

FITASE NA ALIMENTAÇÃO DE POEDEIRAS

PHYTASE IN FEEDS FOR LAYING HENS

Alba Kyonara Barbosa Alves Tenório Fireman¹ Francisco Antônio Tenório Fireman¹

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

Os grãos utilizados nas rações possuem grande parte do seu fósforo na forma fítica, sendo indisponível para a absorção pelos não-ruminantes. Para corrigir esta indisponibilidade, têm-se suplementado as aves com fosfatos inorgânicos. Esta prática onera o custo das rações e pode apresentar efeitos adversos no desempenho das poedeiras, além de provocar problemas ambientais. A inclusão da enzima fitase na ração de poedeiras é uma das maneiras de aumentar a disponibilidade do fósforo de origem vegetal e, conseqüentemente diminuir a quantidade de fósforo inorgânico na ração, o que minimizará os efeitos ambientais provocados pelo excesso de fósforo na excreta. O objetivo desta revisão é enfatizar o efeito do uso da enzima fitase em substituição aos fosfatos inorgânicos na alimentação de poedeiras.

Palavras-chave: aves, poedeiras, nutrição, fitase.

SUMMARY

The phosphorus present in grains is in phytate form, which turns this mineral unavailable to non ruminants. Inorganic phosphates have been used to supplement phosphorus in poultry diets. This practice brings about an increase in diet cost, adverse effects on layer performance and environmental problems. The utilization of phytase is a way to lower the environmental effects caused by this excess of phosphorus excretion, once this enzyme increases vegetal phosphorus availability. This review aims to examine the effect of phytase in substitution of inorganic phosphates in layer diets.

Key words: poultry, layer hens, nutrition, phytase.

INTRODUÇÃO

O fósforo (P) contido nos grãos e seus subprodutos, utilizados na alimentação de aves, se apresenta, em grande parte, indisponível para a ab-

sorção pelos animais não ruminantes. Conforme CROMWELL e COFFEY (1991), a biodisponibilidade do P dos grãos e subprodutos varia entre 1 e 71%, relativa à disponibilidade padrão (100%) do P do fosfato monossódico. Portanto, o P pode encontrar-se de 29 a 99% indisponível nos ingredientes de origem vegetal, por estar preso à estrutura estável do ácido fítico. Por esta razão, é uma prática comum utilizar-se fosfatos inorgânicos nas rações de aves para atender suas exigências nutricionais.

No entanto, existe um limite muito estreito entre a necessidade, a depleção e o excesso de P no que diz respeito às dietas de poedeiras. Além de ser um ingrediente caro, portanto de cuidadoso manuseio, se colocado a menos ou a mais na ração, o P pode apresentar efeitos adversos no desempenho das poedeiras e, talvez, o aspecto mais importante, o P fítico, por ser muito pouco utilizado pelos não-ruminantes, junto com o excesso de P inorgânico adicionado às rações, é eliminado nas fezes destes animais, tornando-se um poluente de rios, lagos e córregos. Uma das maneiras de se prevenir os efeitos ambientais provocados pelo excesso de P na excreta dos animais, com a vantagem de aumentar a disponibilidade do fósforo de fontes vegetais, é o uso da enzima fitase, a qual já é produzida comercialmente a partir de fungos do gênero *Aspergillus ssp.* seus mutantes e recombinantes.

Nesta revisão bibliográfica será explorado o que é fitato, quais os seus efeitos sobre a alimentação de poedeiras e sobre o meio ambiente, como atua a fitase e quais os seus benefícios sobre o desempenho das poedeiras e sobre o custo das rações.

¹Zootecnistas, MSc., Av. Aparício Borges, 168/102, 90680-570, Porto Alegre, RS. Alba = autor para correspondência.

1. FITATO

Segundo NEWMAN (1991), o fitato é a maior reserva de fosfato da planta. O ácido fítico é formado pela esterificação do álcool cíclico inositol com seis grupos de ácido fosfórico (HEINZL, 1996) e o fitato é o duodeca-ânion do ácido fítico, o qual é chamado quimicamente de ácido-inositol-hexafosfórico, ou, de acordo com NEWMAN (1991), mio-inositol-hexaquisfosfato, quando complexado com cátions bivalentes como cálcio (Ca), manganês (Mn), magnésio (Mg), ferro (Fe), zinco (Zn), etc., o que também os torna indisponíveis para o animal. Um potencial poder quelante com proteínas a pH ácido e neutro foi atribuído por SOUZA (1992) e KORNEGAY (1996) aos fitatos, o que reduz a utilização de proteínas e aminoácidos. O segundo autor ainda ressaltou que o fitato, além de ter uma influência negativa na solubilidade das proteínas, prejudica a função das pepsinas por causa das ligações iônicas entre os grupos fosfato do ácido fítico e aminoácidos como lisina, histidina e arginina, sob condições ácidas. E sugere que, sob condições neutras, os grupos carboxil de alguns aminoácidos podem ligar-se ao fitato, usando elementos minerais bivalentes tais como o Ca, como ponte de ligação (Figura 1).

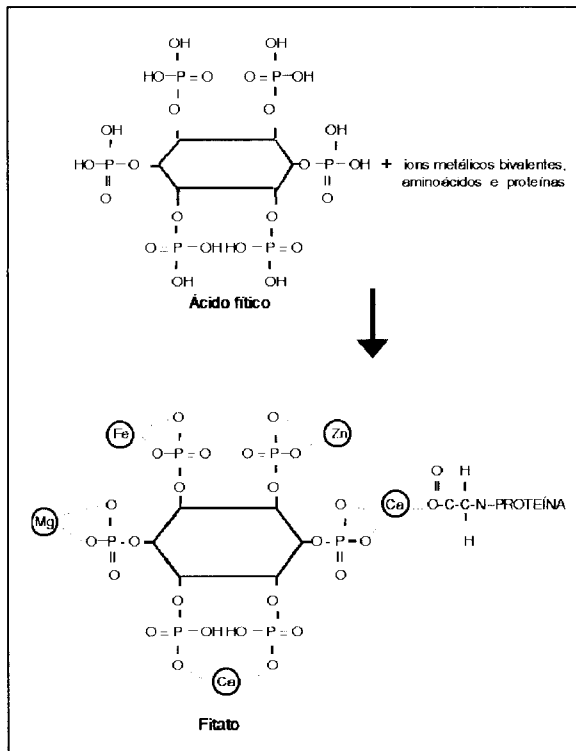


Figura 1 - O ácido fítico ao quelatar íons metálicos bivalentes, aminoácidos e proteínas, forma o fitato. A figura mostra os principais ligantes em pH neutro.

2. FÓSFORO COMO AGENTE POLUIDOR

O P fítico, por ser muito pouco utilizado pelos não ruminantes, é eliminado em grande quantidade nas fezes. Além disso, por causa da baixa disponibilidade do P nos alimentos de origem vegetal, os nutricionistas têm, tradicionalmente, suplementado as dietas com P inorgânico, para satisfazer as necessidades do animal, mas grande parte deste P também é eliminada na excreta.

De acordo com SYERS *et al.* (1973), o P e o nitrogênio (N) são considerados elementos limitantes para o crescimento de plantas aquáticas. Quando encontrados em excesso nos afluentes, provocam a aceleração do processo natural de eutroficação, resultando em marcada deterioração da qualidade da água fresca. As aves, segundo CROMWELL e COFFEY (1991), contribuem com 6,8 milhões de toneladas de fezes, que representam 6,1% do total de fezes eliminadas pelos animais domésticos dos E.U.A. e contêm cerca de 1,2 a 1,8% de P. Grande parte deste resíduo é utilizado para adubações, mas a quantidade fornecida ao solo geralmente excede às necessidades das plantas. Este excesso passa, segundo PAIK *et al.* (1996), de fertilizante do solo a contaminante de rios, lagos e córregos. No Brasil, PERDOMO (1996) registrou alto índice de poluição das águas em cidades ao sul do Estado de Santa Catarina, onde existem grandes criações de suínos e aves. De maneira que, cada vez mais, isto se torna uma preocupação mundial.

3. FITASE

Fitase, segundo NEWMAN (1991), é o nome dado a um grupo de enzimas em cuja presença se processa a hidrólise do ácido fítico em mio-inositol e P inorgânico. Bioquimicamente conhecida como 3-fitase, a fitase, que hoje é utilizada em maior escala nas rações animais, tem como nome sistemático mio-inositol hexa-quisfosfato 3-fosfohidrolase e está classificada pela "Enzyme Commission" sob o nº 3. 1. 3. 8. (WEBB, 1992). A fitase pode ser isolada de fontes vegetais, bacterianas e fúngicas. Aos vegetais, geralmente, atribuem-se baixos valores de fitase, mas Jongbloed e Kemme (1990), *apud* COLE (1991), demonstraram que a fitase do trigo pode melhorar a digestibilidade do P de 27 para 50%. No entanto, para que se extraia a enzima de fontes vegetais em alta produção, é necessário um longo tempo para a germinação e um processo de extração em vários estádios, usando materiais arriscados, como hexano (NEWMAN, 1991). Ademais, KORNEGAY (1996) demonstrou que a fitase do trigo atua em um limite de pH bem menor do que a fitase fúngica e

ressaltou algumas vantagens da fitase fúngica sobre a de origem vegetal, como a de ter atividade conhecida, ser estável e fácil de incorporar nas quantidades desejadas.

A produção comercial de fitase é facilmente atingida com culturas microbianas, mas, para que se processe a enzima em escala comercial, é necessário que o microorganismo a produza extracelularmente. NEWMAN (1991) afirmou que, após um rigoroso levantamento de mais de 2000 microorganismos, a fitase ativa extracelular só foi observada em 30 deles, todos de origem fúngica. O grupo fúngico com fitase de maior atividade foi identificado como *Aspergillus niger*, que produz uma fitase com atividade de 5UFA/g, já a espécie que produz a enzima em mais altas concentrações foi identificada como *Aspergillus ficuum*. Conforme CROMWELL *et al.* (1995), o produto comercial Allzyme Phytase® (Alltech, Nicholasville, KY), proveniente de uma cepa de *Aspergillus niger*, tem atividade de 50UFA/g, enquanto a Finase® (Alko Ltda. Biotechnology, Rajamäki, Finland), fitase também produzida por um mutante do *Aspergillus niger*, tem atividade entre 190 e 550UFA/g.

Mais recentemente, com o problema da poluição ambiental pelo P, as indústrias receberam um grande impulso para desenvolver métodos mais eficientes na produção da fitase e têm obtido um grande progresso através da engenharia genética. A fitase produzida pela recombinação gênica entre os *Aspergillus niger* e *ficuum*, Natuphos® (BASF, Mount Olive, NJ) tem uma atividade 1000 vezes maior que a do *Aspergillus niger* normal, 5000UFA/g (CROMWELL *et al.*, 1995). Uma unidade de fitase ativa (UFA) é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ortofosfato/min, de uma solução a 0,0015 mol/L de fitato de sódio (C₆H₆Na₁₂O₂₄P₆ · 10H₂O) a uma temperatura de 37°C e a pH 5,5 (ENGELEN *et al.*, 1994).

Uma importante característica da fitase microbiana mencionada por HEINZL (1996) é a termoestabilidade. O autor demonstrou que a enzima é estável em um amplo limite de temperatura e que tem máxima atividade próximo a 60°C. A fitase atua otimamente em pH entre 5,0 e 6,5, mas permanece estável entre 2,0 e 7,0 (TRÖSCHER, 1993). Por causa desta estabilidade e da baixa quantidade de P disponível (PD) na maioria dos ingredientes usados para rações, o uso de fitase como enzima exógena em dietas de não-ruminantes tem sido extensivamente pesquisado.

Um efeito adicional da fitase tem atraído a recente atenção de pesquisadores, que é o de melhorar a qualidade de alimentos de origem animal. Com este intuito, RAMBECK e WALTHER (1993)

foram capazes de demonstrar que a adição de fitase em dietas de ratos, codornas japonesas e pintos, diminuiu a retenção de cádmio (Cd) nos rins e fígado dos animais. A toxidez pelo Cd tem sido apontada como responsável por danos nos rins e problemas de concepção. A fitase torna o Ca e o Zn mais disponíveis e, os dois elementos, conhecidamente, diminuem a retenção de Cd. Levando em conta que similar efeito ocorra para aves e suínos, a fitase ajuda a melhorar a qualidade de alimentos de origem animal.

4. O USO DE FITASE EM DIETAS DE AVES

Desde 1968, a fitase tem atraído a atenção dos nutricionistas, e alguns artigos foram publicados, indicando que a disponibilidade do P fítico pode ser significativamente melhorada com a adição de fitase nas dietas. No entanto, naquele tempo, o custo da produção da enzima era um obstáculo para o seu uso.

Em um trabalho clássico, NELSON (1968) observou aumento nas cinzas dos ossos de pintos quando adicionaram culturas filtradas de *Aspergillus*, contendo fitase ativa em dietas à base de farelo de soja. Os pintos utilizaram o fósforo fítico hidrolizado pela fitase tão eficientemente quanto o fizeram com o fósforo inorgânico. Em posterior estudo, NELSON *et al.* (1971) obtiveram resultados semelhantes aplicando, desta feita, a fitase em níveis de 1 a 8g/kg de dieta a qual efetivou a total hidrólise do fitato contido quando suplementada a um nível de 3g/kg de dieta. Observaram ainda, que a atividade da enzima ocorreu no trato digestivo dos pintos e não no alimento antes da ingestão. Consideração importante para a época, pois ficava evidenciado que o aumento da temperatura e umidade, dentro do organismo do animal é que fazia a enzima entrar em atividade.

As pesquisas continuam e, com o rápido progresso da biotecnologia e engenharia genética, é possível que no futuro o uso da fitase esteja ao alcance de qualquer criador. Isto tem renovado o interesse dos pesquisadores, que têm publicado vários artigos evidenciando efeitos benéficos do uso da enzima para frangos de corte. Para poedeiras comerciais, porém, poucos trabalhos utilizando fitase foram desenvolvidos, todavia é crescente o interesse sobre este assunto.

Nos experimentos com medidas de desempenho das poedeiras, a literatura mostra que o aumento da utilização do P fítico, pela adição de fitase, permite reduzir consideravelmente a suplementação com fosfato inorgânico. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos por SIMONS e VERSTEEGH (1993), onde pode-se observar que as

Tabela 1 - Efeito da fitase sobre o desempenho de poedeiras *White Leghorn* de 24 a 52 semanas de idade.

P total %	P disp. %	Fitase (UFA/kg)	Ovo %	Peso ovo (g)	Produção (g/gal/dia)
0,33	0,14	0	78 ^a	53,7 ^a	41,9 ^a
0,39	0,20	0	97 ^b	56,8 ^b	55,1 ^b
0,45	0,26	0	98 ^b	57,3 ^b	56,3 ^b
0,53	0,34	0	96 ^b	57,6 ^b	55,5 ^b
0,33	0,14	200	96 ^b	57,2 ^b	55,0 ^b
0,33	0,14	300	96 ^b	56,5 ^b	54,3 ^b
0,33	0,14	450	95 ^b	56,9 ^b	54,3 ^b

^{a, b} Valores em uma coluna seguidos da mesma letra não diferem significativamente, $p < 0,05$
 Fonte: SIMONS e VERSTEEGH (1993)

excretaram 20% a menos de P, consumindo uma dieta com 0,28% de PD e com 300UFA/kg de ração. Todavia, SUMMERS (1995) demonstrou que, diminuindo o teor de PD de 0,4 para 0,3%, mesmo sem usar fitase, é possível reduzir a excreção do P em 20%, porém o autor observou diminuição no peso do ovo e no consumo alimentar. A resposta das poedeiras ao baixo P das dietas pode variar entre lotes. De acordo com ROLAND e GORDON (1996), alguns

poedeiras alimentadas com dietas contendo apenas 0,14% de PD (P disponível), sem fitase suplementar, apresentaram redução no desempenho geral, que foi corrigida pela adição de 200UFA/kg de ração. Com um nível ainda menor de PD (0,10%), ROLAND e GORDON (1996) também provocaram um decréscimo significativo do desempenho de poedeiras, o qual não foi observado no grupo que recebeu fitase a um nível de 300UFA/kg.

Uma significativa melhora na digestibilidade do P devido ao uso de fitase, em conjunto com uma conseqüente diminuição na suplementação de P inorgânico, foi observada por NAHASHON *et al.* (1994), que utilizaram culturas microbianas contendo fitase ativa em dietas de poedeiras com 0,25% de PD. A adição de tal suplemento possibilitou aumentar a retenção de P em 139%, de N em 25% e de Ca em 32% em relação ao grupo testemunha. A Tabela 2, adaptada de DUVAL (1996) mostra que as aves

lotes podem ser alimentados com baixo P durante várias semanas sem apresentar nenhum sintoma de deficiência, enquanto que, para outros, três semanas são suficientes para que apareçam problemas de osteoporose e fadiga de gaiola. É preciso ter cuidado em apenas reduzir a suplementação de P nas dietas de poedeiras, pois, se esta redução é feita desde o início da vida produtiva da ave, pode provocar lesões renais, alta excreção de Ca, alta incidência de osteoporose e alta mortalidade nos períodos finais da postura (RAO e ROLAND, 1992). O uso de fitase possibilita às aves utilizarem o P fítico e, desta maneira, não é necessária a remoção da reserva óssea deste mineral, que conforme GARLICH *et al.* (1975), esgota-se após 9 dias de dieta deficiente em P, em lotes no pico de postura.

Porém, a utilização do fitato pelas aves é influenciada pela quantidade de Ca adicionada e isto tornou-se um importante aspecto a ser investigado com relação às poedeiras, por ser o Ca oferecido em altas doses, comparado às dietas de frangos. Investigando este aspecto, VAN DER KLIS *et al.* (1996) observaram que poedeiras recebendo dietas com 3,0% de Ca degradaram mais fitato do que aquelas recebendo dietas com 4,0% de Ca. Um aspecto importante do trabalho destes autores foi a evidência de que o efeito da fitase em quaisquer das dietas foi independente do conteúdo de Ca das mesmas (Figura 2). De qualquer forma, não se justifica utilizar-se alto Ca em dietas com fitase, pois a própria fitase liberará o Ca preso ao fitato, tornando-o também disponível para a ave.

Tabela 2 - Vantagens ecológicas do uso de fitase

Parâmetro	Dieta padrão p/ poedeiras	Natuphos® 300UFA/kg
P total na ração (%)	0,60	0,50
P disponível (%)	0,38	0,28
Consumo diário de P (g)	0,64	0,53
Retenção diária de P (g)	0,01	0,01
Saída de P diária p/ ovo	0,11	0,11
Excreção de P (g)	0,52	0,41
Por 1000galinhas/ano		
Excreção de P (kg)	188	150
Relativo à dieta padrão (%)	100	79,7

Fonte: DUVAL (1996)

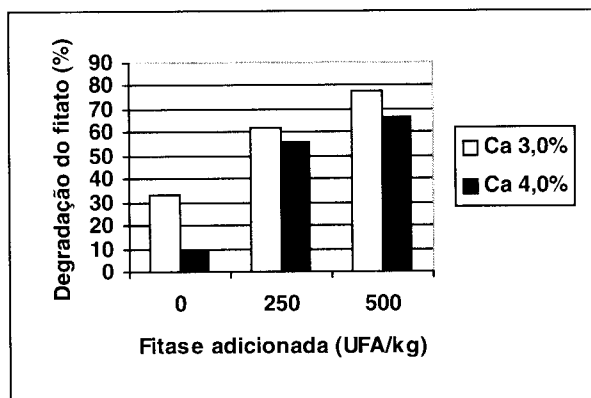


Figura 2 - Efeito da suplementação com fitase na degradação ileal de fitato (% do consumo) medido a 3,0 e 4,0% de Ca na dieta de poedeiras.

Fonte: VAN DER KLIS *et al.* (1996).

Observa-se que há uma preocupação por parte dos autores em determinar a P equivalência da fitase, ou seja, quanto da enzima adicionada substitui 1,0g de fosfato monocalcico (padrão). Esta visão é de interesse prático por quantificar a economicidade da substituição do P pela fitase. Os valores variam entre os experimentos realizados por causa de fatores conhecidos e já discutidos, e por causa de fatores ainda desconhecidos. Encontram-se valores desde 179UFA até 333UFA equivalentes a 1,0g de fosfato monocalcico (SIMONS e VERSTEEGH, 1993; VAN DER KLIS *et al.* 1996; PARR, 1996).

PARR (1996) enfatizou a economia de espaço na ração pelo uso da fitase, ou seja, o espaço livre do qual o computador tira proveito para minimizar o custo da ração. Utilizando um exemplo de ração para poedeiras em que se usou uma P equivalência de 300UFA, ele demonstrou que à medida que aumenta o preço do fosfato bicálcico, fica mais econômico utilizar fitase em dietas de poedeiras à base de milho e soja (Figura 3). Porém, o autor enfatiza que a economicidade do uso desta enzima é uma função de vários fatores, incluindo o custo da fitase e do fosfato inorgânico, a taxa de inclusão, o grau de substituição do P inorgânico, a quantidade de subproduto animal na ração, a extensão com que a fitase libera outros nutrientes ligados ao fitato e a habilidade de deixar espaço livre na ração para reformulação.

CONCLUSÃO

A adição de fitase às dietas de poedeiras, em substituição ao P inorgânico, não altera o desempenho das mesmas.

O uso de fitase em substituição ao P inorgânico nas dietas poedeiras melhora a utilização do

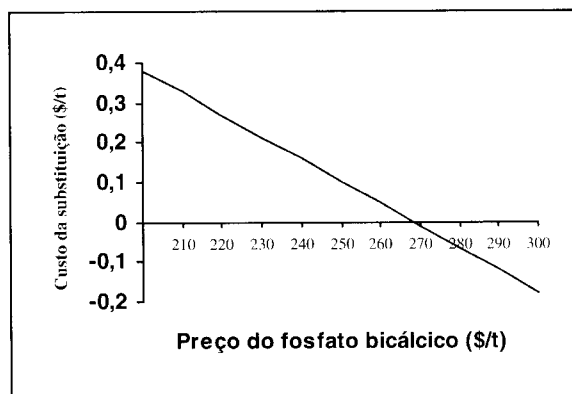


Figura 3 - Custo da fitase (USA\$/ton) em substituição ao fosfato bicálcico em dietas de poedeiras à base de milho e soja. Fitase: USA\$3,00/kg.

Adaptado de: PARR (1996).

P fítico, reduzindo a excreção de P, trazendo assim, benefícios ao meio ambiente.

A economicidade do uso da fitase em dietas de poedeiras depende de uma série de fatores, entre eles o custo da fitase e do fosfato inorgânico, a extensão com que a fitase libera outros ingredientes ligados ao fitato e a habilidade de deixar espaço livre na ração para reformulação.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- COLE, D.J.A. The role of nutritionist in designing feeds for the future. in: **Biotechnology in the feed industry**. Proceedings of Alltech's seventh annual symposium. Edt. T. P. Lyons. Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky, p. 1-20, 1991.
- CROMWELL, G.L., COFFEY, R.D. Phosphorus - a key essential nutrient, yet a possible major pollutant - its central role in animal nutrition. in: **Biotechnology in the feed industry**. Proceedings of Alltech's seventh annual symposium. Edt. T. P. Lyons. Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky, p. 135-145, 1991.
- CROMWELL, G.L., COFFEY, R.D., PARKER, H.J. *et al.* Efficacy of a recombinant-derived phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. **J Anim Sci**, v. 73, p. 2000-2008, 1995.
- DUVAL, M. Natuphos in layer and broiler phosphorus management. **BASF Technical Symposium**. Poultry Nutrition Update. Atlanta, Georgia. January 23, p. 44-65, 1996.
- ENGELN, A.J., HEEFT, F.C.V., RANDSDRP, P.H.G., *et al* Simple and rapid determination of phytase activity. **J. of AOAC International**, v. 77, n. 3, p. 760-764, 1994.
- GARLICH, J.D., JAMES, R.L., WARD, J.B. Effects of short term phosphorus deprivation on laying hens. **Poultry Science**, v. 54, p. 1193-1199, 1975.

- HEINZL, W. Technical specifications of natuphos. **BASF Technical Symposium**. World Congress Center, Atlanta, Georgia. January 23, p. 39-70, 1996.
- KORNEGAY, E.T. Effect of phytase on the bioavailability of phosphorus, calcium, amino acids, and trace minerals in broilers and turkeys. **BASF Technical Symposium**. World Congress Center, Atlanta, Georgia. January 23, 1996, p. 39-70, 1996.
- NAHASHON, S.N., NAKAUE, H.S., MIROSH, L.W. Phytase activity, phosphorus and calcium retention, and performance of single comb White Leghorn layers fed diets containing two levels of available phosphorus and supplemented with direct-feed microbials. **Poultry Science**, v. 73, p. 1552-1562, 1994.
- NELSON, T.S. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. **Poultry Science**, v. 47, p. 1842-1848, 1968.
- NELSON, S.T., SHIEH, T.R., WODZINSK, R.J., *et al.* Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. **J Nutrition**, v. 101, p. 1289-1293, 1971.
- NEWMAN, K. Phytase: The enzyme, its origin e characteristics: impact e potential for increasing phosphorus availability. In: **Biotechnology in the feed industry**. Proceedings of Alltech's seventh annual symposium. Edt. T. P. Lyons. Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky, p. 169-177, 1991.
- PAIK, I.K., BLAIR, R., JACOB, J. Strategies to reduce environmental pollution from animal manure: principles and nutritional management - a review. **AJAS**, v. 9, n. 6, p. 615-635, 1996.
- PARR, J. Formulating layer diets with Natuphos phytase. **BASF technical symposium**. World Congress Center, Atlanta, Georgia, U.S.A. January 23, p. 104-121, 1996.
- PERDOMO, C.C. Impacto da suinocultura sobre o meio ambiente. II suinotec. Conferência internacional sobre ciência e tecnologia de produção e industrialização de suínos. **Anais....** Campinas, 14 a 17 de abril de 1996, p. 87-97.
- RAMBECK, W.A., WALTHER, P. Phytase reduces cadmium retention in rats and in japanese quails. In: WENK, C. and BOESSINGER, M. **Enzymes in Animal Nutrition - 1st symposium. Proceedings...** Kartause Ittingen, Switzerland. October 13-16, 1993, p. 199-201.
- RAO, S.K., ROLAND, D.A. Response of early and late-maturing commercial leghorn pullets to low levels of dietary phosphorus. **Poultry Science**, v. 71, p. 691-699, 1992.
- ROLAND, D.A., GORDON, R. Phytase optimize phosphorus, calcium in layer diets. **Feedstuffs**, n. 4, mar, 1996.
- SIMONS, P.C.M., VERSTEEGH, H.A. J. In: **Enzymes in animal nutrition. Proceedings of the 1st symposium**. Kartause Ittingen, Switzerland. October 13-16, 1993.
- SOUZA, G.A. **Farelo de arroz integral como fonte de P em rações para frangos de corte**. Porto Alegre - RS. 148 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1992.
- SYERS, K.J., HARRIS, R.F., ARMSTRONG, D.E. Phosphate chemistry in lake sediments. **Jour Env Qual**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 1973.
- SUMMERS, J.D. Metabolism and nutrition - reduced dietary phosphorus levels for layers. **Poultry Science**, v. 74, p. 1977-1983, 1995.
- TRÖSCHER, H.D. The use of phytase and phosphates in animal nutrition. **Technical Workshop**, Speyer, September, 35 p., 1993.
- VAN DER KLIS, J.D., VERSTEEGH, H.A.J., SIMONS, P.C.M. Natuphos in laying hen nutrition. **BASF Technical Symposium**. World Congress Center, Atlanta, Georgia. January 23, p. 71-84, 1996.
- WEBB, E. C. **Enzyme nomenclature**. Recommendations of Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NCIUMB) Academic Press, INC., 1992, p. 318-321.