

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

JOÃO ANTÔNIO GALIOTTO MIRANDA

**FITASE, XILANASE- β -GLUCANASE E SUA COMBINAÇÃO SOBRE A
DIGESTIBILIDADE APARENTE DE ENERGIA E NUTRIENTES E EXCREÇÃO DE
NITROGÊNIO E FÓSFORO EM JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis
niloticus*)**

PONTA GROSSA

2021

JOÃO ANTÔNIO GALIOTTO MIRANDA

**FITASE, XILANASE- β -GLUCANASE E SUA COMBINAÇÃO SOBRE A
DIGESTIBILIDADE APARENTE DE ENERGIA E NUTRIENTES E EXCREÇÃO DE
NITROGÊNIO E FÓSFORO EM JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis
niloticus*)**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado junto a Universidade Estadual
de Ponta Grossa para obtenção do título
de Bacharel em Zootecnia.

Área: Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu
Furuya

Coorientadora: Prof. Dr. Valéria Rosseto
Barriviera Furuya

PONTA GROSSA

2021

JOÃO ANTÔNIO GALIOTTO MIRANDA

FITASE, XILANASE- β -GLUCANASE E SUA COMBINAÇÃO SOBRE A
DIGESTIBILIDADE APARENTE DE ENERGIA E NUTRIENTES E EXCREÇÃO DE
NITROGÊNIO E FÓSFORO EM JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis
niloticus*)

Trabalho de conclusão de curso apresentado para obtenção do título de
zootecnista na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de ciências agrárias

Ponta Grossa, 26 de outubro de 2021

Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Orientador Doutor em Zootecnia
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profa. Dra. Valéria R. Barriviera Furuya
Doutora em Zootecnia
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Allan Vinnicius Urbich
Doutorando em Zootecnia
Universidade Estadual de Maringá

Johnny Martins de Brito
Doutor em Zootecnia
Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Lindamar de Fátima Galiotto e Robson Orlando Miranda por todo apoio e amor, em especial a minha mãe por nunca desistir de mim, não conseguiria sem seu apoio e dedicação, obrigado por tornar tudo isso possível. Gratidão!

Agradeço aos meus irmãos por sempre estarem comigo e me ajudarem de todas as formas possíveis.

Agradeço ao meu orientador Wilson Massimitu Furuya, que desde o meu primeiro ano de graduação esteve comigo nessa caminhada e sempre buscou o meu melhor, com inúmeros ensinamentos e incentivos.

Agradeço aos meus amigos que fiz ao longo do curso, em especial Cleriston Lima de Matos, João Pedro Likes, Luís Enrique Dias Wisniewski e Willian Ricardo Zadra, com os quais dividi inúmeros momentos de felicidade e dificuldades, porém sempre estiveram comigo por todos esses anos, muito obrigado!

Agradeço também a todos os meus amigos que estiveram comigo nessa etapa da minha vida e me ajudaram de alguma forma.

Agradeço a todos os integrantes do grupo de pesquisa *FishNutrition*, por todo auxílio e companheirismo ao longo desses anos. Em especial a Johnny Martins de Brito e Tânia Pontes, que sempre me ajudaram com tudo e me ensinaram sobre tudo desde o primeiro momento, meu muito obrigado, isso não seria possível sem vocês.

Agradeço ao corpo docente e funcionários do Departamento de Zootecnia que contribuíram para minha formação.

Agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo fornecimento da estrutura ao longo de toda a graduação ao CNPq pelo fornecimento das bolsas durante a realização de minhas iniciações científicas.

Por fim agradeço a todos que de alguma maneira me ajudaram a estar aqui hoje e fizeram com que isso seja possível. Obrigado!

“Cause life is way too short for you to hide behind your flaws”

(Kenneth La’ron “KennyHoopla”)

RESUMO

A inclusão de alimentos de origem vegetal em dietas para peixes leva a uma alta quantia de fatores antinutricionais nessa dieta, como o fitato e os polissacarídeos não amiláceos (PNA), que são indesejáveis, uma forma de reduzir esses efeitos negativos é a inclusão de enzimas exógenas, como a fitase, xilanase e β -glucanase, na dieta, afim de melhorar sua digestibilidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar a utilização isolada e combinada da fitase e complexo de xilanase- β -glucanase sobre os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da energia e nutrientes, minerais e aminoácidos, além de verificar o impacto do balanço de nitrogênio e fósforo em tilápias do Nilo. Para tanto foi elaborada uma dieta controle (CON), e a partir dela outras três, sendo uma com suplementação de fitase (FT), outra com xilanase- β -glucanase (XB) e outra com fitase, xilanase- β -glucanase (FT+XB). Foram distribuídos 136 juvenis de tilápia do Nilo em delineamento de blocos ao acaso, em oito aquários com 17 peixes por unidade experimental. O experimento foi conduzido por 21 dias, onde os peixes recebiam seis refeições diárias até saciedade aparente e as fezes coletadas pelo sistema modificado de Guelph. A adição de fitase melhorou a digestibilidade da matéria seca, energia, amido, cinzas, dos minerais zinco, magnésio e manganês ($P < 0,001$) e da maioria dos aminoácidos essenciais. Paralelamente a dieta suplementada com xilanase- β -glucanase melhorou a digestibilidade na matéria seca, amido e lipídeos ($P < 0,001$), já entre os minerais houve apenas melhora na digestibilidade do cobre ($P < 0,001$). Quando em conjunto, a fitase, xilanase- β -glucanase proporcionou um maior aumento da digestibilidade dos nutrientes, em especial a proteína digestível ($P < 0,001$), além dos minerais cálcio, fósforo e ferro ($P < 0,001$), sendo a dieta FT+XB a mais eficaz em reduzir a excreção de fósforo ($P < 0,001$) e de nitrogênio ($P = 0,007$), diminuindo o impacto ambiental causado por esses elementos no meio aquático. Em conclusão as enzimas em sua forma isolada ou em conjunto, foram eficazes para melhorar os CDA dos nutrientes e energia em dietas a base de ingredientes de origem vegetal, reduzindo também o impacto ambiental causado pela excreção de fósforo e nitrogênio, promovendo uma criação mais sustentável.

Palavras-chave: Peixe, polissacarídeos não amiláceos, fitato, enzimas exógenas, impacto ambiental.

ABSTRACT

The inclusion of foods from vegetable source in fish diets takes a high amount of non nutritional factors, as the phytate and non-starch polysaccharides (NSP), that are unwanted. A way to reduce those negative effects is the inclusion of exogenous enzymes, such as phytase, xylanase and β -glucanase on those diets, as a mechanism to increase their digestibility. This present study aims to evaluate the isolated and combined use of phytase and xylanase- β -glucanase complex among the apparent digestibility coefficient (ADC) of energy and nutrients, minerals and amino acids, besides verifying the impact of nitrogen and phosphorus balance in Nile's tilapias. In order of it, it was elaborated a control diet (CON) and, using that, other three diets, being one with phytase supplementation (FT), other with xylanase- β -glucanase (XB) and another with xylanase- β -glucanase (FT+XB). 136 Nile's tilapia juveniles were distributed in completely randomized design, at eight aquariums with 17 fishes by experimental unit. The experiment took 21 days, were the fishes received six meals a day, until apparent satiety, and the defecations were collected by the Guelph modified system. The phytase addition increased the digestibility of dry matter, energy, starch, ashes, of zinc, magnesium and manganese minerals ($P < 0,001$) and most of the essential amino acids. At the same time, the xylanase- β -glucanase supplemented diet, increased the digestibility on the dry matter, starch and lipids ($P < 0,001$), on the minerals side, there was improvement only on copper digestibility ($P < 0,001$). When together, the phytase and xylanase- β -glucanase gave major increase in the digestibility of the nutrients, especially the digestible protein ($P < 0,001$), besides the calcium, phosphorus and iron minerals ($P < 0,001$), resulting in the FT + XB diet as the most efficient in reducing the phosphorus ($P < 0,001$) and nitrogen ($P = 0,007$) excretion, decreasing the environmental impact caused by those elements in aquatic ecosystems. In conclusion, the enzymes in their isolated or combined form were efficient at improving the nutrients ADC, and the energy on diets based on vegetable source, also decreasing the environmental impact caused by the excretion of phosphorus and nitrogen minerals, promoting a more sustainable breeding.

Key-words: Fish, non-starch polysaccharides, phytate, exogenous enzymes, phytase, environmental impact.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Valores de energia digestível (ED) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase.....19
- Figura 2 – Valores de proteína digestível (PD) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase.....20
- Figura 3 – Valores do fósforo disponível (Pd) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase.....22
- Figura 4 – Excreção fecal [g/kg de ganho de peso (GP)] de fósforo (P) em juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase.....24
- Figura 5 – Excreção fecal [g/kg de ganho de peso (GP)] de nitrogênio (N) em juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase.....25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição dos ingredientes da dieta basal, com base na matéria seca.....	12
TABELA 2 – Composição química analisada da dieta basal, com base na matéria seca.....	14
TABELA 3 – Coeficiente de digestibilidade aparente (g/kg) da matéria seca, energia bruta e nutrientes de dietas sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo.....	18
TABELA 4 – Coeficiente de disponibilidade aparente (g/kg) dos macros e microminerais analisados de dietas sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo.....	21
TABELA 5 – Coeficiente de digestibilidade aparente (g/kg) dos aminoácidos de dietas sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo.....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3. RESULTADOS.....	17
4. DISCUSSÃO.....	25
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
6. REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil ocupa posição de destaque na produção de peixes, é o quarto maior produtor mundial de tilápias tendo produzido em 2020, aproximadamente, 486 mil toneladas dessa espécie (PEIXE BR, 2021). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) destaca-se pelo rápido crescimento, apresentar uma boa conversão alimentar e possuir carne com características sensoriais desejáveis, sendo indicada para processamento industrial para obtenção de filé sem espinhas (EL-SAYED, 2019).

Devido a essa crescente expansão da produção piscícola e fato das tilápias apresentarem boa aceitação de rações formuladas com ingredientes de origem vegetal torna-se importante a busca por ingredientes de origem vegetal que substituam os de origem animal, afim de reduzir os custos, visto que a ração representa cerca de 30 a 70% do custo de produção (HODAR *et al.*, 2020). Ainda mais levando em consideração o fato de tilápias do Nilo terem um bom aproveitamento com ingredientes de origem vegetal (MAAS *et al.*, 2020). No entanto, ingredientes de origem vegetal apresentam inúmeros fatores antinutricionais em sua composição, como o fitato e polissacarídeos não amiláceos (PNA), que reduzem a disponibilidade utilização dos nutrientes, com implicações sobre o desempenho produtivo e saúde dos peixes (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018; CASTILLO; GATLIN, 2015).

O fitato possui um grupo ortofosfato altamente ionizado que indisponibiliza uma variedade de cátions, na seguinte ordem: cobre > zinco > níquel > cobalto > manganês > ferro > cálcio, além de formar complexos com aminoácidos (HUNG *et al.*, 2015; PERSSON *et al.*, 1999). Os PNAs solúveis, como os arabinoxilanos e β -glucanos reduzem o valor energético dos alimentos, além de promover efeitos adversos sobre a utilização de nutrientes (CONTE *et al.*, 2003). Os PNA possuem elevada capacidade higroscópica e aumentam a viscosidade intestinal, que prejudica a atividade das enzimas digestivas (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Uma alternativa para reduzir os efeitos negativos desses fatores antinutricionais é a inclusão de enzimas exógenas com misturas de fitase, β -glucanase e xilanase, que reduzem os efeitos negativos dos fatores antinutricionais e aumentam a disponibilidade de polissacarídeos de reserva, além de gorduras e proteínas antes complexadas na parede celular dos alimentos (ZHENG *et al.*, 2019).

Além disso, o uso de enzimas reduz a excreção de nitrogênio e fósforo e consequentemente a eutrofização do ambiente criatório. (GOMES *et al.*, 2016).

A combinação de enzimas apresenta grande potencial para, melhorar a digestibilidade de nutrientes, particularmente a combinação de fitase e xilanase (MAAS *et al.*, 2018; WALLACE; MURRAY; LITTLE, 2016). Entretanto, há poucas informações sobre a combinação de fitase e xilanase- β -glucanase sobre a digestibilidade da energia e nutrientes, incluindo minerais e aminoácidos, além dos impactos sobre a excreção de nitrogênio (N) e P em tilápias do Nilo alimentadas com dietas elaboradas exclusivamente com alimentos de origem animal.

Desse modo, objetivou-se com esse estudo avaliar a utilização de enzimas exógenas sobre os coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes e o balanço de nitrogênio e fósforo em juvenis de tilápias do Nilo

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fauna Silvestre e Aquicultura da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa, Paraná. O projeto foi previamente aceito pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo nº 132808/2019).

Foram adquiridos juvenis de tilápia masculinizados da linhagem Premium Aquabel, com peso inicial médio de 15 g, de uma piscicultura comercial local (Ponta Grossa, Paraná). Os peixes foram devidamente transportados para o laboratório onde o experimento foi administrado e mantidos em aquários circulares de 200 L para adaptação e aclimação por sete dias, durante esse período os peixes foram alimentados com ração micro extrusada (Algomix[®]) com 42% de proteína bruta e 4% de gordura, duas vezes ao dia até saciedade aparente.

Foi preparado uma dieta composta por ingredientes de origem vegetal, formulada de forma a atender as exigências nutricionais de juvenis da tilápia do Nilo (NRC, 2011), a dieta controle, sem suplementação de fitase e xilanase- β -glucanase (CON), conforme apresentado na Tabela 1. Tendo como base essa dieta, outras três foram suplementadas, sendo uma dieta com suplementação de fitase – FT – (1000 FTU/kg, Natuphos[®] E, BASF, Ludwigshafen na Rhein, RLP, Alemanha), outra com suplementação de xilanase- β -glucanase – XB – (1120 TXU e 500 TGU/kg, Natugrain[®] TS, BASF, Ludwigshafen na Rhein, RLP, Alemanha) e a última com suplementação

de fitase e xilanase- β -glucanase – FT+XB. Sendo o cromo (Cr_2O_3) incluído como indicador externo, as dietas foram elaboradas com base em valores da composição dos alimentos analisada previamente.

TABELA 1 - Composição dos ingredientes da dieta basal, com base na matéria seca.

Ingrediente	g/kg
Farelo de soja 45%	340,0
Farelo de trigo	255,0
Farinha de trigo	191,4
Quirera de arroz	80,0
Concentrado proteico de soja	60,0
Óleo de soja	30,0
Calcário	12,0
Fosfato bicálcico	10,0
L- Lisina	5,7
Óxido de cromo (Cr_2O_3)	5,0
Premix vitamínico mineral ^a	5,0
Sal	3,5
DL- Metionina	1,2
Antifúngico ^b	1,0
BHT	0,2

^a Premix vitamínico mineral (UI ou mg/kg da dieta): Palmitato de retinol (vitamina A), 6000 UI; colecalciferol (vitamina D₃), 1000 UI; DL- α -tocoferol (vitamina E), 60 mg; menadiona (vitamina K₃), 12 mg; tiamina HCL (vitamina B₁), 24 mg; riboflavina (vitamina B₂), 24 mg; piridoxina HCL (vitamina B₆), 20 mg; cianocobalamina (vitamina B₁₂), 24 mg; ácido fólico, 6 mg; D-pantotenato de cálcio, 60 mg; ácido ascórbico, 240 mg; D- biotina, 0,24 mg; cloreto de colina, 325 mg; niacina, 120 mg; sulfato ferroso, 50 mg; sulfato de cobre, 3 mg; sulfato de manganês, 20 mg; sulfato de zinco, 30 mg; iodeto de potássio, 0,1 mg; sulfato de cobalto, 0,01 mg; selenito de sódio, 0,1 mg.

^b Antifúngico, Mold Zap Aquativa®. Composição: dipropionato de amônia, ácido acético, ácido sórbico e ácido benzoico (Alltech Agroindustrial Ltda, São Paulo, Brasil).

A dieta controle foi misturada, moída e extrusada no Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes – AquaNutri (Botucatu, São Paulo). O processo de moagem foi realizado em moinho centrífugo com peneira com furos de 0,8 mm de diâmetro (Viera MC 680B, Tatuí, São Paulo), em seguida o procedimento de extrusão foi feito em extrusora de rosca simples (Exteec EX30, Ribeirão Preto, São Paulo) com matriz com furo de 3 mm, três “facas” com 40 rpm e temperatura final de 105 °C, resultando em pellets com diâmetro de 4 a 5 mm, que foram secos em estufa de ventilação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, São Paulo) a 55°C, durante 24 horas. Após a secagem e o resfriamento, as enzimas foram adicionadas nas dietas experimentais, sendo elas diluídas em água deionizada e aspergidas *on top* sobre os pellets e secas em estufa

com circulação forçada de ar (Hexis HX00, Jundiaí, São Paulo) a 55 °C por 2 horas no Laboratório de Fauna Silvestre e Aquicultura (UEPG, Ponta Grossa, Paraná).

Para adição das enzimas nas dietas, Natuphos® (10000 FTU/g, BASF, Ludwigshafen na Rhein, RLP, Alemanha) e Natugrain® (5600 TXU e 2500 TGU g⁻¹, BASF, Ludwigshafen na Rhein, RLP, Alemanha) foram diluídas 1:100 em água deionizada para a obtenção de uma solução mãe. Na dieta FT, para cada quilograma de ração foi realizado uma solução com 290 mL de água deionizada e 10 mL de Natuphos®, para assim alcançar uma dieta com 1000 FTU/kg. Para obtenção da dieta XB foi adicionado 280 mL de água deionizada e 20 mL de Natugrain® para obtenção de uma solução, afim de obter uma dieta com 1120 TXU/kg de xilanase e 500 TGU/kg de β-glucanase. Na última dieta foi preparado uma solução com 270 mL de água deionizada, 10 mL de Natuphos® e 20mL de Natugrain®, obtendo uma dieta com 1000 FTU/kg de fitase, 1120 TXU/kg de xilanase e 500 TGU/kg de β-glucanase.

A etapa seguinte foi a adição de óleo de soja sobre a ração afim de revestir e vedar a enzima aplicada para assim minimizar ao máximo as perdas dessa enzima quando entrar em contato com a água, posteriormente as dietas foram secas em estufas de ventilação forçada a 42°C por duas horas e armazenadas na geladeira (4 °C). Após extrusão, secagem e incorporação das enzimas, os valores foram confirmados por meio de análises de composição proximal, minerais e aminoácidos realizadas pela CBO (Valinhos, São Paulo) e apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 - Composição química analisada da dieta basal, com base na matéria seca.

	Dieta
<i>Composição proximal (g/kg)</i>	
Matéria seca	916,50
Energia bruta (kcal/kg)	4194,13
Proteína bruta	340,97
Lipídios totais	38,03
Fibra bruta	35,99
Cinzas	67,64
<i>Minerais</i>	
Cálcio (g/kg)	9,73
Cobre (mg/kg)	27,66
Ferro (mg/kg)	406,89
Fósforo (g/kg)	7,93
Magnésio (mg/kg)	2,23
Manganês (mg/kg)	118,32
Zinco (g/kg)	216,00
<i>Aminoácidos essenciais (AAE, g/kg)</i>	
Arginina	21,76
Fenilalanina	15,43
Histidina	7,65
Isoleucina	13,29
Leucina	23,46
Lisina	19,07
Metionina	5,13
Treonina	11,53
Triptofano	3,76
Valina	15,47
ΣEAA	136,55
<i>Aminoácidos não essenciais (AANE, g/kg)</i>	
Ácido aspártico	31,77
Ácido glutâmico	60,26
Alanina	14,47
Cistina	4,64
Glicina	13,80
Prolina	0,00
Serina	15,62
Tirosina	9,79
ΣNEAA	150,35

Sete dias antecedentes ao início do ensaio de digestibilidade, 136 peixes com peso médio de $22,52 \pm 0,44$ g. O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso (dois), com quatro tratamentos (CON, FT, XB e FT+XB) e duas repetições por bloco, foram

distribuídos em oito gaiolas cilíndricas de PVC de 50 L, acondicionadas em um aquário cilíndrico de fibra de vidro de 200 L, totalizando 17 peixes por unidade experimental, recebendo as dietas experimentais de modo a simular o ensaio de alimentação. Sendo assim foram utilizados quatro tratamentos com duas repetições por bloco, devido à ausência de espaço no laboratório para maiores quantidades de repetições, tentando ao máximo manter as mesmas condições experimentais nos dois blocos.

O ensaio de digestibilidade foi conduzido durante 21 dias, seguindo a metodologia padronizada em tilápias (PEZZATO *et al.*, 2002). Durante o período de alimentação, ou seja, das 8h às 17h, os peixes permaneciam acondicionados nos aquários cilíndricos onde recebiam seis refeições diárias (8, 9, 10, 11, 14 e às 15h), até a saciedade aparente. Assim, às 17h a gaiola era transferida para um aquário com fundo cônico com 150 L, onde permaneciam até a coleta das fezes (sistema modificado de Guelph) realizada no dia seguinte através de um recipiente coletor, após a coleta era feita a transferência da gaiola para o aquário de alimentação. Todos os aquários possuíam aeração e aquecedor acoplado ao termostato.

As fezes coletadas foram centrifugadas a 150 rpm durante 10 min e secas em estufas de ventilação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, São Paulo) a 55 °C por 48h, após esse período elas foram moídas no almofariz com o auxílio do pistilo e armazenadas a -20 °C para realização de análises bromatológicas no laboratório CBO (Valinhos, São Paulo), no Laboratório de Fauna Silvestre e Aquicultura (UEPG, Ponta Grossa, Paraná) e no Laboratório de Nutrição da Ajinomoto (São Paulo).

A temperatura da água dos aquários foi controlada por um aquecedor acoplado a um termostato, sendo mantida em $28,3 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$, estando dentro dos limites de conforto térmico da espécie (KUBITZA, 2011), e os demais parâmetros de qualidade da água, pH ($7,0 \pm 0,2$), oxigênio dissolvido ($5,85 \pm 0,41$ mg/L), nitrogênio amoniacal total ($1,50 \pm 0,06$ mg/L), nitrato ($10,15 \pm 0,32$ mg/L) e nitrito ($1,50 \pm 0,06$ mg/L) foram medidos semanalmente, mensurados a partir de kits (Alfakit®, Florianópolis, SC, Brasil). O fotoperíodo foi de 10h de luz, totalizando 14h de escuro (luzes acesas às 8h e apagadas às 18h).

As análises de matéria seca (método 934,01), extrato etéreo (método 920,85), fibra bruta (método 991,43) e proteína bruta (método 981,10) foram calculados seguindo métodos padronizados pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995). A energia bruta foi analisada a partir de uma bomba calorimétrica (Parr1266; Parr Instruments Co., Moline, IL, USA) seguindo metodologia padronizada

de AOAC (1995). As análises de matéria seca, extrato etéreo e cinzas foram efetuadas no Laboratório de Fauna Silvestre e Aquicultura (UEPG, Ponta Grossa, Paraná), e as análises de energia, fibra bruta e proteína bruta no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (UEM, Maringá, Paraná).

O teor de cromo (Cr_2O_3) nas fezes e na dieta controle foi determinado segundo metodologia de Bremer Neto *et al.* (2005). As análises de cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), zinco (Zn), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu), das dietas e das fezes foram determinadas por espectrometria de absorção atômica (WELZ; SPERLING, 1998). Sendo todas as análises citadas feitas pelo laboratório CBO (Valinhos, São Paulo).

Em relação ao conteúdo de aminoácidos totais e livres na dieta e nas fezes, a determinação ocorreu pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC: *high-performance liquid chromatography*), seguindo a metodologia de Rayner (1985) em que os aminoácidos são separados por cromatografia de troca iônica e quantificados através de fotolorimetria após realização da coloração de ninidrina. Para a quantificação dos aminoácidos essenciais e não essenciais, amostras da dieta controle e fezes foram encaminhadas para o Laboratório de Nutrição da Ajinomoto (São Paulo).

No início e no final do período experimental os peixes foram pesados com auxílio de uma balança de precisão para determinação do ganho de peso. Para manejo dos peixes durante a pesagem eles foram anestesiados com MS-222 na concentração de 100 mg/L (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

Para a obtenção dos valores dos CDA da energia bruta (EB), da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), amido, lipídeos totais (LT), fibra bruta (FB), cinzas, minerais e aminoácidos foi utilizado o método indireto levando em consideração o teor de Cr_2O_3 das rações e das fezes, de acordo com a fórmula de Austreng (1978), representada abaixo.

$$\text{CDA}_{(n)} = 100 - \left[100 \left(\frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_{3d}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_{3f}} \right) \times \left(\frac{\% \text{N}_f}{\% \text{N}_d} \right) \right]$$

Em que:

$\text{CDA}_{(n)}$ = Coeficiente de digestibilidade aparente da energia ou nutriente;

Cr_2O_{3d} = % de óxido de cromo na dieta;

Cr_2O_{3f} = % de óxido de cromo nas fezes;

N_f = % de nutrientes ou energia nas fezes;

N_d = % de nutrientes ou energia na dieta.

Para determinação do nitrogênio (N) e fósforo (P) ingerido durante o experimento, o consumo alimentar médio dos peixes foi monitorado. A excreção fecal do nitrogênio (N_e) e do fósforo (P_e) foi determinado seguindo as equações abaixo:

$$N_e = N_i - (N_i \times CDA_N)$$

$$P_e = P_i - (P_i \times CDA_P)$$

Sendo:

N_e = nitrogênio excretado (g/kg de ganho de peso corporal);

N_i = nitrogênio ingerido (g/kg de ganho de peso corporal);

CDA_N = coeficiente de digestibilidade aparente do nitrogênio (%);

P_e = fósforo excretado (g/kg de ganho de peso corporal);

P_i = fósforo ingerido (g/kg de ganho de peso corporal);

CDA_P = coeficiente de digestibilidade aparente do fósforo (%).

A análise estatística foi realizada submetendo os valores a verificação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, análise de homocedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe, se as duas exigências foram atendidas, os resultados foram submetidos a *one-way* ANOVA ($P < 0,05$), sendo que, em caso de diferenças significativas, os dados foram comparados pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. O programa estatístico utilizado foi o *Statistical Analysis System* – SAS (versão 9.0), sendo os resultados expressos como média e erro padrão médio (EPM).

3. RESULTADOS

Na Tabela 3 estão apresentados os valores de coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) de matéria seca (MS), energia bruta (EB), proteína bruta (PB), amido, extrato etéreo (EE) e fibra bruta (FB). No presente estudo não houve diferença na digestibilidade da FB entre os tratamentos ($P = 0,099$). Para MS e amido os maiores valores de CDA foram encontrados nas dietas suplementadas com as enzimas, não diferindo estatisticamente entre si ($P < 0,001$).

Com relação ao CDA da EB comparando com a dieta controle, a adição de FT, seja individualmente ou com o composto enzimático, apresentou os maiores valores de CDA. A ação individual de XB apresentou efeito sobre o CDA da EB, em relação ao controle ($P < 0,001$).

Em relação ao controle, a adição de FT+XB resultou em maior CDA da PB. A ação individual da FT apresentou efeito sobre o CDA da PB, já a XB não apresentou efeitos sobre o CDA da PB, em relação a dieta controle ($P < 0,001$).

No tocante aos lipídeos totais (LT), o valor de CDA foi maior com a adição de XB quando comparado ao controle. A ação individual de FT não apresentou efeito no CDA dos LT, em relação a dieta controle ($P < 0,001$).

TABELA 3 - Coeficiente de digestibilidade aparente (g/kg) da matéria seca, energia bruta e nutrientes de dietas suplementadas com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo.

CDA (g/kg)	Dieta ¹				EPM ²	Valor- P ³
	CON	FT	XB	FT+XB		
Matéria seca	55,45 ^b	64,79 ^a	64,87 ^a	66,56 ^a	0,305	<0,001
Energia bruta	75,09 ^c	78,77 ^{ab}	77,82 ^b	79,46 ^a	0,452	<0,001
Proteína bruta	89,23 ^c	90,43 ^b	89,97 ^{bc}	91,76 ^a	0,066	<0,001
Amido	96,42 ^b	97,32 ^a	97,55 ^a	97,32 ^a	0,112	<0,001
Lipídeos totais	91,60 ^c	92,45 ^{bc}	93,35 ^{ab}	94,62 ^a	0,330	<0,001
Fibra bruta	-17,10	-10,61	-11,20	-12,96	1,041	0,099
Cinzas	39,64 ^b	49,90 ^a	38,49 ^b	56,62 ^a	0,521	<0,001

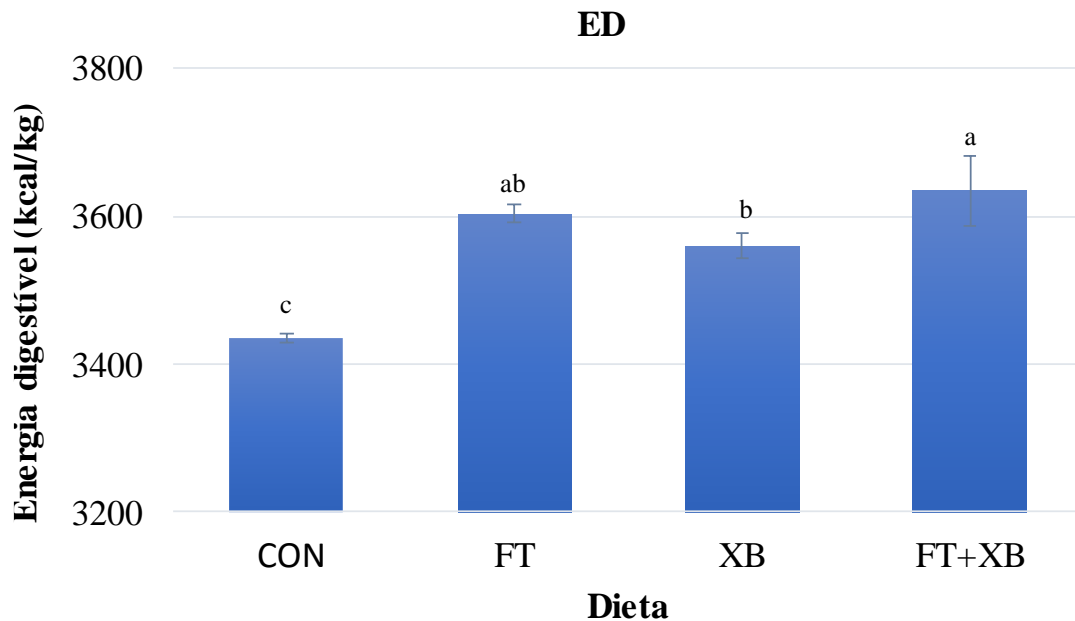
¹ CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase.

² EPM, erro padrão da média.

³ Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para energia digestível (ED), em relação ao controle, os maiores valores foram encontrados em dietas com suplementação de fitase. A adição de XB individualmente apresentou efeito sobre os valores de ED quando comparado a dieta controle, como mostrado na figura 1. ($P < 0,001$).

FIGURA 1 - Valores de energia digestível (ED) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase.

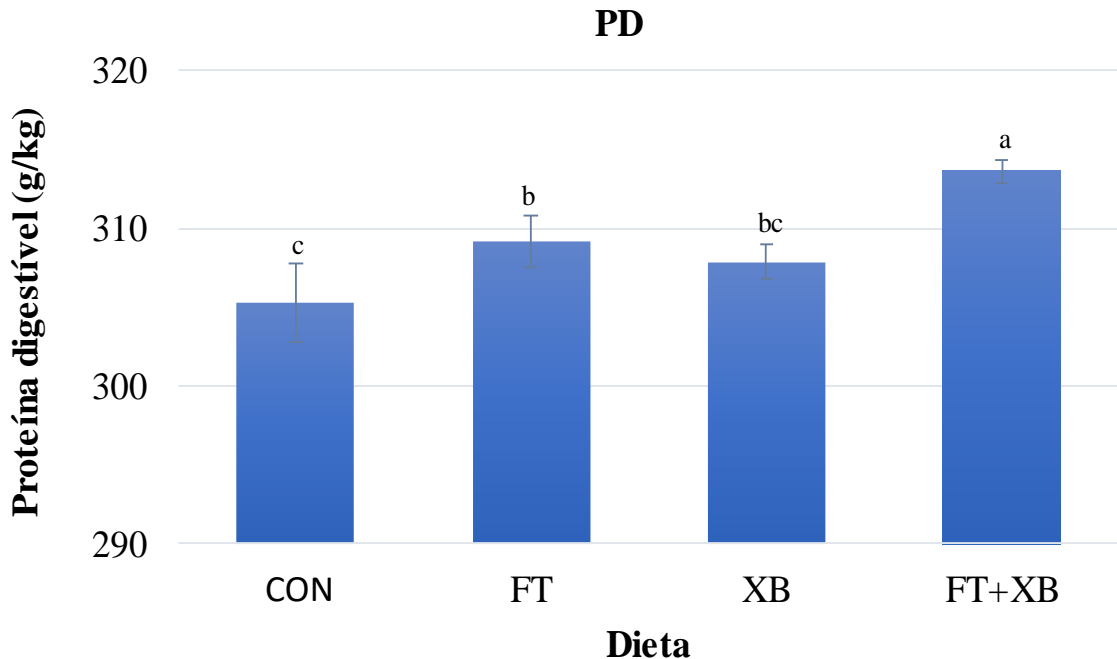


CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase.

Barras representam a média \pm desvio padrão da média para cada tratamento com quatro repetições de 17 peixes cada. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,001$).

Em relação a dieta controle, a adição de FT+XB proporcionou maiores valores de proteína digestível (PD). Já a adição individual de FT apresentou diferenças significativas sobre os valores de PD, porém a adição da XB individualmente não resultou efeitos sobre o valor de PD, em relação ao controle, conforme representado na figura 2 ($P < 0,001$).

FIGURA 2 - Valores de proteína digestível (PD) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase.



CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. Barras representam a média \pm desvio padrão da média para cada tratamento com quatro repetições de 17 peixes cada. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,001$).

A Tabela 4 apresenta os dados de CDA dos macros e microminerais, pode-se verificar, em relação a dieta controle, que a disponibilidade de Ca e P foram superiores em peixes alimentados com dieta suplementadas com FT+XB. Havendo efeitos significativos também com a adição individual da FT e da XB para os CDA do Ca e do P, em relação ao controle ($P < 0,001$).

Com relação ao controle, dietas contendo a adição de FT, apresentaram resultados superiores para CDA de Zn. E a dieta com suplementação individual de XB aumentou a CDA de Zn, comparando com a dieta controle ($P < 0,001$).

Os valores de CDA de Fe, quando comparados com a dieta controle, foram superiores para a dieta com adição de FT+XB. A suplementação individual de FT e XB também obteve efeitos positivos no CDA do Fe em relação a dieta sem a inclusão de enzimas ($P < 0,001$).

Para o Cu, em relação ao controle, a maior diferença significativa positiva do CDA encontrado foi na dieta com a inclusão de XB, a dieta com FT+XB também apresentou CDA positivo em relação ao controle. Já com dieta com adição de FT foi

obtido resultados inferiores para CDA do Cu em relação a dieta sem inclusão de enzimas ($P < 0,001$).

TABELA 04 - Coeficiente de disponibilidade aparente (g/kg) dos macros e microminerais analisados de dietas sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo.

CDA (g/kg) ¹	Dieta ²				EPM ³	Valor- <i>P</i> ⁴
	CON	FT	XB	FT+XB		
Ca	25,80 ^d	55,17 ^b	41,78 ^c	58,92 ^a	3,358	<0,001
P	26,47 ^d	60,42 ^b	44,34 ^c	67,08 ^a	4,088	<0,001
Zn	-6,17 ^c	18,25 ^a	13,52 ^b	20,32 ^a	2,717	<0,001
Fe	-48,38 ^d	-21,74 ^c	-6,58 ^b	-2,84 ^a	4,634	<0,001
Mn	-9,40 ^c	15,82 ^a	-0,02 ^b	17,08 ^a	2,405	<0,001
Mg	61,97 ^c	75,26 ^a	67,16 ^b	76,73 ^a	1,558	<0,001
Cu	51,66 ^c	49,92 ^d	61,07 ^a	54,85 ^b	1,104	<0,001

¹ Ca: cálcio; P: fósforo; Zn: zinco; Fe: ferro; Mn: manganês; Mg: magnésio; Cu: cobre.

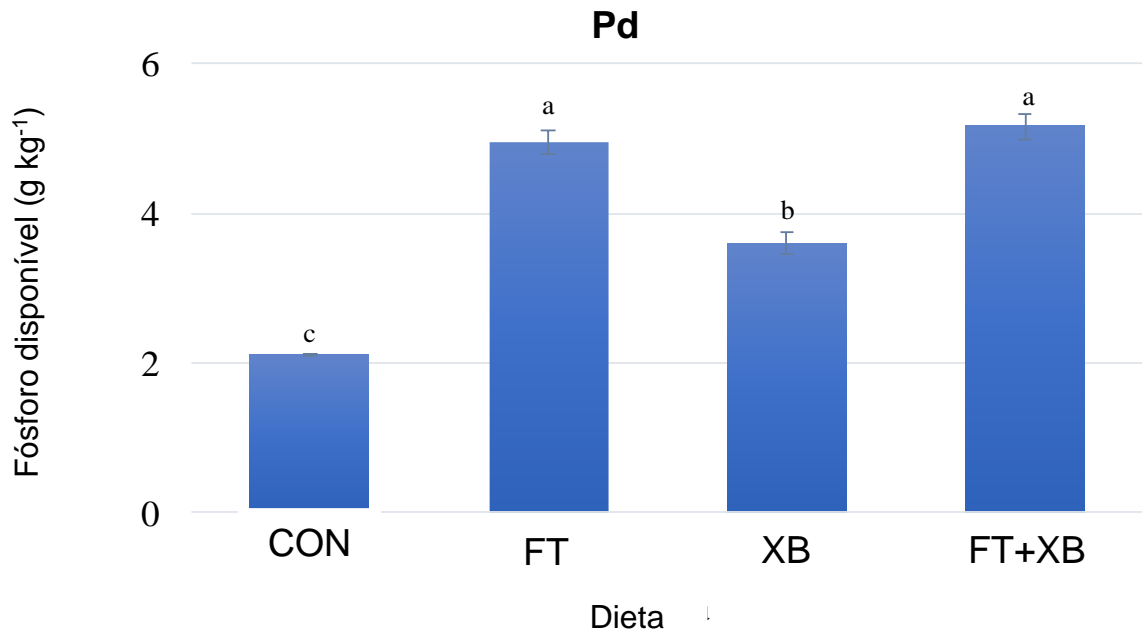
² CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase.

³ EPM, erro padrão da média.

⁴ Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Conforme mostra a Figura 3, as análises de fósforo disponível (Pd) indicaram que as dietas contendo de FT foram as que obtiveram os maiores valores digestíveis em relação a dieta controle. Peixes alimentados com a dieta contendo XB, apresentaram maiores valores para Pd do que peixes alimentados com dieta controle ($P < 0,001$).

FIGURA 3 - Valores do fósforo disponível (Pd) em dietas para tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase.



CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase.

Barras representam a média \pm desvio padrão da média para cada tratamento com quatro repetições de 17 peixes cada. Letras distintas indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,001$).

A Tabela 5 apresenta os valores de digestibilidade aparente dos aminoácidos essenciais (AAE) e dos aminoácidos não essenciais (AANE) das dietas. Para aminoácidos essenciais, com exceção do triptofano, foi observado efeitos dos tratamentos sobre os CDA dos aminoácidos essenciais. ($P < 0,05$).

A arginina, histidina e lisina ($P = 0,019$), comparadas a dieta controle, manifestaram maiores valores de CDA em peixes alimentados com a dieta com FT+XB. No entanto, as ações individuais das enzimas FT e XB, não obtiveram efeitos sobre o CDA da arginina, histidina e lisina, em relação ao controle.

Isoleucina, leucina ($P = 0,004$) e treonina ($P = 0,002$) apresentaram valores de CDA melhores na dieta com adição de FT+XB quando comparadas com a dieta referência. Já as dietas com suplementações isoladas, tanto de FT como XB não apresentaram efeitos sobre o CDA desses aminoácidos, em relação a dieta controle.

A CDA da metionina ($P = 0,001$), em relação ao controle, foi maior para dietas com suplementação da FT. Os valores de digestibilidade da metionina para a dieta com XB isolada não apresentou efeitos sobre a CDA da metionina e se equiparou ao encontrado na dieta controle.

O CDA da valina ($P = 0,025$) foi maior na dieta com suplementação de FT+XB, em relação a dieta controle. Já a ação individual da FT e da XB não causou efeitos sobre o CDA da valina, quando comparadas com o controle.

Em relação aos valores de CDA encontrados para os aminoácidos não essenciais (AANE), o ácido aspártico ($P = 0,35$), a alanina ($P = 0,15$), a glicina ($P = 0,43$) e a tirosina ($P = 0,48$) não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos avaliados. Em contrapartida, os aminoácidos ácido glutâmico ($P = 0,00$), cistina ($P < 0,001$) e serina ($P = 0,01$), em relação ao controle, obtiveram maior CDA em peixes que foram tratados com a dieta contendo FT+XB. Para FT e XB, utilizadas individualmente, não houve efeito sobre o CDA desses aminoácidos em relação a dieta referência.

TABELA 5 - Coeficiente de digestibilidade aparente (g/kg) dos aminoácidos de dietas sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase para juvenis de tilápia do Nilo.

CDA (g/kg)	Dieta ¹				EPM ²	Valor- P ³
	CON	FT	XB	FT+XB		
<i>Aminoácidos essenciais (AAE, g/kg)</i>						
Arginina	95,19 ^b	95,56 ^{ab}	95,28 ^b	96,17 ^a	0,031	0,019
Fenilalanina	88,86 ^c	91,30 ^{ab}	90,89 ^b	92,90 ^a	0,107	0,001
Histidina	92,58 ^b	93,04 ^{ab}	92,72 ^b	93,88 ^a	0,044	0,019
Isoleucina	89,53 ^b	89,65 ^b	89,89 ^b	91,66 ^a	0,069	0,004
Leucina	89,21 ^b	89,72 ^b	89,72 ^b	90,80 ^a	0,046	0,004
Lisina	93,82 ^b	94,35 ^{ab}	93,73 ^b	94,72 ^a	0,035	0,019
Metionina	90,35 ^c	91,90 ^{ab}	91,58 ^{bc}	92,98 ^a	0,070	0,001
Treonina	85,66 ^b	85,21 ^b	85,32 ^b	87,88 ^a	0,084	0,002
Triptofano	85,64	89,35	89,80	90,32	0,178	0,062
Valina	84,31 ^b	85,19 ^{ab}	85,90 ^{ab}	87,40 ^a	0,100	0,025
<i>Aminoácidos não essenciais (AANE, g/kg)</i>						
Ácido aspártico	70,97	63,04	61,29	66,81	0,497	0,35
Ácido glutâmico	96,08 ^b	96,24 ^b	96,28 ^b	97,02 ^a	0,027	0,00
Alanina	84,47	84,26	84,70	86,10	0,079	0,15
Cistina	84,50 ^b	86,99 ^b	87,10 ^b	88,37 ^a	0,102	<0,001
Glicina	86,14	86,03	86,07	87,22	0,071	0,43
Serina	90,73 ^b	91,11 ^b	91,10 ^b	92,30 ^a	0,049	0,01
Tirosina	92,43	92,67	91,90	92,90	0,056	0,48

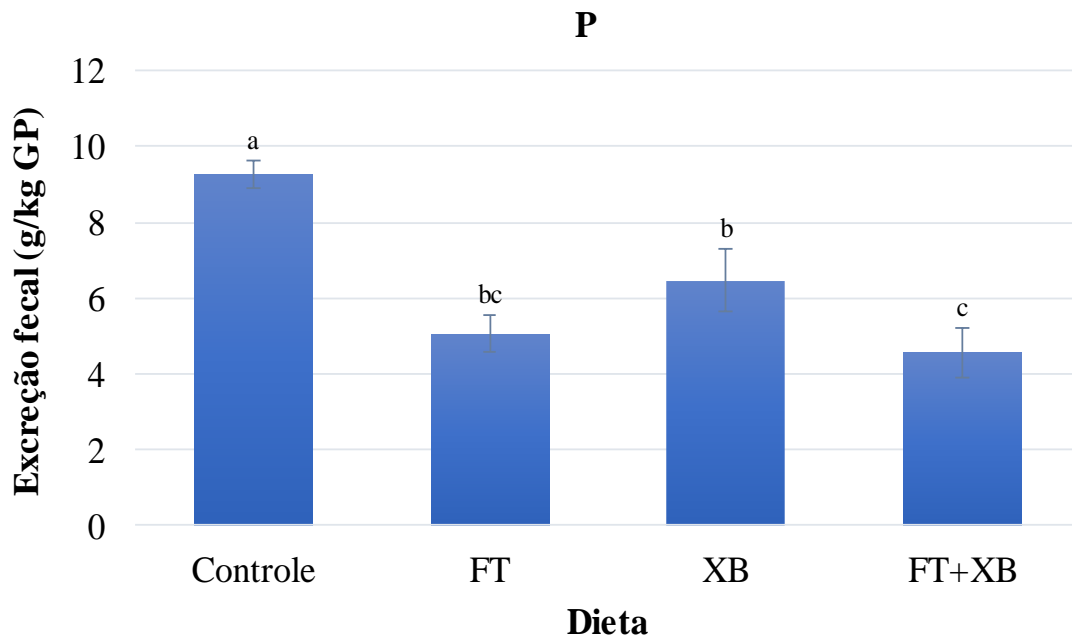
¹ CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase.

² EPM, erro padrão da média.

³ Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A Figura 4 mostra os dados da excreção de P, peixes alimentados com a dieta com FT+XB apresentou uma menor excreção de P para o ambiente criatório. Além disso, peixes alimentados com dietas contendo adição de FT ou XB apresentou efeitos sobre a excreção fecal de P, em relação ao controle, reduzindo seu valor ($P < 0,001$).

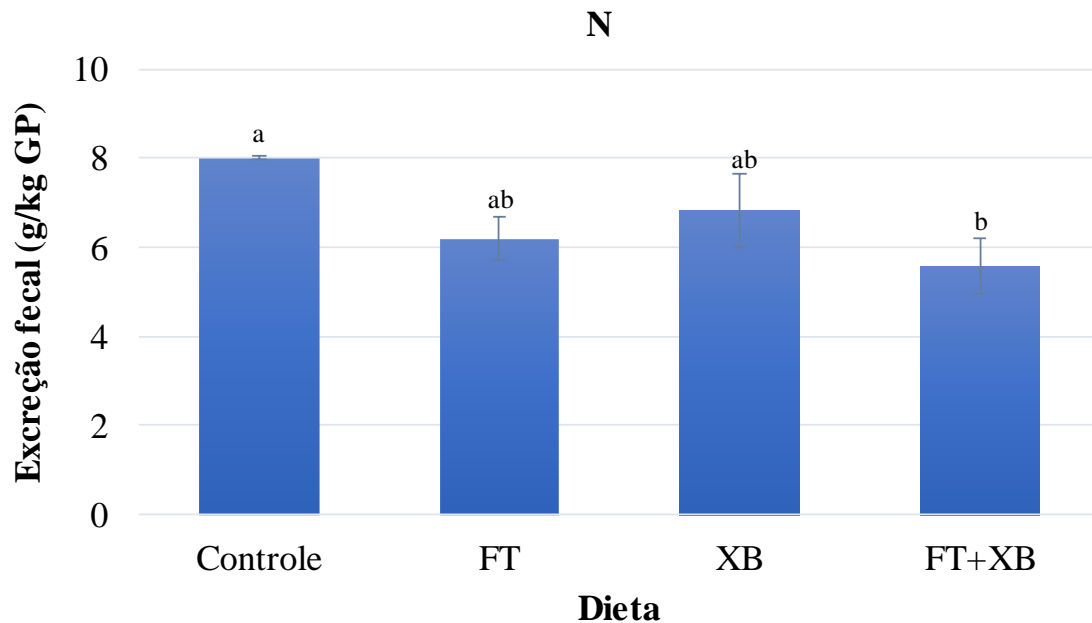
FIGURA 4 - Excreção fecal [g/kg de ganho de peso (GP)] de fósforo (P) em juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase.



CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. Barras representam a média \pm desvio padrão da média para cada tratamento com quatro repetições de 17 peixes cada. Letras distintas indicam diferença significativa de acordo com o teste Tukey ($P < 0,001$).

Conforme a Figura 5, em relação a peixes que receberam a dieta controle, a suplementação de FT+XB reduziu a excreção fecal de N pelos peixes que receberam essa dieta. Foi possível visualizar que a adição de enzimas de forma isolada (FT e XB) não causou efeito sobre a excreção de N, quando comparado com o controle ($P = 0,007$).

FIGURA 5 - Excreção fecal [g/kg de ganho de peso (GP)] de nitrogênio (N) em juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dieta sem e com fitase e/ou xilanase- β -glucanase.



CON: dieta controle; FT: dieta suplementada com fitase; XB: dieta suplementada com xilanase e β -glucanase; FT+XB: dieta suplementada com fitase, xilanase e β -glucanase. Barras representam a média \pm desvio padrão da média para cada tratamento com quatro repetições de 17 peixes cada. Letras distintas indicam diferença significativa de acordo com o teste Tukey ($P = 0,007$).

4. DISCUSSÃO

A suplementação fitase e xilanase- β -glucanase de forma isolada em rações para juvenis de tilápia do Nilo melhora os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes fornecedores de energia, como a proteína, amido e lipídeos, isso resultou em um maior CDA para a energia bruta e conseqüentemente para energia digestível. Isso se deve ao fato da fitase hidrolisar os nutrientes antes complexados e indisponibilizados pelo fitato, tornando-os disponíveis para os peixes (ALEMAYEHU; GEREMEW; GETAHUN, 2018). Já a adição de xilanase- β -glucanase hidrolisa os PNAs, muito presentes na parede celular dos ingredientes de origem vegetal, que compõe a fibra bruta e são uma fonte energética de baixo custo para os peixes (ADEOYE *et al.*, 2016; CASTILLO; GATLIN, 2015).

Esses resultados ficaram mais evidentes quando houve suplementação da fitase junto com o complexo xilanase- β -glucanase, pois houve um acréscimo no CDA da energia bruta, resultando em um maior aproveitamento da energia digestível. Esse resultado se deve a ação conjunta da fitase com o complexo xilanase- β -glucanase em disponibilizar nutrientes não disponíveis para absorção. O efeito positivo da adição de fitase e da xilanase- β -glucanase em dietas para tilápias do Nilo foi corroborado por

diversos autores (CASTILLO; GATLIN, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2009; MAAS *et al.*, 2020, 2021; TACHIBANA *et al.*, 2010).

Os PNAs presentes nas dietas são responsáveis por aumentar a viscosidade da digesta, reduzindo a ação de enzimas digestivas sobre os alimentos, a adição da xilanase objetivou a despolimerização do xilano vegetal presente na hemicelulose, aumentando também a ação das enzimas digestivas, como a quimotripsina, tripsina e amilase em dietas para tilápias do Nilo (ADEOYE *et al.*, 2016; HASSAAN *et al.*, 2019).

Esse resultado também foi encontrado para carpa Jian, *Cyprinus carpio var. Jian* (JIANG *et al.*, 2014) e para tilápia de Moçambique, *Oreochromis mossambicus* (HLOPHE-GININDZA *et al.*, 2015), que quando adicionado xilanase em dietas a base de ingredientes de origem vegetal houve maior atividade das enzimas endógenas. A β -glucanase também possui efeito sobre os PNAs, assim como a xilanase, ela também aumenta a atividade de enzimas endógenas, proporcionando um melhor aproveitamento dos nutrientes (LI; LI; WU, 2009). O presente trabalho demonstra que fitase, usada em conjunto com outras carboidrases (xilanase, β -glucanase) suplementadas em dietas a base de ingredientes vegetais possivelmente são responsáveis por aumentar de forma geral a digestão e o aproveitamento de nutrientes e da energia (CASTILLO; GATLIN, 2015).

Houveram alterações quanto ao CDA dos lipídeos totais, isso ocorreu devido aos lipídeos formarem lipofitinas, complexos formados de Ca/Mg, lipídeos e fitato, que formam um sabão metálico no lúmen do intestino e diminuem o aproveitamento da energia derivada dos lipídeos (LEESON, 1993 apud KUMAR *et al.*, 2012). Assim, com a adição da xilanase, foi possível reduzir o efeito de emulsificação da gordura, impedindo os PNAs de formarem complexos com os sais biliares e permitindo uma maior absorção dos lipídeos (EBIHARA; SCHNEEMAN, 1989; SALEH *et al.*, 2019). Isso justifica o fato encontrado na presente pesquisa, onde peixes que consumiram a dieta contendo xilanase- β -glucanase apresentaram o melhor CDA para lipídeos.

Dietas contendo um nível elevado de PNAs diminuem significativamente a digestibilidade da proteína (MAAS *et al.*, 2020), o fitato também possui um efeito negativo na proteína, formando complexos e reduzindo a digestão de aminoácidos e proteína (KUMAR *et al.*, 2012). Assim, foi observado que peixes alimentados com dietas contendo fitase, houve um aumento no CDA da proteína bruta. Isso se deve ao fato de a fitase degradar o complexo formado entre fitato-proteína, aumentando sua retenção e absorção (KUMAR *et al.*, 2012), proporcionando também o acesso de

proteases sobre os alimentos, melhorando sua digestão (OGUNKOYA *et al.*, 2006). Em conjunto com a xilanase- β -glucanase, também responsável por melhorar a digestibilidade e disponibilidade da proteína, esse complexo de enzimas reduziram a viscosidade dos PNAs e aumentaram a atividade de enzimas digestíveis (JIANG *et al.*, 2014). O efeito positivo da fitase sobre ao aumento da disponibilidade de proteínas para tilápias do Nilo já foi corroborado por diversos autores (BRITO, 2019; MAAS *et al.*, 2018; NOVELLI *et al.*, 2017). Para xilanase- β -glucanase também houve a constatação de maior aproveitamento da proteína por parte dos peixes (HASSAAN *et al.*, 2019; TACHIBANA *et al.*, 2010).

Na presente pesquisa foi obtido um maior CDA para Ca, P, Zn, Fe, Mn e Mg, com adição isolada ou combinada de fitase e xilanase- β -glucanase. A adição da fitase proporciona a hidrólise do fitato, isso reduz a ocorrência de complexos que indisponibilizam os minerais, aumentando assim sua digestibilidade (KUMAR *et al.*, 2012), assim como a adição de xilanase, que degrada a parede celular dos vegetais e reduz o peso molecular dos arabinoxilanos e β -glucanos, reduzindo a viscosidade e tempo de digestão, propiciando um aumento da digestibilidade dos minerais (CASTILLO; GATLIN, 2015; ZIJLSTRA; OWUSU-ASIEDU; SIMMINS, 2010). Corroborando com Wallace; Murray; Little (2016), que constataram que a adição de fitase na dieta para variedade de tilápias vermelhas, *O. niloticus* x *O. mossambicus*, proporcionou um melhor aproveitamento do P e do Zn; em concordância, Maas *et al.* (2021), com adição de fitase, e Brito (2019) com adição de xilanase detectaram uma maior digestibilidade do P e do Ca para tilápia do Nilo.

Em contrapartida foi possível notar que a adição de fitase reduziu o CDA do Cu, já a adição de xilanase- β -glucanase elevou o aproveitamento de Cu dos peixes. Provavelmente isso se deve ao fato do efeito antagônico entre o Zn e o Cu. Com a adição de fitase, a digestibilidade e absorção do Zn é aumentada (HUNG *et al.*, 2015), o que induz altas concentrações de metalotioneína na mucosa intestinal do peixe, essa proteína se liga ao Cu mais fortemente do que no Zn, dificultando a absorção do Cu presente no intestino, fazendo ele ser eliminado pelas células da mucosa (FISCHER; GIROUX; ABBEÂ, 1983; ZACHARIAS; OTT; DROCHNER, 2003).

Porém ainda existem controvérsias quanto ao efeito da fitase sobre o antagonismo Cu/Zn, alguns autores encontraram um aumento da disponibilidade do Cu com adição da fitase em dietas a base de ingredientes de origem vegetal para tilápias do Nilo (GONÇALVES *et al.*, 2005; PONTES *et al.*, 2021). Segundo Zacharias;

Ott; Drochner (2003) essa variação das diferentes respostas do efeito do Cu e Zn, se deve a quantidade de Zn que é liberada do complexo formado com o fitato pela ação da fitase, promovendo ou não a liberação de metalotioneína.

Nesse presente estudo a adição de fitase proporcionou um maior CDA para a maioria dos aminoácidos essenciais; já para os aminoácidos não essenciais, houve uma maior digestibilidade para dietas suplementada com fitase, xilanase- β -glucanase, também evidenciado para aminoácidos essenciais.

Em dietas com ingredientes de origem vegetal, com alta concentração de fitato, ocorre a formação do complexo proteína-fitato-mineral, o que impede a digestão e absorção da proteína e conseqüentemente de aminoácidos (SELLE *et al.*, 2012). Assim, com a adição de fitase, esse complexo formado é hidrolisado, impedindo a formação de complexos binários e ternários, disponibilizando aminoácidos para absorção, aumentando sua digestibilidade, além de também potencializar a disponibilidade de proteína para absorção (RICHE *et al.*, 2001; SELLE *et al.*, 2012).

Assim, os resultado se devem ao efeito aditivo entre essas enzimas, a fitase atua degradando o complexo formado pelo fitato e aumentando a atividade da protease endógena sobre o alimento (OGUNKOYA *et al.*, 2006) e a xilanase- β -glucanase atua reduzindo a viscosidade causada pelos PNAs, facilitando assim o acesso das enzimas ao alimento, melhorando a digestibilidade da proteína e aminoácidos (JIANG *et al.*, 2014). Um estudo realizado por Maas *et al.* (2021) utilizando fitase, xilanase- β -glucanase comprovou esse efeito aditivo positivo na digestibilidade da proteína dietética.

O presente estudo evidencia que a adição de fitase é eficiente para hidrolisar o fósforo complexado com o fitato e liberá-lo para absorção, evitando a formação de quelatos no intestino que podem vir a causar redução da absorção de outros nutrientes (KUMAR *et al.*, 2012). Com essa melhora da digestibilidade do fósforo houve também a redução da sua excreção para o meio externo, assim como demonstrado por Maas *et al.* (2021), onde a adição de fitase foi eficiente para reduzir 17,5% a excreção de fósforo; na presente pesquisa a redução da excreção de fósforo foi potencializado com a utilização do complexo xilanase- β -glucanase.

A alta concentração de fitato faz com que 80% do fósforo presente em ingredientes de origem vegetal esteja complexado na forma de fitato, tornando-o indisponível para os peixes, o que resulta na suplementação de fósforo na forma inorgânica para atender as exigências, como o fosfato bicálcico, fosfato de sódio e

fosfato de potássio (HUANG *et al.*, 2020; PRABHU; SCHRAMA; KAUSHIK, 2013), e utilizar o fósforo extraído de rochas fosfática tem limitações, devido a ser um recurso natural não renovável (OBERSTEINER *et al.*, 2013). Isso resulta em maiores quantidades desse mineral excretado para o viveiro junto com as fezes, podendo causar crescimento acelerado de algas e fitoplânctons, resultando na eutrofização da água e causando mortalidade dos peixes (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005). Assim, a adição de fitase pode ser utilizada para reduzir a excreção de fósforo para a água de cultivo dos peixes e reduzir a utilização das reservas naturais de fósforo. A fitase combinada com a xilanase- β -glucanase proporcionou a melhor resposta entre os tratamentos analisados devido ao efeito aditivo entre as enzimas.

Autores encontraram que fitase e xilanase são efetivos para diminuir a excreção de nitrogênio para o meio aquático (Al *et al.*, 2007; AYHAN *et al.*, 2008), no presente estudo a sinergia entre fitase e xilanase- β -glucanase proporcionou uma menor excreção de nitrogênio, sendo efetiva para reduzir impactos ambientais causadas por excreções nitrogenadas ao viveiro.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

. A suplementação de fitase, xilanase- β -glucanase melhorou o CDA da energia e nutrientes devido ao efeito aditivo presente entre a fitase e as carboidrases, potencializando o efeito individual das enzimas, fato esse, comprovado com a melhora da energia digestível e proteína digestível. Essa combinação também afetou o CDA do Ca, P, Zn, Fe, Mn e Mg, promovendo sua disponibilidade e melhorando seu aproveitamento, melhorou também o CDA da maioria dos aminoácidos essenciais (arginina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina e valina) e alguns aminoácidos não essenciais (ácido glutâmico, cistina e serina). A pesquisa também demonstrou o potencial das dietas em reduzir os impactos ambientais causados pela excreção de compostos nitrogenados e na redução da utilização de reservas naturais de fósforo e cálcio, diminuindo a inclusão da forma orgânica desses minerais na dieta.

A suplementação conjunta das enzimas foi a que proporcionou a maior digestibilidade dos nutrientes, em função de capacidade aditiva, melhorando além disso a proteína digestível, e os minerais cálcio, fósforo e ferro, também foi muito eficaz para reduzir a excreção de fósforo e nitrogênio para o meio. A suplementação

das enzimas, seja na forma isolada ou em conjunto, foi eficiente para potencializar a digestibilidade em dietas com ingredientes exclusivamente de origem vegetal e tornar a criação de peixes mais sustentável, reduzindo o impacto ambiental.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEOYE, A. A. *et al.* Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. **Aquaculture**, v. 463, p. 61–70, 2016.
- AI, Q. *et al.* Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 147, n. 2 SPEC. ISS., p. 502–508, 2007.
- ALEMAYEHU, T. A.; GEREMEW, A.; GETAHUN, A. The role of functional feed additives in tilapia nutrition. **Fisheries and Aquaculture Journal**, v. 09, n. 02, 2018.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Washington: AOAC, 1995.
- AUSTRENG, E. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. **Aquaculture**, v. 13, p. 266–272, 1978.
- AYHAN, V. *et al.* Enzyme supplementation to soybean based diet in Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*): Effects on growth parameters and nitrogen and phosphorus excretion. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 14, n. 2, p. 161–168, 2008.
- BREMER NETO, H. *et al.* The spectrophotometric method on the routine of 1,5-diphenylcarbazine was adjusted on chromium determination in feces, after its utilization as a biological marker as chromium (III) oxide. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 691–697, 2005.
- BRITO, J. M. DE. **Associação de xilanase e b-glucanase sobre a digestibilidade , desempenho produtivo , histologia intestinal e microbioma de tilápias do Nilo**. [s.l.] Universidade Estadual de Maringá, 2019.
- CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M. DA; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 259–272, 2005.
- CASTILLO, S.; GATLIN, D. M. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. **Aquaculture**, v. 435, p. 286–292, 2015.
- EBIHARA, K.; SCHNEEMAN, B. O. Interaction of bile acids, phospholipids, cholesterol and triglyceride with dietary fibers in the small intestine of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 119, n. 8, p. 1100-1106, 1989.
- EL-SAYED, A.F. **Tilapia Culture: Second Edition**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2019.
- FISCHER, P. W. F.; GIROUX, A.; ABBEÂ, M. R. L. Effects of zinc on mucosal copper

binding and on the kinetics of copper absorption. **The Journal of Nutrition**, v. 113, n. 2, p. 462–469, 1983.

GOMES, V. D. S. *et al.* Utilização de enzimas exógenas na nutrição de peixes - Revisão de Literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 4, p. 259–264, 2016.

GONÇALVES, G. S. *et al.* Efeitos da suplementação de fitase sobre a disponibilidade aparente de Mg , Ca , Zn , Cu , Mn e Fe em alimentos vegetais para a tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2155–2163, 2005.

GUIMARÃES, I. G. *et al.* Digestibilidade aparente de rações contendo complexo enzimático para tilápia-do-nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1397–1402, 2009.

HASSAAN, M. S. *et al.* Exogenous xylanase improves growth , protein digestibility and digestive enzymes activities in Nile tilapia , *Oreochromis niloticus* , fed different ratios of fish meal to sunflower meal. **Aquaculture Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 841–853, 2019.

HLOPHE-GININDZA, S. N. *et al.* The effect of exogenous enzyme supplementation on growth performance and digestive enzyme activities in *Oreochromis mossambicus* fed kikuyu-based diets. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 12, p. 3777–3787, 2015.

HODAR, A. R. *et al.* Fish meal and fish oil replacement for alternative sources: a review. **Journal of Experimental Zoology India**, v. 23, n. January, p. 13–21, 2020.

HUANG, Z. *et al.* Effects of exogenous multienzyme complex supplementation in diets on growth performance, digestive enzyme activity and non-specific immunity of the Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 306–315, 2020.

HUNG, L. T. *et al.* A comparison of the effect of dietary fungal phytase and dicalcium phosphate supplementation on growth performances, feed and phosphorus utilization of tra catfish juveniles (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878). **Aquaculture Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 10–17, 2015.

JIANG, T.T. *et al.* Effects of exogenous xylanase supplementation in plant protein-enriched diets on growth performance, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*). **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 6, p. 632–645, 2014.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2. ed. Jundiaí: Acqua Supre Comércio e Suprimentos para Aquicultura, 2011.

KUMAR, V. *et al.* Phytate and phytase in fish nutrition : A Review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 335–364, 2012.

LI, J. S.; LI, J. L.; WU, T. T. Effects of non-starch polysaccharides enzyme, phytase and citric acid on activities of endogenous digestive enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 415–420, 2009.

MAAS, R. M. *et al.* The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 487, p. 7–14, 2018.

MAAS, R. M. *et al.* Carbohydrate utilisation by tilapia: a meta-analytical approach. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 1851–1866, 2020.

MAAS, R. M. *et al.* Effects and interactions between phytase, xylanase and β -glucanase on growth performance and nutrient digestibility in Nile tilapia. **Animal Feed Science and Technology**, v. 271, 2021.

NOVELLI, P. K. *et al.* Enzymes produced by agro-industrial co-products enhance digestible values for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A significant animal feeding alternative. **Aquaculture**, v. 481, n. December 2016, p. 1–7, 2017.

NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.

OBERSTEINER, M. *et al.* The phosphorus trilemma. **Nature Geoscience**, v. 6, n. 11, p. 897–898, 2013.

OGUNKOYA, A. E. *et al.* Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 254, p. 466–475, 2006.

PEIXE BR. **Anuário 2021 Peixe BR da Piscicultura**. São Paulo: Peixe BR, 2021.

PERSSON, H. *et al.* Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. **Doktorsavhandlingar vid Chalmers Tekniska Hogskola**, v. 8561, n. 1473, p. 3194–3200, 1999.

PEZZATO, L. E. *et al.* Digestibilidade aparente de alguns alimentos protéicos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6 suppl 2, p. 1801–1809, 2002.

PONTES, T. C. *et al.* Top-sprayed phytase enhances the digestibility of energy, protein, amino acids and minerals, and reduces phosphorus output in Nile tilapia fed all-vegetable diets. **Aquaculture Research**, n. June, p. 1–9, 2021.

PRABHU, P. A. J.; SCHRAMA, J. W.; KAUSHIK, S. J. Quantifying dietary phosphorus requirement of fish - a meta-analytic approach. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, n. 3, p. 233–249, 2013.

RAYNER, C. J. Protein hydrolysis of animal feeds for amino acid content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 722–725, 1985.

RICHE, M. *et al.* Apparent digestibility of crude protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 181–194, 2001.

SALEH, A. A. *et al.* Effects of dietary xylanase and arabinofuranosidase combination on the growth performance, lipid peroxidation, blood constituents, and immune response of broilers fed low-energy diets. **Animals**, v. 9, n. 7, p. 467, 2019.

SELLE, P. H. *et al.* Protein – phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. **Nutrition Research Reviews**, v. 25, n. 1, p. 1–17, 2012.

TACHIBANA, L. *et al.* Xylanase and beta-glucanase on nutrient apparent digestibility of triticale by Nile tilapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 62, n. 2, p. 445–452, 2010.

WALLACE, J. L.; MURRAY, F. J.; LITTLE, D. C. Effects of β -xylanase and 6-phytase on digestibility, trace mineral utilisation and growth in juvenile red tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) x *O. mossambicus* (Peters, 1852), fed declining fishmeal diets. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 32, n. 3, p. 471–479, 2016.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. [s.l.] Wiley, 1998.

ZACHARIAS, B.; OTT, H.; DROCHNER, W. The influence of dietary microbial phytase and copper on copper status in growing pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, p. 139–148, 2003.

ZHENG, C. CAI *et al.* Exogenous enzymes as functional additives in finfish aquaculture. **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 213–224, 2019.

ZIJLSTRA, R. T.; OWUSU-ASIEDU, A.; SIMMINS, P. H. Future of NSP-degrading enzymes to improve nutrient utilization of co-products and gut health in pigs. **Livestock Science**, v. 134, n. 1–3, p. 255–257, 2010.