

EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DEL FÓSFORO ORGÁNICO E INORGÁNICO A TRAVÉS DE LA SOLUBILIDAD *in vitro* Y UTILIZACIÓN *in vivo*

Cabrera, M.C.^{1,2}, del Puerto, M.¹, Ramos, A.¹, Saadoun, A.², Marchesoni, A.¹

Recibido: 25/09/01 Aceptado: 30/11/01

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la calidad de las fuentes de fósforo, se estudió la solubilidad *in vitro* y la biodisponibilidad *in vivo* en un modelo animal, ave en postura, del fósforo proveniente de fuentes orgánicas e inorgánicas y se relacionó con el nivel de fósforo en la dieta. En el caso de las fuentes orgánicas se relacionó además con el tamaño de partícula. Experimento 1: Las fuentes de P, harina de carne y hueso (HCH; 6.0 % de P total), ceniza de hueso (CH; 15.5 % P total), fosfato monoamónico puro (FMA; 27.8 % P total) y fosfato bicálcico comercial (FB; 18.3 % P total) se incubaron *in vitro* por dos métodos, uno químico y otro enzimático y se midió el P soluble. Experimento 2: Las aves (ocho/tratamiento) reciben una dieta base en fósforo (0.329 % P total) ó la dieta base más una toma de 0.075 ó 0.15 ó 0.25 g de fósforo proveniente del FMA para medir el requerimiento de P en base a la excreción. Experimento 3: Ocho aves/tratamiento reciben la dieta base ó la dieta base más una toma de 0.075 g de fósforo proveniente del FMA o del FB ó de la HCH (partícula gruesa y fina) ó de la CH (partícula gruesa y fina). Experimento 4: Idem al anterior pero con una toma de 0.25 g de fósforo proveniente de las mismas fuentes. Se midió ingesta de fósforo y P excretado en un balance de 48 horas. Se determinó biodisponibilidad utilizando FMA como referencia. A dosis de 0.25 g/día de P la biodisponibilidad del P del FB fue menor al FMA y a las fuentes orgánicas. A dosis bajas de P la partícula fina disminuyó la retención del mineral en HCH. La solubilidad *in vitro* sigue la misma tendencia que la biodisponibilidad *in vivo* del P de las fuentes inorgánicas pero no del P de las fuentes orgánicas. La reducción de la partícula no se traduce en un efecto claro que justifique su implementación en las plantas de elaboración de harinas animales.

PALABRAS CLAVE: biodisponibilidad del fósforo, , solubilidad *in vitro*. balance digestivo.

SUMMARY

EVALUATION OF ORGANIC AND INORGANIC PHOSPHATES BIOAVAILABILITY THROUGH *in vitro* SOLUBILITY AND *in vivo* UTILIZATION

To determine the quality of phosphorous sources, we have studied the *in vitro* solubility and the *in vivo* bioavailability of animal and mineral sources and the effect of a particle reduction (only for organic sources) and phosphorus level was evaluate in laying hens as model. Trial 1: The P sources, meat and bone meal (MBM, 6.0 % of total P), bone ash (BA, 15.5 % of total P), diammonium phosphate pure (ADP, 27.8 % of total P) and the dicalcium Phosphate (DP, 18.3 % of total P) were incubated *in vitro* by both a chemical and enzymatic methods and the soluble phosphorus was measured. Trial 2. Birds (eight/treatment) received a low-P diet (0.329 % total P) or a low-P diet with a load of 0.075; 0.15 or 0.25 g of P coming from ADP to determine the minimum P

¹ Lab. Evaluación Nutricional de Alimentos, Facultad de Agronomía. Uruguay.

² Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Uruguay. Avda. Garzón 809, Montevideo, Uruguay CP 12900. Enviar correspondencia a: mcab@fagro.edu.uy

Financiado parcialmente por CSIC, Fondo de Dedicación Total y Pedeciba.

requeriment . Trial 3: Eight birds/treatment received a low-P diet or a low-P diet supplemented with an amount of 0.075 g of P coming from ADP or DP or MBM or BA. The MBM and BA were ground to a coarse or a thin particle . Trial 4. As the trial 3 but with a load of 0.25 g of P coming from the same sources. We have measured P intaked and excreted in a 48 hours trial balance. The bioavailability was determined using ADP as a reference. When the level of P was 0.25 g/day the bioavailability of P from DP was inferior to ADP and the animals sources. The grounding affected the digestive utilization of P from MBM at low dosis of P. The *in vitro* solubility has well related with the *in vivo* P availability in inorganic sources but not in organic sources of P. The implementation of grounding seems not to be clearly justified.

KEY WORDS: phosphorus bioavailability, *in vitro* solubility, balance trials.

INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) integra la mayoría de las reacciones metabólicas y participa en el mantenimiento de la homeostasis mineral siendo uno de los elementos minerales más versátiles. La cantidad y disponibilidad del fósforo dietario son factores críticos en etapas como el crecimiento y la resorción ósea en los animales de producción. En los monogástricos es particularmente importante ya que los componentes mayores de las raciones, granos y subproductos vegetales tienen alto contenido de P en forma de ácido fítico, en la porción aleurona/pericarpio (trigo y arroz) o en el germen (grano de maíz) (Reddy y col, 1982). Siendo la fitasa, enzima digestiva que lo hidroliza, poco activa a nivel digestivo y muy pobre en dichos granos, la utilización del mineral es reducida y 70-80 % del P ingerido es excretado (Keshavarz, 1998b). Existen fitasas en otros granos que hidrolizan el ácido fítico, pero su ocurrencia y condiciones de actividad son variables (Nys y Barrier, 1995). Siendo el grano de maíz uno de los más carentes en fitasas naturales (Pointillart y col, 1987), la utilización del fósforo de los compuestos vegetales usados corrientemente siempre será parcial y si no se recurre a una fuente de mayor biodisponibilidad de P un desbalance entre el fósforo fítico respecto al no fítico puede ser un impedimento para la utilización de otros macro y microminerales esenciales. Las fitasas microbiales, usadas para aumentar la cantidad de fósforo disponible en las raciones de origen vegetal, tienen dudosa actividad en las raciones a base de maíz y además incrementan los costos de la alimentación. En Uruguay, se utilizan los subproductos de la industria cárnica, harinas de carne y hueso y cenizas de hueso como aporte de proteína, de calcio y de P. A pesar de su uso extendido no se dispone de ningún instrumento a nivel comercial para distinguirlas por su valor biológico respecto al fósforo. Como fuente inorgánica se usan los fosfatos bicálcicos a los cuales se les atribuye una alta disponibilidad de P, sin que ningún estudio específico a nivel nacional se haya realizado para confirmar esa cuali-

dad. La necesidad de adaptar con mayor precisión el aporte de P a los requerimientos, implica un claro y acertado conocimiento de los valores cuantitativos y cualitativos de las fuentes de este mineral. Por un lado, permitiría reducir el P excretado, elemento contaminante no deseado, y por otro lado, permitiría racionalizar los aportes y contribuir a la economía de la alimentación, ya que el P es el tercer elemento mas caro de una dieta.

El concepto de biodisponibilidad se relaciona fuertemente a la parte realmente utilizada para fines metabólicos (Ammerman, 1995) y es en este sentido que permite discernir entre compuestos que teniendo igual contenido químico del elemento no son utilizados y absorbidos en igual forma. Factores inherentes a la fuente, como el origen del mineral, la estructura físico-química para los elementos inorgánicos, así como la superficie expuesta de la partícula y los tratamientos tecnológicos pueden aumentar ó disminuir la disponibilidad biológica de un mineral indirectamente haciendo variar la cantidad excretada en las heces (Pansu y col, 1993).

En estudios realizados sobre la biodisponibilidad del fósforo en los subproductos de origen animal, se reportaron altos valores de digestibilidad aunque variables según la fuente (Lima y col. 1995b). Los fosfatos inorgánicos ó fosfatos procesados (resultantes de la reacción del ácido ortofosfórico con calcáreos para la producción del fosfato de calcio ó del fosfato de roca con ácido ortofosfórico para la producción del fosfato desfluorinado) tienen menor digestibilidad (40 a 80%) y mayor variabilidad según el origen aunque puede justificarse su uso en regiones donde se producen (Lima y col 1995a). La superficie expuesta de la partícula o el tamaño de la partícula pueden incidir sobre la calidad de la fuente de P, en este sentido, Orban y Roland (1992) sugirieron que las grandes partículas de hueso contenidas en las harinas de carne podrían afectar la utilización del P en cerdos y en aves. Sin embargo, Sell y Jeffrey (1996) reportaron alta disponibilidad de P de las harinas de carne y hueso con partículas gruesas o finas. Se han estudiado también las característi-

cas químicas, físicas (Lima y col, 1995b) y biológicas (Potter y col, 1995) de las fuentes inorgánicas pero pocos reportes hay acerca de la relación entre la solubilidad y la calidad biológica de los mismos (Sullivan y col, 1992). Para las fuentes orgánicas estas correlaciones han sido aún más escasas.

El presente estudio fue conducido para evaluar las características químicas y físicas, la solubilidad *in vitro* y determinar la disponibilidad biológica del P de las fuentes orgánicas e inorgánicas utilizadas en el país. Se estudió una harina de carne y hueso, una harina de ceniza de hueso y un fosfato bicálcico comercial, en comparación al fosfato monoamónico puro utilizado como referencia. Se evaluó además el efecto del tamaño de partícula para las fuentes orgánicas y el nivel de P agregado en la dieta sobre la utilización digestiva del P.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de las características físico-químicas y de la solubilidad *in vitro* de las fuentes de P.

Experimento 1: Se evaluaron cuatro fuentes de fósforo: dos de origen animal, harina de carne y hueso (HCH), ceniza de hueso (CH) y dos fuentes inorgánicas, fosfato bicálcico grado comercial (FB) y el fosfato monoamónico puro para análisis (FMA) utilizado como referencia. La HCH y la CH se utilizaron con dos tamaños de partícula, gruesa, la cual se obtuvo haciendo pasar la harina o ceniza por un tamiz con diámetro de abertura de 2.00 mm durante la molienda y fina con diámetro de abertura de 1.00 mm.

Se determinó la composición química en Calcio total (según AOAC, 1984) por Espectrofotometría de Absorción Atómica (Perkin Elmer), Fósforo total (Fiske y Subarrow, 1925) por colorimetría (con espectrofotómetro Shimadzu), Proteína cruda (Kjeldhal, N X 6,25) únicamente para la HCH, se midió la densidad aparente y se cuantificó la capacidad higroscópica en pérdida de agua a 60 °C en estufa durante 24 horas.

Para evaluar la solubilidad *in vitro* de las muestras de HCH (3,96 g), CH (1,35 g), FB (1,33 g) y FMA (0,72 g), 5 réplicas de cada muestra fueron incubadas en una solución de HCl 0.2N (pH inicial 1.2–1.3) durante 15 minutos a temperatura de 37 °C con agitación (90 oscilaciones/min) ó en una solución de pepsina (2 g proveniente de la mucosa de estómago porcino en polvo, actividad: 800-2500 unidades/mg de proteína, P-7000, Sigma Chemical, en 100 ml de HCl 0,1M) a pH 2, 37°C, durante 90 minutos con agitación. Luego se incubó con una solución de bilis-pancreatina (0,14 g de pancreatina porcina, actividad al menos de 4 veces las especificaciones de la USP, P-1625, Sigma

Chemical y 0,86 g de extracto biliar porcino, B-8631, Sigma Chemical, disueltos en 100 ml de NaHCO₃ 0,1M) a pH 7, 37°C, durante 90 minutos con agitación (según método detallado en Ramos, 2001). Se centrifugó una alícuota de cada réplica a 2000 g, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de fósforo.

Estudios de disponibilidad biológica del P *in vivo*

Animales. En los experimentos siguientes (2, 3 y 4) se utilizaron aves hembras ponedoras ISA-BROWN de 64 semanas de edad, seleccionadas por peso homogéneo y alta postura, alojadas en jaulas individuales diseñadas para realizar balance digestivo, con bandejas recolectoras de heces y con dispositivo automático de suministro de agua. La experiencia se llevó a cabo en una sala experimental, con 14 horas luz/10 horas oscuridad y con temperatura (18 °C) y ventilación controladas. La elección de este modelo animal se basó en el alto metabolismo mineral que presenta durante la calcificación de la cáscara de huevo lo cual lo hace más sensible a la calidad del mineral que se incorpora a la dieta. Se utilizaron solamente aquellas aves que tenían las oviposiciones seguidas durante el período del balance digestivo (Rao y col, 1995).

Metodología experimental. La determinación de la disponibilidad biológica del mineral en los experimentos 3 y 4, se basó en el método del balance digestivo para lo cual se siguió la metodología de Sibbald (1982) que fuera modificada para estudiar la biodisponibilidad del calcio por Cabrera y del Puerto (1996) y Cabrera y col (2001a), incorporando una fuente referencia, el FMA, de alta solubilidad y alto transporte intestinal (Ramos y Cabrera, 2000). Se suministró una dieta de adaptación por dos semanas (2700 kcal EM/kg; 180 g/kg PC; 36 g/kg Ca; 7,6 g/kg P total) y se sometieron a un ayuno de 24 horas, inmediatamente antes de comenzar cualquiera de los experimentos siguientes. En todos los experimentos se utilizó la distribución de los tratamientos en parcelas al azar con 8 repeticiones.

Experimento 2: 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 FMA. 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.

Experimento 3: Ocho aves/tratamiento, reciben la dieta base o la dieta base más una cantidad de fósforo de 0.075 g, 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 o del fosfato monoamónico.

Experimento 4: Ocho aves/tratamiento reciben la dieta base ó la dieta base más una cantidad de 0.25 g de P, 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 o del fosfato monoamónico.

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:

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

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.

Análisis estadístico: Los datos se analizaron por ANOVA de 1 vía y se compararon las medias a través del Test de Bonferroni utilizando como referencia al FMA,

cuando había diferencias significativas entre ellas ($P < 0.05\%$) (Sigma Stat Software, 1992).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Características químicas y solubilidad de las fuentes utilizadas. La composición química de las fuentes de fósforo utilizadas se muestran en el Cuadro 1. La característica de solubilidad en una solución de HCl comparada a la solubilidad en una digestión simulada permite diferenciar las propiedades físico-químicas de la sustancia y su forma química en relación al pH. Cuando el pH es bajo (solución HCl) la solubilización es alta para las fuentes inorgánicas y media para las orgánicas (Cuadro 2). Cuando simulamos el proceso de digestión, con un pH a nivel del que se registra en el estómago (cerca a 2) y luego una elevación a pH cercano a 6.5 (como en el intestino), solamente se mantiene soluble el FMA. Cabrera y col (2001b) demostraron que el FB se solubiliza en un 10 % en condiciones simuladas de una digestión péptica (pH 2) y vuelve a ser insoluble en la digestión pancreática/biliar cuando el pH se alcaliniza afectando el transporte intestinal de P.

b) Determinación de los requerimientos dietarios de fósforo a través del estudio de la respuesta de excreción. En la Figura 1 se puede apreciar la excreción de P en respuesta al agregado de 0.075, 0.15 y 0.25 g de fósforo proveniente del fosfato monoamónico puro en comparación con la excreción obtenida con una dieta base en fósforo (3,29 g/kg P total; 0,6 g/kg P disponible). La excreción de fósforo en los animales que recibieron FMA se mantiene constante hasta un nivel de agregado de 0.15 g observándose un aumento estadísticamente significativo ($P < 0.05$) a 0.25 g de P, lo cual indicaría que

el nivel de agregado comienza a satisfacer los requerimientos (Keshavarz, 1998). A partir de estos datos consideramos en el estudio siguiente un agregado de P que equivale al 50 % de los requerimientos (considerando aporte de la ración base más el aporte de cada fuente) y otro equivalente al 100 % de los requerimientos (considerando aporte de la ración base más el aporte de cada fuente) en 0.075 g y 0.25 g respectivamente.

c) Determinación de la biodisponibilidad del fósforo proveniente de diferentes fuentes y efecto de la granulometría. En base al estudio anterior se determi-

Cuadro 1. Características químicas y físicas de las fuentes de fósforo utilizadas, harina de carne y hueso (HCH), harina de ceniza de hueso (CH), ambas con dos tamaños de partícula (2 y 1), fosfato bicálcico (FB) y fosfato monoamónico (FMA).

	Origen mineral		Origen animal			
	FMA*	FB**	HCH		CH	
			2.00***	1.00	2.00***	1.00
Materia seca (%) ^a	98,5 ±0.2	97,6 ±0.3	93,5 ±1.4	94.9 ±0.9	99,7 ±0.1	99.3 ±0.1
Cenizas (%)		82.4 ±0.2	36.1 ±0.9	33.5 ±0.4	97.2 ±0.1	95.7 ±0.4
Calcio (%) ^b		21.5	15.5	15..5	33.1	33.1
Fósforo (%)	27.8 ±0.1	18,3 ±0.5	6.0 ±0.2	6.0 ±0.2	17,2 ±0.2	17.2 ±0.2
Densidad aparente (g/L)	1000 ± 40	2001 ± 20	800 ± 10	755 ± 10	766 ± 20	740 ± 20

* $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, producto puro para análisis (Fluka).

** $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, producto grado comercial para alimentación animal ;la fórmula es indicativa ya que en general estos fosfatos contienen otras formas de fósforo, (Lima y col, 1995a).

*** tamaño de partícula expresada en diámetro de la abertura de la malla en mm .

^a mide la capacidad higroscópica

^b Se indica únicamente a título complementario.

La HCH contiene además 42.7 % de Proteína bruta (Kjeldhal, Nx6.25)

nó la retención aparente (CUDap) para las fuentes testeadas con un nivel de agregado de 0.075 (50 % de los requerimientos) y 0.25 g de fósforo (nivel de requerimiento) y se determinó la biodisponibilidad únicamente para el nivel de 0.25 g de fósforo. Las respuestas obtenidas merecen los siguientes comentarios críticos. Las respuestas de excreción de fósforo de las distintas fuentes agregadas a un nivel bajo de P, permiten demostrar que las partículas finas (malla 1.00) aumentan la excreción y disminuyen la retención del mineral, efecto que es sólo significativo para una fuente orgánica como la HCH (Cuadro 3). Sin embargo, no permitieron determinar diferencias en la biodisponibilidad respecto al estándar ya que las excreciones fueron con alguna de las fuentes iguales o menores a la obtenida en el grupo de aves con la dieta base, que no recibían P suplementario (cuya excreción es de 88 mg P/ave). Por lo cual

consideramos este nivel demasiado bajo para el cálculo de la biodisponibilidad. Sin embargo, es posible interpretar que a una ingesta de P baja el tamaño de la partícula tiene mayor incidencia en el tiempo de retención a nivel digestivo para lograr una correcta solubilización in vivo, por lo tanto las partículas finas no son retenidas lo suficiente para ser solubilizadas. A 0.25 g de agregado de fósforo las respuestas de excreción fueron superiores a la dieta base lo cual puso en evidencia los siguientes resultados. La excreción de fósforo resultó ser más alta en HCH gruesa y FB respecto al FMA ($P < 0.05$; Cuadro 4), así como las retenciones relativas a la ingesta total (CUDap) fueron significativamente más bajas únicamente con el fosfato bicálcico y con la harina de carne y hueso sin moler ($P < 0.05$ %) respecto al estándar. El coeficiente de biodisponibilidad pone en evidencia la diferencia de

Cuadro 2. Solubilidad *in vitro* (%) del P y variación del pH del fosfato monoamónico (FMA), fosfato bicálcico (FB), harina de carne y hueso (HCH; tamaño de partícula 2 y 1) y ceniza de hueso (CH, tamaño de partícula 2 y 1) luego de la incubación en una solución de HCl 0.2N ó en una solución de pepsina/pancreatina/bilis (digestión simulada, ver materiales y métodos).

Fuentes de P	Solubilidad del P (%)		pH	
	Solución HCl 0.2N	Digestión simulada	Solución HCl 0.2N *	Digestión simulada **
FMA	98.3 ±0.3	99.1 ± 4	1.20-1.46	2.5-3.1-6.5
FB	98.3 ±0.3	0.10 ± 0.01	1.30-1.65	4.5-4.5-7.5
HCH²	50.4 ±0.2	3.40 ± 0.2	1.34-1.45	-6.8 ^a
HCH¹	53.5 ±0.1	0.70 ± 0.06	1.37-1.53	- ^a
CH²	37.2 ±0.2	0.63 ± 0.1	1.35-1.50	4.5-3.6-7.00
CH¹	42.1 ±0.3	0.60 ± 0.1	1.34-1.55	4.5-3.7-7.2

2 y 1= tamaño de partícula expresado en diámetro de la malla en mm.

* variación de pH al inicio y final de la incubación de 15 min

** variación del pH al inicio, medio y final de la incubación de 90 min

^a en este caso solo se pudo medir al final de la incubación por las interferencias del material en la medición del pH.

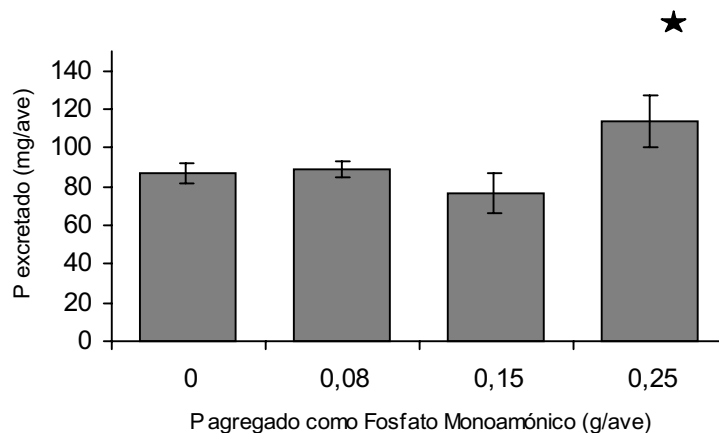


Figura 1: Respuesta de excreción de P a niveles crecientes de agregado de P proveniente del fosfato monoamónico puro (26.7 % P; 100 % biodisponible). A nivel de 0.25 g de P/ave la excreción aumenta significativamente ($P < 0.05$). A nivel de cero agregado de fósforo suplementario las barras representan la excreción de fósforo en el grupo que recibe la dieta base (0.329 % P total; 0.06 % P disponible).

* $P < 0.05$ %.

una sola fuente, el FB, con valores de biodisponibilidad significativamente ($P<0.05\%$) más bajos que el FMA (Cuadro 4). A estas dosis de P la disminución de la partícula no afectó ni la excreción, ni la retención de P de la HCH, la cual es similar al estándar. La ceniza de hueso tiene una alta biodisponibilidad del P, comparable al FMA y la molienda no aumentó dichos valores. La molienda ó disminución del tamaño de la partícula no parece justificarse a niveles de inclusión del mineral próximos a los requerimientos, ya que los resultados son inconsistentes para ambas fuentes (HCH y CH). En cualquier caso la HCH y la CH presentan valores de biodisponibilidad cercanos a un producto puro (90-93 %) indicando esto que es un subproducto de indudable interés como fuente utilizable de P para el país, y que es notoriamente mejor que el fosfato bicálcico, cuyos valores de utilización biológica son muy inferiores (85%) al FMA (96.4%). La relación entre las características químicas, físicas y las biológicas parecen ser consistentes para las fuentes inorgánicas donde la solubilidad

in vitro, ya sea de carácter química como enzimática siguen la misma tendencia que la solubilización in vivo a nivel digestivo (Cuadro 2). El FB es un producto de dudosa composición lo cual lo hace soluble en HCl 0.2N mientras el pH se mantiene debajo de 2 pero no en una digestión simulada. No es soluble en agua (Lima y col, 1995a, Lindner y Cabrera, resultados no publicados), precipitando y formando una reunión molecular fuerte. Cuando se estudió el transporte intestinal de esta fuente en un modelo de intestino invertido (Ramos y Cabrera, 2000; Ramos, 2001) no se logró un transporte mucosal adecuado debido a la capacidad de precipitación que tiene a pH duodenal y yeyunal (pH 6.5). Para las fuentes orgánicas, como la HCH y la CH no se obtuvo relación entre sus características de solubilidad in vitro y la retención in vivo, son medianamente solubles en soluciones de pH <2 (37 – 50%), muy poco solubles en una digestión simulada (0,6 – 3,4%), ver Cuadro 2, y sin embargo, la utilización digestiva es muy alta (CUDap 78 – 82%), ver Cuadro 4.

Cuadro 3 . Excreción de fósforo y coeficiente de utilización digestiva aparente (CUDap; %) del P, suplementado a dosis inferiores a los requerimientos, proveniente de fuentes de origen animal (harina de carne y hueso, HCH y ceniza de hueso, CH, con dos tamaños de partícula, 2 y 1) y de una fuente de origen mineral (fosfato bicálcico comercial, FB) comparados al fosfato monoamónico puro (FMA)

	origen mineral		origen animal			
	FMA ⁽¹⁾	FB	HCH		CH	
			2.00*	1.00	2.00*	1.00
P suplementado (mg/ave)	75 ⁽²⁾	75	75	75	75	75
P excretado (mg/ave)	89.1 ±5.0 a	78.8 ± 6.7 a	71.4 ± 6.7 a	125.5 ± 17.0 b	72.7 ± 4.6 a	87.9 ± 9.8 a
CUD 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 FMA (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).

* 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 todas las fuentes contra el fosfato monoamónico puro.

Cuadro 4. Excreción de fósforo, coeficiente de utilización digestiva aparente (CUDap; %) y biodisponibilidad (%) *in vivo* del P, suplementado para alcanzar la dosis de requerimiento, proveniente de fuentes de origen animal (harina de carne y hueso, HCH y ceniza de hueso, CH, con dos tamaños de partícula, malla 2.00 y 1.00 mm) y de una fuente de origen mineral (fosfato bicálcico comercial, FB) comparados al fosfato monoamónico puro (FMA)

	origen mineral		origen animal			
	FMA ⁽¹⁾	FB	HCH		CH	
			2.00*	1.00	2.00*	1.00
P suplementado (mg/ave)	250 ⁽²⁾	250	250	250	250	250
P excretado (mg/ave)	102 ± 12 a	164 ± 13 b	168 ± 6 b	136 ± 11 a	140 ± 16 a	146 ± 15 a
CUD ap (%) ⁽³⁾	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 (%)	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

⁽¹⁾ El FMA (fosfato monoamónico) se utilizó como estándar considerado 100 % biodisponible. ⁽²⁾ Cada fuente se incorporó a 0.25 g de fósforo. ⁽³⁾ Para el cálculo del CUD ap y de la biodisponibilidad se consideró el P total ingerido, proveniente de cada fuente y de la dieta base (0.329 % de fósforo total).

* tamaño de partícula expresado en diámetro de la 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 comparados al Fosfato monoamónico puro.

Dichos resultados demuestran que la retención de fósforo proveniente de una fuente no fítica estaría relacionado al nivel de P en la dieta no siendo evidente su relación con la naturaleza de la fuente, orgánica o inorgánica cuando este nivel está muy por debajo de los requerimientos. En este sentido Sibbald (1982) propuso que al testear un mineral éste debe ser incorporado en cantidades relativas altas respecto del mismo mineral contenido en la dieta base (o carente en P) para poder apreciar su efecto y evaluarlo. En el caso específico de este estudio la dieta base a base de granos de cereales y harina de sangre contiene el mayor aporte de fósforo total en forma fítica (3,29 g/kg P total y 0,6 g/kg P disponible), similar a las dietas utilizadas a nivel comercial, lo cual demuestra la necesidad de aumentar la incorporación a valores superiores a 0.075 g/día en nuestro caso para detectar diferencias debidas a las fuentes y a los tratamientos tecnológicos y no a la influencia de la dieta base. La retención del P suplementado proveniente del FMA resultó del 82.8 % con dosis bajas de P

suplementario (P no fítico, 33 %) y de 85.9 % con la dosis más alta (P no fítico, 54 %) respecto a una retención del 60 % en las aves que reciben únicamente la dieta base (P no fítico, 19%). El tamaño de la partícula parece ser incidente cuando el nivel de P es muy bajo, apareciendo un efecto deletéreo sobre la retención de P cuando la partícula es muy pequeña y el P no fítico en la dieta es muy bajo.

Por último, estos resultados demuestran que la solubilidad no es una característica que deba relacionarse íntegramente con la biodisponibilidad *in vivo*, es necesario tener en cuenta cual fue el método de solubilidad utilizado sobre todo en relación al grado de acidez de esa solución. Las fuentes inorgánicas muestran una concordancia de su característica de solubilidad en sistemas que simulan una digestión *in vitro* con la utilización *in vivo*, con una clara respuesta a la variación de pH. Las fuentes orgánicas, y en este caso las harinas animales y cenizas de hueso, no son solubles en los tiempos de incubación que se manejaron aquí pero sí se utilizan bien *in vivo*, seguramente porque pueden permanecer más tiempo en contacto

con un pH bajo, cuando esta condición se dé a nivel del animal y liberar lentamente el contenido al intestino lo cual puede facilitar su absorción, un proceso similar al demostrado para el calcio por Pansu y col (1995). Este modelo animal utilizado en nuestro estudio, ave en postura, tiene la particularidad de presentar un pH intestinal más ácido (Nys y Cabrera-Saadoun, 1986) lo cual podría explicar el mejor aprovechamiento *in vivo* del P de las fuentes orgánicas.

El modelo metodológico desarrollado por nuestro laboratorio parece adecuado para detectar la calidad nutricional de las fuentes de fósforo alimentario en relación a una fuente de referencia. Sin embargo, se debe tener en cuenta que factores tales como: el nivel del mineral en la dieta, la relación fósforo fítico-fósforo no fítico y el tamaño de partícula pueden afectar la capacidad de la fuente para aportar fósforo biodisponible. En cuanto a las fuentes concluimos que la biodisponibilidad del fósforo del fosfato bicálcico comercializado en el país es menor a la de las fuentes orgánicas, ceniza de hueso y harina de carne y hueso. Por último, surge de nuestros resultados que la reducción de la partícula no se traduce en un efecto claro que justifique su implementación a nivel de las plantas de elaboración de harinas de origen animal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración técnica de la Sra. Clelia Delgado por la atención de las unidades experimentales y asistencia en el procesamiento de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

- AMMERMAN, C.B. 1995. Methods for estimation of mineral bioavailability. In *Bioavailability of nutrients for animals*. Academic Press, San Diego, CA. 4: 83-94.
- AMMERMAN, C.B., BAKER, D.H., LEWIS, A.J. 1995. *Bioavailability of nutrients for animals: Amino acids, Minerals and Vitamins*. Academic Press, San Diego, CA.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984. *Official Methods of Analysis*, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- CABRERA-SAADOUN M.C., NYS Y., SAUVEUR B. and GAUTRON, J. 1987. Hyperphosphatemia in histamine injected laying hens. *Comp. Bioch. Physiol.*, 86C:395-398.
- CABRERA M.C., DEL PUERTO M., MANFREDI N., OLIVERO R., CORREA D., BERTI A.M. 1995. Biodisponibilidad del calcio en conchillas y calcitas del Uruguay. *Memorias del Congreso Latinoamericano de Producción Animal*, pp 685-688. Mar del Plata. Argentina.
- CABRERA M.C., DEL PUERTO M. 1996. Determinación de la biodisponibilidad del calcio *in vivo*: una modificación al método del balance digestivo. *Memorias del 1er. Congreso Uruguayo de Producción Animal*. Octubre . pp86-88. Montevideo. Uruguay
- CABRERA M.C., DEL PUERTO M., OLIVERO R., SAADOUN, A. 2001a. A study of the bioavailability of the calcium sources, *in vitro* and *in vivo*. (a publicar).
- CABRERA M.C., RAMOS A., LINDNER B. 2001b. Desarrollo de un modelo *in vitro* para determinar la biodisponibilidad del fósforo alimentario basado en la simulación de digestión y de la absorción intestinal. Libro de resúmenes. VI Jornadas Uruguayas de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. pp 10-11. Montevideo. Uruguay.
- FISKE C.H., SUBBARROW Y. 1925. The colourimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400
- INRA. *Alimentation des animaux monogastriques*. 1989. Editions INRA.
- KESHAVARZ K. 1998b. Further investigations on the effect of dietary manipulation of protein, phosphorus and calcium for reducing their requirements for laying hens. *Poultry Sci.* 77 : 1333-1346.
- LIMA F.R., MENDONZA C.X., ALVAREZ J.C., RATTI G., LENHARO S.L.R., KAHN H., GARZILLO J.M.F. 1995a. Chemical and physical evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of phosphorus in animal nutrition. *Poultry Sci.* 74: 1659-1670.
- LIMA I.L., ROSTAGNO H.S., TEXEIRA ALBINO L.F., ZANOTO D.L. 1995b. Disponibilidade em algumas fontes de fósforo para pintos de corte de 1 a 21 dias de idade. *Anais da XXXII Reunião da SBZ Brasil*.
- NYS Y., CABRERA-SAADOUN M.C. 1986. Daily changes in acid secretion, intestinal soluble and study on the carbonic anhydrase activity in pullets and hens laying shell-less or calcified eggs. 7^{eme} Conference Europeenne d'Aviculture. In Vol 2. pp 1037-1041. Ed. M. Larbier. WPSA. Paris.
- NYS Y., BARRIER B. 1995. Calcium and phosphorus in poultry nutrition. 1^{ères} Journées de Recherches Avicoles. Angers. France.
- ORBAN J.L., ROLAND D.A. Sr. 1992. The effect of varying bone meal sources on phosphorus utilization by 3-week old chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 1:75-83.
- PANSU, D., DUFFUS, C., BELLATON, C. AND BRONNER, F. 1993. Solubility and intestinal transit time limit calcium absorption in rats. *J. Nutr.*, 123:1396-1404.
- POINTILLART A., FOURDIN A., FONTAINE N. 1987. Importance of cereal phytase activity for phytate phosphorus utilization by growing pigs fed diets containing triticale or corn. *J. Nutr.* 117:907-917.

- 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* 74:1829 – 1830.
- RAMOS, A. 2001. Características físico-químicas de los fosfatos alimentarios y el efecto sobre el transporte intestinal en un modelo de duodeno aislado. Memoria Licenciatura en Bioquímica, Trabajo Especial II.pp Facultad de Ciencias.Montevideo.Uruguay.
- RAMOS A., CABRERA M.C.2000. Efecto de las características físico-químicas de los fosfatos inorgánicos sobre el transporte duodenal de Pi en situación de carencia dietética de fósforo asimilable. pp88. IX Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. 4-5 mayo . Solis. Uruguay.
- RAO S.K.,ROLAND D.A. Sr., GORDON R.W.1995. A method to determine and factors that influence in vivo solubilization of phosphates in commercial Leghorn hens. *Poultry Sci.* 74: 1644-1649.
- REDDY N.R., BALAKRISHNAN C.V., SALUNKHE D.K. 1982. Phytates in legumes. *Adv. Food Res.* 28: 1-92.
- SELL, J.L., JEFFREY, J.M. 1996. Availability for poult of phosphorus from meat and bones meals of different particles sizes. *Poultry Sci.* 75: 232- 239.
- SIBBALD I.R. 1982. Measurement of mineral bioavailability: extension of the true metabolizable energy methodology. *Poultry Sci.* 61:485-487.
- SIGMA STAT for Windows.Version 1.0, 1992 – 1994. Jandel Corporation. Build 1.02.132.
- SULLIVAN T.W. DOUGLAS, J.H. 1990. Phosphorus bioassay. In:Proceeding Pitman-Moore Nutrition. Bloomington MN. pp: 18-37.
- SULLIVAN T.W., DOUGLAS J.H.,GONZALES N.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 Sci.* 71: 2065-2074.