos, deprimiendo la absorción a nivel del intestino o acelerando el metabolismo del hueso.

Frente a niveles bajos en el plasma, se incrementa la cantidad de PTH, la que estimula la producción de la 1,25(OH)₂D, en el hígado. Esta hormona actúa a nivel del hígado aumentando la hormona transportadora de calcio (CaBP), por la cual se acelera la absorción de calcio intestinal. La vitamina D provoca un aumento de calcio y fósforo en el plasma mediante la estimulación de un mecanismo de bomba a nivel del intestino, hígado y hueso (Mc. Dowel, 1992).

C. Efectos en el intestino.

La vitamina D estimula el pasaje calcio y fósforo a través del epitelio intestinal, bajo la acción de la forma activa de la vitamina D, 1,25(OH)₂D. Wasserman (1981) (citado por Mc. Dowell, (1992) indicó que la 1,25(OH)₂D, es transferida al núcleo de la célula intestinal donde actúa a nivel cromático, provocando un aumento de los RNAs que en el ribosoma mediante proteínas específicas activan la absorción de calcio y fósforo.

D. Efecto en el hueso.

Durante la formación del hueso en animales jóvenes el calcio y el fósforo se van depositando en la matriz formando la traba ósea, permitiendo el crecimiento en longitud del hueso (Maynard y col 1979). El hueso está permanentemente sometido a un proceso de reabsorción y formación con movilización y depósito de calcio y fósforo durante toda la vida.

La reabsorción y la formación del hueso se llevan a cabo por dos células diferentes, los osteoblastos encargados de la formación del hueso y los osteoclastos encargados de la reabsorción del mismo liberando minerales, principalmente calcio y fósforo para procesos tales como la lactación, gestación, producción de huevos, síntesis de tejido muscular, etc.

A. Concepto de biodisponibilidad.

En el estudio del metabolismo mineral, es sabido que el conocimiento de la cantidad total de un mineral en un alimento o en la ración es un dato insuficiente si no se acompaña con el de la disponibilidad de ese alimento para ese animal. Ningún alimento es absorbido ni utilizado completamente, sino que parte se pierde en el proceso natural de la digestión y metabolismo.

Para que un nutriente tenga valor nutricional debe poder ser digerido, absorbido y transportado hacia la parte del cuerpo donde será utilizado. Biodisponibilidad es la medida de la cantidad de nutriente que la fuente puede aportar al proceso fisiológico del animal.

Peeler (1972) definió la biodisponibilidad como la medida de la habilidad de un elemento o ión de soportar los procesos biológicos. Generalmente este dato se da en relación numérica a otro ion o elemento considerado como estándar. De esta forma se minimiza la variabilidad debida a otros factores y permite que los resultados sean ampliamente aplicados.

Estos ensayos se realizan con pollos en crecimiento o gallinas en postura, alimentadas con una dieta carente, principalmente vegetal, suplementada con niveles crecientes de las fuentes de fósforo testeadas y el fósforo de la fuente de referencia. Los niveles deben ser tales que la respuesta al tratamiento aparezcan en la zona recta de la curva de respuesta.

La "respuesta" según Sibbald (1983) de un animal en crecimiento al agregado de un nutriente limitante sigue la "ley de los retornos decrecientes". Cualquier parámetro

responde al añadido de un nutriente limitante con una máxima expresión cuando el nivel del nutriente es bajo y los incrementos en la respuesta disminuyen en la medida que el nivel de nutrientes se aproxima al óptimo.

1. Métodos de evaluación de la biodisponibilidad.

La disponibilidad biológica del fósforo puede ser medida utilizando técnicas in vivo e in vitro. Las técnicas in vivo son las más utilizadas para estudiar la biodisponibilidad mediante la relación de dos coeficientes de regresión. Es una metodología compleja que involucra animales en crecimiento.

Gillis y col, 1954, (citados por Peeler 1972) fueron los primeros investigadores en estudiar la biodisponibilidad del fósforo en pollos en crecimiento a través de la ceniza de tibia, alimentando las aves con diferentes fuentes y comparando los resultados contra un estándar de referencia. La misma técnica fue utilizada por Nelson y Walkers (1964), citados por Peeler (1972), encontrando una repetibilidad en los resultados del 5%.

Ravindran y col 1 (1995) realizaron ensayos de biodisponibilidad del fósforo de diferentes fuentes en ensayos con pollos de 0 a 21 días, tomando como criterios de medición la ceniza del dedo medio derecho, de la tibia y del metatarso, gravedad específica del hueso y volumen del hueso. Como resultado obtuvo buena predicción de todos los criterios excepto la gravedad específica. Los mismos autores concluyeron que los criterios de largo, volumen y gravedad específica del hueso no constituyen criterios de medición confiables. Los ensayos biológicos con pollos son métodos confiables de estimación de la biodisponibilidad relativa. Sin embargo estos ensayos resultan muy caros y largos. Es por ello que los nutricionistas han realizado ensayos explorando la relación entre los métodos in vivo e in vitro.

Las técnicas in vitro comprenden la utilización de test de solubilidad en ácido clorhídrico al 4%, citrato de amonio neutro, ácido cítrico al 2% y líquido abomasal. (Luiz Lima y col. 1995) Ensayos realizados por Sullivan y col (1992) determinaron que existe baja relación entre la biodisponibilidad y la solubilidad en agua, dando valores de 18% para los fosfatos defluorinados y 18,5% para los fosfatos mono y dicálcicos. Los mismos autores encontraron correlación positiva entre la solubilidad del 4%, con el citrato del 2% y con el citrato de amonio neutro del 2%.

Roa y col (1995) crearon un método alternativo para medir la solubilidad de las diferentes fuentes. Este método se basa en la diferente solubilidad de los compuestos en una mezcla de etanol y agua al 60 y 40% y se recobraron aquellos productos que no se solubilizaron los que se suponen no disponibles.

A. Criterios para evaluar la biodisponibilidad in vivo.

Acumulación en los tejidos

El primer criterio que se utilizó fue la presencia de fósforo en el plasma sanguíneo. Los valores normales de fósforo en adultos son de 4,5 a 6 mg/100ml y algo mayor en animales jóvenes 6 a 8 mg/100 ml. Luego de algunas semanas (en aves es suficiente con 10 días) de consumir dietas deficientes en fósforo las concentraciones bajan a 2 o 3 mg/100 ml. Este criterio es poco exacto debido a que los mecanismos de regulación de los minerales en la sangre son muy activos y rápidos.

Crecimiento

La respuesta al crecimiento en aves jóvenes ha sido utilizada como criterio primario para determinar la biodisponibilidad de macro y micro elementos. La desventaja de este criterio es que en estas pruebas se hace necesario el uso de ciertas dietas purificadas. Actualmente está siendo sustituido por otros métodos debido al alto costo de las dietas y mano de obra, período experimental prolongado y la baja sensibilidad del criterio crecimiento como respuesta.

Desarrollo del hueso

El desarrollo del hueso generalmente medido como ceniza de hueso en animales jóvenes ha sido uno de los test mas usados para medir la biodisponibilidad de calcio y fósforo. En general el hueso elegido ha sido la tibia y la cantidad de ceniza se expresa como ceniza total o como concentración de ceniza en el hueso delipidado. Williams et al (1991) estudiaron la concentración de fósforo en varios productos tales como la leche, sangre, heces, huevo, huesos líquido ruminal, etc. De todos los parámetros, los relacionados al hueso demostraron mayor sensibilidad,

Compuestos esenciales y enzimas

Comprende ensayos funcionales, donde se determina la biodisponibilidad de un elemento indispensable para la formación de compuestos.

Uso de isótopos

La acumulación de isótopos estables o radioactivos en determinados órganos o la retención de los mismos en la totalidad del cuerpo ha sido utilizada como criterio para determinar la absorción mineral de algún ingrediente.

Williams y col (1991), proponen como técnica los métodos no invasivos del hueso tales como absorción dual de fotones, fotometría radiográfica y ultrasonido.

B. Formas de expresar la biodisponibilidad.

Absorción aparente

Es utilizada para evaluar ciertos elementos minerales y es definida como la ingesta total menos la excreción total fecal del elemento. Los resultados se expresan generalmente como porcentaje de la ingesta total:

$$AA = \frac{(\text{Ingerido} - \text{excretado})}{\text{Ingerido}} \times 100$$

La diferencia entre lo ingerido y lo excretado representa la parte del alimento que es absorbido a nivel gastrointestinal y no es corregido por la porción del elemento que aparece como producto de la abrasión de las células durante el proceso metabólico.

La absorción aparente tiene uso limitado para el cálculo del calcio, magnesio, fósforo, zinc y cobre en los cuales la mayor parte de la excreción proviene de las células gastrointestinales.

Absorción real

La absorción real o verdadera es el valor corregido por aquella porción del elemento que es absorbida por el cuerpo del animal y posteriormente excretado nuevamente al tracto gastrointestinal. Esta porción del total de la excreción se denomina excreción fecal endógena o excreción fecal metabólica. La absorción verdadera representa la absorción total menos la excreción fecal total de la cual se ha extraído la excreción endógena total.

$$AV = \frac{\text{Ingerido} - (\text{excr. total} - \text{excr. endógena})}{\text{Ingerido total}} \times 100$$

El valor de la absorción verdadera es generalmente mayor que el de la aparente y tiene mayor validez para estudiar la cantidad del elemento mineral presente en los tejidos para procesos metabólicos,

Excreción neta

La retención neta referida como disponibilidad neta por Underwood en 1981, es definida como la ingesta total del elemento menos la excreción total de ese elemento, excreción fecal más la excreción urinaria.

C. Técnicas analíticas para medir el fósforo

Las técnicas corrientemente utilizadas y citadas en los trabajos de investigación relacionados al tema son las siguientes:

Colorimetría : Se utiliza el método de Fiske y Subarrow (1925) para determinar la concentración de fósforo por colorimetría, midiéndose la intensidad del color en espectrofotómetro a 825 nm. El método se basa en que el fósforo inorgánico en medio ácido reacciona con el molibdato de amonio el cual a su vez es reducido a azul de molibdeno por el ácido 1-amino 2-naftol-4 sulfúrico. Se determina el fósforo presente midiendo la intensidad del color desarrollado a 825 nm. Se construye una curva de calibración en base a una solución de 1 g/l de fosfato monopotásico (KH_2O_4).

Análisis de activación de neutrones: Esta técnica consiste en bombardear el material con neutrones de tal forma que los elementos quedan radioactivos Posteriormente se determina cuantitativamente la concentración de elemento dependiendo de la energía irradiada. El uso de esta técnica queda limitada a aquellos laboratorios que utilizan técnicas radioactivas.

II. MATERIALES Y METODOS

A. Estudio de las características químicas y físicas de las fuentes de fósforo utilizadas.

Se estudiaron cinco fuentes de fósforo, tres de origen animal y dos de origen mineral. Las primeras son subproductos de la industria frigorífica, abundantes en el país que tienen la siguiente denominación comercial:

Harina de carne y hueso 35/40 % PC.

Harina de carne y hueso 40/45% PC.

Harina de ceniza de hueso

Estas fuentes de origen animal se evaluaron según dos tamaños de partícula, medidos en abertura de malla a través de la cual pasa la materia prima durante la molienda. El tamaño de malla 10 equivale a una abertura de 1,5 a 2,0 mm de diámetro, es el frecuentemente utilizado en el país. El tamaño de partícula menor (1,0 a 1,5mm de diámetro) se incorporó en este estudio para estudiar su incidencia en la biodisponibilidad del fósforo de esas fuentes. En este estudio denominaremos 2 a la malla 10 y 1 a la malla 12.

Las fuentes de origen mineral que se estudiaron son:

Fosfato bicálcico

Fosfato monoamónico

El fosfato bicálcico, es un producto obtenido mediante la acidificación de la roca fosfatada, generalmente con ácido fosfórico y posteriormente neutralizada con carbonato de calcio (Lima y col 1995).

El fosfato monoamónico, grado analítico, es obtenido por síntesis y se consideró como testigo dado que es 100% asimilable (Ammerman, 1995). Ambas fuentes minerales se utilizaron solamente en tamaño de partícula comercial.

Todas las fuentes en estudio y la utilizada como estándar se analizaron para:

MATERIA SECA 105°: se tomó una pequeña cantidad (3g) de cada una de las muestras a estudiar y se llevó a estufa a 105°C durante 24 horas, luego se retiró de la estufa y se dejó enfriar en desecador con sílica gel una vez fría se pesó y por diferencia de peso se determinó materia seca según la siguiente fórmula

Materia Seca % = peso fresco – peso seco/ peso fresco * 100

CENIZA: se pesaron 2 g de cada una de las muestras a estudiar y se llevaron a mufla a 550°C durante 12 horas al término de las cuales se dejó enfriar en desecador con sílica-gel y se determinó el páso de la ceniza resultante, el % de ceniza se determinó según

Ceniza % = peso muestra seco – peso de ceniza / peso de muestra seco X100. (AOAC, 1990)

PROTEINA CRUDA: Se siguió el método de Kjeldhal. Se pesaron 0,6 g de cada una de las muestras en balanza de precisión y se digirieron a 420°C en ácido sulfúrico 98% ppa en presencia de catalizador de sulfato de cobre y sulfato de manganeso, posteriormente se destiló con hidróxido de sodio 50%. El producto se recepciónó en una solución de ácido sulfúrico 0,4N y se valoró con hidróxido de sodio 0,3N.

La proteína cruda se calculó según:

$\% \text{PROTEINA CRUDA} = (\text{gasto del blanco} - \text{gasto muestra}) * F / \text{peso de muestra}.$

Siendo F un factor que depende de la normalidad del hidróxido de sodio para valorar y del % de proteína de la muestra.

CONTENIDO DE FÓSFORO: Se tomó una cantidad de aproximadamente 2g de materia fresca de cada muestra y se incineró y se disolvieron en ácido clorhídrico 6N a temperatura de ebullición y el residuo se tomó con ácido nítrico 1M (Frapin 1996). El contenido de fósforo se midió por colorimetría (Fiske y Subarrow 1925) en espectrofotómetro Shimadzu.

CONTENIDO DE CALCIO: Se tomó una cantidad aproximada de muestra fresca y se incineró a 550°C durante 12 horas. La ceniza resultante se disolvió en ácido clorhídrico 6N hasta evaporación casi total. El residuo se tomó con ácido nítrico 1 M. El contenido de calcio se determino mediante espectrofotómetro de absorción atómica Perkin – Elmer según AOAC (1990).

SOLUBILIDAD EN ACIDO CLORHIDRICO: Las muestras se incubaron en una solución de Ácido clorhídrico 0,2N a pH =1.2 – 1.3 durante 15 minutos a temperatura de 37°C con agitación (90rpm) (Lidner, 2000). Posteriormente se filtró y se determinó el fósforo solubilizado por el método de Fiske y Subarrow.(1925).

DIGESTION SIMULADA: Las muestras se incubaron en una solución de pepsina (2g) proveniente de la mucosa de estómago porcino en polvo, actividad: 800-2500 unidades/mg de proteína, en 100,0ml de ácido clorhídrico 0,1M a pH2 durante 90 minutos con agitación a 37°C. Luego se con una solución de bilis-pancreatina (0,14 g de pancreatina porcina, disueltos en 100 ml de NaHCO3 0,1M pH 7, durante 90 minutos con agitación a 37°C (Ramos 2001). Se centrifugó una alícuota de cada réplica a 2000g, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de fósforo por el método de Fiske y Subarrow (1925).

B. Estudio de la biodisponibilidad in vivo de las fuentes de fósforo utilizadas.

1. Determinación de la biodisponibilidad del fósforo de fuentes orgánicas e inorgánicas a través de un bioensayo

ANIMALES. Se utilizaron pollos parrilleros de la línea Ross criados en piso hasta 9 días de edad con una dieta normal y alojados en jaulas individuales de 0,30 cm de frente, 0,35 cm de profundidad y 0,35 cm de alto a partir de esa fecha. Los animales se seleccionaron por peso homogéneo y se distribuyeron en trece grupos de 18 aves cada uno, (9 hembras y 9 machos).

METODOLOGIA EXPERIMENTAL. A seis de los grupos arriba mencionados se les suministró ad libitum una ración completa pero carente de fósforo (2964 Kcal/Kg EM;21.2 % PC;0.373 % Ptotal, y 1 % Ca) la que se suplementó con niveles crecientes de este mineral proveniente del fosfato monoamónico, grado analítico (Cuadro 1) con el objetivo de obtener una curva de respuesta.

Los restantes siete grupos recibieron la misma ración carente pero suplementada con fósforo proveniente de cada una de las fuentes en estudio (Cuadro 2). Con esta disposición experimental aplicamos el método de la curva estándar según Littell y col (1995).

Cuadro 1: Niveles de inclusión de fosfato monoamónico

Fósforo ración base %	Fósforo agregado como Fosfato Monoamónico %	Fósforo total %
0,373	0,00	0,373
0,373	0,08	0,453
0,373	0,16	0,533
0,373	0,24	0,613
0,373	0,32	0,693
0,373	0,40	0,773

Cuadro 2: Nivel de inclusión de fósforo proveniente de cada fuente

Fuente de P	Fósforo ración Base %	Fósforo agregado proveniente de las fuentes %	Fósforo total %
Fosfato bicálcico			
H. de carne 35/40 2 *	0,373	0,200	0,573
H. de carne 35/40 1	0,373	0,200	0,573
H. de carne 40/45 2	0,373	0,200	0,573
H. de carne 40/45 1	0,373	0,200	0,573
Ceniza de hueso 2	0,373	0,200	0,573
Ceniza de hueso 1	0,373	0,200	0,573
	0,373	0,200	0,573

* abertura de la malla en mm

Se tomaron datos de peso vivo al inicio y a los 30 días y a los 37 días. Se tomaron datos de consumo de ración semanal y total por animal. A los 30 días se pesaron todos los animales y se sacrificaron la mitad de ellos (5 machos y 4 hembras por tratamiento) a los 37 días se pesaron y sacrificaron los restantes (4 machos y 5 hembras de cada tratamiento). A todos los animales se les extrajo la tibia izquierda sobre la cual se tomó el valor de peso seco. El hueso seco se sometió a un tratamiento de cloroformo y metanol (3/2) a fin de eliminar todo residuo graso, posteriormente se secó a 105°C durante 24 horas y se pesó para determinar peso seco delipidado. Posteriormente se llevó a mufla de 550°C durante 16 horas y se registró peso de ceniza. La totalidad de las cenizas de cada hueso se disolvieron en ácido clorhídrico 6 N en calor seco y se tomó el residuo en ácido nítrico 1 M, se filtro y llevó a volumen de 100 ml en agua deionizada (Frapin 1996). Posteriormente se determinó el porcentaje de fósforo por colorimetría (Fiske y Subarrow, 1925) en espectrofotómetro Shimadzu.

2. Determinación de la biodisponibilidad del fósforo a través de un balance digestivo modificado

ANIMALES. Se utilizaron 128 gallinas ponedoras ISA-BROWN de segundo ciclo de 60 a 62 semanas de edad en postura. Las aves se seleccionaron por intensidad de postura, peso y aspecto sanitario a fin de obtener un lote homogéneo.

ALOJAMIENTO. Las aves se alojaron individualmente en jaulas de metal de 0,70 m de frente por 0,45 m de profundidad por 0,43 m de alto. Las jaulas se adaptaron para la colocación de una bandeja recolectora de heces y la colecta de huevo se realizó en forma manual inmediatamente de la puesta para evitar la contaminación de las heces por el mismo. Se les colocó comedero

plástico individual dentro de la jaula y bebedero niple individual por jaula. Se colocaron en sala climatizada con control de temperatura y fotoperíodo. La temperatura se mantuvo constante durante todo el ensayo en $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y el fotoperíodo en 16 horas diarias.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL. Las aves se distribuyeron al azar en grupos de 8 aves cada uno correspondientes a cada uno de los tratamientos a incluir. Al inicio del ensayo todas las aves se sometieron a un ayuno de 24 horas a fin de lograr la depleción del fósforo metabólico. Posteriormente se les ofreció una ración carente en fósforo 0,329% P total pero con niveles adecuados de los otros componentes, 18,3% PC, 2914Kcal EM/Kg. , 3,29% Ca, por el término de 48 horas. Finalizado este período todas las aves recibieron una única toma determinada de P proveniente de algunas de las fuentes según el tratamiento asignado. Un grupo (8 aves) no recibió toma y continuó consumiendo ración carente. Este grupo considerado como testigo se incluyó a fin de determinar la excreción de fósforo endógeno para el cálculo de la digestibilidad verdadera de cada fuente ó para el estudio de requerimientos. Durante las 48 horas siguientes todas las aves continuaron consumiendo ración carente ad-libitum. A las veinticuatro y cuarenta y ocho horas después de la toma se recolectaron las heces individualmente y se identificaron. Las heces se secaron en estufa de aire forzado a 60°C durante 5 días para determinar materia seca excretada. Se tomó una muestra de 5g de materia seca excretada previamente molida a malla de 1 mm y se llevó a estufa de 550°C durante 12 horas para determinar ceniza excretada. A las muestras así obtenidas se las disolvió en HCl 6N en calor seco y se tomó el residuo en HNO_3 1M, se filtró y se llevó a volumen 100 ml (Frapin 1996). Posteriormente se determinó el porcentaje de fósforo por colorimetría (Fiske y Subarrow, 1925) en espectrofotómetro Shimadzu.

C. Determinación de los requerimientos de P.

Experiencia 1: Ocho aves/tratamiento, reciben la misma dieta de adaptación pero con bajo contenido en fósforo (3,29 g/kg P total determinado analíticamente; 0,6 g/kg P disponible teórico según INRA,1989) ó la dieta base más una única toma de 0.075; 0.15 ó 0,25 g de fósforo proveniente del Fosfato Monoamónico. La finalidad de este estudio es medir la respuesta en P excretado a niveles crecientes de P proveniente de una fuente de alta biodisponibilidad (Ammerman, 1995, Ramos y Cabrera, 2000) y determinar los requerimientos de P para este modelo animal. Este modelo animal tiene un alto metabolismo de fósforo cuyo requerimiento teórico (0.35 g/día de fósforo disponible; INRA,1989) debemos verificar para ajustar en los experimentos siguientes la cantidad de P que se suministrará equivalente al 50 % y al 100% de los requerimientos

D. Determinación de la biodisponibilidad del fósforo y efecto del tamaño de la partícula

Experiencia 2: P suplementado al 50 % de los requerimientos. Ocho aves/tratamiento, reciben la dieta base ó la dieta base más una cantidad de fósforo de 0.075 g según Cuadro 3 una sola vez, equivalente al 50 % de los requerimientos determinados experimentalmente, proveniente de la harina de carne y hueso (partícula gruesa y fina) , de la ceniza de hueso (partícula gruesa y fina) , del fosfato bicálcico ó del fosfato monoamónico.

Experiencia 3: P suplementado al nivel de requerimiento. Ocho aves/tratamiento reciben la dieta base ó la dieta base más una cantidad de 0.25 g de P según Cuadro 3 una sola vez, equivalente a la dosis requerida, proveniente de la harina de carne y hueso (gruesa y fina), ceniza de hueso (gruesa y fina), fosfato bicálcico ó del fosfato monoamónico.

Cuadro 3 : Fuentes de fósforo utilizadas, tamaño de partícula y dosis suministradas como suplemento de la dieta base a un 50 % ó 100 % de los requerimientos previamente determinados.

FUENTE DE P	GRANULOMETRIA	Dosis a 50 % (g)	Dosis a 100% (g)
Fosfato monoamónico	Polvo . Grado analítico	0,075	0.250
Fosfato bicálcico	Polvo .Grado comercial	0,075	0.250
Harina de carne	2 *	0,075	0.250
Harina de carne	1	0,075	0.250
Ceniza de hueso	2	0,075	0.250
Ceniza de hueso	1	0,075	0.250

* abertura de la malla expresada en mm (ver descripción de fuentes de P)

En los tres experimentos se midió la ingesta de la ración carente, se determinó el P total ingerido y se recogieron las heces durante 48 horas a intervalos de 24 horas. Las heces se secaron en estufa de aire forzado a 60 °C durante 2 días y se incineraron en mufla a 550 °C durante 16 horas. La ceniza se disolvió en HCl 6N y en HNO3 1M, se filtró y se llevó a matraz de 100 ml (Cabrera-Saadoun et al, 1987) para la determinación de fósforo por colorimetría (Fiske y Subarrow, 1925) en espectrofotómetro Shimadzu.

La retención aparente del fósforo (coeficiente de utilización digestiva aparente, CUDap, %) de cada fuente se determinó según

$$\text{CUDap (\%)} = \frac{\text{P ingerido (g)} - \text{P hecesA(g)}}{\text{P ingerido(g)}} \times 100$$

Y la biodisponibilidad se determinó de la siguiente forma:

$$\text{Biodisponibilidad (\%)} = \frac{\text{P ingerido(g)} - [\text{P heces A(g)} - \text{P heces B(g)}]}{\text{P ingerido total (g)}} \times 100$$

P ingerido=P ingerido de la fuente a testear+ P ingerido de la dieta base.

P heces A= P excretado (heces+orina) por las aves que reciben una de las fuentes de fósforo.

P heces B= P excretado (heces+orina) por los animales que reciben la dieta base.

E. Análisis estadísticos

En todos los casos los tratamientos se distribuyeron en parcelas al azar con 7-8 repeticiones por tratamiento. Se considera que una repetición consiste en una jaula que aloja 1 ó 2 aves según los protocolos. Se utilizó la comparación de varianzas para determinar linealidad de los datos. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía (Sigma Stat Software, 1994). Cuando hubo significancia se compararon las medias según el estudio realizado utilizando un test de comparación de medias entre ellas ó respecto a un control. (Test de Newman y Keuls ó test de Bonferroni).

III. RESULTADOS Y DISCUSION

A. Características químicas y físicas de las fuentes de fósforo orgánicas e inorgánicas utilizadas.

En el Cuadro 4 se pueden observar las características químicas y físicas que presentan las fuentes utilizadas en este ensayo. En este cuadro aparecen los valores de solubilidad de aquellas materias primas que fueron luego utilizadas en los balances digestivos ya que el objetivo de este parámetro fue compararlo con los valores de utilización digestiva in vivo.

Cuadro 4- Características químicas y físicas de las fuentes de fósforo utilizadas.

Fuentes de fósforo	Harina de carne 35/40		Harina de carne 40/45		Ceniza de hueso		Fosfato monoamónico	Fosfato bicálcico
	2*	1	2	1	2	1		
Materia seca (%)	94,3	94,3	93,5	93,5	99,7	99,7	98,5	97,56
Ceniza (%)	32,33	32,33	41,10	41,10	97,02	97,02	—	82,4
Proteína cruda (%)	36,5	36,5	42,7	42,7
Calcio (%)	17,0	17,0	15,5	15,5	33,1	33,1	21,5
Fósforo (%)	8,0	8,0	7,4	7,4	15,5	15,5	26,7	18,3
Solubilidad En HCl 0.2N (%)	—	—	50,4	53,5	37,2	42,1	98,3	98,3
Solubilidad en digestión simulada (%)	—	—	3,4	0,7	0,63	0,6	99,1	0,1

* abertura de la malla 40 mesh

B. Determinación de los requerimientos de fósforo para crecimiento hasta la edad de 30 y 37 días.

En el Cuadro 5 se aprecia la evolución de los parámetros estudiados en pollitos de 30 días de edad a los que se les suministró una ración pobre en fósforo (0,373% de fósforo total) suplementada con dosis crecientes de fosfato monoamónico. A partir de estos datos podemos establecer que los requerimientos de fósforo para los pollitos de 30 días se satisfacen en el orden de 0,24 g P/ave/día agregado, proveniente de una fuente de alta disponibilidad, esto corresponde

a 0.613g por ave por día de fósforo total (donde aproximadamente el 50% corresponde a fósforo disponible) para los criterios de ganancia de peso, peso de hueso delipidado y peso de ceniza. Cuando consideramos los criterios de mineralización del hueso, los mismos requerimientos se satisfacen con niveles de fósforo de 0,16 g P/ave/día agregado, proveniente de una fuente de alta disponibilidad, esto corresponde a 0.533g por ave por día de fósforo total.

Cuadro 5. Consumo de fósforo total y proveniente de la fuente (g/ave/día), ganancia de peso (g/ave), peso seco delipidado de tibia (g) y concentración de fósforo en el hueso (mg) en pollitos de 30 días alimentados con una ración base (3,73 g/kg P total) suplementada con dosis crecientes de fosfato de amonio 100% asimilable.

Dosis de Fósforo (%)	Ingesta de P total (g/ave)	Ingesta P de la fuente (g/ave/día)	Ganancia de peso Vivo (g/ave)	Peso seco delipidado de tibia (g)	Peso de ceniza de tibia (g)	Contenido de fósforo en tibia (mg)
0,00	3,90 ± 0,11 a	0,00 ± 0,00 a	461,0 ± 22,5 a	1,76 ± 0,11 a	0,613 ± 0,03 a	114,89 ± 7,04 a
0,08	4,73 ± 0,21 b	0,833 ± 0,03 b	481,9 ± 42,5 a	2,29 ± 0,14 bc	0,929 ± 0,04 b	149,36 ± 11,80 b
0,16	7,16 ± 0,07 c	2,15 ± 0,02 c	717,8 ± 15,8 b	2,69 ± 0,19 bc	1,135 ± 0,05 c	209,07 ± 11,26 c
0,24	8,14 ± 0,11 d	3,18 ± 0,04 d	673,8 ± 53,7 c	3,02 ± 0,28 b	1,386 ± 0,07 d	213,8 ± 12,60 c
0,40	10,38 ± 0,17 f	5,24 ± 0,14 f	769,5 ± 27,6 c	2,79 ± 0,19 c	1,341 ± 0,09 d	231,2 ± 10,19 c

Valores seguidos de letra diferente son significativamente diferentes $p < 0,05$, según test de Newman y Keuls

En el Cuadro 6 se presentan los datos de consumo de fósforo agregado y fósforo total consumido por pollitos de 37 días de edad, Los datos obtenidos muestran un aumento del consumo de fósforo significativamente diferente en cada uno de los niveles establecidos.

A continuación se muestran los valores de los parámetros estudiados, ganancia de peso, peso seco delipidado de la tibia, peso de ceniza de la tibia y contenido de fósforo en la tibia.

Podemos observar que basados en cualquiera de los cuatro criterios utilizados, los requerimientos par los pollitos de esta edad se satisfacen con niveles de 0,16 g de fósforo agregado por ave por día, proveniente de una fuente de alta disponibilidad como lo es fosfato de amonio. Estos valores corresponden a un consumo total de fósforo de 0.533 g/ave/día, donde aproximadamente el 50% corresponde a fósforo disponible ya que consumos mayores no determinan diferencias significativas en los valores de los parámetros estudiados.

Cuadro 6. Consumo de fósforo total y proveniente de la fuente (g/ave/día), ganancia de peso (g/ave), peso seco delipidado de tibia (g) y concentración de fósforo en el hueso (mg) en pollitos de 37 días alimentados con una ración base (3,73 g/kg P total) suplementada con dosis crecientes de fosfato de amonio 100% asimilable.

Dosis de fósforo (%)	Ingesta de P total (g/ave/día)	Ingesta de P de la fuente (g/ave/día)	Ganancia de peso (g)	Peso seco de tibia delipidado (g)	peso de ceniza de tibia (g)	Contenido de P en la tibia (mg)
0,00	6,03 ± 0,51 a	0,00 ± 0,00 a	615,1 ± 40,3 a	2,49 ± 0,13 a	0,710 ± 0,03 a	112,5 ± 6,11 a
0,08	9,08 ± 0,62 b	1,42 ± 0,21 b	783,65 ± 36,0 b	3,44 ± 0,18 b	1,14 ± 0,05 b	193,9 ± 9,82 b
0,16	12,97 ± 0,65 c	3,89 ± 0,20 c	1047,90 ± 36,1 c	3,90 ± 0,15 c	1,57 ± 0,04 c	276,7 ± 5,54 c
0,24	14,61 ± 0,49 d	5,72 ± 0,19 d	1103,8 ± 43,5 c	4,06 ± 0,16 c	1,695 ± 0,06 c	318,6 ± 20,80 c
0,32	17,74 ± 0,56 e	8,19 ± 0,26 e	1044,00 ± 54,0 c	3,84 ± 0,27 c	1,84 ± 0,17 c	291,0 ± 15,85 c
0,40	17,64 ± 0,51 e	9,62 ± 0,28 f	1011,32 ± 36,00 c	4,50 ± 0,33 c	1,78 ± 0,11 c	305,3 ± 18,28 c

Valores seguidos de letra diferente son significativamente diferentes $p < 0,05$ según test de Newman y Keuls

C. Efecto de la fuente y tamaño de partícula sobre los parámetros óseos y de crecimiento corporal en aves en crecimiento.

En el Cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos para los mismos criterios evaluados anteriormente pero cuando la ración carente se suplementó con fósforo proveniente de cada una de las fuentes en estudio. Se incluyó una cantidad de fósforo de cada fuente igual para cada tratamiento, pero algo inferior a los requerimientos estimados anteriormente. A partir de estos datos no se observa un comportamiento diferente para las distintas fuentes estudiadas, ni en el consumo de fósforo agregado, sin embargo, sí existe diferencia en el consumo de fósforo total para los diferentes tratamientos

Cuadro 7: Consumo de fósforo total (ración base más fuente, g/ave/día), de fósforo proveniente de la fuente (g/ave/día), ganancia de peso (g/ave), peso seco de tibia delipidada (g) y contenido de fósforo en tibia (mg), en pollitos de 30 días alimentados con una ración base (3.73 g P total /kg) suplementada con las fuentes de fósforo orgánico e inorgánico.

Fuente de fósforo	Ingesta de P total (g)	Ingesta de P fuente (g)	Ganancia de peso (g)	Peso seco de tibia delipidada (g)	Peso de ceniza de tibia (g)	Contenido de fósforo en tibia (mg)
Fosfato bicálcico	8,22 ± 0,09 a	2,87 ± 0,03 a	694,4 ± 23,0 a	2,72 ± 0,16 a	1,18 ± 0,04 a	213,8 ± 8,44 a
Harina de carne 35/40 2*	8,25 ± 0,06 a	2,88 ± 0,02 a	698,7 ± 18,8 a	2,85 ± 0,15 a	1,25 ± 0,05 a	220,8 ± 7,07 a
Harina de carne 35/40 1*	8,24 ± 0,08 a	2,87 ± 0,03 a	746,1 ± 23,1 a	3,23 ± 0,07 a	1,25 ± 0,05 a	215,5 ± 12,43 a
Harina de carne 40/45 2*	7,68 ± 0,12 b	2,64 ± 0,04 b	689,6 ± 25,8 a	2,85 ± 0,20 a	1,19 ± 0,06 a	203,5 ± 9,34 a
Harina de carne 40/45 1*	8,61 ± 0,14 a	3,10 ± 0,05 c	763,8 ± 19,2 a	3,45 ± 0,19 a	1,30 ± 0,07 a	204,1 ± 5,58 a
Ceniza de hueso 2*	8,58 ± 0,07 a	3,04 ± 0,03 c	733,5 ± 28,1 a	3,09 ± 0,11 a	1,25 ± 0,04 a	209,9 ± 9,16 a
Ceniza de hueso 1*	8,20 ± 0,12 a	2,90 ± 0,04 d	732,8 ± 15,4 a	2,75 ± 0,15 a	1,14 ± 0,05 a	206,4 ± 11,85 a

(*) abertura de malla mm

valores seguidos de letra diferente son significativamente diferentes $p < 0.05$ según Test de Newman y Keuls

Cuadro 8: Consumo de fósforo total (ración más la fuente, g/ave/día), consumo de fósforo proveniente de la fuente (g/ave/día), ganancia de peso (g/ave), peso seco de tibia delipidada (g) y contenido de fósforo en tibia (mg) en pollitos de 37 días alimentados con una ración base (3.73 g P total/kg) suplementada con fósforo orgánico ó inorgánico.

Fuente de fósforo	Ingesta P total (g)	Ingesta P de la fuente (g)	Ganancia de peso (g)	Peso seco fémur delipidado (g)	Peso ceniza fémur (g)	Contenido de fósforo fémur (mg)
Fosfato bicálcico	13,2 ± 0,18 abc	4,63 ±0,06 a	1055,0 ±38,1 a	4,03 ±0,17 a	1,73 ±0,06 a	294,3 ±9,54 a
Harina de carne 35/40 2*	12,7 ± 0,15 abc	4,42 ±0,05 b	1092,96 ±21,85	3,98 ±0,19 a	1,67 ±0,07 a	260,6 ±26,25 a
Harina de carne 35/40 1*	12,8 ±0,33 abc	4,45 ± 0,11 b	1108,35 ± 25,46	4,16 ±0,13 a	1,76 ±0,06 a	305,7 ±23,11 a
Harina de carne 40/45 2*	12,4 ±0,27 a	4,46 ±0,09 b	1102,19 ±30,15	4,26 ±0,19 a	1,67 ±0,12 a	289,9 ±13,57 a
Harina de carne 40/45 1*	13,5 ±0,20 b	4,88 ± 0,07 a	1204,88 ±53,91	4,37 ±0,32 a	1,69 ±0,10 a	274,1 ±17,35 a
Ceniza de hueso 2*	13,7 ±0,25 c	4,84 ± 0,09 a	1146,88 ± 56,16	4,07 ±0,26 a	1,71 ±0,10 a	286,4 ±17,52 a
Ceniza de hueso 1*	13,2 ±0,30 abc	4,44 ± 0,10 b	1205,77 ±104,41	3,84 ±0,24 a	1,63 ±0,06 a	275,3 ±18,96 a

(*) abertura de malla en mm

valores seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes $p < 0,05$ de Newman y Keuls

D. Biodisponibilidad del fósforo de las fuentes orgánicas e inorgánicas utilizando un bioensayo

A partir de las ecuaciones de regresión (Cuadros 9 y 10) se calculó la disponibilidad del fósforo de las distintas fuentes, tomando como variables la cantidad de fósforo consumido total (ración mas fuente) y la proveniente solamente de la fuente en estudio.

Solamente los criterios de peso seco delipidado del hueso de la tibia y el contenido de fósforo presente en el hueso mostraron diferencia significativa entre las fuentes (Cuadro 11, 12 13y 14).

Cuadro 9: Ecuación de regresión para cada criterio utilizado en pollitos de 30 días considerando la variable ingesta de fósforo como fósforo total y como fósforo agregado proveniente del fosfato monoamónico.

Criterio utilizado	Parámetro	Ecuación de regresión lineal	Valor de R²	Valor de P
Ganancia de peso corporal	Fósforo total consumido	Y= 273,1 + 50,4 X (Ptl)	0.768	0.0001
	Fósforo agregado	Y= 485,3 + 58,9 X (Pa)	0.700	0.0001
Peso seco delipidado	Fósforo total consumido	Y= 1,41 + 0,157 X (Pt)	0.588	0.0004
	Fósforo agregado	Y= 1,98 + 0,202 X (Pa)	0.646	0.0001
Ceniza de hueso	Fósforo total consumido	Y= 0,336 + 0,108 X (Pt)	0.789	0.0001
	Fósforo agregado	Y= 0,775 + 0,133 X (Pa)	0.752	0.0001
Contenido de fósforo	Fósforo total consumido	Y= 48,5 + 20,1 X (P t)	0.819	0.0001
	Fósforo agregado	Y= 128,4 + 25,0 X (Pa)	0.797	0.0001

CUADRO 10: Ecuación de regresión para cada criterio utilizado en pollitos de 37 días considerando la variable ingesta de fósforo como fósforo total consumido y fósforo agregado proveniente del fosfato monoamónico.

Criterio utilizado	Parámetro	Ecuación de regresión lineal	Valor de R²	Valor de P
Ganancia de peso corporal	Fósforo total consumido	Y=297.5 + 54.6 X (Ptl)	0.845	0.0001
	Fósforo agregado	Y= 612.9 + 94.9 X (Pa)	0.881	0.0001
Peso seco de tibia delipidada	Fósforo total consumido	Y=1,94 + 0,147 X (Pt)	0.711	0.0001
	Fósforo agregado	Y=2,80 + 0,251 X (Pa)	0.726	0.0001
Ceniza en tibia	Fósforo total consumido	Y=0,215 + 0,101 X (Pt)	0.866	0.0001
	Fósforo agregado	Y=0,808 + 0,173 X (Pa)	0.892	0.0001
Contenido de fósforo en tibia	Fósforo total consumido	Y=22,3 + 19.3 X (Pt)	0.817	0.0001
	Fósforo agregado	Y=131.0 + 34.4 X (Pa)	0.875	0.0001

Cuadro 11: Valores de biodisponibilidad relativa (%) calculados considerando los parámetros óseos y corporales en pollitos de 30 días en función del fósforo total consumido proveniente de la fuente y de la dieta base.

Fuente de P	Parámetro			
	Ganancia de peso vivo (g)	Peso seco delipidado de tibia (g)	Peso de ceniza de tibia (g)	Contenido de fósforo en tibia (mg)
Fosfato bicálcico	92,8 ± 4,5 a	91,4 ± 5,9 bd	97,7 ± 11,4 a	105,7 ± 4,0 ac
Harina de carne 35/40 2*	93,3 ± 3,14 a	96,5 ± 8,8 bd	113,2 ± 10,6 a	92,6 ± 2,2 ac
Harina de carne 35/40 1*	132,0 ± 8,2 a	135,3 ± 3,9 a	132,0 ± 8,2 a	97,2 ± 5,9 ac
Harina de carne 40/45 2*	114,4 ± 14,4 a	87,1 ± 8,1 d	114,4 ± 14,4 a	111,2 ± 3,4 ac
Harina de carne 40/45 1*	100,4 ± 10,9 a	121,2 ± 2,1 c	100,4 ± 10,9 a	89,0 ± 3,2 ab
Ceniza de hueso 2*	114,3 ± 11,3 a	108,5 ± 3,9 abd	114,3 ± 11,3 a	89,9 ± 5,5 ab
Ceniza de hueso 1*	96,5 ± 12,4 a	78,7 ± 4,3 bd	96,5 ± 12,7 a	79,4 ± 3,8 c
CME	124.1	205.5	995.7	117.2
P	0.2752	0.0006	0.2932	0.0017

(*) abertura de malla en mm

Valores seguidos de letra diferente son significativamente diferentes P<0,05 según Test de Newman y Keuls

Cuadro 12: Valores de biodisponibilidad relativa (%) calculados considerando los parámetros óseos y corporales en pollitos de 30 días en función del fósforo consumido proveniente del fosfato monoamónico.

Fuente de fósforo	Parámetro			
	Ganancia de peso vivo	Peso seco del plúcido de hueso	Peso de ceniza total del hueso	Contenido de fósforo en el hueso
Fosfato bicalcico	92,8 ± 12,16 a	93,0 ± 4,1 b	97,7 ± 11,36 a	105,7 ± 4,0 ac
Harina de carne 35/40 2*	93,3 ± 3,1 a	83,5 ± 7,8 b	113,2 ± 10,60 a	92,6 ± 2,1 abc
Harina de carne 35/40 1*	101,1 ± 4,7 a	127,2 ± 4,01 a	132,0 ± 8,22 a	97,2 ± 5,9 abc
Harina de carne 40/45 2*	93,4 ± 5,4 a	74,5 ± 10,6 b	114,4 ± 14,42 a	111,2 ± 3,36 a
Harina de carne 40/45 1*	97,0 ± 4,1 a	121,2 ± 2,8 a	100,4 ± 10,96 a	89,0 ± 3,2 ab
Ceniza de hueso 2*	86,7 ± 3,9 a	100,8 ± 6,60 a	114,3 ± 11,27 a	89,9 ± 5,5 bc
Ceniza de hueso 1*	102,4 ± 3,9 a	78,7 ± 6,52 b	96,5 ± 12,40 a	79,4 ± 3,8 b

(*) abertura de malla mm

Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes $P < 0.05$ según Test de Newman y Keuls

CUADRO 13: Valores de biodisponibilidad relativa (%) calculados para cada uno de los parámetros óseos ó corporales en pollitos de 37 días en función del fósforo total consumido proveniente de la fuente y de la dieta base.

Parámetro				
Fuente de fósforo	Ganancia de peso vivo	Peso seco de tibia delipidado	Peso de ceniza de tibia	Contenido de fósforo en el hueso
Fosfato Bicálcico	100,45 ± 5,8 a	107,54 ± 8,3 a	113,15 ± 4,6 a	108,66 ± 3,3 a
Harina de carne 35/40 2	116,17 ± 3,8 a	109,46 ± 9,1 a	114,05 ± 5,9 a	101,92 ± 10,1 a
Harina de carne 35/40 1	115,87 ± 3,7 a	118,95 ± 7,8 a	120,05 ± 5,6 a	120,47 ± 9,9 a
Harina de carne 40/45 2	116,99 ± 4,1 a	128,37 ± 11,9 a	132,03 ± 18,2 a	112,31 ± 6,1 a
Harina de carne 40/45 1	17,71 ± 6,6 a	130,03 ± 13,4 a	112,05 ± 7,02 a	98,90 ± 5,7 a
Ceniza de hueso 2	115,90 ± 6,2 a	104,83 ± 12,9 a	107,34 ± 7,2 a	100,77 ± 7,7 a
Ceniza de hueso 1	108,94 ± 5,8 a	101,67 ± 7,89 a	106,35 ± 3,52 a	94,43 ± 6,8 a

Valores seguidos de letra diferente son significativamente diferentes $p < 0,05$ según test de Newman y Keuls

Cuadro 14: Valores de biodisponibilidad relativa (%) calculados para cada uno de los parámetros óseos ó corporales en pollitos de 37 días en base al fósforo consumido proveniente del fosfato monoamónico.

Parámetro				
Fuente de fósforo	Ganancia de peso vivo	Peso seco de tibia delipidado	Peso de ceniza de tibia	Contenido de fósforo de tibia
Fosfato Bicalcico	93,32 ± 10,1 a	106,5 ± 14,3 a	155,3 ± 7,9 a	106,9 ± 6,02 a
Harina de carne 35/40 2*	114,3 ± 5,5 a	93,3 ± 17,6 a	113,06 ± 9,8 a	91,94 ± 16,4 a
Harina de carne 35/40 1*	115,9 ± 5,6 a	122,2 ± 12,5 a	124,2 ± 7,7 a	122,3 ± 15,3 a
Harina de carne 40/45 2*	110,7 ± 6,9 a	129,7 ± 18,1 a	135,3 ± 29,4 a	102,3 ± 8,8 a
Harina de carne 40/45 1*	119,8 ± 11,2 a	141,7 ± 22,5 a	111,2 ± 12,0 a	89,2 ± 9,6 a
Ceniza de hueso 2*	120,6 ± 12,5 a	103,1 ± 21,0 a	106,7 ± 12,2 a	91,3 ± 10,2 a
Ceniza de hueso 1*	111,21 ± 11,4 a	99,16 ± 14,8 a	106,7 ± 6,5 a	91,3 ± 11,8 a

Los valores representan la media desviación estándar de la media de 8 aves. Valores seguidos de letra distinta son significativamente diferentes según el Test de Newman y Keuls .P<0.05

* abertura de la malla en mm

E. Determinación de los requerimientos de fósforo en el modelo aves en postura.

En el Cuadro 15 se observan los valores de respuesta de los animales frente a dosis crecientes de fósforo (0.00, 0.08, 0,15 y 0,25 g/ave) provenientes del fosfato monoamónico complementando el consumo de una ración base de maíz – soja, deficiente en fósforo disponible (2900 kca EMI/kg 18% PC, 3,5% Ca, 0,329% P total y 0,06% P disponible). De acuerdo a los trabajos realizados en el laboratorio el fosfato monoamónico presenta alta solubilidad (Ramos, 2001) y dado su origen de alta pureza (98%) lo consideramos un material apropiado para utilizarlo como estándar 100% asimilable.

Si observamos los valores de excreción de fósforo obtenidos, estos se mantienen constantes en 88 mg/ave en los grupos que consumieron 75 y 150 mg durante el balance y que corresponden a las dosis de 0,08 y 0,15 g/ave. Cuando el consumo de fósforo se incrementó a 250 mg/ave en el balance (dosis de 0,25) el nivel de excreción aumenta significativamente a 133 mg/ave. Este aumento brusco en la excreción del mineral está indicando que su aporte en la dieta se aproxima a los niveles de requerimiento.

Cuadro 15. Respuesta de excreción, retención y digestibilidad de fósforo a dosis crecientes de fosfato monoamónico en gallinas ponedoras.

	Dosis de Fosfato monoamónico suplementado (mg/ave)			
	0	75	150	250
Consumo total de P (mg/ave)	330 ± 2.2 a	398 ± 7.2 a	443 ± 7,3 b	717 ± 9,9 c
P excretado (mg/ave)	120.15 ± 18.38 a	89 ± 5.0 a	88 ± 7,3 a	133 ± 2,3 a
P retenido (mg/ave)	209.75 ± 18.53 a	308 ± 0.9 a	359 ± 1,2 b	581 ± 2,9 c
CUD ap (%)	63.42 ± 5.6 a	77.53 ± 1.4 a	81,2 ± 2,0 a	81,19 ± 3,0 a

Los valores representan la media desvío estándar de la media de aves. Valores seguidos de letra distinta son significativamente diferentes según Test de Newman y Keuls, a $P < 0.05$.

Los valores de retención de fósforo corresponden a los que esperaríamos encontrar a partir de una fuente de alta disponibilidad, con valores significativamente crecientes en función del incremento del consumo de la misma.

Respecto a los valores de utilización digestiva del fósforo esta es alta 81,2 y 81,19% sin variaciones significativas a consumos próximos a los de requerimiento. Se debe remarcar de que cuando no hay suplemento de fósforo a partir de una fuente cualquiera (grupo cero agregado en el Cuadro 15) el mismo proviene de la ración base y es posible que sea mayormente fítico (0.06 % P disponible de un total de 0.373 % de P) se observa que la utilización del P es bastante más baja que en los grupos recibiendo P de una fuente asimilable. Sin embargo esta diferencia no es significativa ($P < 0.05$).

F. Efecto del tamaño de partícula y de la dosis sobre la biodisponibilidad del P orgánico e inorgánico en un balance digestivo

1. A dosis inferiores a los requerimientos

Los valores de excreción y retención para el fosfato monoamónico se compararon con los obtenidos para fosfato bicálcico, harina de carne y hueso y ceniza de hueso, estas dos últimas en dos tamaños de partícula (Cuadro 16).

CUADRO 16. Consumo (g), excreción (g), retención (g) y coeficiente de disponibilidad aparente (%) del fósforo proveniente de fuentes de origen animal y mineral a un nivel de P equivalente al 50 % de los requerimientos. Efecto del tamaño de partícula (2 ó 1) en las fuentes orgánicas.

	Fosfato monoamónico ⁽¹⁾	Fosfato bicálcico	Harina de Carne y Hueso 2*	Harina de Carne y Hueso 1	Ceniza de hueso 2	Ceniza de hueso 1
Dosis de P (mg/ave)	75	75	75	75	75	75
Consumo de P (mg/ave)	398 ± 7,2 a	399 ± 5,23 a	398 ± 5,0 a	402 ± 4,5 a	393 ± 7,4 a	333 ± 4,2 a
P excretado (mg/ave)	89,1 ± 5,0 a	78,8 ± 6,7 a	71,4 ± 6,5 a	125,5 ± 17,0 b	72,7 ± 4,6 a	87,9 ± 9,8 a
P retenido (mg/ave)	308 ± 0,9 a	320 ± 0,1 a	326 ± 9,0 a	293 ± 1,6 a	320 ± 8,0 a	259 ± 4,2 a
C U D Ap (%)	82,8 ± 1,4 a	80,2 ± 1,9 a	80,5 ± 0,9 a	70,7 ± 4,0 b	81,5 ± 1,1 a	80,7 ± 2,8 a

(1) El fosfato monoamónico se utilizó como estándar considerado 100 % biodisponible. ⁽²⁾ Cada fuente se incorporó a 0.075 g de fósforo. ⁽³⁾ Para el cálculo del CUD ap se consideró el P total ingerido, proveniente de cada fuente y de la dieta base (0.329 % de fósforo total, según materiales y métodos).

(2) * tamaño de partícula expresado en abertura de la malla en mm.

Los valores representan la Media ± Desvío estándar de la Media de 8 aves. Diferentes letras indican diferencia estadística a P<0.05 por el Método de Bonferroni cuando se compararon todos las fuentes contra el fosfato monoamónico puro.

En las fuentes de origen mineral, cuando ambas fuentes se suministran a bajas dosis (75 mg/ave) los valores de excreción se mantienen constantes en 78 mg para el fosfato bicálcico, algo similar sucede con los valores de retención (308mg para el fosfato monoamónico y 320 para el fosfato bicálcico), como consecuencia de lo anterior la digestibilidad aparente del fosfato bicálcico (80.17%) es significativamente mayor a la del monoamónico (77.53%).

Cuando nos referimos a digestibilidad aparente no estamos considerando la pérdida de fósforo endógena, cuyo peso es mayor cuando el animal se encuentra en condiciones de carencia, esto podría explicar el menor valor de digestibilidad del fosfato monoamónico frente al bicálcico.

Respecto a las fuentes de origen animal, si estudiamos los datos de excreción se observa que la ceniza de hueso tiene un comportamiento similar a las fuentes minerales sin importar el tamaño de partícula (72,7 mg/ave y 87,9 mg/ave).

En lo que respecta a la harina de carne y hueso el valor de excreción, cuando es suministrada como partícula comercial no varía respecto a las anteriores (71,4 mg/ave) pero cuando se ofrece como partícula fina (1 mm de diámetro de malla) la excreción aumenta significativamente a 125,5 mg/ave. Cuando vemos los valores de retención de fósforo el menor tamaño de partícula actúa negativamente pero los valores no son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Así las fuentes de origen mineral y las de origen animal ofrecidas en tamaño de partícula comercial 2 mm de abertura de malla, presentan retenciones de fósforo similares, del orden de 310 a 320 mg con consumos similares que oscilan entre 395 y 398 mg de fósforo por animal.

Si expresamos estos resultados en función de la digestibilidad del fósforo que cada fuente aporta el coeficiente para el fosfato monoamónico (82,8%) no varía significativamente del fosfato bicálcico (80,2%) ni de la ceniza de hueso en los dos tamaños de partícula (81,5 y 80,7%). En el caso particular de la harina de carne y hueso la partícula comercial (80,5%) presenta buena disponibilidad del fósforo similar al fosfato monoamónico, pero el tamaño menor, 1 mm de malla, parece tener efecto negativo, dando valores significativamente menores (70,7%; $P < 0.05$).

En general podemos afirmar que la molienda no tiene efecto para las fuentes de origen mineral ni para la ceniza de hueso y que su efecto es negativo para la harina de carne y hueso. En este ensayo no fue posible determinar el coeficiente de disponibilidad verdadera debido a que los valores de excreción encontrados son menores a los obtenidos por el grupo de aves que consumió la dieta deficiente en fósforo. Estos resultados apoyan la teoría sugerida por Sibbald (1982), quien considera que cuando se desea que cuando se debe testear la disponibilidad de un mineral, este debe ser aportado por cada una de las fuentes en cantidades suficientemente altas como para apreciar su efecto respecto a una dieta base. Las cantidades de fósforo ingeridas en la dieta base y en cada uno de los tratamientos resultó muy similar (0,38 g en la dieta base y 0,32 g de fósforo promedio en los tratamientos) por lo cual la excreción de fósforo en la dieta vegetal (0,06% P disponible) resultó muy similar y en algunos animales mayor a la de los tratamientos.

2- A dosis próximas a los requerimientos

A fin de superar este problema se planteó un nuevo protocolo dando las fuentes estudiadas (harina de carne y hueso y ceniza de hueso) y los procesos a que fueron sometidas

(partícula comercial y partícula fina) y se ofrecieron a mayores dosis, cercanas a 100% de requerimientos (Cuadro 17). En este Cuadro se puede observar que frente a consumos similares de fósforo, los animales que consumieron la fuente estándar, fosfato monoamónico, son los que tienen menor excreción (102 mg/ave/día), una excreción similar a las otras fuentes, pero la disponibilidad real supera los valores de las otras fuentes, lo que confirma su elección como fuente estándar.

La ceniza de hueso, tanto en partícula fina como en tamaño comercial tiene un comportamiento muy similar a la del estándar, aunque con valores de excreción algo mayores para el caso de la de tamaño comercial (140 mg/ave tamaño comercial y 146 mg/ave partícula fina). En los valores de retención de fósforo estas tendencias se mantiene observándose mayor retención de fósforo para la partícula gruesa 584 mg/ave con respecto a 536 mg/ave en la partícula fina. Esto puede explicarse debido a que el grupo que consumió ceniza de hueso de tamaño comercial, tuvo mayor consumo de ración base, y por lo tanto mayor consumo de fósforo vegetal fitico, por lo cual es de esperar que la excreción sea mayor.

Cuadro 17. Consumo (g), excreción (g), retención(g) y disponibilidad aparente y real (%) del fósforo proveniente de fuentes de origen animal y mineral a altas tasas de inclusión y con diferente tamaño de partícula.

Fuentes de fósforo	Fosfato monoamónico	Fosfato bicálcico	Harina de carne y hueso 2	Harina de carne y hueso 1	Ceniza de hueso 2	Ceniza de hueso 1
Dosis de P (mg/ave)	250	250	250	250	250	250
Consumo de P (mg/ave)	717 ± 9,8 a	651 ± 2,4 a	722 ± 9,9 a	708 ± 5,4 a	724 ± 1,1 a	669 ± 3,0 a
P excretado (mg/ave)	102 ± 12 a	164 ± 13 b	168 ± 6 b	136 ± 11 a	140 ± 16 a	146 ± 15 a
P retenido (mg/ave)	581 ± 2,9 a	509 ± 1,8 a	563 ± 6,9 a	578 ± 1,3 a	584 ± 1,8 a	536 ± 2,4 a
CUD ap. (%)	85,9 ± 1,6 a	75,5 ± 1,8 b	78,1 ± 1,4 b	81,8 ± 1,2 a	80,7 ± 2,2 a	80,5 ± 2,3 a
Biodisponibilidad del P (%)	96,4 ± 2,0 a	85,1 ± 3,8 b	90,2 ± 1,5 a	93,3 ± 1,4 a	92,7 ± 2,2 a	91,7 ± 2,0 a

Valores seguidos de diferente letra son significativamente diferentes $P < 0.05$ según Test de Bonferroni

En los grupos que consumieron harina de carne el comportamiento fue similar. En ambos tratamientos la excreción de fósforo fue superior a la del fosfato monoamónico, (168 mg/ave en partícula gruesa y 136 mg/ave en partícula fina) y la retención menor 563 mg/ave para partícula comercial y 578 mg/ave para partícula fina.

Si comparamos este efecto de partícula, la harina de carne y hueso en partícula comercial presentó mayor consumo de ración y por lo tanto mayor consumo de fósforo fitico 722 mg/ave frente a 708 mg/ave de la fina, con valores de excreción mayores 168 mg/ave y 136 mg/ave para partícula comercial y fina respectivamente. A partir de estos datos podemos concluir que el afinado de la partícula tiene un efecto positivo en la retención del fósforo de las harinas de carne y hueso. Con respecto a los valores de digestibilidad aparente el efecto de partícula se mantiene, encontrándose valores mayores para la partícula fina (81.8%) que para la partícula comercial (78.1%)

El fosfato de calcio es el que presenta menor disponibilidad del fósforo, estos datos concuerdan con los encontrados por Orsban y col (1990), quien sugiere que podría existir una interacción calcio fósforo que determinaría una menor absorción del fósforo.

Cuando determinamos el coeficiente de digestibilidad real, es decir considerando la pérdida endógena, las tendencias se mantienen. De esta forma las fuentes de origen animal muestran disponibilidades similares, sin que se observe efecto del tamaño de partícula.

El fosfato monoamónico es el que presenta mejor disponibilidad (96,4%) por lo que se mantiene la justificación de considerarlo estándar, aún a nivel de consumo próximo al de requerimiento. Las fuentes de origen animal se aproximan a este nivel de disponibilidad variando entre 90,2 y 93,3% para la harina de carne y hueso comercial y partícula fina respectivamente, la ceniza de hueso presenta valores intermedios en ambos tamaños de partícula, sin que en ningún caso se encuentren diferencias significativas con el fosfato monoamónico.

El fósforo proveniente del fosfato bicálcico presenta disponibilidad real baja, 85,1%, significativamente menor a todas las fuentes estudiadas.

IV. CONCLUSIONES

A. Requerimientos de fósforo para crecimiento y postura

De acuerdo a los datos aportados en este estudio se puede definir como requerimiento para la fase de crecimiento 0.16 ó 0.24 g de P/ave/día según sea el parámetro considerado, siendo la parte disponible al menos un 50% del total de P aportado. Para las aves en postura, 0.58 % de P permite llegar al equilibrio en cuanto a balance de ingesta y excreción. Considerando también en este caso que el aporte en forma disponible debe ser al menos de 40%. Dichas cantidades parecen ser similares a las determinadas por el INRA (1994).

B. Biodisponibilidad del fósforo de fuentes orgánicas e inorgánicas

1- Efecto del origen del fosfato. Los resultados han demostrado que las fuentes inorgánicas, cuando no son de síntesis ó de grado analítico, deben ser consideradas con precaución ya que como lo demuestra este estudio tienen una disponibilidad biológica inferior a las de origen animal.

2- Efecto de los parámetros utilizados como respuesta. Los estudios de biodisponibilidad a partir de un bioensayo han dejado claro las limitaciones del método ya que el mismo parece tener validez a una edad temprana de los animales, menor a 30 días de edad. Por otro lado cuando se calcula biodisponibilidad sobre la base de fósforo agregado los porcentajes son superiores a 100%, en base a esto los valores se restringen a aquellos obtenidos con fósforo total consumido.

Por otra parte, el parámetro variable, corporal u óseo también afecta el valor de la biodisponibilidad relativa. De acuerdo a los estudios analíticos realizados en este ensayo podemos concluir que el criterio más exacto para la determinación de disponibilidad de fósforo en crecimiento es el contenido de fósforo en el hueso. Sin embargo tamados en su conjunto permite obtener mayores y mejores conclusiones acerca de los datos obtenidos.

3- Efecto de la partícula. Varios autores han preconizado que una disminución de la partícula podría mejorar el aporte de P ya que aumentaría la superficie de exposición al ataque ácido del estómago. Este tratamiento tecnológico es, sin embargo, de mayor costo para la planta. En este estudio no hemos observado efectos de impacto, ni en ensayos de crecimiento ni en postura por lo cual no consideramos conveniente la utilización de partículas finas como forma de aumentar la disponibilidad de este mineral.

B. Aplicación práctica de los resultados obtenidos para la elaboración de una tabla de biodisponibilidad de las fuentes de fósforo

Estos resultados tienen sin duda un aporte práctico ya que ubica las distintas fuentes de P utilizadas en el país en la dimensión correspondiente desde el punto de vista de la calidad nutricional del contenido de P. A modo de resumen podemos elaborar una tabla (cuadro 18) donde se expresan los contenidos de P, características de solubilidad y digestión in vitro y el valor de fósforo disponible en ensayos in vivo, de cada una de las fuentes estudiadas. Los valores de disponibilidad en crecimiento se obtienen de los ensayos de crecimiento a 30 días, utilizando como parámetro fósforo total consumido, y se elige el criterio de contenido de fósforo en la tibia, por presentar el menor error medio cuadrado (CME) y la mayor probabilidad de significancia (P). En el ensayo con ponedoras se toman los valores de disponibilidad calculados a partir de dosis cercanas al 100% de requerimiento.

Cuadro 18: contenido de fósforo (%), solubilidad en ácido clorhídrico (%), fósforo soluble (%) según una digestión simulada, pepsina-pancreatina, disponibilidad de fósforo (%) en crecimiento, disponibilidad de fósforo (%) en postura

FUENTE	Contenido de fósforo (%)	Solubilidad en HCL (%)	Digestion simulada (%)*	Biodisponibilidad crecimiento (%)	Biodisponibilidad postura (%)
Fosfato monoamónico	26.7	98.3	99.1		96.4
Fosfato Bicálcico	18.3	98.3	0.1	105.7	85.1
Harina de Carne 35/40 1	8.0	-----	-----	97.2	-----
Harina de carne 35/40 2	8.0	-----	-----	92.6	-----
Harina de carne 40/45 1	7.4	53.5	0.7	89.0	93.3
Harina de carne 40/45 2	7.4	50.4	3.4	111.2	90.2
Ceniza de hueso 1	15.5	42.1	0.6	79.4	91.7
Ceniza de hueso 2	15.5	37.2	0.63	89.9	92.7

*corresponde a una digestión con pepsina en ácido clorhídrico y posteriormente bilis pancreatina.

En base a estos datos podemos concluir que todas las fuentes de fósforo estudiadas en este ensayo tienen igual comportamiento tanto a nivel de pruebas de laboratorio como in vivo, por otra

parte, podemos afirmar que el afinado de la partícula no tiene efecto sobre la utilización del mineral ya que los valores de biodisponibilidad son similares tanto para las harinas de carne como para la ceniza de hueso.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1990). Official methods of analysis .15th.ed. Editado por Kenneth Helrich. USA. Pp
2. AL- MASRI, M. R. 1995. Absorption and endogenous excretion of phosphorus in growing broiler chicks, as influenced by calcium and phosphorus ratios in feed. British Journal of nutrition 74: 407 – 415.
3. AMMERMAN, C. B.; BAKER, D.H.; LEWIS, A. J. 1995. Bioavailability of nutrients for animals Aminoacids, minerals and vitamins. New York, Academic, Press Ed. Técnica interamericana. Pp 83-94.
4. BARLET, J. P.; DAVICCO, M. J.; COXAM, V. 1995. Physiologie de l'absorption intestinale du phosphore chez l'animal. Reproduction and Nutrition Development 35:475-489.
5. CABRERA, M. C.; SAUVEUR, B.; MONGIN, P.1982. Effect of separate calcium feeding and limited program on the metabolizable energy of the diet and nitrogen, calcium and phosphorus retention in laying hens. Reproduction and Nutrition. Developmente, 22: 973-987
6. CABRERA, M. C.; DEL PUERTO, M.; MANFREDI, N.; OLIVERO, R.; CORREA, D.; BERTI, A. M. 1995. Disponibilidad del calcio en conchillas y calcitas del Uruguay. Memorias del Congreso Latinoamericano de Producción Animal. Mar del Plata, Argentina. pp.685-688.
7. CABRERA, M. C.; DEL PUERTO, M.1996 Determinación de la biodisponibilidad del calcio in vivo: una modificación del método de balance digestivo. Congreso Uruguayo de Producción Animal (1º., Montevideo). Pp.86-88.
8. CABRERA, M. C.; RAMOS, A.;LIDNER, B. 2001 Desarrollo de una modelo in vitro para determinar la biodisponibilidad del fósforo alimentario basada en la simulación de digestión y de la absorción intestinal. Libre de resúmenes, VI Jornadas Uruguayas de

Ciencia y Tecnología de los Alimentos (6ª., Montevideo, Uruguay). Montevideo, Uruguay. pp.10-11

9. COMMON R. H. 1936. Serum phosphates in the domestic fowls. *Journal of Agriculture Science* 26:482-508
10. FISKE,C.H.; SUBBAROW,Y. 1925 The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of biological chemistry* 63:374-400
11. FRAPIN, D. 1996. Valorisation du phosphore phytique vegetal chez l'oiseau:interet et mode d'action des phytases vegetales et microbiennes. These .Docteur de l'ensar. Francia., INRA, Nouzilly. Pp 10-124.
12. GILLIS, M. B.; NORRIS, L.L.C.; HEUSSER, G.F. 1953. Phosphorus metabolism and requeriments of hens. *Poultry science* 32:977-983.
13. GROFF, J.L.; GROPER, S. S.; HUNT, S. M. 1995 *Advance nutrition and human metabolism* 2nd ed.
14. HARRISON H.E.; HARRISON,H.C. 1961, Intestinal transport of phosphorus:action of vitamin D, calcium and potasium. *Animal Journal Physiology* 201:1007-1012.
15. HUYGHEBAERT, G.; DE GROOTE, G.; KEPPELS,L. 1980. The relative biological availability of phosphorus in feed phosphates for broilers. *Annais Zootechnic* 29(3).245-263
16. HURWITZ,S.; BAR,A. 1965. Absorption of calcium and phosphorus along gastrointestinal tract of the laying fowl as influenced by dietary calcium and egg shell formation. *Journal of nutrition*, 86:433-438.
17. INRA.1989.*Alimentation des animaux monogastriques*. Paris, INRA.Pp 219 - 220
18. KERSHAVARZ, K.; NAKAJIMA, S. 1993. Re-evaluation of calcium and phosphorus requeriments of laying hens for optimun performance and egg-shell quality. *Poultry Science*. 72: 144 – 153.

19. KESHAVARZ, K. 1994. Laying hens respond differently to high dietary levels of phosphorus in monobasic and dibasic calcium phosphate. *Poultry Science* 73:687-703.
20. KESHAVARZ, K. 1998 Further investigations on the effect of dietary manipulation of protein, phosphorus and calcium for reducing their requirements for laying hens. *Poultry science* 77:1333-1346
21. KESHAVARZ, K. 2000. Reevaluation of nonphytate phosphorus requirement of growing pullets with and without phytase. *Poultry Science* 79:1143-1153.
22. LIMA, F. R.; MENDONCA, jr, C. X.; ALVAREZ, J. C.; RATTI, G.; LENHARO, S. L. R.; KAHN, H.; GARZILLO, J. M. F. 1995. Chemical and physical evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of phosphorus in animal nutrition. *Poultry Science*, 74:1695-1670
23. LIMA, I. L.; ROSTAGNO, H. S.; TEIXEIRA ALBINO, L. F.; ZANOTTO, D. L. 1995. Disponibilidade em algumas fontes de fósforo para pintos de corte de 1 a 21 dias de idade. *Brasil Reuniao da Sociedade Brasileira de Zootecnia (32ª,) Anais*. Pp 554-556.
24. LIMA, F. R.; MENDONCA, jr, C. X.; ALVAREZ, J. C.; GARZILLO, J. M. F.; GHION, E.; LEAL, P. 1997. Biological evaluation of commercial dicalcium phosphates as sources of available phosphorus for broilers chicks. *Poultry science* 76:1707-1713.
25. LIMA F.R.; FERNANDEZ,J.I.M.; OLIVEIRA,E.; FRONZAGLIA,G.C.; KHAN,H. 1999.Laboratory evaluations of feed-grade and agricultural-grade phosphates. *Poultry Science* 78:1717-1728.
26. LITTELL, C.; LEWIS, S. J.; HENRY, P. R. 1900 Statistical evaluation of bioavailability assays. In *Bioavailability of nutrients for animals*. Ed. Ammerman et al. New York, Academic Press. pp 5-32.
27. MAYNARD,L. A.; LOOSI, J. K.; HINTZ, H. F.; WARNER, R. G. 1979. *Animal nutrition*. 7th ed. New York, Mc Graw-hill.

28. MC. DOWEL. 1985. Nutrition of grazing ruminans in warm climates. New York, Academis press.
29. McDOWEL L.R. 1992. Mineral in animal and human nutrition . Gainesville, Florida, University of Florida,Departament of animal science.
30. MILLER, W. J. 1985 in "calcium and phosphore in animal nutrition". West Des Moines, Iowa , National feed ingredient association (NFIA),.
31. MONGIN, P.; SAUVEUR, B. 1979. Plasma inorganic phosphorus concentration during egg – shell formation. British Poultry Science 20: 401 –412,
32. NYS, Y. 1992.Calcium and phosphorus in poultry nutrition, INRA. Congreso latinoamericano de avicultura. Bogotá, Venezuela. Pp 1- 5
33. O´DELL, B. L.; deBOLAND, A. R. 1976 Complexation of phytate with proteins and cations in com germ and oilseed meals. Journal of Agriculture Food Chemistry 24:804.
34. PEELER, H.T. 1972. Biological availability of nutrients in feeds: availability of major mineral oins. Journal of Animal Science. 35(3):695 – 712.
35. POTTER, L. M, POTCHANAKORN, M; RAVINDRAN, V.; KORNEGAY, E. T.1995. Bioavailability of phosphorus in various phosphate sources using body weight and toe ash as response criteria. Poultry Science. 74:813-820
36. RAMOS, A. 2001, Características fisico-químicas de las fuentes de fósforo y su efecto sobre el transporte intestinal en un modelo animal carenciado en fósforo alimentario. Trabajo especial II. Licenciatura en bioquímica. Montevideo. Uruguay. Facultad de Ciencias. Pp 1-45
37. RAMOS, A.; CABRERA, M. C. 2000. Características fisico-químicas de los fosfatos inorgánicos sobre el transporte duodenal de Pi en situación de carencia dietética de fósforo asimilable. IX Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias.(9ª., 4-5 mayo). Solis, Uruguay. pp 88

38. RAVINDRAN,V; KORNEGAY,E.T.; POTTER,L.M.; OGUNABAMERU,B.O.; WELTEN,M.K.; WILSON,J.H.; POTCHANAKORN,M. 1995. An evaluation of various response criteria in assessing biological availability of phosphorus for broilers. Poultry Science 74: 1820 – 1830.
39. RAO, S. K.; ROLAND, D. A.; GORDON, R. W. 1995. A method to determine and factors that influence *in vivo* solubilization of phosphates in commercial leghorn hens. Poultry Science 74:1644-1649
40. SAUVEUR, B. 1989 Phosphore phytique et phytases dans l'alimentation des volailles. INRA prod. anim, 2,343-351.
41. SAUVEUR, B.1986. Influence of minerals on performance and health of broilers and laying hens. Conference Européenne d'Aviculture.(7^e.) Paris. INRA. Station of researches avicoles. pp95 – 109.
42. SELL, J. L.; JEFREY, M. 1979. Availability for poultts of phosphorus from meat and bone meals of different particle sizes . Poultry Science. 75: 232 – 239.
43. SELL, J. L.1996 Influence of dietary concentration and source of meat and bone meal on performance of turkeys. Poultry Science 75: 1076 – 1079.
44. SHAFEY, T. M; McDONALD, M. W.: PYM, R. A. E. 1990. Effects of dietary available phosphorus and vit D on growth rate, food utilisation, plasma and bone constituents and calcium and phosphorus retention of commercial broilers straims. British Poultry Science. 31: 587 - 602
45. SHAFEY, T.M., MCDONALD, M W.; DINGLE, J.G.1991. Effects of dietary calcium and available phosphorus concentration on digesta pH and on the availability of calcium, iron, magnesium and zinc from the intestinal contents of meat chickens . British Poultry Science 32:185-194
46. SIBBALD, I.R. 1982.Measurement of mineral bioavailability : extension of true metabolizable energy methodology. Poultry science 61:485-487.

47. SULLIVAN, T. W.; DOUGLAS, J. H. 1990. Phosphorus bioassay. In: proceeding Pitman-Moore Nutrition. Bloomington MN pp:18-37.
48. SULLIVAN, T. W.; DOUGLAS, N. J. H.; GONZALEZ, J.; BOND, P.L.Jr. 1992. Correlation of biological value of feed phosphates with their solubility in water, dilute hydrogen chloride dilute citric acid and neutral ammonium citrate. Poultry science 71:2065-2074
49. SULLIVAN, T. W.; DOUGLAS, J.H.; WIBOON LAPJATUPON; STRUWE, F.J.; GONZALEZ, 1994. J. Biological value of bone-precipitated calcium phosphate in turkey starter diets. Poultry Science 73:122-128
50. SULLIVAN, T. W.; DOUGLAS, J. H.; GONZALEZ, N. J. 1994. Levels of various elements of concern in feed phosphates of domestic and foreign origin. Poultry science 73:520-528.
51. TRIYUWNTA, C.; LETERRIER, NYS, Y. 1992. Dietary phosphorus and food allowance of dwarfs breeders effects reproductive performance of hens and bone development of their progeny. British Poultry Science. 73: 363 – 379.
52. WALDROUP, P.W.; AMMERMAN, C. B.; HARMS, R. H. 1965 The utilisation of phosphorus from animal protein sources for chicks. Florida Agricultural Experiments Stations.
53. WALDROUP, P. W.; ADAMS, M. 1994. Evaluation of the phosphorus provided by animal proteins in the diet of broilers chicks Journal of Applaid Poultry Researches 3:209-218
54. WILCOX, R. A.; CARLSON, C.W.; KOHLMAYER, Wm. GASTLER, G.F. 1955. The availability of phosphorus from different sources for poult fed practical-type diets. Department of poultry husbandry and station of biochemistry, South Dakota agricultural experiment station, College station ,South Dakota. pp1017-1023.
55. WILLIAMS, W. 1991. Nutricao relacionada com a qualidade do ovo e produtividade . In: Simposio Tecnico de Producao de ovos, (1, Campinas). Anais ...Campinas APA, p86-91.