

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE NUTRICIÓN



**“EFECTO DE DOS FITASAS EXÓGENAS SOBRE EL
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO, MORFOMETRÍA ÓSEA E
INTEGRIDAD ESQUELÉTICA EN POLLOS DE CARNE”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

INGENIERO ZOOTECNISTA

ELMER ROJAS ENCINA

Lima – Perú

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE NUTRICIÓN

**“EFECTO DE DOS FITASAS EXÓGENAS SOBRE EL
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO, MORFOMETRÍA ÓSEA E
INTEGRIDAD ESQUELÉTICA EN POLLOS DE CARNE”**

Tesis para optar el título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

ELMER ROJAS ENCINA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado

Dr. Mariano Echevarría Rojas
PRESIDENTE

Dr. Carlos Vilchez Perales
PATROCINADOR

Ing. Víctor Vergara Rubín
MIEMBRO

Dr. Víctor Guevara Carrasco
MIEMBRO

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1. Generalidades y homeostasis del fósforo	2
2.2. Generalidades de las fitasas	4
2.3. Importancia del uso de fitasas	7
2.4. Uso de fitasas en la alimentación de pollos de engorde	9
2.5. Morfometría ósea e integridad esquelética	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Lugar y duración	14
3.2. Instalaciones, equipos y materiales	14
3.3. Animales experimentales	15
3.4. Dietas experimentales	15
3.5. Procedimiento para la obtención de los huesos	16
3.6. Variables de respuesta	16
3.6.1 Variables productivas	16
3.6.2 Variables de morfometría ósea	18
3.6.3 Variables de integridad esquelética	19

3.7. Diseño estadístico	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	22
4.1 Variables productivas	22
4.2 Variables de morfometría ósea	25
4.3 Variables de integridad esquelética	29
V. CONCLUSIONES	32
VI. RECOMENDACIONES	33
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
VIII. ANEXO	44

ÍNDICE DE CUADROS

NÚMERO		PÁGINA
1.	Composición en ingredientes y nutrientes de las dietas experimentales	17
2.	Efecto del uso de fitasas sobre la respuesta productiva	23
3.	Efecto del uso de fitasas sobre la morfometría y mineralización ósea	26
4.	Efecto del uso de fitasas sobre la integridad esquelética	30

ÍNDICE DE ANEXO

NÚMERO	PÁGINA
I. Evaluación nutricional del alimento inicio y crecimiento	45
II. Variables productivas a los 21 días	46
III. Variables óseas a los 21 días	47
IV. Variables de integridad esquelética a los 21 días	48
V. Contenido de ceniza en tibia a los 21 días	49
VI. Matriz nutricional de la Fitasa A y B	50

I. INTRODUCCIÓN

Los desórdenes esqueléticos vienen causando grandes pérdidas económicas alrededor del mundo, se estima que representan más del 30 por ciento del total de pérdidas y además afecta negativamente el bienestar del ave; estos desórdenes esqueléticos necesitan una continua vigilancia a nivel genético, de manejo y nutricional. En el aspecto nutricional, se tiene que poner especial interés en la nutrición mineral, específicamente de calcio y fósforo, ya que aproximadamente el 99% del calcio y el 80% del fósforo del organismo del ave se encuentran estructurando la matriz ósea, y el 70% de los huesos está formado por estos minerales.

Las dietas convencionales para pollos de carne son deficientes en fósforo, ya que el fósforo proveniente de fuentes vegetales solo es aprovechable en un 30% por el ave, lo cual hace necesario el suplemento de fuentes inorgánicas de este mineral. La enzima fitasa libera el fósforo contenido en los insumos vegetales y la ventaja de su uso es la reducción del costo de producción (el fósforo es el tercer nutriente más costoso en la fórmula del alimento) y la reducción en el impacto ambiental (existe una menor concentración de fósforo en la excreta).

La eficacia de la enzima fitasa en la dieta de pollos de engorde está probada y su uso en avicultura comercial es muy versátil desde el punto de vista productivo y económico; sin embargo, la fuente de la que proviene esta enzima puede ocasionar diferencias en cuanto a parámetros productivos e integridad esquelética; es por ello que el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar los parámetros productivos, morfometría ósea e integridad esquelética bajo el efecto de dos fuentes de fitasas exógenas en pollos de carne.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades y homeostasis del fósforo

El fósforo está asociado a varias funciones metabólicas e interviene en el metabolismo energético, en la formación y mantenimiento de los huesos, así como en la constitución del cascarón del huevo. Constituye, además, parte de los fosfolípidos que integran a membrana celular e interviene como tampón en la regulación del pH corporal (Acosta y Cárdenas, 2006; Rodehutsord, 2009).

Se considera al fósforo como uno de los elementos minerales más versátiles que se encuentran en la naturaleza. Es el segundo mineral más abundante en la composición de los tejidos animales, donde el 80% del fósforo total se encuentra en los huesos y dientes, el resto se distribuye entre los fluidos y otros tejidos (Lima *et al.*, 1999; Acosta y Cárdenas, 2006).

Los monogástricos, en general, carecen o tienen muy pocas enzimas en el intestino delgado que pueden hidrolizar los fitatos Méndez (2008); por esta razón, el fósforo y los demás minerales que se encuentren ligados a los fitatos tendrán una disponibilidad muy limitada. En cambio, las aves sí tienen algo de actividad fitásica a nivel intestinal por lo que el aprovechamiento es superior al de la especie porcina. Hay que señalar que la disponibilidad también depende de la especie animal.

El 80% del fósforo y 99% del calcio del organismo se encuentran formando parte estructural de los huesos; el fósforo presente en el esqueleto se encuentra como fosfato cálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, el resto se encuentra como fósforo

orgánico en los tejidos muscular y nervioso, especialmente en los glóbulos rojos; Gillis *et al.* (1948) fueron los primeros en describir que un aporte subnutricional de fósforo en pollos de engorde afecta negativamente la productividad, la salud y el correcto desarrollo óseo.

El fósforo es necesario para el crecimiento muscular, es componente principal de ácidos nucleicos y fosfolípidos, así mismo es componente y activador de numerosos complejos enzimáticos, mantiene el balance osmótico y el ácido-base, participa en el metabolismo de aminoácidos, interviene en la síntesis de proteína, y también es el factor más importante del metabolismo energético al formar parte estructural de la molécula energética conocida como ATP (Barkley *et al.*, 2004).

El hueso es parte de la estructura que interviene en la regulación interna de calcio y fósforo, ya que es el principal reservorio mineral de calcio y de fósforo en el organismo (Cassis, 1984); por otro lado, el riñón es uno de los órganos que regula el metabolismo del calcio y del fósforo mediante el aumento o disminución de la reabsorción tubular de acuerdo a la acción de otras hormonas que actúan sobre este (Ansar *et al.*, 2004). La paratohormona incrementa la reabsorción tubular renal de calcio y disminuye la reabsorción tubular renal del fósforo, por ello se retiene calcio y se excreta fósforo, mientras que la calcitonina tiene una acción contraria a la paratohormona, ya que produce la disminución en la absorción tubular de calcio y con ello se incrementa la absorción de fósforo (García, 2003).

La vitamina D, esteroide que se presenta en muchas formas, pero la que presenta un papel activo en la nutrición y metabolismo de aves es el colecalciferol (D_3), que ingresa al ave a través de la dieta, luego se dirige al hígado en donde se da la primera hidroxilación y se convierte en 25-(OH)D_3 , luego y según las necesidades se transporta a los riñones en donde sufre una segunda hidroxilación y se convierte en $1,25\text{-(OH)}_2D_3$, el cual representa la forma más activa de la vitamina D al ser la encargada de producir las proteínas de transporte del calcio y fósforo en el intestino delgado; además se regula por retroalimentación negativa, y cuando hay un exceso de calcio en el organismo se produce

una tercera hidroxilación y la vitamina D se convierte en 1,24,25-(OH)₃D₃, un metabolito que no tiene acción en la regulación de estos minerales (Cassius, 2005).

La estructura química de la fuente del fósforo influye en la disponibilidad de este mineral, la forma metabólicamente activa para el pollo de engorde es el ortofosfato (PO₄⁻). Otras formas en las que se encuentra el fósforo en el organismo son el pirofosfato y el metafosfato; la primera consiste en dos moléculas enlazadas, mientras que la segunda está constituida por estructuras cíclicas; además cuando las moléculas están entrelazadas (polifosfatos) la absorción a través de la pared intestinal del ave es bastante lenta, en consecuencia, el nivel de absorción del fósforo es bajo (Gillis *et al.*, 1954; Barkley *et al.*, 2004; Manangi, 2008).

2.2. Generalidades de las fitasas

Las fitasas son fosfatasas que pertenecen a un conjunto diferenciado de enzimas, clasificadas en fosfatasas alcalinas, fosfatasas ácidas de alto y bajo peso molecular y fosfatasas-proteína (Vincent *et al.*, 1992). La enzima fitasa hidroliza el ácido fítico, produciendo ortofosfato inorgánico, esteres fosfóricos y mioinositol, lo que permite que una fracción mayor de fósforo sea transformado en una forma aprovechable para los animales monogástricos (Godoy *et al.*, 2002). Para mejorar la biodisponibilidad del fósforo fítico en dietas para aves, actualmente en avicultura comercial se incorporan fitasas sintéticas (Romero *et al.*, 2009).

Las fitasas están presentes de forma natural en numerosos cultivos de bacterias y hongos; se encuentran, además, en ciertos granos y pueden llegar al tracto intestinal de todos los animales por la ingestión de plantas que las contienen o por la propia microflora intestinal que las produce, así como también por la producción enzimática endógena de la mucosa (Applegate *et al.* 2003; Moran, 2004).

Uno de los problemas para medir la actividad de las diferentes fitasas se debe a que no existe una unidad internacional estándar, lo cual creó confusiones en la industria de venta de aditivos en el pasado; este problema perduró hasta que Engelen *et al.* (1994) definió como unidades fitasa (FTU) a la cantidad de enzima que libera una mol de ortofosfato inorgánico por minuto, de 0.0051 mol por litro de fitato de sodio a pH 5.5 y a una temperatura de 37°C.

Entre los productos que encontramos en el mercado se tiene a la 6-fitasa que se puede originar a partir de la *Escherichia coli* y la 3-fitasa que puede generarse a partir del *Aspergillus niger* (Ravindran *et al.*, 1995; Nagashiro, 2008; Shang *et al.*, 2015). Según Onyango *et al.* (2005), la fitasa que se origina a partir de la *Escherichia coli* manifiesta actividad en un intervalo de pH óptimo de 2.5 a 3.5; en cambio la 3-fitasa fúngica (*Aspergillus niger*) tiene un rango de actividad más amplio, con pH entre 2.5- 5.5.

En pollos de carne, debido a que el nivel de pH en el intestino delgado es entre 5.5-6.6, puede haber un impacto negativo sobre la disponibilidad del fósforo-fítico y sobre la disponibilidad de los minerales quelados con el ácido fítico (Shang *et al.*, 2015). La mayor parte de la fitasa actúa mejor en la parte inicial del tracto gastrointestinal (buche, proventrículo y molleja) del ave, en donde los niveles de pH son bajos y se incrementa la degradación del ácido fítico (Romero *et al.*, 2009). Recientemente se ha demostrado que la adición de calcio en las dietas aumenta el pH en el buche, lugar principal de degradación del ácido fítico por las fitasas exógenas, reduciendo la eficiencia de la fitasa para liberar el fósforo fítico (Viveros *et al.*, 2002; Seller *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2015).

La interpretación de eficiencia de una enzima comercial, puede ser influenciada por el nivel de pH óptimo debido a que las fitasas, de origen fúngico o bacteriano, necesitan un medio ácido para alcanzar su máxima eficiencia y así poder liberar el fósforo proveniente del ácido fítico (Simons *et al.*, 1990). No se han demostrado sinergias en la utilización de las fitasas de origen fúngico y las de origen bacteriana sobre el nivel de fósforo plasmático (Viveros *et al.*, 2002).

En nutrición animal los requerimientos de calcio (Ca) y fósforo (P) son ampliamente conocidos por las inclusiones dietarias de piedra caliza, suplementos de fósforo inorgánico como fosfato dicálcico y por permitirse harina de carne y hueso (Seller *et al.*, 2009); el fósforo es el tercer componente más costoso en la dieta de no rumiantes, después de la energía y la proteína (Boling *et al.*, 2000); además, es un mineral crítico (Rama *et al.*, 1998), ya que del total de elementos minerales en el organismo, Ca y P representan el 70% y son esenciales para la formación de huesos, la transferencia de energía a las células, la regulación del pH en la sangre, el control del apetito, la ganancia de peso y la conversión alimentaria; además, teniendo en cuenta que en los recursos de origen vegetal se presentan cantidades considerables de P pero la mayoría de ellos están ligados con fitatos (myoinositol, hexafosfato), que llevan un máximo de doce cargas negativas y potencialmente podrían quedar hasta seis átomos de Ca, se constituyen en la principal fuente potencial de P (Peceros, 2015).

La afinidad del fitato también es grande para otros cationes divalentes, incluyendo zinc y cobre (Seller *et al.*, 2009), por ello los fitatos están catalogados como agentes antinutricionales ya que forman complejos con minerales e incluso pueden reaccionar con proteínas reduciendo su disponibilidad (Ahmad *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2009). Se está poniendo interés en esta línea de investigación y la administración de super dosis de fitasas parece aumentar la performance del animal por liberar micro minerales necesarios para maximizar el metabolismo del ave (Walk *et al.*, 2014; Truong *et al.*, 2015).

Se viene incentivando la investigación sobre la adición de fitasas en la dieta de monogástricos para mejorar tanto el desempeño productivo a partir del incremento en la disponibilidad de los minerales y las proteínas (Romero *et al.*, 2009), así como los efectos en la digestibilidad de los aminoácidos (Snow *et al.*, 2003); en la actualidad las fitasas exógenas son usadas en las dietas para hidrolizar el fósforo fítico, que lo hace disponible, y disminuye los requerimientos de fósforo inorgánico en la dieta (Maenz, 2001; Walk *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2013; Walk *et al.*, 2014; Hamdi *et al.*, 2015).

2.3. Importancia del uso de fitasas

Los principales ingredientes usados en la alimentación avícola son el maíz y la soya, estos insumos almacenan el fósforo bajo la forma de ácido fítico y sus sales (Eeckhout y Paepe, 1994), el fósforo atrapado en el ácido fítico no es disponible para las aves ya que estas no poseen la enzima denominada fitasa, por lo que se hace necesaria la suplementación con fuentes inorgánicas de fósforo, principalmente el fosfato dicálcico y monocalcico; además, debemos tener en cuenta que no todos los fosfatos son igualmente disponibles para el animal según sea la forma del proceso de obtención (Lima *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 1999; Uculmana y Vílchez, 2015d).

Se conoce la acción negativa de un desbalance de fósforo en la dieta sobre la performance productiva, es por ello que muchos nutricionistas agregan este ingrediente con un margen de seguridad (Uculmana, 2015d); sin embargo, hoy en día la preocupación por reducir el impacto ambiental ha llevado a tomar especial interés en este aspecto de la nutrición, tratando de reducir el contenido de fósforo en las excretas, por sus efectos negativos en aguas superficiales al causar la eutrofización de lagos (Rodehutschord, 2009).

Otro punto a tener en cuenta es que a raíz de los replanteamientos mundiales sobre producción limpia y mitigación de impacto ambiental, se ha minimizado la utilización de antibióticos y harinas de origen animal, lo que ha incrementado el uso de vegetales en la formulación de las dietas (Castro y Rodríguez, 2005; Walk *et al.*, 2014); por consiguiente, en los últimos años se ha presentado un creciente interés sobre el uso de aditivos alimentarios naturales y terapias alternativas no medicamentosas como probióticos, prebióticos, simbióticos y enzimas digestivas que optimicen el desempeño productivo (Rosmini *et al.*, 2004) con el propósito de propiciar la resistencia natural a la presentación de enfermedades infecciosas del tracto gastrointestinal y optimizar los procesos de digestión y absorción de los nutrientes constitutivos de las dietas (Collins *et al.*, 1999). Según Maenz y Classen (1998), en áreas concentradas de producción animal el incremento de P no digerible en las heces presenta problemas medioambientales puesto que los ecosistemas acuáticos son afectados por la eutrofización (exceso de minerales y nutrientes

en un ecosistema acuático) producida por la contaminación con fósforo, razón por la cual la actividad fitásica se califica como un beneficio para el medioambiente (Seller *et al.*, 2009). Esta apreciación es ratificada por Castro y Rodríguez (2005) al afirmar que, reemplazando el fósforo inorgánico en las dietas, se reduce su excreción en más del 50%.

Algunas investigaciones han demostrado que con la inclusión de 300 FTU en la dieta los niveles de excreción de P disminuyen en un 50% (Bolling *et al.*, 2000), lo que infiere la importancia del uso de fitasas cuando se consideran los aspectos medioambientales en la industria avícola. De igual manera, se encuentran reportes sobre el uso de dietas bajas en proteínas suplementadas con aminoácidos esenciales y fitasas que disminuyen significativamente la excreción de N, lo que ha desarrollado interés en los investigadores porque reduce el impacto medioambiental de la producción avícola, ya que se disminuye la excreción de P y N (Keshavarz y Austic, 2004; Nahm, 2007).

Entonces, la conveniencia de la utilización de fitasas exógenas dependerá de los avances biotecnológicos que se realizarán en este ámbito y de la relación costo beneficio que se deriven de su uso. El componente ambiental puede jugar un papel determinante que podría obviar en cierta medida las limitadas ventajas económicas que bajo los conocimientos y tecnologías actuales se están logrando mediante el uso de fitasas exógenas (Godoy *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2012).

El problema del fósforo, la contaminación ambiental, así como las duras restricciones a que esto conlleva, es situación bastante común para todo el mundo. En algunos países asiáticos esta cuestión es especialmente seria, porque las densidades de animales domésticos son muy altas. En ciertos países europeos, los residuos producidos por los animales corresponden, más o menos, al doble de lo que producen los habitantes. En este sentido, la aplicación de las enzimas fitasas como estrategia nutricional ha mostrado ser un método eficaz para reducir el fósforo contenido en el estiércol de los animales monogástricos. Estas enzimas desempeñarán un importante papel, en el futuro, para reducir los crecientes problemas medioambientales del mundo (Acosta y Cárdenas, 2006).

El fósforo considerado como el tercer nutriente más costoso en la matriz de formulación ya que se adiciona bajo la forma de fosfatos inorgánicos; en este sentido la enzima fitasa, al liberar y hacer disponible el fósforo atrapado por el ácido fítico en los ingredientes de origen vegetal, busca reducir la adición de una fuente inorgánica de fósforo, por consiguiente reducir el costo de formulación sin afectar la performance final, traduciendo el efecto en mayor rentabilidad para la casa productora (Smith *et al.*, 2001). La fitasa entonces, ayuda a reducir el impacto ambiental de la avicultura y por tanto generar una ventaja competitiva frente a otras explotaciones pecuarias, y a aumentar el ingreso económico a las casas productoras ya que se disminuyen los costos de producción y no se afecta la performance de los animales (Maenz, 2001; Smith *et al.*, 2001).

2.4. Uso de fitasas en la alimentación de pollos de engorde

Se ha visto que el uso de fitasas en dietas de aves puede disminuir el costo de la dieta, en situaciones de crianzas comerciales, Sebastian *et al.* (1996) Llegaron a la conclusión que animales que recibieron fitasas en la dieta tuvieron un desempeño productivo similar al de los animales alimentados con dietas sin fitasas; sin embargo, en el primer grupo se observó que hubo una mayor retención de P, Ca, Cu y Zn, con lo que se encuentra un beneficio adicional de la fitasa además de la liberación de fósforo de insumos vegetales (Cowieson *et al.*, 2011). Además, los pollos que presentan una mayor tasa de crecimiento poseen huesos más largos, anchos, pesados y fuertes que aquellos pollos que presentan menor tasa de crecimiento (Shim *et al.*, 2011).

En pollos Hubbard se ha estudiado la reducción del fósforo no fítico (NPP) de 4.5 g/kg a 3 g/kg y se concluye que manteniendo niveles de calcio de 10 g/kg (relación Ca:NPP 3.3:1) se disminuye la ganancia de peso en un 17.3%; sin embargo, si la relación Ca:NPP se disminuye a 2.5:1 (7.5 g/kg de Ca) la disminución en la ganancia de peso es solo del 6.8% (Rama *et al.*, 1998), reiterando los resultados de Aksakal *et al.*, citado por Seller *et al.* (2009), quienes reportan que la relación Ca:NPP 2:1 mejora el desempeño de los pollos de engorde (Uculmana, 2015a), y es a partir de estos resultados que Rama *et al.* (1998) infieren que las dietas altas de calcio y bajas de P aumentan el pH intestinal y reducen la

fracción soluble de minerales, lo cual reduce por consiguiente su disponibilidad para la absorción; además, se atribuyó a la actividad fitásica intestinal el aumento en el contenido de cenizas de la tibia; a esta misma conclusión llegaron Nie *et al.* (2013) y Shang *et al.* (2015).

En otros estudios con pollos Hubbard (Ahmad *et al.*, 2000) se formularon dietas bajas en NPP, con maíz y soya tratadas con fitasas microbiales, encontrándose que, aunque se observó incremento en el consumo y la ganancia de peso con respecto al testigo, el coeficiente de conversión alimenticia no presentó diferencias significativas; no obstante, los contenidos de P y Ca de la tibia se incrementaron en 4.5 y 9.8% respectivamente, con respecto al testigo. Resultados semejantes se obtuvieron con pollos Arbor Acres (Guo *et al.*, 2009) al suplementar las dietas con 500 y 1000 FTU, hallándose adicionalmente que la suplementación con fitasa y gluconato de sodio (20 g/kg) en dietas bajas en fósforo mejora la eficiencia productiva y aumenta el peso de la tibia y el calcio contenido en sus cenizas; de igual forma lo expresaron Augspurger *et al.* (2004) al evaluar la biodisponibilidad de Ca de la dieta basal con pollitos New Hampshire de 8 a 20 días de edad y concluyen que el 80% del calcio estaba unido a las moléculas de fitatos pero se hizo disponible por la acción hidrolítica de las fitasas.

Estudios realizados en pollos Cobb 500 (Godoy *et al.*, 2002) con niveles crecientes de fitasas sintéticas de *Aspergillus niger* (300, 400 y 500 FTU/kg) y niveles crecientes de fósforo total (0.45, 0.55 y 0.65%) demostraron que para liberar un gramo de fósforo fítico se requieren 540 FTU/kg de alimento y 1.290 FTU/kg de alimento, obteniéndose 0.25 y 0.35% de P disponible, respectivamente. Viveros *et al.*, (2002) alimentaron pollos Cobb con una ración deficiente en fósforo (0.23% de NPP) suplementado con salvado de centeno sin tratar y tratado a diferentes temperaturas (de 25 a 75 °C) para determinar la actividad fítica endógena frente al tratamiento con y sin fitasa microbiana; hallaron que con la presencia de salvado de centeno sin tratar y tratado pero sin fitasas microbianas disminuyó significativamente el desempeño productivo con respecto a las que consumieron la ración control y la fitasa microbiana, lo que demostró una menor eficacia de la fitasa vegetal sobre la fitasa microbiana comparada con la utilización del fósforo.

En otro estudio con pollos Cobb 500, se trabajó con aves que fueron sometidas a dietas con dosis y mega dosis de fitasa microbiana (hasta 5.000 FTU) derivada de la *E. coli* para evaluar el efecto hidrolítico sobre los fitatos de la dieta, hallándose que la hidrólisis completa del fósforo fítico y la máxima retención del fósforo total se da con dosis de 1.000 FTU/kg de alimento (Manangi y Coon, 2008).

Juan Pere *et al.* (2004), interesados en el impacto medioambiental generado por la industria avícola, evaluaron dietas con 500 FTU y bajas concentraciones de NPP para pollos Ross 308 y se encontró que dicha actividad incrementa la retención de fósforo y reduce la excreción del mineral en un 45%. Complementando al estudio anterior, en un experimento con pollos Ross 708 de 36 a 47 días de edad se halló que al incluir 500 FTU en la dieta con diferentes grados de densidad de aminoácidos esenciales en la fase de engorde se redujo la excreción de P en 0.18 g por ave pero aumentaron los niveles de excreción de N; además, contrario a sus investigaciones previas en pollos de 20 a 40 días en el 2001 y el 2007, no se afectaron la ganancia de peso, la conversión alimenticia ni la mortalidad (Dozier *et al.*, 2007; Cowieson *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012).

Por otra parte, un estudio de perfil hepático hecho con pollos Cobb 500 suplementados con fitasas (200, 400 y 600 FTU) demostró que el nivel sérico de proteínas totales aumentó; además, los niveles séricos de Ca, P, Mg y Zn aumentaron de manera lineal en un 9, 10 y 16% respectivamente; también se observó que el peso de la tibia se incrementó en un 9% y también aumentó el consumo de alimento y la ganancia de peso; en este estudio los autores comprobaron una menor eficacia de las fitasas de origen vegetal sobre la microbiana respecto de la utilización del fósforo, lo que plantea una posible relación con el estrecho margen de actuación de la enzima con el pH y su limitada estabilidad a las temperaturas lo cual sugiere que las bajas dosis no logran absorber todo el P orgánico de la dieta (Juanpere *et al.*, 2004). Por esta razón, no se recomienda usar fosfatos cuando se incluye fitasa en la dieta, puesto que la presencia de esta enzima garantiza la disponibilidad adicional de P que cubre parte de los requerimientos dietéticos del mineral (Leytem *et al.*, 2007; Peceros, 2015).

2.5. Morfometría ósea e integridad esquelética

El desarrollo óseo ha sido considerado por años como uno de los principales criterios para estimar la biodisponibilidad del calcio y fósforo (Ammerman *et al.*, 1995). El hueso está compuesto aproximadamente en un 70% por minerales, 20% de materia orgánica y 10% de agua (Rath *et al.*, 2000).

El crecimiento de los huesos en pollos de engorde se lleva a cabo mediante el proceso de crecimiento endocondrial, que tiene lugar en las placas de crecimiento hipofisiario (Whitehead, 2009); los condrocitos de las placas de crecimiento están expuestos a procesos de desarrollo, proliferación y diferenciación que es donde se inicia la mineralización cuando se deposita fosfato cálcico. A este proceso le sigue la formación del hueso por la acción de los osteoblastos y la remodelación posterior como un proceso continuo, esta acción es llevada a cabo por los osteoclastos (Buckner *et al.*, 1950; Whitehead, 1995).

Una inadecuada integridad esquelética es uno de los mayores problemas en granjas, ya que se traducen en una pobre respuesta productiva, incremento en la mortalidad del lote, condenaciones en planta e incremento significativo de los costos de producción (Rath *et al.*, 1999); en la actualidad parece ser que no hay una concordancia entre el crecimiento corporal y el desarrollo óseo ya que la selección de las aves de producción se ha orientado a la mayor ganancia de peso corporal en el menor tiempo posible, esto ha originado que las aves sean más propensas a presentar problemas de patas (Zelenka, 2012).

Existen indicios de que podrían ser necesario un nivel más alto de calcio y fósforo en las dietas de arranque de los pollos de carne para normalizar el desarrollo de la placa de crecimiento debido a los problemas típicos que encontramos en campo, como la necrosis de cabeza de fémur, el raquitismo, la discondroplasia tibial y más recientemente el síndrome del hueso negro (Whitehead, 2009).

Los problemas de patas en pollos de engorde pueden ser causados por muchos factores como la genética, edad del ave, densidad de crianza, condiciones ambientales y de manejo, nutrición, desórdenes metabólicos, enfermedades y micotoxinas, cualquier factor que interfiera con el correcto desarrollo de las estructuras óseas puede causar anomalías en los huesos o en las piernas (Wu *et al.*, 1993; Naas, 2008, Martínez, 2012; Uculmana, 2015a).

Un problema adicional son los llamados desórdenes en la locomoción o problemas para caminar normalmente, que son frecuentes en las líneas actuales de pollos de engorde debido al rápido crecimiento (Uculmana, 2015a); anomalías en el desarrollo del sistema esquelético afectan directamente la capacidad para caminar de las aves, y estos animales son los que generalmente tienen una inadecuada ganancia de peso (Kestin *et al.*, 1992), disminuyendo así el retorno económico de las empresas pecuarias; además de ser un problema a nivel de bienestar animal ya que estas aves, al no poder desplazarse, no pueden acceder ni al alimento ni al agua (Weeks *et al.*, 2000).

Los principales problemas de integridad esquelética en la avicultura comercial son: la discondroplasia tibial (que es el desarrollo anormal del cartílago epifisiario asociado a una alteración de la placa de crecimiento), la necrosis de cabeza femoral, las patas torcidas que incapacitan al animal para caminar, y las desviaciones de las patas (varus y valgus) (Whitehead, 2009). En vista de los problemas presentados en la industria, los requerimientos de calcio y fósforo serán los que brinden los mejores resultados productivos y máximo retorno económico, sin que se perjudique la integridad esquelética y mineralización ósea (Uculmana, 2015a); además, reducir al máximo la excreción de minerales contaminantes al medio ambiente (Zelenka, 2012).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y duración

El trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de investigación en nutrición y alimentación de aves de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM). La duración fue de 21 días comprendidos entre Abril y Mayo del 2015.

3.2. Instalaciones, equipos y materiales

Se utilizó dos jaulas metálicas, que cuentan con cinco pisos divididas en dos compartimentos, adicionalmente se dividió cada compartimento en dos partes, dando un total de veinte de ellos por jaula. Las cuales tienen calefacción eléctrica controlada por termostatos. En cada compartimento se colocó un comedero lineal y por cada dos compartimentos un bebedero lineal; así como el uso de una bandeja galvanizada para la colección de heces. Para el pesaje del alimento y de los pollos se utilizó una balanza digital con capacidad de 6 kg y una precisión de 0.5 g. Para la limpieza de las instalaciones e equipos se utilizó escobas, baldes, desinfectante, detergente, lejía, etc. Se utilizaron cortinas para el manejo adecuado de la ventilación del ambiente, del mismo modo se mantuvo la homogeneidad de las condiciones de manejo para todas las aves.

Para la necropsia de las aves se utilizó tijeras, gorros, mascarilla, guantes quirúrgicos y bolsas descartables. Así mismo utilizó la técnica de dislocación cervical para el sacrificio de las aves. Para el procedimiento del hervido se utilizó una cocina a gas y una olla. Los huesos muestreados fueron pesados empleando una balanza electrónica de precisión, para

determinar el largo y ancho de los huesos se empleó un vernier profesional con capacidad de 15 cm y una aproximación de 0.05mm.

3.3. Animales experimentales

Se emplearon 195 pollos de carne machos de la línea Cobb-500, distribuido en tres grupos de 65 aves, formando 13 subgrupos con 5 aves por cada repetición. Al concluir los 21 días se sacrificó dos pollos por cada subgrupo para las mediciones correspondientes.

3.4. Dietas experimentales

Se emplearon 3 dietas experimentales formuladas considerando las especificaciones nutricionales para pollos de carne de la línea Cobb 500 (2012) y los aportes de los productos comerciales, fueron según las indicadas en sus matrices nutricionales correspondientes.

- **Dieta control:** formulada según especificaciones nutricionales para pollos de carne de la línea cobb-500.
- **Dieta control + Fitasa A (0.01%):** reformulada con la adición de la fitasa A (ANEXO VI).
- **Dieta control + Fitasa B (0.01%):** reformulada con la adición de la fitasa B (ANEXO VI).

La preparación de las dietas se realizó en la planta de alimentos balanceados del programa de investigación y proyección social en alimentos de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria la Molina. Los ingredientes fueron torta de soya, maíz, aceite de soya. La presentación de las dietas fue en harina. El agua y alimento se suministraron a libre disposición del animal. La composición y valores nutricionales estimados de las dietas se muestran en el **Cuadro 1**.

3.5. Procedimiento para obtención de los huesos

Los animales fueron sacrificados según el método de dislocación cervical e inmediatamente después se realizaron las mediciones, a fin de evitar que los resultados puedan afectarse por cambios post-mortem (Bowes y Julian, 1988). Luego a cada ave se retiró los muslos, piernas y patas izquierdas, y fue puesto en agua hirviendo por el lapso de 15 minutos para remover el tejido del hueso (Buckner *et al.*, 1950; Applegate y Lilburn, 2002), procedimiento que no altera el contenido mineral ni la densidad del hueso pero permite retirar hasta el 80% de grasa contenida en los huesos (Almeida *et al.*, 2008). La pata derecha fue analizada para discontroplasia tibial y necrosis femoral.

3.6. Variables de respuesta

Se agruparon las variables según su grado de relación en: variables productivas, variables de morfometría ósea y variables de integridad esquelética.

3.6.1 Variables productivas

A. Peso vivo

Los animales fueron pesados al inicio del experimento, obteniéndose pesos individuales por repetición. Se utilizó una balanza con capacidad de 6 kg y una sensibilidad de 0.5 g. Esta operación se repitió cada semana hasta los 21 días. Luego se obtuvo el peso en gramos por pollo de cada una de las repeticiones de los tratamientos.

Cuadro 1. Composición en ingredientes y nutrientes de las dietas experimentales

Composición, %	Inicio (1-10 días)			Crecimiento (11-21 días)		
	Control	Fitasa A	Fitasa B	Control	Fitasa A	Fitasa B
Maíz	57.10	58.56	58.32	63.82	65.28	65.04
Torta de soya	34.80	34.52	34.57	28.17	27.89	27.94
Aceite crudo soya	4.21	3.37	3.81	4.25	3.77	3.85
Fosfato dicálcico	1.71	0.89	0.98	1.61	0.80	0.89
Carbonato de calcio	0.88	0.97	1.00	0.84	0.93	0.96
Sal común	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
DI – metionina	0.27	0.27	0.27	0.25	0.25	0.25
Hcl – lisina	0.18	0.18	0.18	0.20	0.20	0.20
Premezcla de vit. Y minerales	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Cloruro de colina	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
L – treonina	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07
Zinc bacitracina	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Secuestrante de micotoxinas	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Antioxidante	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Fitasa A	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00
Fitasa B	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01
Total, %	100	100	100	100	100	100
Nutrientes calculados						
E.metabolizable, kcal/kg	3035	3035	3035	3108	3108	3108
Proteína cruda, %	21.50	21.50	21.50	19.00	19.00	19.00
Lisina dig, %	1.20	1.20	1.20	1.05	1.05	1.05
Metionina dig, %	0.58	0.58	0.58	0.53	0.53	0.53
Calcio, %	0.90	0.90	0.90	0.84	0.84	0.84
Fosforo disponible, %	0.45	0.45	0.45	0.42	0.42	0.42

B. Ganancia de peso

Se calculó con la diferencia de los pesos vivos al final y al inicio de cada semana para cada repetición.

$$\text{Ganancia de peso (semanal)} = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}$$

C. Consumo de alimento

Se llevó un registro del alimento ofrecido durante todos los días que duró la investigación. Al término de cada semana, se pesó el residuo en todos los comederos y se calculó la diferencia con el total suministrado.

$$\text{Consumo de alimento, g/pollo} = \text{Alimento suministrado, g} - \text{Alimento residual, g}$$

D. Conversión alimentaria (CA)

La conversión alimentaria relaciona el consumo de alimento y la ganancia de peso por cada repetición.

$$\text{CA} = \text{consumo de alimento, g} / \text{ganancia de peso, g}$$

3.6.2 Variables de morfometría ósea

A. Peso de la tibia

Se pesaron la tibia de las aves sacrificadas el día 21, el peso se realizó utilizando una balanza electrónica con capacidad para 300 gramos, con valores en miligramos (mg).

B. Largo de la tibia

Se determinó considerando la longitud mayor de extremo a extremo de la tibia de las aves sacrificadas a los 21 días, utilizando un vernier profesional y siguiendo los procedimientos de Uculmana (2015a).

C. Ancho de la tibia

Se determinó los diámetros latero-lateral (DLL) y los diámetros cráneo-caudal (DCC) de la diáfisis en la mitad de la longitud de la tibia (Kocabagli, 2001; Applegate y Lilburn, 2002; Martínez, 2012; Uculmana 2015a) de las aves sacrificadas a los 21 días. Con estos dos datos, se obtuvo el valor promedio del diámetro de la diáfisis (DP), que se expresó en milímetros (mm) y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\mathbf{DP = (DLL + DCC) / 2}$$

D. Contenido de ceniza en tibia

Los análisis químicos fueron determinados a partir de las muestras de tibia izquierda, obtenidas de las aves sacrificadas a los 21 días. El análisis de cenizas se realizó por calcinación de las tibias (Martínez, 2012; Uculmana 2015a).

3.6.3 Variables de integridad esquelética

A. Capacidad para caminar

El día 21 se evaluó de manera cualitativa la capacidad para caminar del ave, la evaluación se realizó antes del sacrificio. Se planteó el score propuesto por Kestin *et al.* (1992):

- 6: normal.
- 5: defectos leves.
- 4: anormalidad definida para caminar.

- 3: lesión evidente.
- 2: gran dificultad para caminar.
- 1: incapacidad para sostenerse sobre sus patas.

B. Necrosis de cabeza femoral

El día 21 se evaluó la degeneración ósea del fémur de las aves sacrificadas, se siguió el procedimiento utilizado por Almeida paz *et al.* (2008), estudio en el que se emplea el índice de degeneración femoral, la escala va del 1 al 5, donde:

- 1: hueso sin lesión.
- 2: el cartílago está ausente en la cabeza femoral y el hueso está intacto.
- 3: la cabeza femoral no tiene el cartílago y está parcialmente rota.
- 4: la cabeza femoral está considerablemente dañada pero su contorno está aún visible.
- 5: la cabeza del fémur está completamente rota y no es posible reconocer su contorno (lesión clínicamente conocida como epifisiólisis femoral proximal).

C. Discondroplasia tibial

El día 21 se evaluará de manera cualitativa la discondroplasia tibia siguiendo el modelo de Thorp *et al.* (1997), el cual indica:

- 0: epífisis sin lesiones
- 1-3: placas de crecimiento con lesiones que varían desde bajo, moderado y severo.

3.7. Diseño estadístico

Se empleó el Diseño Completo al Azar con tres tratamientos y trece repeticiones. El análisis de varianza se realizó aplicando el procedimiento anova del programa statistical analysis system sas 9.0 (SAS, 2009) y la diferencia de medias empleando la Prueba de Duncan (1955). El modelo aditivo lineal general aplicado será el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = variable respuesta

μ = media general

T_i = i-ésimo tratamiento (i = 1, 2, 3)

ε_{ij} = error experimental

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se muestran en cuadros de acuerdo al grado de relación entre variables y se dividieron en: variables productivas, variables de morfometría ósea y variables de integridad esquelética.

4.1. Variables productivas

Los resultados de las variables productivas (peso vivo, ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimentaria) se presentan en el **Cuadro 2** y en el **ANEXO II**.

4.1.1. Peso vivo

Al evaluar dos tipos de fitasas, con respecto a una dieta sin fitasas, se encontró diferencias significativas a los 7 días ($P < 0.05$), 14 días ($P < 0.05$) y 21 días ($P < 0.05$).

En el día 7 solo hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la dieta control con la dieta control + Fitasa B, mas no entre la dieta Control + Fitasa A y la Dieta + Fitasa B, o entre la dieta control y la dieta control + Fitasa A; esto nos indica que el uso de fitasas afecta significativamente el peso desde la 1° semana (Godoy *et al.*, 2002) pero este resultado depende de la fitasa utilizada (Nagashiro, 2008; Korinna *et al.*, 2015).

Cuadro 2. Efecto del uso de fitasas sobre la respuesta productiva

Variables	Dietas experimentales		
	Control	Fitasa A	Fitasa B
Peso 7 días, g	169.55 ^b	175.75 ^{ab}	178.69 ^a
Peso 14 días, g	423.92 ^b	443.34 ^{ab}	459.60 ^a
Peso 21 días, g	829.07 ^b	853.01 ^{ab}	890.40 ^a
Consumo 21 días, g	1015.27 ^a	1032.79 ^a	1040.78 ^a
Conversión alimentaria 21 días	1.20 ^a	1.20 ^a	1.20 ^a

^{a, b} Promedios significativamente diferentes no comparten la misma letra ($P < 0.05$).

A los 14 días se observa la misma tendencia, es decir, la Fitasa B mostró ser superior significativamente ($P < 0.05$) a la dieta control, pero no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la dieta control y la Fitasa A, y entre la Fitasa A y B. Este resultado concuerda con lo encontrado por Peceros (2015) quien también encontró diferencias significativas de peso cuando utilizó fitasas; además, hay una influencia del mayor peso a la primera semana, que es directamente proporcional a los pesos posteriores (Zelenka, 2012).

Para el día 21, se mantiene la ventaja que tiene la Fitasa B para la variable: peso vivo; a esta edad la Fitasa B sigue teniendo diferencias significativas ($P < 0.05$) con la dieta control. Por otro lado, entre la dieta control y la Fitasa A, así como entre la Fitasa A y B no se encontró diferencias significativas ($P > 0.05$); lo que indica que la adición de la enzima fitasa mejora el peso corporal pero depende del tipo y de la cantidad de fitasa utilizada en la dieta (Nagashiro, 2008; Truong *et al.*, 2015).

Los resultados encontrados concuerdan con Kocabagli (2001), quien encontró que incrementando la suplementación de fitasa de 0 hasta 700 FTU/Kg de alimento el peso vivo se incrementaba en forma proporcional. Luego, en la investigación de Godoy *et al.*

(2002), se observó una tendencia similar, ya que el peso corporal de las aves (g) a la cuarta semana de edad aumentó significativamente ($P < 0.05$) con la incorporación de fitasa en la dieta y los mayores pesos se alcanzaron con el nivel de 0.65% fósforo total.

4.1.2. Consumo de alimento

No se encontró diferencias significativas en el consumo de alimento al día 21 ($P > 0.05$), esto concuerda con Walk *et al.*, (2012), quienes en su experimento no evidenciaron diferencias significativas en el consumo de alimento en 6 tratamientos que contenían 0, 500 y 5000 FTU/Kg de alimento para los niveles de 1.08 y 0.64% de calcio en las dietas; sin embargo, Godoy *et al.* (2002) si encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento ($P < 0.05$) y fue el nivel de 0.65% de fósforo total (Pt), junto a la utilización de la enzima fitasa la que reportó el mayor consumo y performance del animal.

En investigaciones recientes, Shang *et al.* (2015), tampoco encontraron diferencias significativas para el consumo de alimento de 0 a 14 días, cuando emplearon una dieta control negativa, una dieta control positiva y la adición de fitasa a la dieta control negativa; sin embargo, sí encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) para el consumo de alimento de 15 a 21 días, en donde el consumo de alimento fue mayor significativamente en la dieta suplementada con la enzima fitasa.

4.1.3. Conversión alimentaria

Al evaluar la conversión alimentaria a los 21 días, no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos; estos resultados concuerdan con una investigación reciente (Hermes *et al.*, 2013), en donde los pollos que fueron alimentados con una dieta que contenía fitasa (1000 FTU/Kg) más 25-OHD₃ (69 µg/Kg) no afectaron sus valores de consumo de alimento y conversión alimenticia, siendo similares a los valores de las aves alimentadas con una dieta control (sin contenido de fitasa y 25-OHD₃). En otros estudios también se

observó que la suplementación de fitasa ó 25-OHD₃ en dietas para pollos de carne, no afectó negativamente el consumo de alimento y la conversión alimenticia (Ahmad *et al.*, 2000; Driver *et al.*, 2005; Roberson *et al.*, 2005).

Walk *et al.* (2012) tampoco encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la conversión alimentaria en pollos de 16 días cuando adicionaron distintas dosis de fitasas a dietas con distintos niveles de calcio y fósforo. Este hallazgo también concuerda con una investigación reciente (Peceros, 2015) en donde el uso de fitasas, incluso cuando se le agrega vitamina D, no afecta significativamente ($P > 0.05$) la conversión alimentaria. Se puede decir que estamos frente a un aditivo que mejora el peso vivo final (Kocabagli, 2001) y la ganancia de peso (Godoy *et al.*, 2002), pero que no interfiere con la conversión alimentaria (Ahmadi y Rodehutsord, 2012; Peceros, 2015; Korinna *et al.*, 2015).

Sin embargo, Shang *et al.* (2015) encontraron que cuando a una dieta que contenía menos calcio y fósforo que el recomendado se le adicionaba fitasa, esta nueva dieta tenía una conversión alimentaria significativamente ($P < 0.05$) menor en comparación con la dieta control, esto debido al enfoque del experimento, en donde la mayor biodisponibilidad de la fuente de fósforo usada influyó directamente en los resultados productivos (Truong *et al.*, 2015; Uculmana y Vílchez, 2015).

4.2. Variables óseas

Los resultados de las variables óseas (peso, longitud y ancho de la tibia) así como el contenido de ceniza en tibia se presentan en el **Cuadro 3** y en los **ANEXOS III y IV**.

Cuadro 3. Efecto del uso de fitasas sobre la morfometría y mineralización ósea.

Variables	Dietas experimentales		
	Control	Fitasa A	Fitasa B
Peso de la tibia 21 días, g	1.60 ^{ab}	1.54 ^b	1.71 ^a
Longitud de la tibia 21 días, mm	62.09 ^b	62.73 ^b	64.37 ^a
Ancho de la tibia 21 días, mm	5.71 ^a	5.59 ^a	5.71 ^a
Ceniza en tibia 21 días, %	45.53 ^a	44.62 ^a	46.02 ^a

^{a, b} Promedios significativamente diferentes no comparten la misma letra ($P < 0.05$).

4.2.1. Peso de la tibia

El efecto de dos fitasas y una dieta control fue evaluado en el peso de la tibia a los 21 días, este presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) con un resultado numéricamente positivo hacia el Tratamiento 3. La fitasa B difiere significativamente ($P < 0.05$) de la fitasa A, es decir, con la Fitasa A se obtiene un mayor peso de tibia; mientras que entre la dieta control y la fitasa B no existen diferencias significativas ($P > 0.05$), del mismo modo que entre la dieta control y la fitasa A tampoco se encontró diferencias significativas ($P > 0.05$). Valores numéricos similares al peso de la tibia fueron reportados por Applegate y Lilburn (2003), quienes obtuvieron un valor promedio de 1.670 g; además Uculmana (2015) y Peceros (2015) también encontraron valores similares al del presente estudio.

Resultados similares al de la presente investigación fueron reportados por Kocabagli (2001), quien no encontró diferencias significativas ($P > 0.05$) para el peso de la tibia entre dietas con 300, 500 y 700 FTU/Kg de alimento y una dieta control libre de fitasas, indicador de que el uso de fitasas no afecta significativamente el peso de la tibia (Nagashiro, 2008).

4.2.2. Longitud de la tibia

Al evaluar dos fuentes de fitasas y una dieta sin ellas, se encontró diferencias significativas en la longitud de la tibia a los 21 días de edad ($P < 0.05$). La fitasa B difiere significativamente ($P < 0.05$) respecto a la dieta control y la fitasa A, es decir, con la Fitasa B se obtiene una mayor longitud de tibia con respecto a la Fitasa A y también frente a una dieta control; esto concuerda con Shim *et al.* (2011) quienes concluyeron que los pollos que presentan una mayor tasa de crecimiento poseen huesos más largos, anchos, pesados y fuertes que aquellos pollos que presentan una menor tasa de crecimiento, y el tratamiento que obtuvo los mayores pesos, también obtuvo los mayores valores para la longitud de la tibia.

La tibia ha sido ampliamente estudiada debido a la sensibilidad a numerosas deficiencias en la dieta (Leach y Lilburn, 1992) y a su alta tasa de crecimiento en comparación con otros huesos largos (Buckner *et al.*, 1950); además, la tibia es el hueso más largo y el que tiene la tasa de crecimiento más alta en comparación con el fémur y el tarso; este largo está estrechamente relacionado al peso del animal y este a su vez influenciado por el sexo (Buckner *et al.*, 1950).

A pesar de los resultados encontrados en la presente investigación, Kocabagli (2001) no encontró diferencias significativas ($P > 0.05$) para el largo de la tibia con la adición de fitasas.

4.2.3. Ancho de la tibia

El ancho de la tibia no mostró diferencias significativas cuando se evaluó dos fuentes de fitasas y una dieta control; estos resultados concuerdan con Kocabagli (2001), quien tampoco encontró diferencias significativas ($P > 0.05$) en el ancho de la tibia cuando evaluó 3 niveles de fitasas y una dieta control; del mismo modo, Peceros (2015) tampoco encontró

diferencias significativas entre sus tratamientos, los cuales incluían el uso de fitasas y vitamina D.

Según Baranova *et al.* (2008; citado por Peceros, 2015) la relación calcio:fósforo no afecta significativamente el ancho de los huesos. Además, en los estudios de Sebastian *et al.* (1996; 1998) tampoco se encontraron diferencias significativas en el ancho de los huesos; posiblemente debido a que ni siquiera un cambio en la relación de calcio:fósforo afecte significativamente ($P>0.05$) esta variable (Uculmana, 2015a; 2015b).

Williams *et al.* (2000a) hicieron un estudio en el que comparaban el ancho de la tibia en dos líneas genéticas de pollos de engorde (línea del año 1972 y una línea actual), encontrando que existe una diferencia significativa en el ancho de este hueso con respecto a la línea genética; a los 18 días reportaron una longitud de 5.0 y 3.8 mm para las líneas genéticas de 1972 y la moderna respectivamente, indicativo de la reducción significativa del ancho de este hueso con el paso del tiempo.

4.2.4. Contenido de ceniza en tibia

El contenido de ceniza en tibia no mostró ser influenciado significativamente por los tratamientos; esto indica que el uso de fitasas en la dieta no afecta la mineralización ósea, principal variable a evaluar cuando se trabaja con niveles de calcio, fósforo, vitamina D y/o fitasas (Ammerman *et al.*, 1995).

Investigaciones concuerdan con lo encontrado en la presente investigación ya que muestran que el uso de fitasas no afecta significativamente el contenido de ceniza en tibia; así, Walk *et al.* (2012), no encontraron diferencias significativas cuando adicionaron distintas dosis de fitasas a dietas con distintas relaciones calcio: fósforo; otro caso es el de Onyango *et al.* (2005), quienes tampoco encontraron diferencias significativas al usar distintas dosis e incluso superdosis de fitasas en la dieta de pollos de 8 a 21 días de edad. Además, en un estudio realizado por Ahmad *et al.* (2000) concluyen que pollos

alimentados con una dieta conteniendo fitasa, con nivel normal de calcio y bajo de fósforo no fítico (0.36 %) obtuvieron similar ($P>0.05$) contenido de ceniza en el hueso en relación a pollos alimentados con una dieta conteniendo niveles normales de calcio y fósforo.

Sin embargo, investigación como la de Godoy *et al.* (2002) no concuerda con los resultados encontrados en el presente estudio, ellos sí encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) en el contenido de ceniza en tibia de las aves alimentadas con diferentes niveles de fósforo y de incorporación de fitasas; Kocabagli (2001) también encontró diferencias significativas ($P<0.05$) cuando evaluó 3 niveles de fitasas comerciales frente a una dieta control, en este estudio se evidenció que los diferentes niveles de fitasas tuvieron un resultado estadísticamente similar ($P>0.05$), pero cada una de estas dietas fue significativamente diferente ($P<0.05$) y superior a la dieta control, lo que demuestra que el uso de fitasas mejora y/o incrementa el contenido de ceniza en tibia, ya que el fósforo liberado del insumo vegetal es más biodisponible que el fósforo inerte (Ammerman *et al.*, 1995; Yi *et al.*, 1996; Nagashiro, 2008).

4.3. Variables de integridad esquelética

Los resultados de las variables de integridad esquelética (necrosis de cabeza femoral, discondroplasia tibial y capacidad para caminar) se muestran en el **Cuadro 4** y en el **ANEXO V**.

Ninguna de las variables de integridad esquelética presentó diferencias significativas, lo que indica que el uso de fitasas en la dieta no causa alteraciones esqueléticas negativas en el pollo de engorde. Es importante el uso de las variables de integridad esquelética en estudios que incluyan niveles de calcio, fósforo, vitamina D y/o fitasas, para asegurar que resultados de investigaciones en este campo se repliquen en situaciones comerciales (Uculmana, 2015a). Existen pocas investigaciones en las que se haya empleado variables de integridad esquelética cuando se ha probado la eficacia de las fitasas (Peceros, 2015), incluso, en estudios recientes (Uculmana, 2015a) se recomienda su utilización.

Cuadro 4. Efecto del uso de fitasas sobre la integridad esquelética

Variables	Dietas experimentales		
	Control	Fitasa A	Fitasa B
Necrosis de cabeza femoral	1.10 ^a	1.04 ^a	1.04 ^a
Discondroplasia tibial	1.12 ^a	1.19 ^a	1.31 ^a
Capacidad para caminar	5.30 ^a	5.25 ^a	5.12 ^a

^a Promedios iguales estadísticamente comparten la misma letra ($P>0.05$).

4.3.1. Necrosis de cabeza femoral

La necrosis de la cabeza de fémur, al ser evaluada con dos fitasas y una dieta control, no mostró ser afectada significativamente por los tratamientos, a pesar de ser uno de los mayores problemas que afronta la avicultura moderna (Whitehead, 2009). Es importante su medición en experimentos de este tipo ya que se permite tener un panorama más amplio acerca de la integridad esquelética (Martínez, 2012; Peceros, 2015; Uculmana, 2015a).

La patología conocida como necrosis de cabeza femoral solo se reportó en casos leves para todos los tratamientos, posiblemente debido a que en situaciones de laboratorio esta patología no se exprese adecuadamente, ya que necesita de una disbacteriosis a nivel de tracto gastrointestinal para que las bacterias se trasloquen al área entre la cabeza del fémur y el acetábulo (Whitehead, 2009; Martínez, 2012).

4.3.2. Discondroplasia tibial

Al evaluar la discondroplasia de la tibia con dos fitasas comerciales y una dieta sin ella, no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos. En general, no se reportó casos severos de discondroplasia tibial para los tres tratamientos. Lo que se quería reportar al

evaluar esta variable es el hecho de que el uso de fitasas no presente complicaciones a nivel de esta patología ósea, por lo que su uso en dietas comerciales es viable (Roberson *et al.*, 2000), encontrándose incluso tendencias numéricas a presentarse menos casos o casos más leves de discondroplasia tibial en dietas que contienen fitasas (Whitehead, 2009); algo importante que cabe resaltar en este punto es que la discondroplasia es una patología ósea (Whitehead, 2009) que puede presentarse en todos los huesos largos del ave; sin embargo, su uso amplio a nivel de tibia se da porque este hueso es el que tiene la mayor tasa de crecimiento en comparación con el fémur y el tarso (Uculmana 2015a, 2015b, 2015c). Cabe mencionar que en la búsqueda de bibliografía referida al uso de fitasas en dietas de pollos de engorde, no se encontró que la discondroplasia tibial haya sido tomada como criterio de evaluación, por lo que los datos encontrados pueden servir de contraste para futuras investigaciones en este rubro.

4.3.3. Capacidad para caminar

La capacidad para caminar de las aves no se vio afectada significativamente ($P > 0.05$) cuando se evaluó dos fitasas y una dieta control. Peceros (2015) tampoco encontró diferencias significativas en cuanto a la capacidad para caminar cuando utilizó una dieta con fitasa y sin ella.

En estudios previos se reporta que la capacidad para caminar se ve afectada significativamente ($P < 0.05$) cuando la relación calcio a fósforo se encuentra por debajo de 1.55 (Uculmana, 2015a; 2015b), pero en el presente estudio no se reportó casos severos de problemas a nivel locomotor, ya que las dietas, suplementadas con fitasas o no, cumplían con los requerimientos nutricionales de las aves en desarrollo.

A pesar que los problemas esqueléticos terminan en un deterioro en la capacidad para caminar (Whitehead, 2009), no hay muchos estudios que utilicen esta variable de respuesta; sin embargo, se ha recomendado su uso para tener un panorama más amplio sobre el estado de salud ósea en las parvadas de pollos de engorde (Uculmana, 2015a).

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó el presente estudio se concluye lo siguiente:

El uso de fitasa no afecta el consumo de alimento ni la conversión alimentaria; sin embargo, si afecta al peso vivo y en esta última variable los tratamientos con incorporación de fitasa resulta ser mejores que el control.

El uso de fitasas afectó el peso de la tibia y la longitud de la misma, en este sentido, la Fitasa B tuvo el mayor peso de tibia y la mayor longitud de tibia con respecto a los otros tratamientos; además, no se encontró diferencias ni para el ancho de la tibia ni para el contenido de ceniza en tibia.

El uso de fitasas no afectó a las variables de integridad esquelética como la capacidad para caminar, discondroplasia tibial y necrosis de cabeza femoral, con respecto al control.

VI. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se recomienda lo siguiente:

Utilizar fitasa en la dieta para tener una mayor respuesta productiva, mayores valores de morfometría ósea y una adecuada integridad esquelética.

Evaluar la Fitasas A y B en alimento peletizado y en suplementaciones mayores a las indicadas en el presente estudio.

Utilizar variables de integridad esquelética para predecir el comportamiento de las aves en situaciones comerciales.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A.; CÁRDENAS MAYRA. 2006. Enzimas en la alimentación de aves. Fitasas. Revista Cubana de Ciencia Agrícola 40: 377-387.

AHMAD T. RASOOL, S. SARWAR, M. HAQ, A. HASAN, Z. 2000. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 83: 103-114.

AHMADI, H.; M. RODEHUTSCORD. 2012. A meta-analysis of responses to dietary nonphytate phosphorus and phytase in laying hens. *Poultry Sci.* 91:2072–2078.

ALMEIDA PAZ I. C. L.; MENDES A. A.; BALOG A.; VULCANO L. C.; BALLARIN A. W.; ALMEIDA I. C. L.; TAKAHASHI S. E.; KOMIYAMA C. M.; SILVA M. C.; CARDOSO K. F. G. 2008. Study on the bone mineral density of broiler suffering femoral joint degenerative lesions. *Brazilian Journal of Poultry Science* 10: 103-108.

AMMERMAN, C. B.; D. H. BAKER; A. J. LEWIS. 1995. Bioavailability of nutrients for animals: Amino acids, minerals and vitamins. Academic Press San Diego.

ANSAR, M., S. A. KHAN, Z. I. CHAUDHARY, N. A. MIAN, M. Y. TIPU, AND M. F. RAI. 2004. Effects of high dietary calcium and low phosphorus on urinary system of broiler chicks. *Pakistan Vet. J.* 24:113-116.

APPLEGATE, T.J.; JAERN, B.C.; NASSBAUN, D.L.; ANGEL, R. 2003. Water soluble phosphorous in fresh broiler litter is dependent upon phosphorous concentration fed but not on fungal phytase supplementation. *Poultry. Sci.* 82: 1024-1029.

AUGSPURGER, N. BAKER, D. 2004. Phytase improve dietary calcium utilization in chicks and oyster shell, carbonate, citrate, and citrate- malate, forms of calcium are equally bioavailable. *Nutrition Research* 24: 293-301.

BARKLEY, G. R.; MILLER, H. M. Y J. M. FORBES.2004. The ability of laying hens to regulate phosphorus intake when offered two feed containing different levels of phosphorus. *Br. J. Nutr.* 92: 233-240.

BOLLING, S. DOUGLAS, M. JOHNSON, M. WANG, X. PARSONS, C. 2000. The Effects of Dietary Available Phosphorus Levels and Phytase on Performance of Young and Older Laying Hens. *Poultry Sci.* 79:224–230.

BOWES, V. A.; JULIAN, R. J. 1988. Organ weights of normal broilers chickens and those dying of sudden death syndrome. *Can Vet. J.* 29: 153-156.

BUCKNER, G. D., W. M. INSKO, JR., A. HARMS-HENRY, AND E. FAULL-WACHS. 1950. The comparative rates of growth and calcification of the femur, tibia and metatarsus bones of the male and female new hampshire chicken having straight keel. *Poultry Sci.* 29:332–335.

CASSIS, C. 1984. Metabolismo del calcio y del fósforo. Conferencia presentada en el curso "presente y futuro del paciente nefrológico". Universidad del norte. Barranquilla, Colombia.

CASSIUS, J. 2005. The influence of calcium intake by broiler breeders on bone development and egg characteristics. Thesis tesis philosophiae doctor (Ph.D.). Departamento de animales, ciencias de la vida silvestre y de pastizales. Universidad del estado libre, bloemfontein, República de Sudáfrica. 233 pág.

CASTRO M Y RODRIGUEZ F.2005. Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Revista Corpoica* N°4.

COLLINS, D., GIBSON, G. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Journal Clinical Nutrition* 69: 1025-1027

COWIESON, A. J.; P. WILCOCK; M. R. BEDFORD. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Sci. J.* 67:225–235.

DOZIER, W. KIDD M. CORZO A. OWENS P. BRANTON S. 2007. live performance and environmental impact of broiler chickens fed diets varying in amino acid and phytase. *Animal Feed Science and Technology* 141: 92-103.

DRIVER J. P.; J. M. PESTI; R. I. BAKALLI; H. M. EDWARDS Jr. 2005. Calcium Requeriments of the Modern Broiler Chicken as Influenced by Dietary Protein and Age. *Poultry Sci.* 84: 1629-1639.

EECKHOUT, W., AND M. DE PAEPE. 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 47:19-29.

ENGELEN AJ; VAN DER HEEFT FC; RANDSDORP PHG; SMIT ELC. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International* 77(3):760-764.

FERNANDES, J.I.M.; LIMA, F.R.; MENDONCA, J. R.; MABE, I.; ALBUQUERQUE, R.; LEAL, P.M. 1999. Relative bioavailability of phosphorus in feed and agricultural phosphates for poultry. *Poultry Sci.* 78: 1729-1736.

GARCÍA, A. 2003. Homeostasis del calcio durante procesos reproductores. Conferencia de la Real Academia de Ciencias Veterinarias.

GILLIS, M. B., L. C. NORRIS AND G. F. HEUSER. 1948. The utilization by the chick of phosphorus from different sources. *J. Nutrition.* 35:195-207.

GILLIS, M. B.; NORRIS, L. C. Y HEUSER, G. F. 1954. Studies on the biological value of inorganic phosphates. *J. Nutritión.* 52:115

GODOY, S.; G. HERNÁNDEZ Y C. CHICCO. 2002. Effect of supplemental microbial phytase on the utilization of phosphorus phytate in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Revista Científica XII:* 519-523.

GUO, Y. SHI, Y, LI, F. CHEN J. ZHEN C. HAO C. 2009. Effects of sodium gluconate and phytase on performance and bone characteristics in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 150: 270-282.

HAMDI, M.; SOLA-ORIOLE, D., DAVIN, R.; PEREZ, J.F. 2015. Calcium sources and their interaction with the different levels of non-phytate phosphorus affect performance and bone mineralisation in broiler chickens. *Poultry Sci.* 94: 2136–2143.

JUANPERE J. PÉREZ-VENDRELL A. BRUFAU J. 2004. Effect of microbial phytase on broiler feed barley-based diets in the presence or not of endogenous phytase. *Animal Feed Science and Technology* 115: 265-279.

KESHAVARZ, K. AUSTIC R. 2004. The Use of Low-Protein, Low- Phosphorus, Amino Acid- and Phytase-Supplemented Diets on Laying Hen Performance and Nitrogen and Phosphorus Excretion. *Poultry Sci.* 83: 75-83.

KESTIN S.C.; T.G. KNOWLES; A.E. TINCH; N.G. GREGORY. 1992. Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. *Veterinary Record* 131(9): 190-194.

KOCABAGLI N. 2001. The effect of dietary phytase supplementation at different levels on tibia bone characteristics and strength in broilers. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 25: 797 – 802.

KORINNA HUBER; ELLEN ZELLER; MARKUS RODEHUTSCORD. 2015. Modulation of small intestinal phosphate transporter by dietary supplements of mineral phosphorus and phytase in broilers. *Poultry Sci.* 94: 1009 – 1017.

LIMA, F.R.; MENDONÇA, J. R.; ALVAREZ, J.C.; GARZILLO, J.M.F.; CHION, E.; LEAL, P.M. 1997. Biological evaluation of commercial dicalcium phosphates as sources of available phosphorus for broiler chicks. *Poultry Sci.* 76: 1707-1713.

LIMA, F.R.; FERNANDES, J.I.M.; OLIVEIRA, E.; FRONZAGLIA, G.C.; KAHN, H. 1999. Laboratory evaluations of feed-grade and agricultural-grade phosphates. *Poultry Sci.* 78: 1717-1728.

LEACH, R. M., JR., AND M. S. LILBURN. 1992. Current knowledge on the etiology of tibial dyschondroplasia in the avian species. *Poult. Sci. Rev.* 4:57–65.

LEYTEM A. WILLING B. TACKER P. 2007. Phytate and phosphorus excretion by broiler chickens fed diets containing cereal grains varying in phytate and phytase content utilization. *Animal Feed Science and Technology* 146: 160-168.

MAENZ, D. CLASSEN H. 1998. Phytase Activity in the Small Intestinal Brush Border Membrane of the Chicken. *Poultry Sci.* 77: 557–563.

MAENZ D. 2001. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. *Enzyme in farm animal nutrition* 48: 61-63.

MANANGI M. COON C. 2008. Phytate phosphorus hydrolysis en broilers in response to dietary phytase, Calcium and phosphorus concentrations. *Poultry Sci.* 87: 1577-1586.

MARTÍNEZ P., D. 2012. Evaluación de un producto a base de aceite esencial de orégano sobre la integridad intestinal, la capacidad de absorción de nutrientes y el comportamiento productivo de pollos de carne. Tesis para optar el grado de Mg. Sc. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú.

MORAN, E. 2004. Use of exogenous corn-soybean meal enzymes to relieve food pathogen infections in broilers. *Arkansas Nutrition Conference Proc.*

NAGASHIRO, C. 2008. Actualidad del uso de enzimas en la nutrición de aves. DSM Nutritional Products. 1° Pre – Congreso de Enzimas - Venezuela.

NAHM. K. 2007. Feed formulation to reduce N excretion and ammonia emission from poultry manure. *Bioresource Technology.* 2007; 98: 2288-2300.

NIE, W.; Y. YANG; J. YUAN; Z. WANG; Y. GUO. 2013. Effect of dietary nonphytate phosphorus on laying performance and small intestinal epithelial phosphate transporter expression in Dwarf pink-shell laying hens. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4:34.

ONYANGO E. M.; BEDFORD M. R.; ADEOLA O. 2005. Efficacy of an envolved Eschrerichia coli Phytase in diets of broiler chicks. Poultry Sci. 84: 248 – 255.

PECEROS R., G. 2015. Respuesta productiva, mineralización e integridad de tibias de pollos de carne con dietas suplementadas con fitasas y 25-Hidroxicolecalciferol. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Universidad Nacional Agraria la Molina.

RAMA, R. REDDY R, RAMASUBBA R. 1998. Enhancement of phytate phosphorus availability in the diets of comercial broilers and layers. Animal Feed Science and Technology 211-222.

RATH, NC; BALOG, JM; HUFF, GR; KULKARNI, GB; TIERCE, JF. 1999. Comparative differences in the composition and biomechanical properties of tibiae of seven and seventy two week old male and female broiler breeder chickens. Poultry Sci. 78: 1232-1239.

RATH, NC; HUFF, GR; HUFF, WW; BALOG, JM. 2000. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. Poultry Sci. 79: 1024 -1032.

RAVINDRAN, V., W. L. BRYDEN, AND E. T. KORNEGAY. 1995. Phytates: Occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. Poult. Avian Biol. Rev. 6:125–143.

ROBERSON, K. D.; LEDWABA, M. F. y. CHARBENEAU. R. A. 2005. Studies on the efficacy of twenty-five-hydroxycholecalciferol to prevent tibial dyschondroplasia in Ross broilers fed marginal calcium to market age. International Journal of Poultry Science 4: 85-90.

RODEHUTSCORD, M. 2009. Approaches and challenges for evaluating phosphorus sources for poultry. Proc. 17th European Symposium on Poultry Nutrition. Edinburgh, Scotland.

ROMERO NÚÑEZ C.; SALAS-RAMIREZ M.; G. CONTRERAS; A. MENDOZA; MARTÍNEZ G.; PLATA-PÉREZ F. 2009. Efecto de una fitasa en la digestibilidad y

actividad de tripsiona y quimiotripsina en cerdos destetados. Archivos de Zootecnia 58: 223. 366-369.

ROSMINI, M., SEQUEIRA. G., GUERRERO, L., MARTI, L., DALLA. 2004. Producción de Prebióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. Revista Mexicana de Ingeniería Química 3: 181-191.

SEBASTIAN, S., TOUCHBURN, S.P. & CHAVEZ, E.R. 1996. Efficacy of supplemental microbial phytase at different calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. Poultry Sci. 75:1516-1523.

SEBASTIAN, S; TOUCHBURN S. P.; E. R. CHAVEZ. 1998. Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: A Review. World's Poultry Science J. 54: 27 – 47.

SELLER, P. COWIESON, A. RAVINDRAN V. 2009. Consequences of calciuminteractions whit phytate and phytase for poultry and pigs. Livestock Science 124: 126-141.

SHANG Y.; ROGIEWICZ A.; R. PATTERSON; B. A. SLOMINSKI; W. K. KIM. 2015. The effect of phytase and fructiiligosaccharide supplementation on growth performance, bone quality, and phosphorus utilization in broiler chickens.

SHIM, M. Y.; PARR, C. y PESTI, G. M. 2011. The effects of dietary fluoride on growth and bone mineralization in broiler chicks. Poultry Sci. 90 :1967–1974.

SIMONS, P. C., H. A. J. VERSTEEGH, A. W. JONGBLOED, AND P. A. KEMME. 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. Br. J. Nutrition. 64:525–540.

SMITH, M.; MADRAZO, G.; GUEVARA, C.; MARTIN, O. 2001. Niveles de vitamina D3, calcio y fósforo disponible en dietas para aves reproductoras ligeras white leghorn. Rev. Cub. Cienc. Avic. 25: 113-118.

SNOW, J. DOUGLAS, M.; PARSONS C.2003. Phytase Effects on Amino Acid Digestibility in Molted Laying Hens. Poultry Sci. 82: 474–477.

STARNE, D. PADMANHABAN, P. SHIVENDRA, S. Effect of P source on growth, P accumulation and activities of phytase and acid phosphatases in two cultivars of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*). *Plant Physiology and Biochemistry*. 2007; 46: 580-589.

THORP B.H.; WADDINGTON D. 1997. Relationship between the bone pathologies, ash and mineral content of long bones in 35 day old broiler chickens. *Research in Veterinary Science* 62: 67.73.

TRUONG, H.H.; BOLD, R.M.; LIU, S.Y.; SELLE, P.H. 2015. Standard phytase inclusion in maize-based broiler diets enhances digestibility coefficients of starch, amino acids and sodium in four small intestinal segments and digestive dynamics of starch and protein. *Animal Feed Science and Technology* 209: 240–248.

UCULMANA M., C. 2015a. Efecto de la relación calcio:fósforo disponible sobre el crecimiento alométrico, morfometría, integridad y mineralización ósea en pollos de engorde. Tesis para optar el Título de Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional Agraria la Molina.

UCULMANA M., C.; MARTÍNEZ, D.; VÍLCHEZ, C. 2015b. Efecto de la relación Ca:Pd sobre la morfometría ósea, integridad esquelética y crecimiento alométrico en pollos de engorde. *Memorias VIII Seminario AMEVEA* 2015.

UCULMANA M., C. ; MARTÍNEZ, D.; VÍLCHEZ, C. 2015c. Morfometría ósea y crecimiento alométrico como indicadores de porcentaje de ceniza en tibia. *Memorias Congreso Latinoamericano de Avicultura*. Ecuador 2015.

UCULMANA M., C.; VÍLCHEZ, C. 2015d. ¿Son todos los fosfatos iguales? *Actualidad Avipecuaria* N° 49:25-26.

VINCENT, J.B., CROWDER, M.W. & AVERILL, B.A. 1992. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem. Sci.* 17:105.

VIVEROS A, ARIJA I, CENTENO C, BRENES A. 2002. Efecto de la administración de fitasas de origen vegetal y microbiano sobre la utilización del P en pollos Broiler. *Produccion Sanidad Animal* 17: 1-22.

WALK, C. L., M. R. BEDFORD, AND A. P. MCELROY. 2012. Influence of limestone and phytase on broiler performance, gastrointestinal pH, and apparent ileal nutrient digestibility. *Poultry Sci.* 91:1371– 1378.

WALK, C. L.; T. T. SANTOS; M. R. BEDFORD. 2014. Influence of superdoses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. *Poultry Sci.* 93:1172–1177.

WEEKS C. A.; T. D. DANBURY; H. C. DAVIES P.; S. C. HUNT. 2000. The behavior of broiler chickens and its modification by lameness. *App. Anim. Behav. Sci.* 67: 111-125.

WHITEHEAD, C. 1995. Influencia de la nutrición sobre el metabolismo macromineral: desarrollo del hueso y calidad de la cáscara. XI curso de especialización fedna, institute roslin, edimburgo. 8 pág.

WHITEHEAD, C. 2009. Nutritional factors in current broiler bone problems. XLVI Symposium Científico de Avicultura. Zaragoza, Septiembre 2009. 12 pág.

WILLIAMS, B.; SOLOMON, S.; WADDINGTON, D.; THORP, B.; FARQUHARSON, C. 2000a. Skeletal development in the meat-type chicken. *British Poultry Science* 41, 141-149.

WILLIAMS, B.; WADDINGTON, D.; SOLOMON, S.; FARQUHARSON, C. 2000b. Dietary effects on bone quality and turnover, and Ca and P metabolism in chickens. *Research in Veterinary Science* 69: 81-87.

WU, W; M. E. COOK; Q. CHU; B. SMALLEY. 1993. Tibial dyschondroplasia of chickens induced by fusarochromanone, a micotoxin. *Avian Dis.* 37: 302-309.

YI, Z., E. KOMEGAY, V. RAVINDRAN AND D. DENBOW, 1996. Effect of microbial phytase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of turkey poult fed corn-soybean meal diets. *Poultry Sci.* 75: 979-990.

YU, S.; A. COWIESON; C. GILBERT; P. PLUMSTEAD; S. DALSGAARD. 2012. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1–5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *J. Anim. Sci.* 90:1824–1832.

ZELENKA, J. 2012. Allometric growth of copper, zinc, manganese and iron in slow – and fast – growing young chickens. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brumensis*1: 237-241.

VIII. ANEXO

ANEXO I. Evaluación nutricional del alimento inicio y crecimiento (LENA – 2015).

Tipo de Alimento	P, %	Ca, %
Inicio – T1	0.66	1.22
Inicio – T2	0.38	0.93
Inicio – T3	0.49	0.99
Crecimiento – T1	0.63	1.09
Crecimiento – T2	0.52	0.84
Crecimiento T3	0.56	0.90

ANEXO II. Variables productivas a los 21 días

Trat.	Repet.	Peso 7 días	Peso 14 días	Peso 21 días	Consumo 21 días	Conversión alimentaria 21 días
Unidad		g	g	g	g	g/g
P (probabilidad)		0.021	0.003	0.008	0.593	0.962
1	1	170.80	394.80	808.60	1092.80	1.24
1	2	166.40	418.40	827.80	1081.35	1.31
1	3	176.00	448.60	884.20	888.40	1.24
1	4	178.80	438.20	812.50	1072.00	1.14
1	5	172.00	448.20	782.60	989.75	1.25
1	6	154.60	391.00	800.25	1026.60	1.28
1	7	170.60	435.00	815.80	986.80	1.12
1	8	164.80	400.20	822.20	1093.00	1.19
1	9	180.60	433.80	870.20	975.60	1.18
1	10	161.20	428.20	864.20	957.60	1.20
1	11	159.40	405.00	817.25	1104.00	1.21
1	12	177.20	460.20	879.80	925.60	1.14
1	13	171.80	409.40	792.50	1005.00	1.15
Promedio T1		169.55	423.92	829.07	1015.27	1.20
2	1	183.60	417.00	824.25	1077.40	1.21
2	2	175.60	460.25	901.25	949.60	1.22
2	3	175.20	398.60	714.00	921.25	1.15
2	4	158.60	444.00	823.60	1008.60	1.24
2	5	180.20	419.40	883.20	1096.80	1.18
2	6	178.60	445.00	824.00	1012.80	1.23
2	7	171.40	467.00	947.40	993.80	1.15
2	8	172.00	449.20	898.80	1052.60	1.22
2	9	165.60	417.60	803.60	1009.20	1.29
2	10	176.00	482.20	888.60	1086.40	1.15
2	11	172.00	419.00	781.20	1095.40	1.22
2	12	191.20	472.40	897.60	1055.60	1.19
2	13	184.80	471.80	901.60	1066.85	1.18
Promedio T2		175.75	443.34	853.01	1032.79	1.20
3	1	181.60	474.20	937.80	1155.00	1.22
3	2	184.40	463.80	919.00	1070.20	1.19
3	3	172.40	462.20	902.20	1061.40	1.23
3	4	195.60	451.20	862.40	1046.20	1.19
3	5	178.60	467.80	909.60	899.60	1.05
3	6	179.40	443.20	860.00	972.20	1.20
3	7	173.80	460.80	876.60	1081.40	1.24
3	8	175.80	468.80	893.60	1047.15	1.27
3	9	188.80	491.00	942.20	1065.00	1.19
3	10	173.20	410.20	800.60	1102.60	1.22
3	11	169.60	447.20	882.80	1075.40	1.20
3	12	167.80	429.80	861.00	963.20	1.17
3	13	182.00	504.60	927.40	990.80	1.21
Promedio T3		178.69	459.60	890.40	1040.78	1.20

ANEXO III.

Variables óseas a los 21 días

Trat	Repet	Peso de la tibia 21 días	Longitud de la tibia 21 días	Ancho de la tibia 21 días
Unidad		g	mm	Mm
P (probabilidad)		0.022	0.003	0.492
1	1	1.67	62.50	5.63
1	2	1.64	59.62	6.84
1	3	1.73	61.11	5.93
1	4	1.24	60.54	5.10
1	5	1.23	57.24	5.30
1	6	1.50	60.16	5.79
1	7	1.73	66.93	5.90
1	8	1.81	64.37	5.71
1	9	1.50	64.87	5.70
1	10	1.87	66.67	5.90
1	11	1.40	59.52	6.16
1	12	1.64	61.12	5.91
1	13	1.54	61.22	6.04
1	14	1.60	62.69	5.26
1	15	1.43	59.16	5.55
1	16	1.81	65.11	6.07
1	17	1.28	61.40	4.89
1	18	1.62	62.29	5.83
1	19	1.75	64.56	5.53
1	20	1.86	62.76	6.17
1	21	1.66	62.18	5.57
1	22	1.77	63.03	6.29
1	23	1.54	57.29	5.09
1	24	1.57	61.72	5.70
1	25	1.43	62.28	4.85
1	26	1.80	64.10	5.90
Promedio T1		1.60	62.09	5.71
2	1	2.09	68.05	6.44
2	2	1.44	62.69	5.34
2	3	1.99	66.19	6.31
2	4	1.88	65.58	5.98
2	5	1.53	64.19	5.35
2	6	1.31	59.44	5.50
2	7	1.35	62.34	4.82
2	8	1.62	62.96	5.93
2	9	1.91	65.64	5.69
2	10	1.44	61.57	5.48
2	11	1.20	60.37	4.92

2	12	2.02	66.92	5.81
2	13	1.50	62.47	5.81
2	14	1.51	62.26	6.06
2	15	1.50	61.73	5.78
2	16	1.82	66.09	5.95
2	17	1.35	60.62	5.28
2	18	1.51	61.69	5.13
2	19	1.08	56.25	5.39
2	20	1.26	60.31	5.31
2	21	1.63	64.38	5.68
2	22	1.50	62.27	5.90
2	23	1.35	60.61	5.64
2	24	1.32	58.12	5.21
2	25	1.61	64.51	5.40
2	26	1.41	63.65	5.36
Promedio T2		1.54	62.73	5.59
3	1	1.99	66.64	5.75
3	2	1.72	62.78	5.91
3	3	1.80	65.70	5.75
3	4	1.61	66.46	5.32
3	5	1.99	63.43	5.73
3	6	1.82	66.15	5.96
3	7	1.56	60.76	5.57
3	8	1.70	65.51	5.59
3	9	2.08	67.58	5.96
3	10	1.99	64.54	6.65
3	11	1.35	61.73	5.04
3	12	1.67	65.32	6.12
3	13	1.57	64.67	5.14
3	14	1.77	64.36	5.54
3	15	1.71	66.99	5.69
3	16	1.34	62.16	5.42
3	17	1.73	64.02	5.59
3	18	1.48	64.58	5.35
3	19	2.04	67.37	6.15
3	20	1.64	64.10	5.69
3	21	1.74	64.46	6.01
3	22	1.55	62.18	4.98
3	23	1.72	63.48	5.99
3	24	1.65	63.53	6.15
3	25	1.48	61.06	5.63
3	26	1.82	63.97	5.77
Promedio T3		1.71	64.37	5.71

ANEXO IV. Variables de integridad esquelética a los 21 días

Trat.	Repet.	Necrosis de cabeza femoral	Discondroplasia tibial	Capacidad para caminar
Unidad		Escala	escala	escala
P (probabilidad)		0.693	0.355	0.384
1	1	1.00	1.00	5.60
1	2	2.00	1.00	5.20
1	3	1.00	1.00	5.00
1	4	1.00	1.50	5.50
1	5	1.25	1.00	4.40
1	6	1.00	1.00	5.50
1	7	1.00	1.00	4.60
1	8	1.00	1.00	5.60
1	9	1.00	1.00	5.80
1	10	1.00	1.00	5.40
1	11	1.00	1.00	5.75
1	12	1.00	1.50	5.00
1	13	1.00	1.50	5.50
Promedio T1		1.10	1.12	5.30
2	1	1.00	1.00	5.00
2	2	1.00	1.00	5.00
2	3	1.00	2.50	5.40
2	4	1.00	1.00	5.40
2	5	1.00	1.00	5.20
2	6	1.00	1.00	5.25
2	7	1.00	1.00	5.00
2	8	1.00	1.00	5.80
2	9	1.00	1.00	5.40
2	10	1.00	1.50	5.60
2	11	1.00	1.00	5.00
2	12	1.50	1.50	4.40
2	13	1.00	1.00	5.80
Promedio T2		1.04	1.19	5.25
3	1	1.00	2.00	5.20
3	2	1.00	1.50	5.60
3	3	1.00	1.50	5.00
3	4	1.00	1.00	4.40
3	5	1.00	1.50	5.00
3	6	1.00	1.00	5.60
3	7	1.50	1.00	5.40
3	8	1.00	1.00	5.80
3	9	1.00	1.00	3.40
3	10	1.00	1.50	5.80
3	11	1.00	1.50	4.60
3	12	1.00	1.50	5.40
3	13	1.00	1.00	5.40
Promedio T3		1.04	1.31	5.12

ANEXO V. Contenido de ceniza en tibia a los 21 días

Trat.	Repet.	Ceniza en tibia 21 días
Unidad		%
P (probabilidad)		0.235
1	1	45.09
1	2	47.30
1	3	42.52
1	4	45.86
1	5	45.77
1	6	47.40
1	7	47.35
1	8	45.04
1	9	42.36
1	10	46.61
Promedio T1		45.53
2	1	45.53
2	2	43.98
2	3	44.91
2	4	46.76
2	5	45.94
2	6	42.65
2	7	42.33
2	8	42.00
2	9	45.70
2	10	46.42
Promedio T2		44.62
3	1	45.63
3	2	44.46
3	3	44.53
3	4	42.85
3	5	46.99
3	6	47.01
3	7	45.10
3	8	47.51
3	9	47.10
3	10	49.04
Promedio T3		46.02

ANEXO VI. Contenido nutricional de la Fitasa A

La Fitasa A aporta 6-fitasa (10.000 FTU / g) con una forma de producto obtenida mediante una nueva tecnología GT (Granulado Termoestable) patentada por Novozymes, que le confiere mayor estabilidad y resistencia a las altas temperatura de granulación (hasta 95°C), manteniendo una efica óptima en el aparato digestivo de las aves y de los cerdos.

La fitasa A tiene una excelente fluidez para una correcta dosificación, alto número de partículas para una mejor homogenización (14.000 partículas/g y 500 µm de diámetro medio) y está libre de polvo para un manejo más seguro durante el proceso de fabricación y suministro del pienso.

Cuadro. Matriz Nutricional de la Fitasa A

Nutriente, %	Fitasa A
Fósforo disponible	1300
Calcio	1430
Sodio	300
Proteína Total	3650
Energía Metabolizable, Kcal/kg	450140
Lisina	150
Metionina	33
Cisteina	297
Metionina + Cisteina	330
Treonina	290
Triptofano	170
Isoleucina	220
Arginina	110
Valina	200
Glicina + Serina	490

Nota: El contenido nutricional de la Fitasa B aún no está disponible ya que el producto no está a la venta y se encuentra en evaluaciones para su comercialización.

Cuadro. Matriz Nutricional de la Fitasa B

Nutriente, %	Fitasa B
Fósforo disponible	1460
Calcio	1776
Proteína Total	2552
Lisina digestible	108
Metionina digestible	41
Metionina + cisteinadig	65
Treonina digestible	65
Triptofano digestible	18
Isoleucina digestible	105
Arginina digestible	103
Valina digestible	108
Energía Metabolizable, Kcal/kg	750416