

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

NOVA GERAÇÃO DE FITASE LÍQUIDA EM DIETAS PARA  
TILÁPIAS DO NILO

Autora: Tânia Cristina Pontes  
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Eiko Murakami

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Abril – 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

NOVA GERAÇÃO DE FITASE LÍQUIDA EM DIETAS PARA  
TILÁPIAS DO NILO

Autora: Tânia Cristina Pontes  
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alice Eiko Murakami

“Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal”.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Abril – 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

P814n Pontes, Tânia Cristina  
Nova geração de fitase líquida em dietas para tilápias do Nilo  
/ Tânia Cristina Pontes. -- Maringá, 2019.  
xvi, 72 f. : il. color.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya. Coorientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alice Eiko Murakami. Tese (doutorado) -  
Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, 2019.

1. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) - Digestibilidade - Fitase.  
- Retenção de minerais. 3. Aquicultura. 4. Aminoácidos. I. Furuya,  
Wilson Massamitu, orient. II. Murakami, Alice Eiko. III. Universidade  
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia.  
IV. Título.

CDD 23.ed. 639.3774  
Síntique Raquel de C. Eleuterio – CRB 9/1641



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

NOVA GERAÇÃO DE FITASE LÍQUIDA EM DIETAS  
PARA TILÁPIAS DO NILO

Autora: Tânia Cristina Pontes  
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 17 de abril de 2019.

Profª Drª Raquel Abdallah da  
Rocha Oliveira

Profª Drª Cheila Roberta Lehnen

Profª Drª Margarida Maria Barros

Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato

Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya  
Orientador

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*(Martin Luther King)*

Aos meus pais Antônio Roberto Pontes e Ana Maria dos Santos Pontes, a minha irmã Josiane Aparecida Pontes, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e apoiando, dando forças em todos os momentos, a vocês dedico tudo que consegui. Amo vocês!

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo! Por me conceder a realização de um sonho, acompanhar-me em cada decisão tomada, e me mostrar que cada coisa acontece no momento certo. Obrigada meu Deus!

Aos meus pais Ana Maria dos Santos Pontes e Antônio Roberto Pontes, pelo apoio, incentivo e conselhos;

A minha irmã Josiane Aparecida Pontes, pelos conselhos e amizade;

Aos meus colegas do grupo de pesquisa Fish Nutrition, Johnny Martins de Brito, Fabricio Eugenio de Araújo, Karla Miky Tsujii, Paola Aparecida Paulovski Panaczervicz, Dayane Cheritt Batista, Allan Vinicius Urbich, Alycia Renata Rudnik, João Antônio Galiotto Miranda, Maytê Vedam Dimbarre, Ana Flávia Moreira e Fernanda Eleutério Miara de Almeida, pelo apoio, amizade, companheirismo em todos os momentos. Muito obrigada!

A meu orientador, Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya, pela orientação.

A minha amiga Amanda de Paula Lima, pelo apoio, risadas e pelo companheirismo, meus sinceros agradecimentos!

Ao colega Marcio Gregório Rojas dos Santos, pelo apoio em todos os momentos e pela amizade. Muito obrigada!

A Bruno Wernick, consultor de serviços técnicos da BASF, pelo apoio ao projeto de pesquisa.

Aos técnicos de laboratório da Universidade Estadual de Ponta Grossa Valquíria Nanuncio Chochel e Antônio do Espírito Santo do Prado, pela colaboração durante a execução dos experimentos.

A toda a equipe AquaNutri, pela colaboração na confecção das rações. Meus sinceros agradecimentos, em especial ao colega Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudo;

A BASF, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa;

## BIOGRAFIA

TÂNIA CRISTINA PONTES, filha de Antônio Roberto Pontes e Ana Maria dos Santos Pontes, nascida na cidade de Paraguaçu Paulista – SP, no dia 07 de agosto de 1988.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal da Grande Dourados (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil) em 2009. Durante a graduação foi bolsista do grupo Pet – Biologia. Obteve o título de Licenciada em Ciências Biológicas em abril de 2013.

Em junho de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, na Universidade Federal do Paraná (Palotina, Paraná, Brasil), área de concentração Nutrição de Peixes. Em agosto de 2015 obteve o título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

Em março de 2016 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, Paraná, Brasil) área de concentração em Produção Animal, onde concentrou seus estudos na especialidade Aquicultura.

Em fevereiro de 2019 submeteu-se ao exame de qualificação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

Em 17 abril de 2019 obteve o título de DOUTORA EM ZOOTECNIA.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
I – INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
1.1 Fósforo na nutrição animal .....	4
1.2 Fitato.....	5
1.3 Fitase .....	8
1.4 Fitase em dietas para peixes .....	11
1.5 Efeitos da fitase na digestibilidade de nutrientes.....	11
1.6 Parâmetros bioquímicos .....	12
1.7 Referências .....	14
2. Objetivo geral.....	22
2.1 Objetivos Específicos.....	22
II - Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes de dietas elaboradas com alimentos vegetais e adição de nova geração de fitase líquida para juvenis de tilápias do Nilo .....	24
RESUMO:.....	24
ABSTRACT:.....	25
1. Introdução.....	26
2. Material e métodos.....	27
2.1 Dietas.....	28
2.2. Análises químicas.....	31
2.3 Peixes e manejo .....	31

2.4 Digestibilidade .....	32
2.5 Análise Estatística .....	33
3. Resultados .....	33
3.1 Ensaio de digestibilidade .....	33
3.2 Coeficiente de digestibilidade aparente dos aminoácidos .....	34
4. Discussão .....	35
4.1. Ensaio de Digestibilidade .....	35
4.2 Digestibilidade de aminoácidos .....	37
5. Conclusões .....	38
Agradecimentos .....	38
Referências.....	39
III - Redução do fosfato bicálcico em dietas com adição da nova geração de fitase líquida para juvenis de tilápias do Nilo com base no desempenho produtivo, retenção de minerais e parâmetros sanguíneos .....	44
RESUMO:.....	44
ABSTRACT.....	46
1. Introdução .....	47
2. Material e métodos.....	48
2.1 Dietas .....	48
2.2 Peixes e manejo .....	51
2.3 Coleta de sangue .....	51
2.4 Coleta de vértebras .....	52
2.5 Análises químicas .....	52
2.6 Análise Estatística .....	53
3. Resultados.....	53
3.1 Ensaio de crescimento.....	53
3.2 Parâmetros bioquímicos .....	54
3.3 Composição corporal.....	55
3.4 Concentração de minerais nas vértebras .....	56
4. Discussão .....	58
4.1. Ensaio de crescimento.....	58
4.2 Parâmetros bioquímicos .....	60
4.3 Concentração de minerais nas vértebras e composição corporal .....	62
5. Conclusão.....	63

Agradecimentos .....	63
Referências.....	64
IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	71
V - Anexo.....	73

## LISTA DE TABELAS

### **I – Revisão de Literatura**

Tabela 1- Quantidade de fósforo total e fítico em alimentos de origem vegetal (base da matéria seca). ..... 8

### **II - Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes de dietas elaboradas com alimentos vegetais e adição de nova geração de fitase líquida para juvenis de tilápias do Nilo.**

Tabela 1 - Composição dos ingredientes das dietas experimentais (g/kg). ..... 28

Tabela 2 - Composição química analisada das dietas experimentais (g/kg), com base na matéria seca) ..... 30

Tabela 3 - Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, energia bruta e nutrientes pela tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo diferentes níveis da nova geração de fitase líquida ..... 34

Tabela 4 - Coeficiente de digestibilidade aparente de aminoácidos essenciais e não essenciais por juvenis de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de fitase, durante 56 dieta.....35

### **III - Redução do fosfato bicálcico em dietas com adição de nova geração de fitase líquida para juvenis de tilápias do Nilo com base no desempenho produtivo, retenção de minerais e parâmetros sanguíneos**

Tabela 1- Composição das dietas experimentais (g/kg) para juvenis de tilápias do Nilo por um período de 56 dias..... 49

Tabela 2 – Desempenho produtivo de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem e com substituição parcial de fosfato bicálcico pela nova geração de fitase líquida. .... 54

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem e com substituição parcial de fosfato bicálcico pela nova geração de fitase líquida.....	55
Tabela 4 - Composição corporal e retenção de minerais nas vértebras de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem e com substituição parcial de fosfato bicálcico pela nova geração de fitase líquida..	57

## LISTA DE FIGURAS

### **I – Revisão de literatura**

Figura 1. Fórmula estrutural do ácido fitico .....	5
Figura 2. Possíveis interações do fitato com minerais catiônicos.....	6
Figura 3. Engenharia genética da fitase híbrida Natuphos® E.....	10
Anexo .....	73
Figura 1. Efeito da adição de fitase no nível de 1000 FTU/kg e redução na inclusão de fosfato bicálcico (FB) em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. Dietas com 30 g/kg de FB; 20 g/kg de FB + 1000 FTU/kg, 10 g/kg de FB + 1000 FTU/kg, FB0 + 1000 FTU/kg e FB0.....	73

## RESUMO

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar a adição de nova geração de fitase sobre o coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da energia, proteína, lipídios totais aminoácidos e minerais (Experimento I) e desempenho produtivo, retenção de minerais e parâmetros sanguíneos de juvenis de tilápias do Nilo (Experimento II). No o experimento I, foi elaborada dieta controle, contendo alimentos vegetais com 320,33 g/kg de proteína bruta (PB), 19,50 MJ/kg de energia bruta (EB), 8,70 g/kg de cálcio (Ca) e 7,73 g/kg de fósforo (P). A fitase líquida foi adicionada após a extrusão das dietas nos níveis de 0 (controle), 500, 1000 e 1500 unidades de fitase ativa (FTU/kg), utilizando óxido de cromo como indicador. Juvenis de tilápias do Nilo ( $n = 96$ , peso corporal inicial  $36,0 \pm 1,33$  g) foram distribuídos em oito aquários de digestibilidade em um delineamento inteiramente ao acaso com quatro tratamentos e duas repetições as fezes foram coletadas durante 21 dias. Os peixes que receberam as dietas com adição de 1000 e 1500 FTU/kg apresentaram maior CDA da matéria seca (MS) ( $P = 0,004$ ), EB ( $P = 0,005$ ) e PB ( $P = 0,002$ ) em relação aos peixes alimentados com a dieta controle e com 500 FTU/kg. O CDA do extrato etéreo não foi influenciado pelas dietas ( $P = 0,107$ ). Peixes alimentados com as dietas contendo 1000 e 1500 FTU/kg apresentaram maior CDA do Ca ( $0,001$ ); P ( $P < 0,001$ ); Fe ( $P = 0,037$ ), cobre (Cu) ( $P = 0,016$ ), magnésio (Mg) ( $P = 0,001$ ) e manganês (Mn) ( $P = 0,008$ ) em relação aos peixes alimentados com a dieta sem adição da enzima. Peixes alimentados com dietas contendo 1000 e 1500 FTU/kg apresentaram maiores CDA da leucina ( $P = 0,019$ ), lisina ( $P = 0,003$ ) e serina ( $P = 0,014$ ) em relação aos peixes que consumiram a dieta sem a adição da enzima. A adição de fitase no nível de 1000 FTU/kg foi eficaz para melhorar o CDA da energia e nutrientes. No experimento II, foi realizado ensaio de crescimento com o objetivo de avaliar a substituição de fosfato bicálcico (FB) em dietas pela adição de nova geração de fitase (1000 FTU/kg) para juvenis de tilápias do Nilo. Foram elaboradas cinco dietas extrusadas com

aproximadamente 19,54 MJ/kg de EB e 326,44 g/kg de PB, com 30 g/kg de FB e sem adição de fitase (controle positivo, FB30), sem adição de FB e de fitase (controle negativo, FB0), sem FB e com adição de 1000 FTU/kg (FB0 + F), com a inclusão de 10 g/kg de FB e 1000 FTU/kg (FB10 + F) e dieta com 20 g/kg de FB e 1000 FTU/kg (FB20 + F). Juvenis de tilápias do Nilo ( $n = 240$ , peso corporal inicial  $12,03 \pm 0,14$ g) foram distribuídos em 20 aquários em um delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições, durante 56 dias. Peixes que receberam as dietas com FB30, FB10 + F e FB20 + F apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) peso final, ganho de peso, consumo e taxa de eficiência proteica em relação aos que consumiram a dieta FB0 e FB0 + F. Peixes alimentados com as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F apresentaram menores valores de ( $P < 0,05$ ) gordura visceral, energia corporal e gordura corporal em relação aos peixes alimentados com as dietas FB0 e FB0 + F. Foi observada maior mortalidade ( $P < 0,05$ ), aumento no nível de colesterol, triglicerídeos e atividade da enzima fosfatase alcalina no plasma dos peixes alimentados com a dieta FB0 e FB0 + F em relação aos peixes que receberam as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F. As menores concentrações de Ca e P plasmáticos ( $P < 0,05$ ) e Ca, P, Mg e Mn nas vértebras foram observadas nos peixes que receberam as dietas FB0, quando comparados com os peixes alimentados com as dietas FB10 + F e FB20 + F. Não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) dos tratamentos sobre a conversão alimentar, índice hepatossomático, atividade da enzima aspartato aminotransferase no plasma, teores de ferro (Fe) e zinco (Zn) nas vértebras, umidade e proteína bruta corporal. Concluiu-se que a adição de 1000 FTU/kg é adequada para otimizar os CDA e que o FB pode ser reduzido em 67% com inclusão de 1000 FTU/kg e 20 g/kg de FB em dietas elaboradas com alimentos de origem vegetal para juvenis de tilápias do Nilo.

**Palavras-chave:** aminoácidos, fosfatase alcalina, fósforo, nutrição, retenção de minerais

## ABSTRACT

Two experiments were carried out to evaluate the phytase addition to the apparent digestibility coefficient (ADC) of energy, protein, total amino acid, lipids and minerals (Experiment I) and productive performance, mineral retention and blood parameters of Nile tilapia juveniles (Experiment II). In the experiment I, a control diet was elaborated, containing vegetal foods with 320.33 g/kg of crude protein (CP), 19.50 MJ/kg of crude energy (GE), 8.70 g/kg of calcium (Ca) and 7.73 g/kg of phosphorus (P). Liquid phytase was added after diets extrusion at the levels of 0 (control), 500, 1000 and 1500 units of active phytase (FTU/kg), using chromium oxide as indicator. Nile tilapia juveniles ( $n = 96$ , initial body weight  $36.0 \pm 1.33$  g) were distributed in eight digestibility aquaria in a completely randomized design with four treatments and two replicates. The faeces were collected for 21 days. Fish that received diets with addition of 1000 and 1500 FTU/kg had higher ADC of dry matter (DM) ( $P = 0.004$ ), GE ( $P = 0.005$ ) and CP ( $P = 0.002$ ) when compared to fish fed with control diet and 500 FTU/kg. The ADC of the ethereal extract was not influenced by diets ( $P = 0.107$ ). Fish fed diets containing 1000 and 1500 FTU/kg showed higher Ca ( $P = 0.001$ ); P ( $P < 0.001$ ); Fe ( $P = 0.037$ ), copper (Cu) ( $P = 0.016$ ), magnesium (Mg) ( $P = 0.001$ ) and manganese (Mn) ( $P = 0.008$ ) ADC when compared to fish fed with the diet without enzyme addition. Fish fed diets containing 1000 and 1500 FTU/kg showed higher ADC of leucine ( $P = 0.019$ ), lysine ( $P = 0.003$ ) and serine ( $P = 0.014$ ) in relation to fish that consumed the diet without the enzyme addition. Phytase addition at the 1000 FTU/kg level was effective in enhancing the energy and nutrient ADC. In the experiment II, a growth assay was carried out to evaluate the dicalcium phosphate (DP) replacement in diets by the addition of new generation of phytase (1000 FTU/kg) for Nile tilapia juveniles. Five extruded diets with approximately

19.54 MJ/kg of GE and 326.44 g/kg of CP were prepared, with 30 g/kg DP and without phytase addition (positive control, DP30), without DP addition and (DP0 + F), with the addition of 10 g/kg DP and 1000 FTU/kg (DP10 + F) and a diet with 20 g/kg DP and 1000 FTU/kg (DP20 + F). Nile tilapia juveniles ( $n = 240$ , initial body weight  $12.03 \pm 0.14$ g) were distributed in 20 aquariums in a completely randomized design with five treatments and four replicates for 56 days. Fish fed diets with DP30, DP10 + F and DP20 + F showed higher ( $P < 0.05$ ) final weight, weight gain, consumption and protein efficiency ratio than those consuming the diet DP0 and DP0 + F. Fish fed diets DP30, DP10 + F and DP20 + F presented lower values ( $P < 0.05$ ) of visceral fat, body energy and body fat in relation to fish fed with the DP0 and DP0 + F diets. There was higher mortality index as well as an increase ( $P < 0.05$ ) in the cholesterol, triglycerides and plasma alkaline phosphatase enzyme activity levels of fish fed the diet DP0 and DP0 + F in relation to the fish that received the DP30, DP10 + F and DP20 diets. The lowest amount of plasmatic calcium and phosphorus ( $P < 0.05$ ) and Ca, P, Mg and Mn in the vertebrae were observed in fish that received the DP0 diets when compared to the fish fed the DP10 + F and DP20 + F diets. No effect ( $P > 0.05$ ) of treatments on feed conversion, hepatosomatic index, plasmatic aspartate aminotransferase enzyme activity, iron (Fe) and zinc (Zn) contents in the vertebrae, moisture and crude body protein was observed. It was concluded that the addition of 1000 FTU/kg is adequate to optimize ADC and that DP can be reduced by 67% with inclusion of 1000 FTU/kg and 20 g/kg DP in diets made from plant based ingredients for Nile tilapia juveniles.

**Key words:** alkaline phosphatase, digestibility, mineral retention, nutrition, phosphorus.

## I – INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura cresceu de forma acelerada nos últimos anos, com incremento na produção de tilápias. De acordo com a Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR) o Brasil é o 4º produtor mundial de tilápias, com produção de 357 mil toneladas em 2017, mais de 51% da produção total da piscicultura nacional. Com o avanço na produção, tem-se buscado a inclusão de dietas que visem melhorar o desempenho animal e reduzir os impactos no ambiente de cultivo.

Assim, a produção de alimentos de forma sustentável tem sido exigida pelos consumidores de diversos países. Os alimentos de origem vegetal são avaliados para elaborar dietas comerciais para peixes, considerando os aspectos nutricionais e a redução das cargas de nutrientes excretados pelos animais (Adeoye et al., 2016). No entanto, os alimentos vegetais utilizados em substituição parcial ou total das fontes proteicas de origem animal possuem fatores antinutricionais como o fitato, principal forma de armazenamento do fósforo, este mineral encontra-se complexado a molécula de fitato, não disponível para animais monogástricos (NRC, 1993).

Na nutrição animal o fósforo desempenha diversas funções como transferência e armazenamento de energia, faz parte de diversos processos bioquímicos sendo um mineral de elevada importância para diversos processos metabólicos (Nelson e Cox, 2014), na indisponibilidade desse mineral nas dietas é acrescentado fosfato bicálcico para suprir a exigência dos animais (Ahmed, 2014). O fosfato bicálcico de origem sedimentar e ígnea tem sido utilizado na produção de suplementos alimentares como fonte de fósforo para animais domésticos e domésticos nas últimas décadas (Behaviour, 1990).

O fitato (*hexafosfato de mio-inositol*) é a principal forma de armazenamento de fósforo em sementes e grãos (Kumar et al., 2010). Esse composto possui estrutura polianiônica que pode formar complexos com cátions divalentes como, cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), fósforo (P), magnésio (Mg), manganês (Mn), zinco (Zn), proteínas e aminoácidos, tornando-os indisponíveis para a absorção (Harland e Morris, 1995). Assim, o fitato não absorvido é excretado no ambiente de criação, resultando em poluição, pelo crescimento excessivo de algas (Papatryphon et al., 1999). Como alternativa para utilização do fósforo complexado como fitato, tem sido incluída nas dietas a enzima fitase que proporciona a hidrólise desse composto, liberando o fósforo para absorção.

A adição de fitase aumenta a disponibilidade do fósforo e permite a redução da inclusão de fontes inorgânicas em dietas para animais monogástricos (Verlhac-Trichet et al., 2014). Os efeitos negativos do fitato são neutralizados pela enzima que hidrolisa a molécula de fitato em penta-, tetra-, tri-, di- e mono-fosfato de mioinositol (Mitchell et al., 1997). A inclusão de fitase as dietas proporciona melhora nos coeficientes de digestibilidade aparente do fósforo (Hussain et al., 2016; Kemigabo et al., 2018; Nwanna e Liebert, 2016). Além disso, aumenta a disponibilidade de outros minerais (Cheng e Hardy, 2002; Debnath et al., 2005a; Hussain et al., 2015) com efeitos positivos sobre a digestibilidade da energia (Hussain et al., 2016; Maas et al., 2018), proteína bruta (Cao et al., 2008; Liebert e Portz, 2005) e aminoácidos (Nwanna e Liebert, 2016; Riche et al., 2002). Consequentemente, aumenta o ganho de peso (Nie et al., 2017; von Danwitz et al., 2016) e a eficiência alimentar (Liu et al., 2012; Tudkaew et al., 2008).

As fitases utilizadas na nutrição animal têm redução na atividade em variações de pH e temperatura, as fitases ácidas mostram desfosforilação máxima do fitato em pH 5,0 e atividade reduzida em temperaturas acima de 60°C (Kumar et al., 2011). Assim, o pH ótimo e a maior termoestabilidade determinam a eficiência da atuação da enzima (Cowieson et al., 2011). Para atividade ótima uma fitase que deve estar ativa no intestino delgado requer uma estabilidade suficientemente alta sob as condições de pH no estômago e no intestino, assim como alta resistência a atividades proteolíticas, principalmente de pepsina no estômago e proteases pancreáticas no intestino delgado (Gontia-Mishra e Tiwari, 2013). Os resultados da adição da enzima as dietas variam de acordo com a origem e os ingredientes utilizados nas dietas, podendo haver indisponibilidade da atuação em variações de pH e temperatura (Cao et al., 2008). Nos últimos anos, novas gerações de enzimas foram desenvolvidas para aumentar a

disponibilidade de nutrientes. Com o objetivo de se obter produtos mais eficientes, a BASF lançou no mercado no ano de 2016 a nova fitase Natuphos® E. Essa enzima possui maior estabilidade térmica, além de garantir rápida liberação de nutrientes ligados ao fitato. As fontes das enzimas utilizadas variam e sua atividade depende da temperatura e pH. As formas de inclusão às dietas podem reduzir sua atividade e, assim, tem-se utilizado enzimas na forma líquida, após o processamento, para evitar desnaturação e garantir melhores resultados.

A adição da fitase é tema de vários estudos com diversas espécies, dentre elas, a tilápia do Nilo. Essa espécie apresenta elevada importância na aquicultura em todo o mundo (Martins et al., 2004), destaca-se por apresentar características desejáveis como facilidade de manejo, alimentam-se da base da cadeia trófica, resistentes às doenças, às variações climáticas, carne com boas características organolépticas como ausência de espinhos intramusculares em forma de “Y”, e bom rendimento de filé (Martins et al., 2004).

Ainda que diversas pesquisas tenham sido avaliadas com a utilização de fitase para tilápias do Nilo (Hassaan et al., 2013; Nwanna e Olusola, 2014), não existem informações da utilização da nova geração de fitase na forma líquida, sobre a disponibilidade dos aminoácidos em dietas isentas de alimentos de origem animal, sem a inclusão de fontes inorgânicas de fósforo.

Desta forma, é importante a continuidade de pesquisas para avaliar o potencial das novas enzimas disponíveis no mercado para viabilizar a adição das mesmas em dietas comerciais para tilápias. Destaca-se que o processo de extrusão é rotineiro na elaboração de dietas para tilápias e a adição pós-extrusão e secagem via “coating” viabiliza a aplicação da enzima de forma comercial com elevado valor residual de atividade enzimática. Portanto, pela necessidade de entender os efeitos da nova fitase em dietas para peixes, é importante experimentos com a adição da nova enzima a fim de comprovar sua eficiência.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Fósforo na nutrição animal

Os minerais são constituintes de diversos tecidos e estão presentes em quantidades variadas de acordo com sua função no organismo animal. O cálcio e fósforo constituem a maior parte do conteúdo mineral nos ossos (Nelson e Cox, 2014). O fósforo faz parte de vários processos bioquímicos como geração, transferência de energia e armazenamento de compostos fosforilados como ATP (trifosfato de adenosina) (Moore et al., 2015). Está envolvido em diversas funções de crescimento e diferenciação celular, é um dos componentes dos ácidos nucleicos, DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico), auxilia na manutenção do equilíbrio ácido básico, representa importante função no metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos (Lall, 2002). Portanto, a deficiência de fósforo pode ocasionar declínio no crescimento, maior retenção de gordura corporal, menor mineralização nos ossos, deformidades operculares e esqueléticas (Fjellidal et al., 2012).

A capacidade dos peixes em absorver fósforo do ambiente de cultivo é reduzida, pela baixa concentração desse mineral em água doce (Boyd, 1979). Assim, para suprir suas exigências, precisam adquirir esse elemento por meio da dieta. No entanto, nos ingredientes de origem vegetal, o fósforo encontra-se complexado à molécula de fitato, indisponível, por causa da ausência de secreção endógena da enzima fitase pela mucosa intestinal (Kumar et al., 2012). Isso pode comprometer a demanda de fósforo quando utilizado somente ingredientes de fontes vegetais as dietas. Em caso de deficiências, os peixes mobilizam as reservas contidas nos ossos (Fjellidal et al., 2012).

Em juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a deficiência de fósforo por cinco semanas provocou anorexia, letargia e crescimento reduzido. Em casos de anorexia, a redução da ingestão dos nutrientes essenciais somados ao aumento da gordura corporal, podem tornar os peixes mais susceptíveis à doenças (Sugiura et al., 2004). Redução no apetite, maior teor de gordura corporal, coloração escura dos peixes, crescimento reduzido e baixa mineralização óssea foram sintomas encontrados em juvenis de perca prateada (*Bidyanu bidyanus*) alimentadas com dietas deficientes em fósforo (Yang et al., 2006). Em “peixe branco” (*Coregonus lavaretus*), quando submetidos a deficiência de

fósforo houve baixa concentração de fosfato plasmático, redução da mineralização óssea e crescimento reduzido (Vielma et al., 2002).

A exigência dietética de fósforo varia de acordo com a idade do animal, o estágio de desenvolvimento, taxa de crescimento e fatores externos (Sugiura et al., 2004). Sua deficiência também interfere no metabolismo intermediário, prejudicando a transferência de energia (Nelson e Cox, 2014), reduzindo a utilização dos carboidratos, proteínas, lipídios e conseqüentemente, afetando o crescimento (Rodehutsord et al., 2000). O excesso ou fração não absorvida da dieta é excretada no ambiente, o que proporciona aumento das concentrações de compostos fosfatados que acarreta eutrofização do ambiente aquático (Jahan et al., 2002) resultando em desequilíbrio no balanço do oxigênio dissolvido na água, que pode provocar mortalidade de peixes (Baruah et al., 2004).

A adição de fitase em dietas com a finalidade de disponibilizar o fósforo presente nos ingredientes de origem vegetal é uma alternativa para reduzir a suplementação de fontes inorgânicas desse mineral (Cao et al., 2008). Além disso, é possível reduzir a excreção de fósforo pelos peixes e contribuir para a sustentabilidade no sistema produtivo.

## 1.2 Fitato

O fitato refere-se ao sal misto de ácido fítico (*hexafosfato de mio-inositol*, IP6), de fórmula molecular  $C_6H_{18}O_{24}P_6$ . É um composto formado naturalmente durante a maturação da semente sendo a forma primária de armazenamento de fósforo durante a germinação (Selle e Ravindran, 2007). Na Figura 1 é apresentada a fórmula estrutural do ácido fítico.

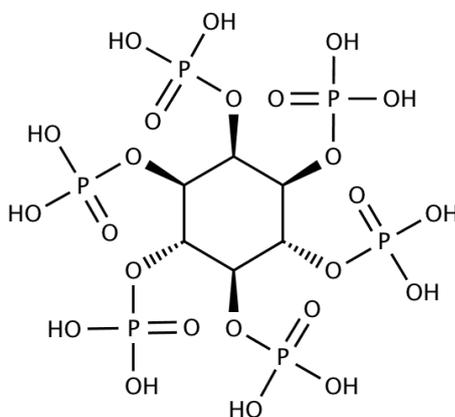


Figura 1. Fórmula estrutural do ácido fítico (Haefner et al., 2005)

O fitato isolado a partir de plantas faz parte do grupo dos fosfatos orgânicos que é uma mistura de sal de cálcio e magnésio do ácido inositol hexafosfórico (Baruah et al., 2007). No processo de amadurecimento, as sementes de cereais e leguminosas acumulam quantidades consideráveis de fitato (Honke et al., 1998). Assim, a maioria dessas sementes e seus coprodutos contêm 1-2% de fitato que representam cerca de 60-82% de seu fósforo total (Ravindran et al., 1994). No milho, cerca de 90% do fitato é encontrado no gérmen, no trigo e arroz, apresenta-se em maior quantidade nas camadas externas do pericarpo e aleurona (O'Dell et al., 1972). O conteúdo de fitato varia de acordo com as espécies vegetais, entre os alimentos mais utilizados em dietas para peixes como o farelo de soja, farinha de colza e gergelim, a quantidade de fitato é a cerca de 1,0-1,5; 5,0-7,5 e 2,4% respectivamente (Francis et al., 2001).

Para animais monogástricos, os ingredientes de origem vegetal apresentam fósforo com baixa disponibilidade pela ausência da enzima fitase endógena, necessária para catalisar a hidrólise do fitato (Kumar et al., 2011). Além da baixa disponibilidade de fósforo, o fitato pode formar quelatos com outros compostos, reduzindo a disponibilidade desses nutrientes (Kumar et al., 2012). Este fato ocorre por causa de sua estrutura polianiônica que permite interação com minerais catiônicos, tendo maior suscetibilidade os divalentes tais como o Zn, Cu, Ca, Fe Mg e Mn. O fitato pode também formar quelatos com proteínas e aminoácidos, essa interação é dependente do pH, podendo haver formação de complexos binários proteína e fitato e complexos ternários proteína, mineral e fitato, resultando em redução no desempenho animal, (Liu et al., 2005), a formação de complexos é apresentada na Figura 2.

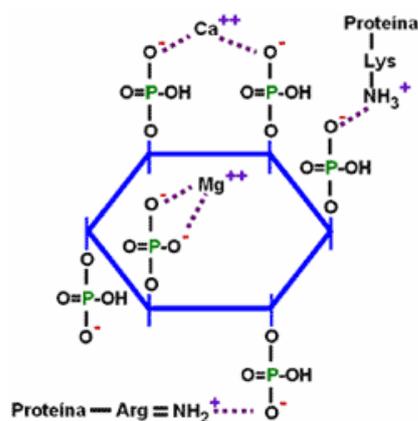


Figura 2. Possíveis interações do fitato com minerais catiônicos (Kornegay, 2001).

A formação de um complexo ocorre quando um íon metálico combina com um doador de elétrons. Quando o doador de elétrons (fitato) possui dois ou mais grupos de doadores (fosfatos) para que forme um ou mais anéis, há então a formação de estruturas denominadas quelatos (McMurry e Fay, 2003). Durante a formação dos quelatos ocorre deslocamento de um ou mais prótons ácidos do agente quelante por um íon metálico, aumentando o  $H^+$  livre e reduzindo o pH (Greiner, 2010).

A formação de quelatos como proteína-fitato ocorre no estômago de animais monogástricos (Kies et al., 2006), esses complexos podem, além de afetar a estrutura proteica, reduzir a digestibilidade da proteína (Morales et al., 2011). As reações são dependentes do pH do meio, da solubilidade do fitato, do ponto isoelétrico da proteína e da sua estrutura terciária ou quaternária (Kumar et al., 2011). Assim, a formação dos complexos pode reduzir o desempenho dos animais pela redução da digestão desses nutrientes.

A complexidade do fitato nos ingredientes vegetais e suas propriedades funcionais dependem de sua estrutura. Vários fatores afetam sua disponibilidade, como genética, condições de irrigação, variações ambientais e tipos de solo (Nwanna e Olusola, 2014). Portanto, o efeito do fitato no desempenho dos peixes depende de algumas condições, tais como, quantidade presente na dieta e espécie em estudo, resultando em diversos efeitos fisiológicos que podem refletir de forma negativa o desempenho dos animais. Na Tabela 1 são apresentados a quantidade de fitato presente em alguns ingredientes de origem vegetal.

Tabela 1

Quantidade de fósforo total e fítico em alimentos de origem vegetal (base da matéria seca).

<b>Alimento</b>	<b>P total (g/kg)</b>	<b>P fítico (g/kg)</b>
Milho	2,50	1,70
Glúten de milho	5,00	4,20
Farelo de arroz	17,51	15,83
Arroz	1,20	0,80
Arroz quebrado	0,85	0,40
Farelo de trigo	10,96	8,36
Trigo	3,08	2,20
Sorgo	2,92	2,41
Cevada	2,73	1,86
Aveia	2,43	2,10
Farelo de girassol	9,05	7,48
Farelo de amendoim	6,00	4,60
Farelo de coco	4,30	2,40
Semente de algodão	6,05	4,25
Farelo de algodão	11,36	9,11
Farelo de girassol	9,05	7,48
Farelo de canola	8,76	6,69
Soja grão	6,66	4,53

Adaptado por Selle et al., (2003).

### 1.3 Fitase

A fitase (*mio-inositol-hexaqui-fosfato fosfohidrolase*) é uma fosfatase que catalisa a hidrólise do fitato, formando inositol e fosfatos, disponibilizando o fósforo para ser absorvido (Konietzny e Greiner, 2002). O estudo da fitase teve início com Warden e Schaible (1962) que pesquisaram a aplicação da enzima em dietas para frangos de corte (Greiner e Konietzny, 2010).

As fitases podem ser endógenas presentes no intestino delgado e intestino grosso de animais e as fitases presentes nos vegetais e microrganismos (Kumar et al., 2012). A atividade da enzima é influenciada pelo pH e temperatura. Para sua atividade ótima as fitases devem ser resistentes à temperatura, apresentar alta capacidade de degradação do fitato e elevada atividade em ampla faixa de pH (Greiner e Konietzny, 2010).

As principais fontes da enzima são os microrganismos, estes podem manter sua atividade em altas temperaturas e variações no pH (Haefner et al., 2005). As fitases

nativas provenientes dos vegetais perdem sua atividade com pequenas variações durante o tratamento térmico, tendo pouca aplicação na nutrição animal (Greiner e Konietzny, 2010). Dependendo da origem da enzima, a hidrólise do fitato pode variar de 35 a 80°C (Greiner et al., 2002). Atualmente, as fitases mais utilizadas são derivadas de fungos (*Aspergillus niger*, *Peniophora lycii*) ou bactérias (*Escherichia coli*) (Kumar et al., 2012).

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as fitases podem ser classificadas em duas categorias como: 3 fitases (EC 3.1.3.8), conhecida como mio-inositol hexaquifosfato-3-fosfohidrolases que hidrolisam o fitato na posição C1 ou C3 do carbono no anel de inositol, encontradas geralmente em bactérias e fungos e 6 fitases (EC 3.1.3.26) que promove a desfosforilação do ácido fítico no carbono C6 (Selle e Ravindran, 2007).

Quanto à forma estrutural e catalítica as fitases podem ser classificadas de acordo com o pH ideal, como ácidas (pH 2,5 – 6,0) e alcalinas (pH 6,0 - 8,0). São subdivididas em três classes: fosfatases ácidas de histidina (HFA), fitase  $\beta$ -hélice (FBA) e fosfatase ácido “purple” (FAP) (Mullaney e Ullah, 2003), sendo a mais conhecida as fosfatases ácidas. No processo de hidrólise da fitase sobre o ácido fítico, ocorre uma série de reações de desfosforilação, gerando ésteres de fosfato de mio-inositol inferiores (IP6 $\Rightarrow$ IP5 $\Rightarrow$ IP4 $\Rightarrow$ IP3 $\Rightarrow$ IP2 $\Rightarrow$ IP1) e a produção do mio-inositol livre juntamente com a cadeia de ésteres fosfóricos inferiores (penta-fosfato de inositol para monofosfato) (Greiner e Konietzny, 2010). Os intermediários formados são liberados das enzimas e servem como substratos para hidrólise adicional (Lei, 2003). As fosfatases de histidina, independente da origem, fúngica ou bacteriana, geralmente liberam cinco dos seis resíduos de fosfato da molécula de fitato, sendo o produto final de degradação identificado como fosfato de mio-inositol (Greiner et al., 2002).

A atividade da fitase varia de acordo com a espécie animal atuando no estômago e na parte superior do intestino delgado em suínos, em aves a atividade da fitase ocorre na parte superior do trato digestório e em peixes a fitase atua no estômago (Israr et al., 2017). A adição da fitase tem mostrado melhoria na utilização do fosfato a partir do fitato e redução na excreção desse mineral no ambiente (Greiner e Konietzny, 2006). Sua atividade pode ser expressa como FYT, FTU, PU ou U, todos tendo o mesmo significado (Kumar et al., 2012). De acordo com Engelen et al. (1994), 1 FTU é a quantidade de

fósforo inorgânico liberado ( $\mu\text{mol}$ ) no período de um minuto de reação numa solução de fitato de sódio na concentração de  $5,1 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 5,5 e temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Para a elaboração de enzimas que atuem de forma efetiva na nutrição animal, os principais fatores a serem considerados são a resistência às faixas de pH, temperatura ideal de atividade e resistência às proteases (Chen et al., 2015). Em trabalhos com diferentes interações entre fitato e proteína utilizando fitase fúngica (*Peniophora lycii*) e bacteriana (*Escherichia coli*) em diferentes condições de digestão pH (2,0; 3,0 e 4,0) e temperatura ( $6$  e  $16^\circ\text{C}$ ) em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a atividade da fitase fúngica apresentou pH ótimo a 5,5 e a fitase bacteriana mostrou dois picos 2,5 e 4,5. Esses fatores podem alterar a atividade da fitase, afetando a solubilidade do fitato (Morales et al., 2011).

Com o objetivo de obter enzima com maior estabilidade ao pH estomacal e resistente a alta temperatura durante o processamento, foi desenvolvida e apresentada pela BASF (Corporation, Ludwigshafen, Germany), no ano de 2016 a Natuphos® E, em forma de pó, líquida e granulada. A enzima foi desenvolvida a partir de três fontes bacterianas, obtendo-se uma geração híbrida que foi inserida em uma cepa de fungo filamentososo *Aspergillus niger*. Na figura 3 é apresentado o modelo da engenharia genética na nova fitase

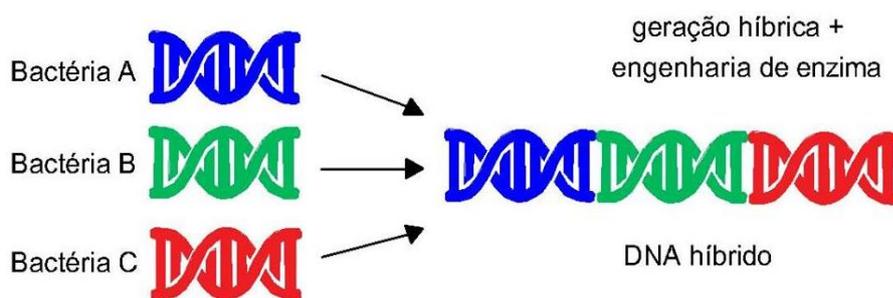


Figura 3. Engenharia genética da fitase híbrida Natuphos® E (BASF, 2016)

O maior interesse na elaboração da nova fitase é a obtenção de um produto que tenha maior estabilidade a variações de pH no trato digestório e temperatura durante a extrusão. Além disso, foi desenvolvida para que seja eficiente na liberação de fósforo, de modo a aumentar o desempenho do animal, além de minimizar os impactos negativos

causados pela excreção de fósforo pelos animais de interesse na produção animal (BASF, 2016). Com o objetivo de mostrar os efeitos positivos da adição da nova fitase em dietas para peixes é necessário estudos que comprovem sua eficácia, sendo este o objetivo do presente estudo.

#### 1.4 Fitase em dietas para peixes

A utilização de enzimas exógenas na nutrição pode melhorar a viabilidade para o uso de ingredientes de origem vegetal na alimentação de peixes. O farelo de soja já é amplamente utilizado, por apresentar alto teor proteico e considerável balanço em aminoácidos (Gatlin et al., 2007). Assim, é considerado substituto parcial ou total de fontes de proteína de origem animal. No entanto, apesar de viável, o uso de ingredientes vegetais em dietas para peixes tornam-se limitados devido aos fatores antinutricionais que indisponibilizam a utilização da energia e nutrientes (Francis et al., 2001).

A adição de fitase tem mostrado resultados positivos, proporcionando aumento na disponibilidade do fósforo, melhora no crescimento e aumento na retenção corporal de minerais (Li e Robinson, 1997). Os efeitos da adição de fitase variam de acordo com o nível, fonte do mineral na dieta (Greiner e Konietzny, 2010), espécie de peixe e forma de aplicação da enzima, resultando em diversos níveis de recomendação, variando de 300 a 4000 FTU/kg (Tabela 2).

A eficácia da fitase microbiana está relacionada direta ou indiretamente por fatores como espécie, níveis, formas de inclusão e fonte da enzima (Kumar et al, 2010). Uma ampla variedade da enzima foi caracterizada com o objetivo de obter maior estabilidade, resistência a altas temperaturas e pH (Cao et al., 2007). Assim, com o objetivo de melhorar a utilização de nutrientes é importante avaliar a adição de fitase considerando as particularidades de cada espécie de peixe.

#### 1.5 Efeitos da fitase na digestibilidade de nutrientes

Nas últimas décadas a utilização de fitase na aquicultura tem proporcionado melhora no desempenho de crescimento (Portz e Liebert, 2004; Cao et al., 2008; Olusola,

2014), aumento na biodisponibilidade de minerais (Cheng e Hardy, 2002; Nwanna et al., 2007), além de ser fundamental para redução dos excessos de fósforo despejados no meio ambiente (Kumar et al., 2012).

A capacidade de quelação do fitato é reduzida através da ação da fitase, os complexos formados com cátions divalentes podem aumentar a quelação com minerais traços tais como o zinco, formando coprecipitados que indisponibilizam o zinco para os animais (Baruah et al., 2004). Assim, o fitato reduz a disponibilidade de diversos nutrientes através da formação de complexos insolúveis (Cao et al., 2007).

A adição da fitase em dietas à base de ingredientes de origem vegetal foi relatada para melhorar a digestibilidade da proteína. Esses achados foram mostrados por Portz et al., (2004) com a adição de 1000 e 2000 FTU/kg em dietas para tilápia do Nilo. Nesse estudo a adição da enzima melhorou os coeficientes de digestibilidade da energia, proteína e fósforo. Cao et al., (2008) mostraram que dietas pré-tratadas com fitase aumentaram a digestibilidade de fósforo em dietas para tilápia do Nilo. Resultados semelhantes também foram relatados por Hussain et al., (2016) em trabalhos em que a digestibilidade aparente da proteína bruta, gordura e energia bruta em dietas à base de farelo de canola foi significativamente melhorada pela adição enzimática em dietas para carpa rohu (*Labeo rohita*).

O aumento na digestibilidade de nutrientes, pela adição de fitase às dietas foram relatados em diversos estudos como em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Carter e Sajjadi, 2011); tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Hassaan et al., 2013); truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Yigit et al., 2016); pregado (*Psetta maxima*) (von Danwitz et al., 2016) e carpa rohu (Bano e Afzal, 2017). O aumento na digestibilidade dos nutrientes ocorre devido a prévia hidrólise do fitato, evitando assim a formação de quelatos com minerais catiônicos, disponibilizando esses minerais para absorção (Cao et al., 2008), resultando em melhora no desempenho dos animais, e redução na excreção de fósforo e nitrogênio no ambiente de cultivo.

## 1.6 Parâmetros bioquímicos

As informações sobre os parâmetros bioquímicos são fatores importantes para a compreensão das atividades enzimáticas dos peixes e as alterações que podem ocorrer

quando a fitase é adicionada na dieta. Na avaliação do status de saúde dos animais de produção destacam-se a atividade de três enzimas, a fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

A enzima ALP é uma glicoproteína plasmática ligada à membrana que hidrolisa os monoésteres do ácido ortofosfórico, pirofosfato, diésteres de fosfato em meio alcalino (Vieira, 1999). É amplamente distribuída nos sistemas biológicos, está presente na membrana celular, nas células do osso, intestino e rins desempenhando diversas funções, tais como processamento de metabólitos, transporte, secreção e mineralização óssea (Szabó e Ferrier, 2014).

Nos vertebrados, a ALP tem sido associada principalmente a mineralização esquelética (Donachy et al., 1990). No fígado, é considerada um biomarcador da membrana plasmática, principalmente para o canalículo biliar, sendo induzida com facilidade por grande número de estímulos (Donachy et al., 1990). Também é responsável pelo aumento das concentrações de fosfato inorgânico (Pi) e age como uma proteína de ligação ao cálcio atuando como uma bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  nas membranas celulares, ou indiretamente, atuando na mineralização como regulador da divisão e diferenciação celular (Racicot et al., 1975).

Altos níveis de ALP no osso e cartilagem foram associados com a possível relação da enzima a mineralização óssea por meio da hidrólise de fosfatos orgânicos para liberar fosfato inorgânico livre nos locais de mineralização (Donachy et al., 1990). Assim a ALP é utilizada como indicador do desenvolvimento ósseo e quantidades excessivas no plasma podem estar associadas a hipofosfatemia (Sakamoto e Yone, 1980). O aumento na disponibilidade de fósforo em dietas com ingredientes de origem vegetal pode alterar a quantidade da enzima. Devido a importância da ALP no metabolismo do fósforo, a quantificação dessa enzima é um fator que deve ser destacado quando há inclusão da fitase nas dietas.

As transaminases (aminotransferase) ALT e AST são pertencentes a um grupo de enzimas com funções importantes no metabolismo de proteínas e aminoácidos, consideradas transaminases mais importantes no diagnóstico de alterações metabólicas (Coles, 1993). Além da degradação de aminoácidos, como abrangem a formação do piruvato ou ácidos carboxílicos, atuam como ligantes entre o metabolismo de aminoácidos e carboidratos, entrando para o ciclo de Krebs. São encontradas no fígado e

músculo esquelético, medida por meio do plasma sanguíneos não hemolisados (Nelson e Cox, 2014).

Grandes quantidades de AST no sangue podem sugerir danos às células hepáticas. Em peixes, o intervalo normal de transaminases não pode ser estabelecido pela escassez de trabalhos relacionados com a resposta da enzima em animais recebendo dietas com fitase (Kumar, 2011). As alterações na atividade das transaminases podem ser observadas devido a quantidades excessivas de fitato na dieta. O efeito antinutritivo desse composto pode deprimir a transaminação afetando o metabolismo nos nutrientes nos peixes (Kumar, 2011). A principal função do sistema digestivo dos animais compreende a aquisição dos alimentos, seguida pela assimilação dos nutrientes vitais através dos processos digestivos em que enzimas são secretadas no trato gastrointestinal, com a função de hidrolisar os polímeros presentes nos alimentos, em monômeros para assim serem absorvidos (Bakke et al., 2010).

Os exames bioquímicos avaliam os componentes do sangue como colesterol que é precursor de hormônios e vitaminas necessárias para o adequado funcionamento do organismo (Caula et al., 2008), triglicerídeos principal forma de armazenamento de gordura no tecido animal, a concentração de proteínas totais é utilizada como índice básico para a saúde e estado nutricional em peixes (Kumar et al., 2010). Assim é importante avaliar os parâmetros bioquímicos, pois estes são utilizados como indicadores do estado fisiológico e as condições de saúde dos peixes (Higuchi et al., 2011).

Portanto, a presente revisão teve por objetivo mostrar os aspectos relacionados a importância do fósforo, os efeitos causados pelo fitato que podem afetar o desempenho desses animais quando alimentados com dietas contendo ingredientes de origem vegetal e os benefícios da adição de fitase em dietas para peixes. A compreensão desses parâmetros mostra a importância do estudo da fitase para melhorar a produção de peixes, e redução no impacto causado pela excreção de fósforo no ambiente de cultivo.

## 1.7 Referências

- Adeoye, A.A., Jaramillo-Torres, A., Fox, S.W., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2016. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: Overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. *Anim. Feed Sci. Technol.* 215, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.002>

- Ahmed, S., 2014. Phosphate rock as potential cost effective raw material synthesis of dicalcium phosphate used as feed additive for animals from phosphate rock as potential cost-effective raw material. *J. Chem. Sci.* 12(1), 111–120.
- Associação Brasileira da Piscicultura - PEIXE BR., 2018
- Bakke, A.M., Glover, C., Krogdahl, Å., 2010. Feeding, digestion and absorption of nutrients. *Fish Physiol.* 30, 57–110. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03002-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03002-5)
- Bano, N., Afzal, M., 2017. Combined effect of acidification and phytas supplementation on calcium and phosphorus digestibility and body composition of rohu (*Labeo rohita*). *Pak. J. Zool.* 49, 2093–2101. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.6.2093.2101>
- Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Debnath, D., 2004. Dietary Phytase: An ideal approach for a cost effective and low-polluting aquafeed. *NAGA, WorldFish Cent. Q.* 27, 15–19.
- Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Debnath, D., Yengkokpam, S., Mukherjee, S.C., 2007. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), juveniles. *J. World Aquac. Soc.* 38, 238–249. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00092.x>
- Behaviour, T.E., 1990. *The Environmental Behaviour of Radium*. 2. ed. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1990. 310.
- Boyd, C.E., Lichtkoppler, F., 1979. *Water Quality Management in Pond Fish* 30.
- Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., Li, D., 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 497–507. <https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2007.01.007>
- Cao, L., Yang, Y., Wang, W.M., Yakupitiyage, A., Yuan, D.R., Diana, J.S., 2008. Effects of pretreatment with microbial phytase on phosphorous utilization and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Nutr.* 14, 99–109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00508.x>
- Carter, C.G., Sajjadi, M., 2011. Low fishmeal diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using soy protein concentrate treated with graded levels of phytase. *Aquac. Int.* 19, 431–444. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9358-z>
- Caula, F.C.B., Oliveira, M.P. De, Maia, E.L., 2008. Cholesterol content and proximate composition of some fish species from the Ceará state. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 28, 959–963. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000400031>
- Chen, W., Ye, L., Guo, F., Lv, Y., Yu, H., 2015. Enhanced activity of an alkaline phytase from *Bacillus subtilis* 168 in acidic and neutral environments by directed evolution. *Biochem. Eng. J.* 98, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.021>
- Cheng, Z.J., Hardy, R.W., 2002. Effect of microbial phytase on apparent nutrient digestibility of barley, canola meal, wheat and wheat middlings, measured in vivo using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 8, 271–277. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00219.x>
- Cowieson, A. J., Wilcock, P., & Bedford, M. R. (2011). Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal*, 67(2), 225–235. <https://doi.org/10.1017/S0043933911000250>

- Coles, E.H. 1993. Liver function. *Veterinary clinical pathology*. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1974. 165p.
- Debnath, D., Pal, A.K., Sahu, N.P., Jain, K.K., Yengkokpam, S., Mukherjee, S.C., 2005a. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. *Aquac. Res.* 36, 180–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01203.x>
- Debnath, D., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jain, K.K., Yengkokpam, S., Mukherjee, S.C., 2005b. Mineral status of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings in relation to supplemental phytase: Absorption, whole-body and bone mineral content. *Aquac. Res.* 36, 326–335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01204.x>
- Donachy, J.E., Watabe, N., Showman, R.M., 1990. Alkaline phosphatase and carbonic anhydrase activity associated with arm regeneration in the seastar *Asterias forbesi*. *Mar. Biol.* 105, 471–476. <https://doi.org/10.1007/BF01316318>
- Engelen, A.J., van der Heeft, P.H., Randsdorp, Smit, E.L., 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International*. 77,760-764
- Fjellidal, P.G., Hansen, T., Albrektsen, S., 2012. Inadequate phosphorus nutrition in juvenile Atlantic salmon has a negative effect on long-term bone health. *Aquaculture* 334–337, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.043>
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish, *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. *Aquac. Res.* 38, 551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Greiner, R., Farouk, A., Alminger, M.L., Carlsson, N.-G., 2002. The pathway of dephosphorylation of myo -inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus* spp. *Can. J. Microbiol.* 48, 986–994. <https://doi.org/10.1139/w02-097>
- Greiner, R., Konietzny, U., 2006. Phytase for food application. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 125–140.
- Greiner, R., Konietzny, U., 2010. Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. *Enzym. farm Anim. Nutr.* 96–128.
- Gontia-Mishra, I., & Tiwari, S. (2013). Molecular characterization and comparative phylogenetic analysis of phytases from fungi with their prospective applications. *Food Technology and Biotechnology*, 51(3), 313–326.
- Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., Zelder, O., 2005. Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 588–597. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0005-y>
- Harland, B.F., Morris, E.R., 1995. Phytate: A good or a bad food component? *Nutr. Res.* 15, 733–754. [https://doi.org/10.1016/0271-5317\(95\)00040-P](https://doi.org/10.1016/0271-5317(95)00040-P)
- Hassaan, M.S., Soltan, M.A., Agouz, H.M., Badr, A.M., 2013. Influences of

- calcium/phosphorus ratio on supplemental microbial phytase efficiency for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Egypt. J. Aquat. Res. 39, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.09.001>
- Honke, J., Kozłowska, H., Frias, C.V.J., 1998. Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds 279–283.
- Higuchi, L.H., Feiden, A., Maluf, M.L.F., Dallagnol, J.M., Zaminhan, M., Boscolo, W.R., 2011. Avaliação eritrocitária e bioquímica de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos à dieta com diferentes níveis protéicos e energéticos. Ciência Anim. Bras. 12, 70–75. <https://doi.org/10.5216/cab.v12i1.8986>
- Hussain, S.M., Afzal, M., Javid, A., Hussain, A.I., Ali, Q., Mustafa, I., Chatha, S.A.S., Shah, S.Z.H., Hussain, M., Ullah, M.I., 2015. Efficacy of phytase supplementation on growth performance and mineral digestibility of *Labeo rohita* fingerlings fed on cottonseed meal based diet. Pak. J. Zool. 47, 699–709.
- Hussain, S.M., Afzal, M., Nasir, S., Javid, A., Makhdoom, S.M., Jabeen, F., Azmat, H., Hussain, M., Shah, S.Z.H., 2016. Efficacy of phytase supplementation in improving mineral digestibility in *Labeo rohita* fingerlings fed on canola meal-based diets. Iran. J. Fish. Sci. 15, 645–661. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1091331>
- Israr, B., Frazier, R.A., Gordon, M.H., 2017. Enzymatic hydrolysis of phytate and effects on soluble oxalate concentration in foods. Food Chem. 214, 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.044>
- Jahan, P., Watanabe, T., Satoh, S., Kiron, V., 2002. A laboratory-based assessment of phosphorus and nitrogen loading from currently available commercial carp feeds. Fish. Sci. 68, 579–586. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00464.x>
- Kemigabo, C., Abdel-Tawwab, M., Lazaro, J.W., Sikawa, D., Masembe, C., Kang'Ombe, J., 2018. Combined effect of dietary protein and phytase levels on growth performance, feed utilization, and nutrients digestibility of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), reared in earthen ponds. J. Appl. Aquac. 0, 1–16. <https://doi.org/10.1080/10454438.2018.1439425>
- Kies, A.K., De Jonge, L.H., Kemme, P.A., Jongbloed, A.W., 2006. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies. J. Agric. Food Chem. 54, 1753–1758. <https://doi.org/10.1021/jf0518554>
- Konietzny, U., Greiner, R., 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). Int. J. Food Sci. Technol. 37, 791–812. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00617.x>
- Kornegay, E. T. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). Enzymes in farm animal nutrition. Cambridge: CABI, 2001. p. 237-271. Acesso em 19 de outubro de 2017 [http://www.animal.nutrition.basf.com/web/global/animal-nutrition/en/Product-Launch/Natuphos E/index?mid=0](http://www.animal.nutrition.basf.com/web/global/animal-nutrition/en/Product-Launch/Natuphos-E/index?mid=0)
- Kumar, V., Makkar, H.P.S., Devappa, R.K., Becker, K., 2011. Isolation of phytate from *Jatropha curcas* kernel meal and effects of isolated phytate on growth, digestive physiology and metabolic changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Food Chem. Toxicol. 49, 2144–2156. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.029>
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chem. 120, 945–959.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.052>
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 96, 335–364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>
- Lall, S.P. The minerals, *Fish Nutrition*, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2002, p. 259-308.
- Lei, X.G., 2003. Phytase enzymology , applications , and biotechnology 1787–1794.
- Li, M.H., Robinson, E.H., 1996. Phosphorus Availability of Common Feedstuffs to Channel Catfish *Ictalurus Punctatus* as Measured by Weight Gain and Bone Mineralization. *J. World Aquac. Soc.* 27, 297–302. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1996.tb00611.x>
- Liebert, F., Portz, L., 2005. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture* 248, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.009>
- Liu, Z., Cheng, F., Zhang, G., 2005. Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar and environment and its relation to protein content. *Food Chem.* 89, 49–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.081>
- Liu, L.W., Su, J., Luo, Y., 2012. Effect of partial replacement of dietary monocalcium phosphate with neutral phytase on growth performance and phosphorus digestibility in gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch). *Aquac. Res.* 43, 1404–1413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02944.x>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Dersjant-Li, Y., Schrama, J.W., 2018. The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture* 487, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.040>
- Martins, C., Oliveira, C., Wasko, A.P., Wright, J.M., 2004. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - A review. *Aquaculture* 231, 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.017>
- McMurry, J., Fay, R., 2003. *Chemistry: Biochemistry* 117, 1952–1953.
- Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B.J., Pasamontes, L., Van Loon, A.P.G.M., 1997. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: Isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology* 143, 245–252. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-245>
- Morales, G.A., Moyano, F.J., Marquez, L., 2011. In vitro assessment of the effects of phytate and phytase on nitrogen and phosphorus bioaccessibility within fish digestive tract. *Anim. Feed Sci. Technol.* 170, 209–221.
- Moore, L.W., Nolte, J. V, Gaber, A.O., Suki, W.N., 2015. By Levels of Kidney Function 1 , 2. *Am J Clin Nutr* 444–453. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.102715>.
- Mullaney, E.J., Ullah, A.H.J., 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.176>
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. *Lehninger Princípios de Bioquímica*.

- <https://doi.org/10.1002/14651858>
- Nie, X., Chen, S., Zhang, X., Dai, B., Qian, L., 2017. Effects of neutral phytase on growth performance and phosphorus utilization in crucian carp (*Carassius auratus*). *J. Zhejiang Univ. B* 18, 886–896. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600280>
- National Research Council (NRC). Nutrient requirements of fish. Washington, DC: National Academy Press; 1993, 114 pp.
- Nwanna, L.C., 2007. Effect of dietary phytase on growth, enzyme activities and phosphorus load of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Engineering Appl. Sci.* 2, 972 - 976
- Nwanna, L.C., Eisenreich, R., Schwarz, F.J., 2007. Effect of wet-incubation of dietary plant feedstuffs with phytases on growth and mineral digestibility by common carp (*Cyprinus carpio* L). *Aquaculture* 271, 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.020>
- Nwanna, L.C, Olusola, S., 2014. Effect of Supplemental Phytase on Phosphorus Digestibility and Mineral Composition in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int. J. Aquac.* 4, 89–95. <https://doi.org/10.5376/ija.2014.04.0015>
- Nwanna, L.C., Liebert, F., 2016. Effect of Varied Levels of Lysine Supplemented with Phytase on the Growth , Nutrient Digestibility , Phosphorus and Nitrogen Load of all Male Nile. *African Sci. Fish. Aquaculture Resour. Manag.* 1, 1–12.
- Nwanna, L.C., Schwarz, F.J., 2007. Effect of supplemental phytase on growth, phosphorus digestibility and bone mineralization of common carp (*Cyprinus carpio* L). *Aquac. Res.* 38, 1037–1044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01752.x>
- O'Dell, B.L., De Boland, A.R., Koirtiyohann, S.R., 1972. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* 20, 718–723. <https://doi.org/10.1021/jf60181a021>
- Olusola, 2014. Growth Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed Processed Soybean Meal Based Diets Supplemented With Phytase. *Int. J. Aquac.* 4. <https://doi.org/10.5376/ija.2014.04.0008>
- Papatryphon, E., Howell, R. a, Soares, J.H., 1999. Growth and Mineral Absorption by Striped Bass *Morone saxatilis* Fed a Plant Feedstuff Based Diet Supplemented with Phytase. *J. World Aquac. Soc.* 30, 161–173. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00863.x>
- Portz, L., Liebert, F., 2004. Growth, nutrient utilization and parameters of mineral metabolism in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed plant-based diets with graded levels of microbial phytase. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 88, 311–320. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2004.00486.x>
- Racicot, J.G., Gaudet, M., Leray, C., 1975. Blood and liver enzymes in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) with emphasis on their diagnostic use: Study of CCl<sub>4</sub> toxicity and a case of Aeromonas infection. *J. Fish Biol.* 7, 825–835. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1975.tb04653.x>
- Ravindran, V., Ravindran, G., Sivalogan, S., 1994. Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chem.* 50, 133–136. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90109-0](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90109-0)
- Riche, M., Trottier, N.L., Ku, P.K., Garling, D.L., 2002. Apparent digestibility of crude

- protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets. *Fish Physiol. Biochem.* 25, 181–194. <https://doi.org/10.1023/A:1022222431004>
- Rodehutsord, M., Gregus, Z., Pfeffer, E., 2000. Effect of phosphorus intake on faecal and non-faecal phosphorus excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the consequences for comparative phosphorus availability studies. *Aquaculture* 188, 383–398. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00341-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00341-0)
- Sakamoto, S., Yone, Y., 1978. Effect of dietary phosphorus level on chemical composition of red sea bream. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.*
- Sardar, P., 2007. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization, body compositions and hemato-biochemical profiles of *Cyprinus carpio* (L.) fingerlings fed soy protein based diet. *Aquacult. Nutr* 13, 444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00497.x>
- Selle, P.H., Cowieson, A.J., Cowieson, N.P., Ravindran, V., 2012. Protein–phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutr. Res. Rev.* 25, 1–17. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000151>
- Selle, P.H., Ravindran, V., 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010>
- Selle, P.H., Walker, A.R., Bryden, W.L., 2003. Total and phytate-phosphorus contents and phytase activity of Australian-sourced feed ingredients for pigs and poultry. *Aust. J. Exp. Agric.* 43, 475–479. <https://doi.org/10.1071/EA02155>
- Sugiura, S.H., Hardy, R.W., Roberts, R.J., 2004. The pathology of phosphorus deficiency in fish - A review. *J. Fish Dis.* 27, 255–265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00527.x>
- Sugiura, S.H., Raboy, V., Young, K.A., Dong, F.M., Hardy, R.W., 1999. Availability of phosphorus and trace elements in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 170, 285–296. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00414-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00414-1)
- Szabó, R., Ferrier, D.E.K., 2014. The dynamics of alkaline phosphatase activity during operculum regeneration in the polychaete *Pomatoceros lamarckii*. *Int. J. Dev. Biol.* 58, 635–642. <https://doi.org/10.1387/ijdb.140116df>
- Tudkaew, J., Gabaudan, J., Phromkunthong, W., 2008. The supplementation of phytase Ronozyme® P on the growth and the utilisation of phosphorus by sex-reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 30, 17–24.
- Van Weerd, J.H., Khalaf, K.A., Aartsen, F.J., Tijssen, P.A.T., 1999. Balance trials with African catfish *Clarias gariepinus* fed phytase-treated soybean meal-based diets. *Aquac. Nutr.* 5, 135–142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1999.00100.x>
- Verlhac-Trichet, V., Vielma, J., Dias, J., Rema, P., Santigosa, E., Wahli, T., Vogel, K., 2014. The Efficacy of a Novel Microbial 6-Phytase Expressed in *Aspergillus oryzae* on the Performance and Phosphorus Utilization of Cold- and Warm-Water Fish: Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, and Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. World Aquac. Soc.* 45, 367–379. <https://doi.org/10.1111/jwas.12133>
- Vielma, J., Mäkinen, T., Ekholm, P., Koskela, J., 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture* 183,

- 349–362. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00299-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00299-9)
- Vielma, J., Mäkinen, T., Ekholm, P., Koskela, J., 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture* 183, 349–362. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00299-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00299-9)
- Vielma, J., Koskela, J., Ruuhonen, K., 2002. Growth, bone mineralization, and heat and low oxygen tolerance in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) fed with graded levels of phosphorus. *Aquaculture* 212, 321–333. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00039-x](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00039-x)
- Vieira, J.G.H., 1999. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 43, 415–422. <https://doi.org/10.1590/S0004-27301999000600005>
- von Danwitz, A., van Bussel, C.G.J., Klatt, S.F., Schulz, C., 2016. Dietary phytase supplementation in rapeseed protein based diets influences growth performance, digestibility and nutrient utilisation in turbot (*Psetta maxima* L.). *Aquaculture* 450, 405–411. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.026>
- Yang, S. Der, Lin, T.S., Liu, F.G., Liou, C.H., 2006. Influence of dietary phosphorus levels on growth, metabolic response and body composition of juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 253, 592–601. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.002>
- Yigit, N.O., Bahadır Koca, S., Didinen, B.I., Diler, I., 2016. Effect of protease and phytase supplementation on growth performance and nutrient digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fed soybean meal-based diets. *J. Appl. Anim. Res.* 2119, 1–4. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1256292>

## 2.OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da adição da nova geração de fitase na forma líquida em dietas elaboradas com alimentos de origem vegetal para juvenis de tilápias do Nilo.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Determinar os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, energia bruta, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas de tilápias alimentadas com dietas contendo nova geração de fitase;
- Verificar a disponibilidade de minerais e aminoácidos com nova geração de fitase líquida para juvenis de tilápias do Nilo;
- Avaliar o desempenho produtivo, retenção corporal de minerais e parâmetros bioquímicos em tilápias do Nilo alimentadas com dietas elaboradas com alimentos de origem vegetal reduzidas em fosfato bicálcico e adição da nova geração de fitase líquida.

## **II – Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes em dietas elaboradas com alimentos vegetais e adição de nova geração de fitase líquida para juvenis de tilápias do Nilo**

RESUMO: O objetivo do trabalho foi determinar os efeitos da adição de fitase líquida sobre os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da energia bruta (EB), proteína bruta (PB) disponibilidade dos aminoácidos (AA) e minerais. Foi elaborada dieta basal com alimentos de origem vegetal com 320,33 g/kg de proteína bruta (PB), 19,50 MJ/kg de energia bruta (EB), 8,70 g/kg de cálcio (Ca) e 7,73 g/kg de fósforo (P) total. A partir da dieta basal, foram elaboradas mais três dietas, com 500, 1000 e 1500 unidades de fitase ativa (FTU/kg). Juvenis de tilápia do Nilo ( $n = 96$ , peso corporal inicial  $36,0 \pm 1,33$ g) foram distribuídos em oito aquários de digestibilidade de 250 L cada. O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro tratamentos e duas repetições. As fezes foram coletadas pelo método modificado de Guelp, utilizando o óxido de cromo III como indicador. Peixes alimentados com dietas com adição de 1000 e 1500 FTU/kg apresentaram maiores CDA, da matéria seca (MS) ( $P = 0,004$ ), EB ( $P = 0,005$ ) e PB ( $P = 0,002$ ) em relação aos peixes alimentados com a dieta sem adição da enzima e com 500 FTU/kg. Peixes alimentados com dieta com adição de 1000 e 1500 FTU/kg apresentaram maior CDA do Ca ( $P = 0,001$ ), P ( $P < 0,001$ ), ferro (Fe) ( $P = 0,037$ ), magnésio ( $P = 0,001$ ) e manganês (Mn) ( $P = 0,008$ ) em relação aos peixes alimentados com a dieta sem fitase e com 500 FTU/kg. Peixes alimentados com dietas com adição de 1000 e 1500 FTU/kg apresentaram maiores CDA da leucina ( $P = 0,019$ ), lisina ( $P = 0,003$ ) e serina ( $P = 0,014$ ) em relação aos peixes que consumiram a dieta sem fitase. O CDA dos demais AA não foram influenciados pelos níveis de fitase avaliados. A adição de fitase no nível de 1000 FTU/kg melhorou o CDA da energia e nutrientes em dietas com ingredientes de origem vegetal para juvenis de tilápias do Nilo.

**Palavras-chave:** aquicultura, aminoácidos, enzima, fitato, nutrição, valor nutritivo.

*Abreviações:* CDA, coeficiente de digestibilidade aparente; EB, energia bruta; PB, proteína bruta; AA, aminoácidos; Ca, cálcio; P, fósforo; MS, matéria seca; Cu, cobre; Fe, ferro; Mn, manganês; Mg, magnésio; Zn, zinco; MM, matéria mineral; EE, extrato etéreo; FB, fibra bruta.

## **II - Coefficients of apparent digestibility of energy and nutrients in diets made with plant foods and addition of new generation of liquid phytase for Nile tilapia juveniles**

**ABSTRACT:** The objective of this work was to determine the addition effects of liquid phytase on the apparent digestibility coefficients (ADC) of crude energy (GE), crude protein (CP) and amino acids (AA) and minerals availability. Basal diet was prepared with foods of vegetable origin with 320.33 g/kg of crude protein (CP), 19.50 MJ/kg of crude energy (GE), 8.70 g/kg of calcium (Ca) and 7.73 g/kg of total phosphorus (P). From the basal diet, three diets were elaborated, with 500, 1000 and 1500 units of active phytase (FTU/kg). Nile tilapia juveniles (n = 96, initial body weight  $36.0 \pm 1.33$ g) were distributed in eight digestibility aquaria of 250 L each. The design was completely randomized with four treatments and two replicates. The faeces were collected by the modified Guelp method, using chromium oxide as indicator. Fish fed diets with 1000 and 1500 FTU/kg addition showed higher dry matter (DM) (P= 0.004), GE (P = 0.005) and CP (P = 0.002) ADC when compared to fish fed with the diet without enzyme addition and 500 FTU/kg. Fish fed diets with 1000 and 1500 FTU/kg had higher ADC of Ca (P = 0.01), P (P = 0.001), iron (Fe) (P = 0.037), magnesium (P = 0.001) and manganese (Mn) (P = 0.008) when compared with fish fed the diet without phytase and 500 FTU/kg. Fish fed diets with addition of 1000 and 1500 FTU/kg showed higher ADC levels of leucine (P = 0.019), lysine (P = 0.003) and serine (P = 0.014) compared to fish consuming the diet without phytase. The ADC of the remaining AAs were not influenced by the phytase levels evaluated. Phytase addition at the 1000 FTU/kg level improved ADC of energy and nutrients in diets with plant-based ingredients for Nile tilapia juveniles.

**Key words:** aquaculture, amino acids, enzyme, nutrition, nutritional value, phytate.

Abbreviations: ADC, apparent digestibility coefficient; GE, gross energy; CP, crude protein; AA, amino acids; Ca, calcium; P, phosphorus; DM, dry matter; Cu, copper; Fe, iron; Mn, manganese; Mg, magnesium; Zn, zinc; MM, mineral matter; EE, ethereal extract; CF, crude fiber.

## 1. Introdução

A utilização de ingredientes vegetais em dietas para peixes tem aumentado a busca por alternativas que garantam o bom aproveitamento destes nutrientes. Entretanto, alguns ingredientes se encontram indisponível por causa da presença de fatores antinutricionais (Kumar et al., 2011). Como alternativa, tem-se utilizado nas rações a adição de fitase, com o objetivo de disponibilizar fósforo indisponível nesses ingredientes.

Os cereais, legumes e coprodutos são fontes sustentáveis de energia e proteínas em dietas para organismos aquáticos em substituição à farinha de peixe (Gatlin et al., 2007). No entanto, apresentam fatores antinutricionais como o fitato, a principal forma de armazenamento do fósforo em alimentos vegetais (Francis et al., 2001). O fitato (*hexafofato de mio-inositol*) é uma molécula polianiónica que se pode ligar a cátions divalentes como cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn), formando complexos insolúveis (Kumar et al., 2011). Como consequência, pode haver redução na digestibilidade de nutrientes, redução no crescimento e aumento na excreção de fósforo (Baruah et al., 2004).

Os efeitos negativos do fitato podem ser reduzidos pela inclusão da enzima fitase, uma fosfatase que catalisa a hidrólise do fitato em inositol e fosfato inorgânico, reduzindo assim a necessidade de adição de fontes inorgânicas desse mineral (Kumar et al., 2011). Um dos problemas associados com a utilização da enzima refere-se à redução na atividade da enzima em temperaturas elevadas e variações no pH (Cao et al., 2007).

A atividade da fitase é dependente das características do trato digestório do peixe, principalmente o pH, além do tratamento térmico durante o processamento das dietas, considerando o baixo pH estomacal de tilápias do Nilo (Getachew, 1989). Assim foi elaborada uma nova geração de fitase desenvolvida a partir de três fontes bacterianas, obtendo uma geração híbrida que foi inserida em uma cepa de fungo filamentosos *Aspergillus niger* com o objetivo de obter uma enzima mais resistente às variações de pH e com maior termoestabilidade.

Dietas para peixes com adição de fitase têm sido utilizadas com objetivo de melhorar a biodisponibilidade e a utilização de nutrientes devido a prévia hidrólise do fitato, disponibilizando esses nutrientes para absorção (Cao et al., 2007). Além disso, melhor

uso de nutrientes resulta em menor descarga de fósforo no ambiente, reduzindo a poluição aquática (Baruah et al., 2004).

As dietas contendo ingredientes vegetais com adição de fitase têm sido relatadas para melhorar a utilização de fósforo em diversas espécies, como em carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Nwanna e Schwarz, 2007), tilápia do Nilo (Hassaan et al., 2013), truta arco-íris (Yigit et al., 2016) e carpa rohu (Hussain et al., 2016) e outros minerais (Nwanna e Schwarz, 2008), energia (Liebert e Portz, 2005; Portz e Liebert, 2004), proteína (Sardar, 2007) e aminoácidos (Nwanna e Olusola, 2014; Riche, Trottier, Ku, e Garling, 2002) com aumento no ganho de peso (Nie et al., 2017; von Danwitz et al., 2016) e a eficiência alimentar (Liu et al., 2012; Tudkaew et al., 2008), proporcionando melhora no desempenho dos animais.

A utilização de novas gerações de fitase mais resistentes à acidez estomacal e elevada temperatura durante o processamento pode resultar em melhorias nos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da energia e nutrientes, principalmente do fósforo, com consequente melhora no desempenho produtivo dos peixes. No entanto, não há trabalhos avaliando a nova fitase mais resistente às variações de pH estomacal e variações na temperatura.

Assim com os resultados positivos com a adição de fitase, novas pesquisas estão surgindo e gerações de novos produtos que visem a melhora no desempenho dos animais de forma sustentável. O objetivo do trabalho foi avaliar dietas com diferentes níveis de adição de uma nova geração de fitase líquida em dietas elaboradas com ingredientes vegetais para juvenis de tilápias do Nilo por meio de ensaio de digestibilidade.

## **2. Material e métodos**

Os procedimentos experimentais foram previamente submetidos e aprovados para execução pelo Comitê de Conduta Ética para Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo N° 6352/2017).

## 2.1 Dietas

Foi elaborada uma dieta basal, exclusivamente, com alimentos de origem vegetal (Tabela 1) contendo 320,33 g/kg de PB, 19,50 MJ/kg de EB, 7,73 g/kg de P total e 8,70 g/kg de Ca. A partir dessa dieta basal, foram elaboradas três dietas contendo 500, 1000 e 1500 FTU/kg. O óxido de cromo foi utilizado como indicador (0,1% da dieta) para a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (Neto et al., 2003)

Tabela 1

Composição dos ingredientes das dietas experimentais ofertadas a juvenis de tilápias do Nilo (g/kg).

Ingredientes	Dietas			
	0	500	1000	1500
Farelo de soja		330,00		
Farinha de trigo		173,00		
Farelo de trigo		150,00		
Milho		136,00		
Farelo de arroz		100,00		
Glúten de milho		80,00		
Calcário		15,00		
Supl. Min. Vit. <sup>1</sup>		5,00		
L-lisina		4,00		
Sal		3,50		
DL-metionina		2,50		
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		1,00		
Níveis de fitase				

<sup>1</sup>Suplemento mineral e vitamínico: Composição (IU ou mg kg<sup>1</sup>da dieta): vitamina A (palmitato de retinol), 1.200.000 UI; vitamina D3 (colecalfiferol), 200000 UI; vitamina E (DL- $\alpha$ -tocoferol), 12000 mg; vitamina K3 (menadiona), 2400 mg; vitamina B1 (tiamina HCl), 4800 mg; vitamina B2 (riboflavina), 4800 mg; vitamina B6 (piridoxina HCl), 4000 mg; vitamina B12 (cianocobalamina), 4,8 mg; ácido fólico, 1200 mg; Pantotenato de D-cálcio. 12000 mg; vitamina C (ácido ascórbico), 48000 mg; D-biotina, 48 mg; cloreto de colina, 65000 mg; niacina, 24000 mg; sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, 7H<sub>2</sub>O), 10000 mg; sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O), 600 mg; sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O), 4000 mg; sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 6000 mg; sulfato de cobalto (CoSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O), 2 mg; Selenito de sódio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), 20 mg.

As dietas foram elaboradas com base em análise prévia da composição dos alimentos e confirmadas por meio de análises laboratoriais. A atividade da enzima fitase foi confirmada por meio de análise laboratorial após aplicação da enzima nas dietas (Tabela 2).

Tabela 2

Composição química analisada das dietas experimentais (g/kg), com base na matéria seca.

Parâmetros	Dietas			
Matéria seca	939,83			
Energia bruta (MJ/kg)	14,43			
Proteína bruta	320,33			
Lipídios	51,80			
Fibra bruta	46,80			
Cinzas	57,60			
Cálcio	8,70			
Cobre	0,02			
Ferro	0,34			
Fósforo	7,73			
Magnésio	3,50			
Manganês	0,12			
Aminoácidos essenciais				
Arginina	19,80			
Fenilalanina	15,80			
Histidina	8,00			
Isoleucina	13,30			
Leucina	29,80			
Lisina	18,00			
Metionina	7,00			
Treonina	11,00			
Triptofano	3,00			
Valina	15,00			
Aminoácidos não essenciais				
Ácido aspártico	26,00			
Ácido glutâmico	60,80			
Alanina	16,80			
Cistina	5,80			
Glicina	13,00			
Prolina	19,80			
Serina	16,30			
Tirosina	10,50			
Atividade enzimática				
	ND <sup>2</sup>	430	1050	1570

<sup>1</sup> Natuphos E 10,000 FTU/g (BASF Corporation, Ludwigshafen, Germany).<sup>2</sup>ND: não detectada.

Foi utilizada fitase microbiana (Natuphos® E-10,000 FTU/kg<sup>-1</sup>), produzida a partir da combinação de três fontes bacterianas, formando uma geração híbrida que foi então inserida na cepa de *Aspergillus niger*. Antes da adição da enzima, a atividade da fitase foi confirmada em laboratório da CBO – Valinhos SP, Brasil, seguindo metodologia descrita por Engelen et al., (2001) por HPLC e espectrofotometria de absorção atômica.

As dietas foram misturadas, moídas e extrusadas no AquaNutri (Botucatu, SP, Brasil). A moagem foi realizada em moinho centrífugo com peneiras com furos de 0,7 mm (Vieira MC 680 B, Tatuí, SP, Brasil) a extrusão foi realizada em extrusor de rosca simples com matriz com furo de 1,00 mm (Exteec EX30, Ribeirão Preto, SP, Brasil), de forma a obter pellets com 2,5 mm de diâmetro. As dietas foram secas em estufa de ventilação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, SP, Brasil) a 55°C durante 24 horas. Após secagem e resfriamento, foi adicionada à fitase.

A adição da fitase ocorreu por meio de aspersão. Foi elaborada solução com 10 ml de fitase em 990 ml de água destilada. Em seguida, foram retirados 11,4; 22,7 e 34,1 ml da solução e adicionados em 300 ml de água destilada e aspergidas *on top* para obtenção de rações com 500, 1000 e 1500 FTU/kg respectivamente. Em seguida as rações foram secas em estufa com circulação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, SP, Brasil) a 42°C por 2 horas.

## 2.2. Análises químicas

Foram realizadas as análises de MS (método 934,01), MM (método 942,05), nitrogênio (método 981,10), a PB (calculada pelo percentual de nitrogênio multiplicado por 6,25) o EE (método 920,85) e FB (método 991,43) das dietas experimentais de acordo com métodos padronizados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

## 2.3. Peixes e manejo

O ensaio de digestibilidade foi conduzido pelo período de 21 dias. Foram adquiridos 200 juvenis de tilápias do Nilo com peso inicial médio de  $30,0 \pm 1,05$ g, revertidos sexualmente para machos oriundos da piscicultura Aquabel (Rolândia, PR, Brasil). Esses animais permaneceram pelo período de sete dias nos aquários de alimentação para

adaptação as condições experimentais. Após o período de adaptação, 96 juvenis com peso médio de  $36,0 \pm 1,33$ g foram distribuídos em oito aquários de alimentação com formato circular, volume total de 150 litros e oito aquários de formato cônico para coleta de fezes por gravidade com capacidade de 200 litros, confeccionados em fibra de vidro. Os peixes foram distribuídos em gaiolas com telas de PVC com capacidade de 50 litros (12 peixes por gaiola) com malha de 3 cm utilizadas com a função de tanque rede. Todos os aquários foram dotados de aeração individual constante e termostato para controle da temperatura, seguindo a metodologia descrita por Pezzato et al. (2002).

A temperatura da água e o oxigênio dissolvidos foram aferidos diariamente com medidor de oxigênio e temperatura portátil (YSI F-1055, Blumenau, SC, Brasil), o pH foi determinado semanalmente por meio de pHmetro de bancada (TEC – 2, Piracicaba, SP, Brasil), amônia, nitrito, nitrato foram determinados semanalmente por meio de kit (ALFAKIT, Florianópolis, SC, Brasil). Os valores foram mantidos em  $27,34 \pm 0,51^{\circ}\text{C}$ ;  $5,85 \pm 0,51\text{mg/L}$ ;  $0,02 \pm 0,01\text{mg/L}$ ;  $0,06 \pm 0,02\text{mg/L}$ ;  $0,02 \pm 0,01$  e  $6,94 \pm 0,79$  para temperatura, oxigênio dissolvido, nitrato, nitrito e pH respectivamente, mantendo os limites de conforto térmico para tilápias segundo Boyd e Lichtkoppler (1979).

O coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) foi determinado pelo método indireto, utilizando óxido de cromo como indicador. Os peixes permaneceram nos aquários de alimentação das 8 às 17 horas, e recebiam a alimentação às 11, 14 e 16 horas. Às 17 horas, os peixes foram transferidos para os aquários de coleta de fezes até a manhã do dia seguinte, momento em que foi realizado a coleta das fezes. Os aquários de alimentação foram sifonados diariamente, após a transferência dos peixes para os aquários de coleta (Pezzato et al., 2002).

As fezes coletadas foram secas em estufa com circulação forçada a  $55^{\circ}\text{C}$  por 48 horas e trituradas com auxílio de gral e pistilo no Laboratório de Nutrição Animal, do Departamento de Zootecnia, em Ponta Grossa, PR. Em seguida foram encaminhadas para CBO – Valinhos para análises da composição química.

#### *2.4 Digestibilidade*

Os nutrientes das dietas foram calculados segundo o método padrão (Maynard e Loosli, 1969):

$$CDA_{(n)} = 100 - \left[ 100 \left( \frac{\%Cr_2O_{3d}}{\%Cr_2O_{3f}} \right) \times \left( \frac{\%N_f}{\%N_d} \right) \right]$$

Em que:

$CDA_{(n)}$  = 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;

$N_d$  = Nutrientes na dieta;

$N_f$  = Nutriente nas fezes.

## 2.5 Análise Estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso (DIC), composto por quatro tratamentos e duas repetições. O modelo estatístico para DIC foi:  $y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$  em que  $Y_{ij}$  = efeito do tratamento  $i$  na repetição  $j$ ,  $\mu$  = média geral das variáveis,  $t_i$  = efeito do tratamento  $i$ ,  $e_{ij}$  = erro aleatório associado a cada observação  $ij$ . Para análise dos dados, estes foram submetidos a verificação de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Liliefors e verificação de homogeneidade pelo teste de Levene. Quando essas duas exigências foram atendidas, os resultados foram submetidos à ANOVA ( $P < 0,05$ ). Em caso de diferenças, os dados foram comparados pelo teste de Tukey com um nível de significância de 5%. Utilizou-se o programa estatístico *Statistical Analysis System – SAS* (versão 9.0). Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio (EPM).

## 3. Resultados

### 3.1 Ensaio de digestibilidade

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do CDA da matéria seca, energia bruta, proteína bruta, extrato etéreo, cálcio, fósforo, ferro; cobre, magnésio e manganês em peixes alimentados com dietas sem e com diferentes níveis de fitase. Os peixes que consumiram dietas com 1000 e 1500 FTU/kg apresentaram maior CDA da MS ( $P = 0,004$ ), EB ( $P = 0,005$ ) e PB ( $P = 0,002$ ), quando comparadas aos peixes alimentados com as dietas sem adição de fitase e com 500 FTU/kg. Não foi observado efeito ( $P = 0,107$ ) dos tratamentos avaliados sobre o CDA do EE.

Peixes alimentados com dietas com adição de 1000 e 1500 FTU/kg apresentaram maior CDA do Ca ( $P = 0,001$ ), P ( $P < 0,001$ ), Cu ( $P = 0,016$ ), Mn ( $P = 0,008$ ) e Mg ( $P = 0,001$ ) em relação aos peixes alimentados com a dieta sem a adição da enzima. Peixes que receberam as dietas com os níveis de 500, 1000 e 1500 FTU/kg apresentaram maiores concentrações de Fe ( $P = 0,037$ ) quando comparados aos peixes alimentados com dieta sem enzima.

A adição de 1000 FTU/kg aumentou os valores de energia digestível em 160, 13; 174,47; 50,19 kcal em relação aos peixes que receberam as dietas com 0, 500 e 1500 FTU/kg respectivamente. A proteína digestível foi maior nos peixes alimentados com as dietas com 1000 FTU/kg em comparação aos que receberam as dietas sem adição de fitase e com 500 e 1500 FTU/kg (0,13; 1,84 e 1,63 %) respectivamente.

Tabela 3

Coefficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, energia bruta e nutrientes pela tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo diferentes níveis da nova geração de fitase líquida.

Parâmetros <sup>1</sup>	Níveis de fitase FTU/kg				EPM <sup>2</sup>	Valor- <i>P</i>
	0 (Controle)	500	1000	1500		
MS	0,738 <sup>b</sup>	0,745 <sup>b</sup>	0,789 <sup>a</sup>	0,782 <sup>a</sup>	0,008	0,004
EB	0,746 <sup>b</sup>	0,742 <sup>b</sup>	0,792 <sup>a</sup>	0,777 <sup>a</sup>	0,008	0,005
PB	0,916 <sup>b</sup>	0,914 <sup>b</sup>	0,931 <sup>a</sup>	0,930 <sup>a</sup>	0,003	0,002
EE	0,909	0,870	0,922	0,908	0,024	0,107
Ca	0,049 <sup>c</sup>	0,264 <sup>b</sup>	0,432 <sup>a</sup>	0,443 <sup>a</sup>	0,067	0,001
P	0,116 <sup>c</sup>	0,379 <sup>b</sup>	0,540 <sup>a</sup>	0,607 <sup>a</sup>	0,050	< 0,001
Fe	0,787 <sup>b</sup>	0,812 <sup>ab</sup>	0,812 <sup>ab</sup>	0,832 <sup>a</sup>	0,008	0,037
Cu	0,480 <sup>b</sup>	0,506 <sup>b</sup>	0,513 <sup>ab</sup>	0,585 <sup>a</sup>	0,032	0,016
Mn	0,373 <sup>c</sup>	0,437 <sup>bc</sup>	0,511 <sup>ab</sup>	0,557 <sup>a</sup>	0,071	0,008
Mg	0,591 <sup>c</sup>	0,692 <sup>b</sup>	0,747 <sup>ab</sup>	0,778 <sup>a</sup>	0,019	0,001

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

<sup>1</sup> MS: matéria seca; EB: energia bruta; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; Ca: cálcio; P: fósforo; Fe: ferro; Mn: manganês e Mg: magnésio

<sup>2</sup>EPM: erro padrão médio.

### 3.2 Coeficiente de digestibilidade aparente dos aminoácidos

Peixes alimentados com as dietas contendo 1000 e 1500 FTU/kg apresentaram maior CDA da leucina ( $P = 0,019$ ) e lisina ( $P = 0,003$ ) em relação aos peixes que consumiram as

dietas controle e com 500 FTU/kg. No entanto, o CDA desses AA não diferiu entre os peixes que consumiram dietas com 1000 e 1500 FTU/kg. Peixes alimentados com a dieta sem fitase apresentaram menor CDA do AA não essencial serina ( $P = 0,014$ ) em relação aos que consumiram as dietas com adição de 1500 FTU/kg. Por outro lado, os CDA não variaram entre os peixes que consumiram as dietas com 500, 1000 e 1500 FTU/kg. Os CDA dos demais AA não foram influenciados pelos tratamentos avaliados (Tabela 4).

Tabela 4

Coefficiente de digestibilidade aparente de aminoácidos essenciais e não essenciais por juvenis de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de fitase, durante 56 dias.

Parâmetros	Níveis de fitase FTU/kg				EPM <sup>1</sup>	Valor – P
	0 (Controle)	500	1000	1500		
<b>Aminoácidos Essenciais</b>						
Arginina	0,974	0,974	0,976	0,976	0,032	0,371
Fenilalanina	0,947	0,946	0,952	0,952	0,034	0,079
Histidina	0,946	0,949	0,950	0,954	0,168	0,396
Isoleucina	93,87	93,84	94,14	94,51	0,043	0,092
Leucina	0,940 <sup>b</sup>	0,942 <sup>b</sup>	0,946 <sup>ab</sup>	0,948 <sup>a</sup>	0,021	0,019
Lisina	0,959 <sup>b</sup>	0,960 <sup>b</sup>	0,966 <sup>a</sup>	0,966 <sup>a</sup>	0,008	0,003
Metionina	0,975	0,976	0,978	0,980	0,057	0,383
Treonina	0,913	0,919	0,919	0,924	0,080	0,080
Triptofano	0,954	0,942	0,958	0,948	0,557	0,303
Valina	0,927	0,927	0,932	0,932	0,055	0,804
<b>Aminoácidos não essenciais</b>						
Ácido aspártico	0,977	0,979	0,981	0,978	0,019	0,146
Ácido glutâmico	0,978	0,980	0,982	0,981	0,009	0,052
Alanina	0,916	0,924	0,926	0,927	0,128	0,115
Cistina	0,964	0,967	0,970	0,968	0,083	0,349
Glicina	0,882	0,899	0,907	0,908	0,516	0,066
Prolina	0,939	0,946	0,949	0,950	0,125	0,106
Serina	0,937 <sup>b</sup>	0,941 <sup>a</sup>	0,947 <sup>a</sup>	0,947 <sup>a</sup>	0,031	0,014
Tirosina	0,954	0,950	0,955	0,952	0,206	0,769

<sup>a b</sup> Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $P < 0,05$ )

<sup>1</sup>EPM: erro padrão médio

## 4. Discussão

### 4.1. Ensaio de Digestibilidade

O presente estudo confirma que a digestibilidade dos nutrientes com a adição de fitase em dietas contendo ingredientes exclusivamente vegetais melhora o coeficiente de digestibilidade aparente. A prévia hidrólise do ácido fítico por meio da adição da fitase reduz a ocorrência de complexos que indisponibilizam minerais, assim há aumento no coeficiente de digestibilidade desses nutrientes (Kumar et al., 2011). A maior disponibilidade dos minerais em juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas com adição de fitase já foi demonstrada anteriormente (Nwanna e Olusola, 2014), sendo relatado para essa mesma espécie que a adição de 1000 FTU/kg de fitase foi adequada para disponibilizar os minerais Ca, Mg, P, Fe, Zn, Mn (Hassaan et al., 2013).

Os efeitos positivos da adição da fitase foram confirmados por Verlhac-Trichet et al. (2014), que relataram melhora no CDA do P em truta arco-íris e tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo 2000 FTU/kg. Com os resultados do presente estudo a melhora no coeficiente de digestibilidade da energia e nutrientes mostrou que a nova fitase é eficiente em hidrolisar a molécula de fitato e liberar P para absorção, reduzindo assim a formação de quelatos.

A adição de enzima em dietas contendo ingredientes vegetais é importante não somente para melhorar o desempenho dos animais como para reduzir o impacto ambiental pela elevada excreção de P (Greiner e Konietzny, 2006). Assim a adição de fitase as dietas, contribui de forma sustentável para a redução nas reservas não renováveis de P inorgânico como também para minimizar os impactos causados pela excreção de compostos fosfatados no ambiente de cultivo (Selle et al., 2012).

A ligação do fitato com minerais formam complexos insolúveis no intestino delgado superior, local de maior absorção de nutrientes, reduzindo assim a absorção de elementos essenciais ao desenvolvimento animal (Kumar et al., 2012). Em concordância com o observado no presente estudo, resultados positivos da adição de 1000 FTU/kg de fitase para maior disponibilidade dos minerais Ca e P foram relatados em carpa comum, (Nwanna e Schwarz, 2007) e carpa rohu (Bano e Afzal, 2017).

No presente estudo a melhora na digestibilidade da proteína comprova que a adição da fitase proporciona rompimento do complexo formado entre proteína e fitato (Kumar et al., 2012) e disponibiliza alguns aminoácidos para absorção. Os complexos binários (proteína-fitato) podem ocorrer no estômago de animais monogástricos, em que há precipitação de proteínas em pH ácido, e pode afetar a digestibilidade da proteína (Morales et al., 2011). A maior digestibilidade da proteína em tilápias do Nilo alimentadas

com 1000 e 2000 FTU/kg foram confirmadas anteriormente (Portz e Liebert., 2004). O efeito positivo da fitase sobre o CDA da proteína também foi reportado em outras espécies como em carpa rohu (Hussain et al., 2016) e truta arco-íris (Vandenberg et al., 2012).

#### 4.2 Digestibilidade de aminoácidos

A adição de fitase no presente estudo melhorou o CDA dos AA essenciais leucina, lisina e do AA não essencial serina. A base primária das propriedades antinutricionais do fitato é sua alta capacidade quelante, devido a sua estrutura polianiónica (Angel et al., 2002).

No estômago, o fitato pode ligar-se aos AA básicos como arginina, histidina e lisina (Cheryan e Rackis, 1980). Em pH alcalino há formação de complexos ternários proteína-fitato-mineral que podem impedir a digestão de proteínas e absorção de AA no intestino delgado (Selle et al., 2012). Além do pH, as interações entre proteína e fitato dependem das suas concentrações relativas.

Quando a proteína está acima de seu ponto isoelétrico, apresenta uma carga negativa líquida, e a ligação multifuncional de cátions como o Ca, parece estar envolvida na formação de complexos fitato proteína (Sarwar et al., 2005). Outro mecanismo indireto de inibição de fitato ocorre sobre a atividade das enzimas digestivas. Estudos *in vitro* tem sido realizados para melhor entendimento das interações complexas entre fitato, enzimas digestivas e outras proteínas presentes na solução (Li et al., 1993). Assim, a fitase pode aumentar a disponibilidade de proteína e AA pela prévia hidrólise do fitato, e impede a formação de complexos binários e ternários, disponibilizando os nutrientes necessários para adequado desempenho (Riche et al., 2001).

No presente experimento, a fitase foi eficaz em romper o complexo fitato, que resultou em aumento na disponibilidade de três AA. Resultados diferentes foram relatados por Riche et al., (2001) que não encontraram efeito no CDA dos AA em dietas contendo farelo de soja pré tratados com fitase, neste trabalho a fitase utilizada continha 5000 FTU/kg, proveniente de *Aspergillus niger*. O que mostra a eficiência na nova fitase em aumentar a digestibilidade da proteína quando comparada aos trabalhos utilizando fitase originária de fungo ou bactéria. A nova fitase é uma geração híbrida proveniente de três fontes bacterianas e inseridas na cepa de um fungo, elaborada com o objetivo de ser

mais resistente a variações no pH e maior termoestabilidade, além de liberar fósforo ligado ao fitato age também disponibilizando outros nutrientes.

A adição da nova fitase mostrou-se eficaz em aumentar o CDA dos nutrientes, e pode estar relacionado a maior estabilidade da enzima a variações no pH, aumentando assim os efeitos positivos, quando comparada as fitases anteriores. Assim, a inclusão da fitase em dietas para animais monogástricos é importante para degradar o fitato e atenuar seus efeitos negativos de forma direta sobre a hidrólise dos nutrientes ou indireta pela redução dos efeitos negativos do fitato sobre as enzimas digestivas.

No presente estudo a adição de 1000 FTU/kg melhorou o coeficiente de digestibilidade da energia, proteína e cálcio e fósforo em relação aos que receberam dietas sem a adição da enzima 160,13 kcal, 0,13%, 88,66% e 80,89% respectivamente. A fitase foi eficiente para aumentar o valor nutritivo, podendo ser utilizada como ferramenta para melhoria do desempenho produtivo pela maior biodisponibilidade da energia, proteína e minerais. Ainda, reduzir a inclusão de fonte inorgânica de Ca e P com consequente impacto na extração de reservas naturais desses minerais.

## **5. Conclusões**

A adição de fitase em dietas com ingredientes de origem vegetal no nível de 1000 FTU/kg foi eficaz para melhorar o CDA do Ca, P, Cu, Fe, Mn e Mg, aumentando o valor energético e proteico.

## **Agradecimentos**

Este estudo foi apoiado pela BASF (Corporation, Ludwigshafen, Germany). Os autores agradecem ao apoio financeiro fornecido pela BASF (Corporation, Ludwigshafen, Germany), e enzimas Natuphos®, utilizada no presente estudo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Referências

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official methods of analysis, 16th ed. AOAC Int., Arlington, VA., 1995.
- Angel, R., Tamim, N.M., Applegate, T.J., Dhandu, A.S., Ellestad, L.E., 2002. Phytic acid chemistry: Influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *J. Appl. Poult. Res.* 11, 471–480. <https://doi.org/10.1093/japr/11.4.471>
- Bano, N., Afzal, M., 2017. Combined effect of acidification and phytase supplementation on calcium and phosphorus digestibility and body composition of rohu (*Labeo rohita*). *Pak. J. Zool.* 49, 2093–2101. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.6.2093.2101>
- Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Debnath, D., 2004. Dietary Phytase: An ideal approach for a cost effective and low-polluting aquafeed. *NAGA, WorldFish Cent. Q.* 27, 15–19.
- Boyd, C.E., Lichtkoppler, F., 1979. Water Quality Management in pond fish culture.pdf 1–30.
- Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., Li, D., 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 497–507.
- Cheryan, M., Rackis, J.J., 1980. Phytic acid interactions in food systems, *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* <https://doi.org/10.1080/10408398009527293>
- Engelen, A.J., van der Heeft, F.C., Randsdorp, P.H., Somers, W.A., Schaefer, J., van der Vat, B.J., 2001. Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method: collaborative interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 84, 629–633.
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish, *Aquaculture.* [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. *Aquac. Res.* 38,

- 551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Getachew, T., 1989. Stomach pH, feeding rhythm and ingestion rate in *Oreochromis niloticus* L. (Pisces: Cichlidae) in Lake Awasa, Ethiopia. *Hydrobiologia* 174, 43–48. <https://doi.org/10.1007/BF00006056>
- Greiner, R., Konietzny, U., 2006. Phytase for food application. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 125–140.
- Hassaan, M.S., Soltan, M.A., Agouz, H.M., Badr, A.M., 2013. Influences of calcium/phosphorus ratio on supplemental microbial phytase efficiency for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egypt. J. Aquat. Res.* 39, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.09.001>
- Hussain, S.M., Afzal, M., Nasir, S., Javid, A., Makhdoom, S.M., Jabeen, F., Azmat, H., Hussain, M., Shah, S.Z.H., 2016. Efficacy of phytase supplementation in improving mineral digestibility in *Labeo rohita* fingerlings fed on canola meal-based diets. *Iran. J. Fish. Sci.* 15, 645–661. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1091331>
- Kumar, V., Makkar, H.P.S., Devappa, R.K., Becker, K., 2011. Isolation of phytate from *Jatropha curcas* kernel meal and effects of isolated phytate on growth, digestive physiology and metabolic changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Food Chem. Toxicol.* 49, 2144–2156. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.029>
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 96, 335–364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>
- Liebert, F., Portz, L., 2005. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture* 248, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.009>
- Li, Z., Alli, I., Kermasha, S., 1993. In-vitro  $\alpha$ -amylase inhibitor activity-phytate relationships in proteins from Phaseolus beans. *Food Res. Int.* 26, 195–201. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(93\)90053-L](https://doi.org/10.1016/0963-9969(93)90053-L)
- Liu, L., Luo, Y., Liang, X.F., Wang, W., Wu, J., Pan, J., 2013. Effects of Neutral Phytase Supplementation on Biochemical Parameters in Grass Carp, *Ctenopharyngodon idellus*, and Gibel Carp, *Carassius auratus gibelio*, Fed Different Levels of Monocalcium Phosphate. *J. World Aquac. Soc.* 44, 56–65.

<https://doi.org/10.1111/jwas.12002>

- Maynard, L.A. e Loosli, J.K. 1969 Animal nutrition. New York: McGraw-Hill. 613p.
- Morales, G.A., Moyano, F.J., Marquez, L., 2011. In vitro assessment of the effects of phytate and phytase on nitrogen and phosphorus bioaccessibility within fish digestive tract. *Anim. Feed Sci. Technol.* 170, 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.08.011>
- Neto, H.B., Augusto, C., Graner, F., Pezzato, L.E., Padovani, R., Cantelmo, O.A., 2003. Diminuição do Teor de Óxido de Crômio ( III ) Usado como Marcador Externo 1 Reduction in Chromium ( III ) Oxide Level as an External Marker 249–255.
- Nie, X., Chen, S., Zhang, X., Dai, B., Qian, L., 2017. Effects of neutral phytase on growth performance and phosphorus utilization in crucian carp (*Carassius auratus*). *J. Zhejiang Univ. B* 18, 886–896. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600280>
- Nwanna, L.C, Olusola, S., 2014. Effect of Supplemental Phytase on Phosphorus Digestibility and Mineral Composition in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int. J. Aquac.* 4, 89–95. <https://doi.org/10.5376/ija.2014.04.0015>
- Nwanna, L.C., Schwarz, F.J., 2007. Effect of supplemental phytase on growth, phosphorus digestibility and bone mineralization of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquac. Res.* 38, 1037–1044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01752.x>
- Nwanna, L. C., & Schwarz, F. J. 2008. Effect of different levels of phytase on growth and mineral deposition in common carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 24(5), 574–580. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01073.x>
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C. de, Pinto, L.G.Q., Furuya, W.M., Barros, M.M., Rosa, G.J.M., Lanna, E.A.T., 2002. Avaliação de dois métodos de determinação do coeficiente de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Sci. Anim. Sci.* 24, 965–971. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v24i0.2452>
- Portz, L., Liebert, F., 2004. Growth, nutrient utilization and parameters of mineral metabolism in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed plant-based diets with graded levels of microbial phytase. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 88, 311–320. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2004.00486.x>

- Riche, M., Trottier, N.L., Ku, P.K., Garling, D.L., 2001. Apparent digestibility of crude protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets. *Fish Physiol. Biochem.* 25, 181–194. <https://doi.org/10.1023/A:1022222431004>
- Sardar, P. 2007. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization, body compositions and hemato-biochemical profiles of *Cyprinus carpio* (L.) fingerlings fed soy protein based diet. *Aquacult. Nutr.* 13, 444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00497.x>
- Sarwar, G., Cockell, K.A., Sepehr, E., 2005. Effects of food processing on protein digestibility and amino acid availability 967–987.
- SAS, I., 2002. Statistical Analysis System user's guide. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute. 2008.
- Selle, P.H., Cowieson, A.J., Cowieson, N.P., Ravindran, V., 2012. Protein–phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutr. Res. Rev.* 25, 1–17. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000151>
- Selle, P.H., Ravindran, V., Caldwell, A., Bryden, W.L., 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutr. Res. Rev.* 13, 255. <https://doi.org/10.1079/095442200108729098>
- Vandenberg, G.W., Scott, S.L., De La Noüe, J., 2012. Factors affecting nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant protein-based diet supplemented with microbial phytase. *Aquac. Nutr.* 18, 369–379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00901.x>
- Verlhac-Trichet, V., Vielma, J., Dias, J., Rema, P., Santigosa, E., Wahli, T., Vogel, K., 2014. The Efficacy of a Novel Microbial 6-Phytase Expressed in *Aspergillus oryzae* on the Performance and Phosphorus Utilization of Cold- and Warm-Water Fish: Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, and Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. World Aquac. Soc.* 45, 367–379. <https://doi.org/10.1111/jwas.12133>
- von Danwitz, A., van Bussel, C.G.J., Klatt, S.F., Schulz, C., 2016. Dietary phytase supplementation in rapeseed protein based diets influences growth performance, digestibility and nutrient utilisation in turbot (*Psetta maxima* L.). *Aquaculture* 450, 405–411. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.026>

Yigit, N.O., Bahadir Koca, S., Didinen, B.I., Diler, I., 2016. Effect of protease and phytase supplementation on growth performance and nutrient digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fed soybean meal-based diets. J. Appl. Anim. Res. 2119, 1–4. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1256292>

### **III - Redução do fosfato bicálcico em dietas com adição da nova geração de fitase líquida para juvenis de tilápias do Nilo com base no desempenho produtivo, retenção de minerais e parâmetros sanguíneos <sup>1</sup>**

RESUMO: Objetivou-se avaliar a redução de fosfato bicálcico (FB) em dietas elaboradas com alimentos de origem vegetal com adição de nova geração de fitase sobre o desempenho produtivo, retenção mineral corporal e nas vértebras e parâmetros sanguíneos de juvenis de tilápias do Nilo. Foram elaboradas cinco dietas extrusadas com aproximadamente 19,54 MJ/kg de energia bruta (EB) e 326,44 g de proteína bruta (PB), com 30 g/kg de fosfato bicálcico e sem adição de fitase (controle positivo, FB30), sem adição de FB e de fitase (controle negativo, FB0), sem adição de FB e com 1000 unidades de fitase ativa (FTU/kg) (FB0 + F), 10 g/kg de FB e 1000 FTU/kg (FB10 + F) e dieta com 20 g/kg de FB e 1000 FTU/kg (FB20 + F). Juvenis de tilápias do Nilo ( $n = 240$ , peso corporal inicial  $12,03 \pm 0,14$ g) foram distribuídos em 20 aquários em um delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições, durante oito semanas. Peixes alimentados com as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F apresentaram maior ganho de peso ( $P = 0,001$ ), consumo ( $P = 0,001$ ) e taxa de eficiência proteica ( $P = 0,002$ ), menor conteúdo de gordura visceral ( $P = 0,005$ ), energia corporal ( $P = 0,007$ ) e gordura corporal ( $P = 0,013$ ) em relação aos peixes alimentados com as dietas FB0 e FB0 + F. Foram observadas maiores mortalidades ( $P = 0,011$ ) e maiores concentrações de colesterol ( $P = 0,022$ ) triglicérides ( $P = 0,048$ ) e maior atividade da enzima fosfatase alcalina ( $P = 0,001$ ) no plasma de peixes alimentados com a dieta FB0 em relação aos peixes dos alimentados com as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F. Peixes alimentados com a dieta FB0 apresentaram menores concentrações de Ca ( $P = 0,001$ ) e P ( $P = 0,021$ ) plasmático e menores teores de Ca ( $P < 0,002$ ), P ( $P < 0,002$ ), Mg ( $P < 0,001$ ) e Mn ( $P < 0,005$ ) nas vértebras em relação aos peixes que receberam as dietas FB10 + F e FB20 + F. Não foram observados efeitos ( $P > 0,985$ ) das dietas sobre a conversão alimentar, índice hepatossomático ( $P = 0,648$ ), atividade da enzima aspartato aminotransferase no

---

<sup>1</sup> \*De acordo com normas da Revista *Animal Feed Science and Technology*, ISSN: 0377-8401, <https://www.journals.elsevier.com/animal-feed-science-and-technology>, Cite Score: 2,30 e Fator de Impacto: 2,143

plasma, teores de Fe e Zn nas vértebras, umidade e proteína bruta corporal. Concluiu-se que o FB pode ser reduzido até 67% em dietas elaboradas com alimentos de origem vegetal e com adição de 1000 FTU/kg para juvenis de tilápias do Nilo.

**Palavras-chave:** aquicultura, enzima, fosfatase alcalina, fósforo, nutrição.

*Abreviações:* FB, fosfato bicálcico; EB, energia bruta; PB, proteína bruta; Ca, cálcio; P, fósforo; Mg, magnésio; Mn, manganês; Fe, ferro; Zn, zinco; MS, matéria seca; MM, matéria mineral; EE, extrato etéreo; ALT, alanina aminotransferase; ALP, fosfatase alcalina; AST, aspartato aminotransferase.

### **III - Reduction of dicalcium phosphate in diets with the addition of the new generation of liquid phytase for Nile tilapia juveniles based on productive performance, mineral retention and blood parameters**

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the dicalcium phosphate (DP) reduction in diets made with plant origin ingredients with addition of new generation of phytase on the productive performance, body mineral retention and in the vertebrae and blood parameters of Nile tilapia juveniles. Five extruded diets with approximately 19.54 MJ/kg of gross energy (GE) and 326.44 g of crude protein (CP) were prepared with 30 g/kg of dicalcium phosphate and no addition of phytase (positive control, FB30) (FB0 + F), 10 g/kg DP and 1000 FTU/kg (DP0 + F), with no DP addition and with 1000 FTU/kg (DP0 + F) + F and diet with 20 g/kg DP and 1000 FTU/kg (DP20 + F). Nile tilapia juveniles (n = 240, initial body weight  $12.03 \pm 0.14$  g) were distributed in 20 aquaria in a completely randomized design with five treatments and four replicates for eight weeks. Fish fed with the DP30, DP10 + F and DP20 + F diets presented greater weight gain ( $P = 0.001$ ), consumption ( $P = 0.001$ ) and protein efficiency ratio ( $P = 0.002$ ), lower visceral fat content ( $P = 0.005$ ), body energy ( $P = 0.007$ ) and body fat ( $P = 0.013$ ) were observed in relation to fish fed the DP0 and DP0 + F diets. Higher mortalities ( $P = 0.011$ ) and higher cholesterol concentrations were observed ( $P = 0.022$ ), ( $P = 0.048$ ) and higher activity of the alkaline phosphatase enzyme in the plasma ( $P = 0.001$ ) were observed for fish fed the DP0 diet in relation to the fish fed with the DP30, DP10 + F and DP20 + F diets. Fish fed with diet with addition of 1000 and 1500 FTU/kg presented higher CDA of Ca ( $P = 0.01$ ), P ( $P < 0.01$ ), Fe ( $P = 0.037$ ), Mg ( $P = 0.001$ ) and Mn ( $P = 0.008$ ) in relation to the fish that received diet without phytase and 500 FTU/kg. No effects ( $P = 0.985$ ) of the diets on feed conversion, hepatosomatic index ( $P = 0.648$ ), plasma aspartate aminotransferase enzyme activity, Fe and Zn levels in the vertebrae, moisture and crude body protein were observed. It was concluded that the DP can be reduced up to 67% in diets made from plant based ingredients and with addition of 1000 FTU/kg for Nile tilapia juveniles.

**Key words:** aquaculture, alkaline phosphatase, enzyme, nutrition, phosphorus.

Abbreviations: DP, dicalcium phosphate; GE, gross energy; CP, crude protein; Ca, calcium; P, phosphorus; Mg, magnesium; Mn, manganese; Fe, iron; Zn, zinc; MS, dry matter; MM, mineral matter; EE, ethereal extract; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase.

## 1. Introdução

Com o incremento da aquicultura aumentou a busca por inovações que melhorem e viabilizem a produção, reduzindo os impactos causados no ambiente de cultivo. Com a utilização dos ingredientes vegetais, tem-se utilizado a enzima fitase como alternativa para os animais obterem o fósforo presente nesses ingredientes e que se encontra indisponível para animais monogástricos devido à ausência de fitase endógena (Baruah et al., 2007). O uso da fitase reduz a inclusão de fosfato bicálcico nas dietas e consequentemente redução na excreção de fósforo no ambiente de cultivo (Cowieson et al., 2011).

O fósforo presente nos vegetais encontra-se como fitato, forma que afeta negativamente a utilização da energia e nutrientes e, consequentemente o desempenho e saúde dos peixes (Kumar et al., 2012). Ainda que o processamento por aquecimento e fermentação possam aumentar a disponibilidade do fósforo dos alimentos de origem vegetal, a adição de fitase tem sido o método mais prático e eficiente para liberar o fósforo do fitato (Hung et al., 2015).

Foi demonstrado em diversos estudos que a adição de fitase melhora a disponibilidade da energia (Hussain et al., 2016; Maas et al., 2018), proteína (Cao et al., 2008; Liebert e Portz, 2005), aminoácidos (Nwanna e Liebert, 2016) e outros minerais (Cheng e Hardy, 2002; Debnath et al., 2005; Hussain et al., 2015). A adição da fitase fúngica ou bacteriana, pode apresentar resultados não satisfatórios pelas variações no pH e temperatura que provocam a redução na atividade da enzima (Hung et al., 2015).

Com os avanços na área da biotecnologia, têm-se buscado inovações para melhoria na produção de fitase, surgindo no mercado novas gerações de enzimas mais resistentes à acidez estomacal e ao processamento térmico (Lemos e Tacon, 2016). As tilápias possuem pH estomacal ácido (Greiner e Konietzny, 2010) e uma fitase mais resistente à acidez pode permitir maior eficiência. A fitase líquida é adicionada após os processos de moagem, extrusão e secagem e permite maior segurança da atividade da enzima adicionada.

Ainda faltam informações sobre as novas gerações de fitase líquida em dietas extrusadas para tilápias do Nilo considerando a possibilidade de reduzir fonte inorgânica de Ca e fósforo. O fosfato bicálcico é a principal fonte inorgânica desses minerais e está presente em elevadas proporções em dietas elaboradas exclusivamente com alimentos de

origem vegetal. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a possibilidade de reduzir a inclusão de fosfato bicálcico (FB) por meio da adição de nova geração de fitase em dietas elaboradas exclusivamente com alimentos de origem vegetal, com base no desempenho produtivo, retenção de minerais e parâmetros sanguíneos.

## **2. Material e métodos**

Os procedimentos experimentais foram previamente submetidos e aprovados para execução pelo Comitê de Conduta Ética sobre o Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo N°6352/2017).

### *2.1 Dietas*

Foram elaboradas cinco dietas extrusadas com aproximadamente 19,54 MJ/kg de EB e 326,44 g/kg de PB, contendo exclusivamente alimentos de origem vegetal, com inclusão de 30 g/kg de fosfato bicálcico e sem adição de fitase (controle positivo, FB30), sem adição de FB e de fitase (controle negativo, FB0), sem FB e com 1000 unidade de fitase ativa (FTU/kg) (FB0 + F), com 10 g/kg de FB e 1000 FTU/kg (FB10 + F) e 20 g/kg de FB e 1000 FTU/kg (FB20 + F). Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia (8, 11, 14 e 16 horas) até saciedade aparente (Tabela 1).

Tabela 1

Composição das dietas experimentais (g/kg) para juvenis de tilápias do Nilo pelo período de 56 dias.

Ingredientes	Dietas <sup>1</sup>				
	FB30	FB0	FB0+F	FB10+F	FB20+F
Farelo de trigo	230,00	230,00	230,00	230,00	230,00
Farinha de trigo	208,50	208,50	208,50	208,50	208,50
Farelo de soja	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Farelo de arroz	180,00	180,00	180,00	180,00	180,00
Glúten de milho	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00
Conc. soja	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Fos. Bicálcico	30,00	0,00	0,00	10,00	20,00
Calcário	0,00	20,00	20,00	13,50	7,00
Inerte	0,00	10,00	10,00	6,50	3,00
L-lisina	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10
Supl. Min.vit. <sup>2</sup>	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Sal	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
DL-metionina	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
L-treonina	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
L-histidina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Antifúngico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L-arginina	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
L-triptofano	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Antioxidante	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Composição analisada <sup>3</sup>					
MS	948,50	946,50	950,70	947,60	945,90
EB (MJ/kg)	19,60	19,76	19,51	19,51	19,48
PB	327,50	327,60	327,60	326,10	323,40
EE	61,80	64,30	64,40	61,80	63,20
FB	47,40	48,50	48,30	48,90	49,20
Ca	8,60	8,80	8,80	8,70	8,60
P	16,20	9,30	9,30	12,10	14,70
MM	77,80	63,46	63,30	66,96	70,46
Fitase (FTU/kg)	ND <sup>4</sup>	ND	1100,00	1070,00	1110,00

<sup>1</sup>Dietas - FB30, dieta com 30 g/kg de fosfato bicálcico; FB0, dieta sem fosfato bicálcico; FB0+F, dieta sem fosfato bicálcico e adição de 1000 FTU/kg; FB10 + F, dieta com 10 g/kg de fosfato bicálcico e adição de 1000 FTU/kg e FB20 + F, dieta com 20 g/kg de FB com 1000 FTU/kg.

<sup>2</sup> Suplemento mineral e vitamínico: Composição (IU ou mg/kg da dieta): vitamina A (palmitato de retinol), 1,200.000 UI; vitamina D<sub>3</sub> (colecalciferol), 200000 UI; vitamina E (DL- $\alpha$ -tocoferol), 12000 mg; vitamina K<sub>3</sub> (menadiona), 2400 mg; vitamina B<sub>1</sub> (tiamina HCl), 4800 mg; vitamina B<sub>2</sub>(riboflavina), 4800 mg; vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina HCl), 4000 mg; vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina), 4,8 mg; ácido fólico, 1200 mg; Pantotenato de D-cálcio, 12000 mg; vitamina C (ácido ascórbico), 48000 mg; D-biotina, 48 mg; cloreto de colina, 65000 mg; niacina, 24 000 mg; sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 7H<sub>2</sub>O), 10000 mg; sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O), 600 mg; sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O), 4000 mg; sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 6000 mg; sulfato de cobalto (CoSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O), 2 mg; Selenito de sódio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), 20 mg.

<sup>3</sup>MS, matéria seca; EB, energia bruta; P, proteína bruta; EE, extrato etéreo; FB, fibra bruta; Ca, cálcio, P, fósforo e MM, matéria mineral.

<sup>4</sup>ND: não detectada.

Foi utilizada fitase microbiana (Natuphos® E-10.000 FTU/kg) produzida a partir da combinação de três fontes bacterianas, formando uma geração híbrida que foi então inserida na cepa do fungo *Aspergillus niger*. Antes da inclusão da enzima, a atividade da fitase foi confirmada por meio de análise laboratorial, seguindo metodologia descrita por Engelen et al. (2001) por HPLC e espectrofotometria de absorção atômica no laboratório CBO (Valinhos SP, Brasil).

As dietas foram misturadas, moídas e extrusadas no Laboratório AquaNutri (Botucatu, SP, Brasil). A moagem foi realizada em moinho centrífugo com peneiras com furos de 0,7 mm (Vieira MC 680 B, Tatuí, SP, Brasil) e a extrusão foi realizada em extrusor de rosca simples (Exteec EX30, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com matriz de 0,8 mm de diâmetro e secas em estufa de ventilação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, SP, Brasil) a 55°C, durante 24 horas. Após, secagem e resfriamento, a fitase líquida foi adicionada às dietas por aspersão.

Para aspersão da enzima foi elaborada solução mãe com 10 ml de Natuphos® E e 990 ml de água destilada. Em seguida, foi retirado alíquota de 10 ml da solução mãe e adicionada em 300 ml de água destilada para cada kg de dieta, resultando em dietas com 1000 FTU/kg. A solução foi aspergida *on top* nas dietas, parcelada em duas aplicações por meio de aspersor manual. Após cada aplicação, as dietas foram secas em estufa com circulação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, SP, Brasil) a 42°C por 2 horas.

## 2.2 Peixes e manejo

Foram adquiridos 1000 alevinos masculinizados de tilápias do Nilo com peso médio de  $1,05 \pm 0,02$  g, da piscicultura Aquabel (Rolândia, PR, Brasil). Os peixes permaneceram pelo período de 20 dias em tanque com volume útil de 1000L, mantidos sob temperatura controlada ( $27 \pm 0,20^\circ\text{C}$ ) e aeração constante de forma a manter os níveis de oxigênio entre 6,00 a 6,50 mg/L. Os peixes foram alimentados com dieta comercial microextrusada (0,4 mm de diâmetro) com 45 g/kg de PB, seis vezes por dia, com consumo voluntário até atingirem peso corporal médio de 12 g. Em seguida, 240 peixes com peso médio de  $12,03 \pm 0,14$  g foram distribuídos aleatoriamente em 20 caixas de polietileno com volume útil de 70 litros em sistema de recirculação, proporcionando taxa de entrada de água de 1,94 L/min em cada aquário.

O sistema de recirculação era composto por caixa de decantação, filtro biológico e filtro UV, com aeração por meio de soprador de 0,5 CV e sistema de aquecimento na caixa decantação, de forma a manter o oxigênio dissolvido de  $6,00 \pm 0,20$  mg/L, com termostato regulado para manter a temperatura de  $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Os valores médios de amônia, nitrato, nitrito e pH da água dos tanques foram analisados semanalmente e mantidos em  $0,003 \pm 0,01$  mg/L,  $0,003 \pm 0,01$  mg/L,  $0,006 \pm 0,01$  mg/L e  $7,00 \pm 0,23$  respectivamente.

Diariamente, os aquários foram sifonados de forma a renovar 33,3% da água do tanque. Para renovação da água, foram mantidos quatro caixas de 250 L, com valores de temperaturas e oxigênio dissolvido iguais aos da água dos aquários experimentais. Todas as fontes inorgânicas de minerais foram retiradas do sistema de recirculação. A temperatura da água e o oxigênio dissolvido foram aferidos diariamente com medidor de oxigênio e temperatura portátil (YSI F-1055, Blumenau, SC, Brasil), o pH foi determinado semanalmente por meio de pHmetro de bancada (TEC – 2, Piracicaba, SP, Brasil), amônia, nitrito, nitrato foram determinados semanalmente por meio de spectrokit (ALFAKIT, Florianópolis, SC, Brasil).

Antes do início do experimento, os peixes permaneceram por sete dias para adaptação as condições experimentais. Ao término do ensaio de crescimento, todos os peixes foram anestesiados com 100 mg/L de ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS222, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

Os resultados de desempenho foram analisados de acordo com as seguintes equações: Ganho de peso (g) = peso final (g) - peso inicial (g), Consumo (g) = consumo total/número de peixes; Taxa de eficiência proteica = ganho de peso (g)/proteína consumida (g); Conversão alimentar = consumo (g)/ganho de peso (g), Índice hepatossomático (%) =  $100 \times$  peso do fígado (g)/peso corporal (g); Gordura visceral (%) =  $100 \times$  peso da gordura visceral e somática (g)/peso corporal (g); Sobrevivência (%) =  $100 \times$  número de peixes no final do experimento/número de peixes no início do experimento.

### 2.3 Coleta de sangue

Para a coleta de sangue, foram utilizados três peixes de cada unidade experimental. Todos os peixes foram mantidos em um período de 12 horas em jejum. O sangue foi coletado

por punção do vaso caudal com o auxílio de seringas de 1 ml com agulhas heparinizadas (0,60 x 25mm). Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos para separação do plasma e em seguida armazenado a -20°C para posterior análises.

#### *2.4 Coleta de vértebras*

Para análise de minerais nas vértebras foram utilizados oito peixes de cada unidade experimental. Os peixes foram submetidos à cocção em forno de micro-ondas por 3 minutos e lavados com água deionizada para remoção do tecido residual. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa a 105°C por 24 horas, armazenadas com respectivas identificações para posterior análises. Após, foram desengorduradas, permanecendo durante 24 horas em solução éter de petróleo a temperatura ambiente, desidratadas ao ar durante 12 horas, secas em estufa a 105°C durante duas horas, moídas em moinho bola e armazenadas em freezer a -20°C até análises laboratoriais.

#### *2.5 Análises químicas*

Foram realizadas as análises de matéria seca (MS) (método 934,01), MM (método 942,05) e nitrogênio (método 981,10). A PB foi calculada pelo percentual de nitrogênio multiplicado por 6,25. O extrato etéreo (EE) (método 920,85) das dietas e corporal dos peixes e fibra bruta (método 991,43) das dietas foram determinados de acordo com Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

As análises plasmáticas de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST), Ca, P, colesterol, glicose, proteína total e triglicérides, foram realizadas por espectrofotometria em analisador bioquímico semiautomático (BIO-2000 IL, Barueri, SP, Brasil), utilizando kits comercial (BIOTÉCNICA®, Varginha, MG, Brasil). Para análise de retenção de Ca, P, Fe, Mg, Mn e Zn nas vértebras, estas foram encaminhadas para o laboratório CBO – Valinhos – SP.

## 2.6 Análise Estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso, composto por cinco tratamentos e quatro repetições. A repetição foi utilizada como unidade experimental. Para análise dos dados, estes foram submetidos a verificação de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Liliefors e verificação de homogeneidade pelo teste de Levene. Quando essas duas exigências foram atendidas, os resultados foram submetidos à ANOVA ( $P < 0,05$ ), em caso de efeito, os dados foram comparados pelo teste de Tukey com um nível de significância de 5%. Utilizou-se o programa estatístico *Statistical Analysis System* – SAS (versão 9.0). Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio (EPM).

## 3. Resultados

### 3.1 Ensaio de crescimento

Peixes que receberam as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F obtiveram maior, peso final ( $P = 0,001$ ), ganho de peso ( $P = 0,001$ ), consumo ( $P = 0,001$ ) e taxa de eficiência proteica ( $P = 0,002$ ) quando comparados aos que receberam as dietas FB0 + F e FB0 respectivamente. No entanto, não foram observados efeitos na conversão alimentar ( $P = 0,985$ ) e índice hepatossomático ( $P = 0,648$ ).

A menor porcentagem de gordura visceral ( $P = 0,005$ ) foi encontrada nos peixes alimentados com a dieta FB30, FB10 + F e FB20 + F em relação aos que receberam as dietas FB0 e FB0 + F que apresentaram maior porcentagem de gordura visceral. Foi observado maior taxa de mortalidade ( $P = 0,011$ ) nos peixes alimentados com a dieta FB0 e FB0 + F quando comparados aos que receberam as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F (Tabela 3). Os peixes que receberam as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F apresentaram melhores resultados de crescimento quando comparados aos peixes que receberam as dietas FB0 e FB0 + FTU (Figura 1).

Tabela 2

Desempenho produtivo de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem e com substituição parcial de fosfato bicálcico pela nova geração de fitase líquida<sup>1</sup>.

Parâmetros <sup>2</sup>	Dietas <sup>3</sup>					EPM <sup>4</sup>	Valor - <i>P</i>
	FB30	FB0	FB0+F	FB10+F	FB20+F		
PF (g)	84,96 <sup>a</sup>	44,38 <sup>c</sup>	71,29 <sup>b</sup>	88,37 <sup>a</sup>	89,65 <sup>a</sup>	3,970	0,001
GP (g)	73,05 <sup>a</sup>	33,75 <sup>c</sup>	59,22 <sup>b</sup>	76,06 <sup>a</sup>	77,71 <sup>a</sup>	3,954	0,001
CR (g)	81,81 <sup>a</sup>	38,79 <sup>c</sup>	64,65 <sup>b</sup>	84,11 <sup>a</sup>	82,22 <sup>a</sup>	4,052	0,001
TEP	3,18 <sup>a</sup>	2,19 <sup>c</sup>	2,85 <sup>b</sup>	3,21 <sup>a</sup>	3,34 <sup>a</sup>	0,020	0,002
CA	1,11	1,14	1,09	1,10	1,06	0,028	0,985
IHS (%)	2,59	2,57	2,73	2,50	2,37	0,110	0,648
GV (%)	1,22 <sup>b</sup>	1,61 <sup>a</sup>	1,68 <sup>a</sup>	1,27 <sup>b</sup>	1,11 <sup>b</sup>	0,044	0,005
Sob	100,00 <sup>a</sup>	89,58 <sup>b</sup>	95,83 <sup>ab</sup>	100,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	1,307	0,011

<sup>1</sup> Os dados são valores médios de 4 repetições contendo 12 tilápias do Nilo por unidade experimental

<sup>2</sup> PF, peso final; GP, ganho de peso; CR, consumo; CA: conversão alimentar; TEP, taxa de eficiência proteica; IHS, índice hepatossomático; GV, gordura visceral e Sob, Sobrevivência.

<sup>3</sup> FB30, dieta com 30 g/kg de fosfato bicálcico; FB0, dieta sem fosfato bicálcico; FB0 + F, dieta sem fosfato bicálcico e adição de 1000 FTU/kg; FB10 + F, dieta com 10 g/kg de fosfato bicálcico e com 1000 FTU/kg e FB20 + F, dieta com 20 g/kg de fosfato bicálcico e adição de 1000 FTU/kg.

<sup>4</sup> Erro padrão médio.

### 3.2 Parâmetros bioquímicos

Foi observado maior concentração plasmática de colesterol ( $P = 0,022$ ), triglicerídeos ( $P = 0,048$ ) e proteína plasmática ( $P = 0,001$ ) em peixes alimentados com a dieta FB0 em relação aos peixes dos demais tratamentos. Peixes alimentados com as dietas FB10 + F e FB20 + F apresentaram maiores concentrações de P plasmático ( $P = 0,021$ ) em relação aos peixes que consumiram a dieta FB0. No entanto, não foram observadas diferenças no nível de P plasmático em peixes alimentados com as dietas FB30, FB0 + F, FB10 + F e FB20 + F. A concentração de Ca foi maior nos peixes alimentados com as dietas FB10 + F e FB20 + F, quando comparados aos demais tratamentos. Não foi observado efeito ( $P = 0,746$ ) dos tratamentos sobre a atividade da enzima aspartato aminotransferase. A atividade da enzima fosfatase alcalina foi maior ( $P = 0,048$ ) em peixes que receberam a dieta FB0, mas não diferiu entre os demais tratamentos avaliados. A atividade da enzima alanina aminotransferase foi menor ( $P = 0,001$ ) em peixes alimentados com as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F em relação ao observado no plasma de peixes que consumiram a dieta FB0. No entanto, não foi

observado diferença na atividade dessa enzima em peixes que consumiram as dietas FB0 e FB0 + F (Tabela 4).

Tabela 3

Parâmetros bioquímicos de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem e com substituição parcial de fosfato bicálcico pela nova geração de fitase líquida.<sup>1</sup>

Parâmetros <sup>2</sup>	Dietas <sup>3</sup>					EPM	Valor - <i>P</i>
	FB30	FB0	FB0+F	FB10+F	FB20+F		
ALT (UI <sup>-1</sup> )	38,50 <sup>b</sup>	56,50 <sup>a</sup>	35,50 <sup>b</sup>	37,00 <sup>b</sup>	35,00 <sup>b</sup>	2,750	0,048
ALP (UI <sup>-1</sup> )	24,00 <sup>b</sup>	31,50 <sup>a</sup>	25,50 <sup>ab</sup>	14,50 <sup>c</sup>	11,00 <sup>c</sup>	5,367	0,001
AST (UI <sup>-1</sup> )	92,00	114,00	66,50	79,00	121,00	13,69	0,746
Colesterol (mg/dl)	75,00 <sup>b</sup>	97,00 <sup>a</sup>	81,00 <sup>b</sup>	80,00 <sup>b</sup>	80,50 <sup>b</sup>	1,301	0,022
Cálcio (%)	11,00 <sup>b</sup>	11,10 <sup>b</sup>	11,00 <sup>b</sup>	12,00 <sup>a</sup>	12,00 <sup>a</sup>	0,338	0,001
Fósforo (%)	7,70 <sup>ab</sup>	4,80 <sup>b</sup>	6,25 <sup>ab</sup>	8,85 <sup>a</sup>	9,25 <sup>a</sup>	1,257	0,021
Proteína total (mg/dl)	3,50 <sup>bc</sup>	4,05 <sup>a</sup>	3,50 <sup>b</sup>	2,95 <sup>c</sup>	2,90 <sup>c</sup>	0,140	0,001
Triglicerídeos (mg/dL)	114,00 <sup>b</sup>	184,80 <sup>a</sup>	102,50 <sup>b</sup>	112,50 <sup>b</sup>	116,00 <sup>b</sup>	3,090	0,048

<sup>1</sup>Os dados são valores médios de 4 repetições contendo 12 tilápias do Nilo por unidade experimental  
<sup>a, b</sup> Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

<sup>2</sup>ALT, alanina aminotransferase; ALP, fosfatase alcalina e AST, aspartato aminotransferase

<sup>3</sup>FB30, dieta com 30 g/kg de fosfato bicálcico; FB0, dieta sem fosfato bicálcico; FB0 + F, dieta sem fosfato bicálcico e com adição de 1000 FTU/kg; FB10 + F, dieta com 10 g/kg de fosfato bicálcico e adição de 1000 FTU/kg e FB20 + F, dieta com 20 g/kg de fosfato bicálcico e 1000 FTU/kg;

<sup>4</sup> Erro padrão médio.

### 3.3 Composição corporal

Não foi observado efeito dos tratamentos sobre a umidade ( $P = 0,134$ ) e PB corporal ( $P = 0,248$ ). A composição corporal de minerais ( $P = 0,001$ ) foi maior nos peixes que receberam dieta FB20 + F quando comparadas aos que receberam as dietas FB0 e FB0 + F. Foram observados maiores teores de Ca ( $P = 0,004$ ) e P ( $P = 0,004$ ) corporal nos peixes alimentados com as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F em relação ao observado nos peixes alimentados com a dieta FB0. Foi observado maior deposição corporal de EB ( $P = 0,007$ ) e extrato etéreo ( $P = 0,013$ ) em peixes que receberam a dieta FB0 em relação ao observado nos peixes que consumiram as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F (Tabela 5).

### 3.6 *Concentração de minerais nas vértebras*

Peixes alimentados com as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F apresentaram maiores concentrações de Ca ( $P = 0,002$ ) e P ( $P = 0,002$ ) em relação aos peixes alimentados com a dieta FB0. Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) na concentração de Fe e Zn nas vértebras. Foram observadas maiores concentrações de Mg ( $P = 0,001$ ) nos peixes que receberam as dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F, quando comparados aos que receberam a dieta FB0. A concentração de Mn foi maior ( $P = 0,005$ ) nos peixes que receberam a dieta FB30, mas não significativamente diferente dos peixes que receberam a dieta FB10 + F (Tabela 5).

Tabela 4

Composição corporal e concentração de minerais nas vértebras de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem e com substituição parcial de fosfato bicálcico pela nova geração de fitase líquida.<sup>1</sup>

Parâmetros <sup>2</sup>	Dietas <sup>3</sup>					EPM <sup>4</sup>	Valor - <i>P</i>
	FB30	FB0	FB0+F	FB10+F	FB20+F		
Composição Corporal (g/kg)							
UM	699,7	686,3	691,1	708,9	723,9	0,436	0,134
PB	158,7	157,7	159,5	154,5	144,8	0,218	0,248
EE	70,5 <sup>b</sup>	90,6 <sup>a</sup>	87,8 <sup>a</sup>	71,0 <sup>b</sup>	64,4 <sup>b</sup>	0,183	0,013
EB (MJ/kg)	23,73 <sup>b</sup>	26,00 <sup>a</sup>	26,11 <sup>a</sup>	23,85 <sup>b</sup>	23,52 <sup>b</sup>	0,097	0,007
MM	37,0 <sup>b</sup>	27,2 <sup>c</sup>	30,9 <sup>c</sup>	35,6 <sup>b</sup>	42,0 <sup>a</sup>	0,039	0,001
Ca	10,5 <sup>ab</sup>	6,70 <sup>c</sup>	8,20 <sup>bc</sup>	10,4 <sup>ab</sup>	11,0 <sup>a</sup>	0,022	0,004
P	6,50 <sup>a</sup>	4,50 <sup>b</sup>	5,30 <sup>ab</sup>	6,30 <sup>a</sup>	6,50 <sup>a</sup>	0,011	0,004
Minerais nas vértebras							
Ca (g/kg)	13,28 <sup>a</sup>	11,62 <sup>b</sup>	12,47 <sup>ab</sup>	13,37 <sup>a</sup>	13,22 <sup>a</sup>	0,188	0,002
P (g/kg)	6,88 <sup>a</sup>	5,58 <sup>b</sup>	6,41 <sup>ab</sup>	7,09 <sup>a</sup>	7,17 <sup>a</sup>	0,164	0,002
Fe (mg/kg)	20,21	21,27	25,78	22,71	20,45	0,911	0,296
Mg (g/kg)	0,22 <sup>a</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,19 <sup>ab</sup>	0,23 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,008	0,001
Mn (mg/kg)	27,28 <sup>a</sup>	15,56 <sup>b</sup>	15,74 <sup>b</sup>	22,20 <sup>ab</sup>	23,45 <sup>b</sup>	1,341	0,005
Zn (mg/kg)	93,20	87,57	85,66	88,65	94,33	1,132	0,460

<sup>1</sup> Os dados são valores médios de 4 repetições contendo 12 tilápias do Nilo por unidade experimental

<sup>2</sup>UM, umidade; PB, proteína bruta; EE, extrato etéreo; EB, energia bruta; MM, matéria mineral; Ca, cálcio; P, fósforo; Fe, ferro; Mg, magnésio; Mn, manganês; Zn, zinco.

<sup>3</sup> Dietas - FB30, dieta com 30 g/kg de fosfato bicálcico; FB0, dieta sem fosfato bicálcico; FB0+F, dieta sem fosfato bicálcico e adição de 1000 FTU/kg; FB10+F, dieta com 10 g/kg de fosfato bicálcico e adição de 1000 FTU/kg e FB20+F, dieta com 20 g/kg de fosfato bicálcico e 1000 FTU/kg.

<sup>4</sup>EPM: Erro padrão médio.

<sup>a, b</sup> Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

## 4. Discussão

### 4.1. Ensaio de crescimento

Os peixes que receberam dietas com substituição de fosfato bicálcico nos níveis de 10 e 20 g/kg na dieta obtiveram resultados positivos para peso final, ganho de peso, consumo de ração e taxa de eficiência proteica, e evidencia o efeito positivo da atuação da fitase em hidrolisar o fitato, resultando em melhora no desempenho dos peixes.

A taxa de eficiência proteica foi menor nos peixes que receberam as dietas FB0 e FB0 + F, divergindo da gordura visceral que aumentou nesses tratamentos. Alta relação energia/proteína (E/P) da dieta, isto é, pouca proteína para muita energia, resulta na diminuição do consumo voluntário de alimento, resultando em menor ingestão de proteína e aumento de deposição de gordura visceral (Page e Andrews, 1973).

Com o aumento no aproveitamento dos nutrientes com a adição de fitase as dietas, confirma-se a possibilidade de reduzir em 67% a inclusão de FB em dietas elaboradas com alimentos de origem vegetal e com adição de fitase. Abo Norag et al. (2018) observaram a possibilidade de reduzir a inclusão de fosfato bicálcico em 50% com a adição de 1000 FTU/kg em dietas para tilápias do Nilo. O aumento no desempenho dos peixes está relacionado aos efeitos da fitase sobre a disponibilidade de outros nutrientes como os aminoácidos (Riche et al., 2001) e minerais catiônicos (Hassaan et al., 2013).

No presente estudo, o baixo ganho de peso e piora na eficiência de utilização da proteína dietética observados nos peixes alimentados com as dietas FB0 e FB0 + F estão relacionados com a deficiência de P para as atividades metabólicas de manutenção e produção. Assim, a adição de fitase em dietas sem P não foi suficiente para atender as exigências de P nos peixes alimentados com a dieta FB0 + F. O fósforo desempenha papel importante no metabolismo celular, estreitamente relacionado ao ATP, sendo importante como doador de fosfato para muitas reações metabólicas (Amanzadeh e Reilly, 2006) que são dependentes da disponibilidade do P dietético. A síntese proteica depende da disponibilidade de aminoácidos e de energia para catalisar essas reações, sendo um processo de alta demanda energética (Shariatmadari e Forbes, 1993) e altamente dependente da disponibilidade de P (Hettleman et al., 1983).

Resultados positivos com a adição de fitase também foram comprovados com pangá (*Pangasianodon hypophthalmus*) em que a adição de 750 e 1500 FTU/kg foram adequadas para aumentar o ganho de peso e taxa de eficiência proteica, semelhante aos peixes que receberam dietas com a inclusão de 15 g/kg de FB (Hung et al., 2015). Um dos principais antinutrientes presente nos ingredientes vegetais é o ácido fítico, que reduz o crescimento dos peixes, tornando necessária a suplementação de P inorgânico às dietas (Cowieson et al., 2011). A adição de fitase inibe os efeitos negativos do ácido fítico, melhorando a disponibilidade de P e o desempenho dos animais (Cao et al., 2007). Portanto, a melhora no desempenho dos peixes que receberam dietas com adição de fitase também está relacionada a maior disponibilidade de minerais e aminoácidos (Cao et al., 2008; Hussain et al., 2016; Nwanna e Olusola, 2014).

No presente estudo, peixes que receberam dietas FB30, FB10 + F e FB20 + F, apresentaram menor índice de gordura visceral e menor deposição de gordura corporal em relação aos que receberam a dieta FB0. A deficiência de P prejudica a digestibilidade de lipídios, carboidratos e conseqüentemente a disponibilidade de energia, por causa da redução na oxidação de ácidos graxos com conseqüente redução na glicogênese (Sakamoto e Yone, 1978). A deficiência de P influencia no metabolismo intermediário, exercendo importante função na transferência de energia química no organismo por meio do trifosfato de adenosina (Nelson e Cox, 2014). A inibição da fosforilação oxidativa resulta em acúmulo de gordura corporal (Lall, 2002) e aumento de gordura em peixes alimentados com dietas deficientes em P (Eya e Love, 1997; Roy e Lall, 2003; Yang et al., 2006).

Os peixes que receberam as dietas FB0 e FB0 + F apresentaram redução no consumo, comportamento agressivo e maior mortalidade. A deficiência de minerais pode causar deformidades esqueléticas, mortalidade, redução do crescimento e baixa utilização dos nutrientes pelos animais ocasionando em aumento na mortalidade (Sakamoto e Yone, 1978). Os peixes com deficiência de fósforo no presente estudo, buscavam suprir suas necessidades tentando obter esse mineral nas escamas de outros peixes, e levou ao aumento de brigas, fato evidenciado pela ausência de escamas nos peixes que foram encontrados mortos.

Resultados semelhantes foram relatados por Portz et al., (2004) que observaram aumento na mortalidade de tilápias do Nilo alimentadas com dietas deficientes em P, os autores relataram que os peixes alimentados com dietas deficientes em P apresentaram

comportamento agressivo. Abo Norag et al., (2018), também observaram menor taxa de sobrevivência em tilápias do Nilo alimentadas com dietas deficientes em P. Os sinais de deficiência de P foram relatados pela redução no consumo, aumento no conteúdo de gordura corporal, no fígado e redução na mineralização óssea (Yang et al., 2006).

#### 4.2 Parâmetros bioquímicos

A análise dos parâmetros sanguíneos é importante para avaliar o estado nutricional e de saúde dos peixes (Higuchi et al., 2011). No presente estudo, a concentração de AST não foi influenciada pelos diferentes tratamentos. As variações nas concentrações de AST pode ser menor específica do que a ALT, porém mantêm-se em níveis basais por mais tempo, são menos hepato-específicas (Thrall et al., 2015). Resultados semelhantes foram relatados por Hassaan et al. (2013), em que a adição de 1000 FTU/kg não alterou as concentrações da enzima AST no plasma de tilápias do Nilo. Transaminases como a ALT e AST apresentam importantes funções no metabolismo de aminoácidos e proteínas e são importantes no diagnóstico de alterações metabólicas (Leandro et al., 2015).

A enzima ALT é encontrada em grande concentração no citoplasma de hepatócitos e alterações como lesões ou necrose celular podem levar ao aumento da atividade sérica dessa enzima (Montanha e Pimpão, 2012). No presente estudo, os peixes que receberam dietas sem fosfato e fitase apresentaram maiores concentrações de ALT no plasma. O aumento da atividade da ALT indica dano tecidual, por causa das perturbações nos processos fisiológicos que podem estar relacionados ao estresse (Zikic et al., 2001) e estado nutricional provocado pela maior deposição de gordura corporal, resultando em maior deposição de gordura no fígado.

A atividade da enzima ALP aumentou em peixes que receberam a dieta deficiente em P (FBO) em relação ao observado nos peixes alimentados com dietas contendo FB e adição de fitase. A ALP desempenha importante função na mineralização óssea e o aumento plasmático da sua concentração está relacionado a distúrbio ósseo, que pode ocorrer pela deficiência de Ca e/ou P ou pela alteração dietética da relação entre esses minerais (Bernet et al., 2001). Em concordância com o observado no presente estudo, em “red sea bream”, *Pagrus major*, a elevada concentração de ALP plasmática foi associada à hipofosfatemia (Sakamoto e Yone, 1980), sendo a enzima mais responsiva aos níveis

de P (Kumar, 2011). O aumento da ALP no plasma também foi relatado por Yang et al. (2006), em “silver perch”, *Bidyanus bidyanus* alimentados com dietas deficientes em P. Shearer e Hardy (1987) relataram aumento na atividade da enzima ALP no plasma de truta arco-íris alimentadas com dietas deficientes em P, quando comparadas com as que receberam quantidades adequadas de P na dieta.

A mineralização óssea é um processo biológico complexo e alto nível de ALP está relacionado com a atuação da enzima nos locais de mineralização óssea e cartilagem, por meio da hidrólise de fosfato orgânico para liberar fosfato inorgânico em locais de mineralização resultando em maior crescimento (Donachy et al., 1990). Com a redução do P na dieta há redução no crescimento. Bodansky (1938) descreveu o conceito da reatividade específica controlada para a reabsorção óssea traduzida pela velocidade em que os minerais são retirados e, em seguida novamente depositados nos ossos. Assim, a concentração ALP no soro foi descrita como uma resposta dessa reatividade específica.

Altos níveis de ALP têm sido associados aos distúrbios hipofosfatêmicos, sugerindo que a expressão de ALP nos osteoblastos é regulada pelos níveis de P, o sistema de regulação poderia aumentar a síntese de ALP em resposta a níveis reduzidos de P (Orimo e Shimada, 2008; Yoshiko et al., 2007), fato que justifica o aumento da ALP no plasma dos peixes do presente estudo que foram alimentados com dietas sem FB.

Os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos foram influenciados pelos diferentes tratamentos no presente estudo, com maiores concentrações em peixes que consumiram a dieta sem suplementação de FB e fitase. Tal resposta está relacionada com a importância do P sobre o metabolismo energético e deposição corporal de lipídios e conseqüentemente nos valores plasmáticos de triglicerídeos e colesterol em peixes alimentados com dietas deficientes em P.

No presente trabalho, peixes que consumiram a dieta sem FB e com adição de fitase apresentaram maior deposição de gordura visceral e maior teor de gordura corporal, semelhantemente ao observado em trutas arco-íris e carpa, *Carassius auratus grandoculis* alimentadas com dietas deficientes em P (Sugiura et al., 2011). Os valores elevados de colesterol, triglicerídeos e proteína total nos peixes que receberam as dietas sem FB e sem adição de fitase, refletiram nos valores elevados de ALP e proteínas totais no sangue nesses tratamentos.

A hipofosfatemia prejudica a fosforilação oxidativa pela baixa concentração de P citoplasmático e hipóxia celular causado pela baixa concentração de 2,3-difosfoglicerato nos eritrócitos (Knochel 2000). Além disso, baixa concentração de P intracelular prejudica a fosforilação do gliceraldeído 3-fosfato levando ao seu acúmulo e declínio de 1,3-difosfoglicerato e 2,3-difosfoglicerato, prejudicando a utilização de glicose e a síntese de ATP na glicólise (DeFronzo e Lang, 1980). Assim, na deficiência de P, a síntese de ATP é comprometida tanto no nível do substrato quanto nas fosforilações oxidativas e a fração lipídica da dieta não pode ser metabolizada de forma eficiente e se acumulará no corpo (Sugiura et al., 2011). O nível de proteína total aumentou nos peixes que receberam dietas isentas de fosfato e fitase e está relacionado a deficiência de fósforo nesse tratamento. A concentração de proteína total no sangue é usada como índice básico para a saúde e estado nutricional em peixes (Kumar et al., 2010).

No presente estudo, o aumento nos níveis plasmáticos de P nos peixes alimentados com dietas contendo FB e com adição de fitase confirmou a eficácia da nova enzima em disponibilizar P do ácido fítico, assemelhando-se ao resultado previamente relatado em tilápias do Nilo alimentadas com dietas deficientes em P com adição fitase (Hassan et al., 2013; Abo Norag et al., 2018). O aumento na concentração de minerais no sangue de peixes alimentados com dietas adicionada fitase foi evidenciado em outros trabalhos como em bagre-africano, *Clarias gariepinus* (Akpoilih et al., 2016) e kinguio, *Carassius auratus* (Nie et al., 2017).

#### 4.3 Concentração de minerais nas vértebras e composição corporal

No presente estudo, a adição de fitase nas dietas com 10 e 20 g/kg de FB resultou em maior concentração de Ca, P, Mg e Mn nas vértebras em relação aos peixes que consumiram a dieta sem FB e sem fitase. Resultados semelhantes foram relatados por Hassaan et al. (2013), em que a adição de 1000 FTU/kg aumentou a retenção de P nas vértebras e a composição corporal de minerais em tilápias do Nilo. Maior retenção dos minerais Ca, P e Mg nas vértebras e aumento corporal de minerais também foi relatada por Portz e Liebert (2004) em tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo somente ingredientes de origem vegetal e adição de 1000 FTU/kg.

A hidrólise do ácido fítico pela fitase aumenta as concentrações de P e minerais catiônicos como o Ca, Fe, Cu, Mg, Mn e Zn, levando maior conteúdo de minerais no

corpo dos peixes (Cao et al., 2007). Os ossos representam o principal reservatório de P (Lall, 2002) e alterações na mineralização óssea é principal sinal de deficiência de P, tendo em vista que a concentração de P nas vértebras é responsiva ao consumo de P na dieta (Helland et al., 2005; Mai et al., 2006). A deficiência de P induz a mobilização de P das vértebras e a transferência para os tecidos moles e processos metabólicos (Baeverfjord et al., 1998). Assim, o P armazenado nas vértebras é uma importante fonte de reserva desse mineral (Portz e Liebert, 2004).

A fitase pode ser utilizada como ferramenta nutricional para reduzir a inclusão de FB em dietas para tilápias do Nilo reduzindo os impactos ambientais pela melhoria na utilização do P e outros nutrientes. O processamento em cada etapa varia de acordo com as características da dieta e equipamentos utilizados, dificultando padronizar um valor residual de enzimas adicionadas antes dessas etapas. Assim, a adição de fitase líquida permite maior garantia residual da atividade da enzima, uma vez que é adicionada após etapas de processamento térmico durante moagem, extrusão e secagem. Destaca-se no presente estudo que a adição de fitase possibilitou a redução de 67% de FB, constituindo-se em importante alternativa para melhorar o valor nutritivo pelos efeitos adicionais sobre a disponibilidade da energia e de outros nutrientes além do P. Assim, a fitase é uma alternativa a ser considerada na criação de tilápias, que demandam dietas que contribuam para maior sustentabilidade ambiental para manter globalmente a atual taxa de crescimento da atividade.

## **5. Conclusão**

O fosfato bicálcico pode ser reduzido até 67% em dieta para juvenis de tilápias do Nilo contendo exclusivamente alimentos de origem vegetal e com adição da nova fitase no nível de 1000 FTU/kg, sem afetar o desempenho produtivo dos animais, retenção de minerais e parâmetros sanguíneos.

## **Agradecimentos**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Este estudo

foi parcialmente apoiado pela BASF (Corporation, Ludwigshafen, Germany) com a doação da fitase e análises laboratoriais.

## Referências

- Abo Norag, M.A., El-Shenawy, A.M., Fadl, S.E., Abdo, W.S., Gad, D.M., Rashed, M.A., Prince, A.M., 2018. Effect of phytase enzyme on growth performance, serum biochemical alteration, immune response and gene expression in Nile tilapia. *Fish Shellfish Immunol.* 80, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.051>
- Akpoilih, B.U., Omitoyin, B.O., Ajani, E.K., 2016. Dietary microbial phytase improves growth, phosphorus digestibility and serum phosphorus, but not bone mineralization, in juvenile *Clarias gariepinus* fed roasted and oil-pressed groundnut-based diet. *J. Fish. Aquat. Sci.* 11, 108–130. <https://doi.org/10.3923/jfas.2016.108.130>
- Amanzadeh, J., Reilly, R.F.J., 2006. Showcasing excellence and innovation in community pharmacy. *Aust. J. Pharm.* 90, 53–58. <https://doi.org/10.1038/ncpneph0124>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official methods of analysis, 16th ed. AOAC Int., Arlington, VA., 1995.
- Baeverfjord, Asgard, Shearer, 1998. Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, parr and post-smolts. *Aquac. Nutr.* 4, 1–11. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1998.00095.x>
- Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jain, K.K., Debnath, D., Mukherjee, S.C., 2007. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. *Aquac. Res.* 38, 109–120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01624.x>
- Bernet, D., Schmidt, H., Wahli, T., Burkhardt-Holm, P., 2001. Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta L.*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 140–147. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2012>
- Bodansky, M., 1938. Changes in serum calcium, inorganic phosphate and phosphatase activity in the pregnant woman\* 36–51.

- Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., Li, D., 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 497–507. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.007>
- Cao, L., Yang, Y., Wang, W.M., Yakupitiyage, A., Yuan, D.R., Diana, J.S., 2008. Effects of pretreatment with microbial phytase on phosphorous utilization and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Nutr.* 14, 99–109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00508.x>
- Cheng, Z.J., Hardy, R.W., 2002. Effect of microbial phytase on apparent nutrient digestibility of barley, canola meal, wheat and wheat middlings, measured in vivo using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 8, 271–277. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00219.x>
- Cowieson, A.J., Wilcock, P., Bedford, M.R., 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *Worlds. Poult. Sci. J.* 67, 225–235. <https://doi.org/10.1017/S0043933911000250>
- Debnath, D., Pal, A.K., Sahu, N.P., Jain, K.K., Yengkokpam, S., Mukherjee, S.C., 2005. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. *Aquac. Res.* 36, 180–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01203.x>
- DeFronzo, R.A., Lang, R., 1980. The New England Journal of Medicine Downloaded from [nejm.org](http://nejm.org) at PENN STATE UNIVERSITY on November 25, 2015. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. *N Engl J Med* 319, 1374–1378. <https://doi.org/10.1056/NEJM198603063141003>
- Donachy, J.E., Watabe, N., Showman, R.M., 1990. Alkaline phosphatase and carbonic anhydrase activity associated with arm regeneration in the seastar *Asterias forbesi*. *Mar. Biol.* 105, 471–476. <https://doi.org/10.1007/BF01316318>
- Engelen, A.J., van der Heeft, F.C., Randsdorp, P.H., Somers, W.A., Schaefer, J., van der Vat, B.J., 2001. Determination of phytase activity in feed by a colorimetric enzymatic method: collaborative interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 84, 629–633.
- Eya, J., Love, R., 1997. Available phosphorus requirements of food-size channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed practical diets in ponds. *Aquaculture* 154, 283–291.

- Greiner, R., Konietzny, U., 2010. Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. *Enzym. farm Anim. Nutr.* 96–128.
- Hassaan, M.S., Soltan, M.A., Agouz, H.M., Badr, A.M., 2013. Influences of calcium/phosphorus ratio on supplemental microbial phytase efficiency for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egypt. J. Aquat. Res.* 39, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.09.001>
- Helland, S., Refstie, S., Espmark, Å., Hjelde, K., Baeverfjord, G., 2005. Mineral balance and bone formation in fast-growing Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) in response to dissolved metabolic carbon dioxide and restricted dietary phosphorus supply. *Aquaculture* 250, 364–376. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.032>
- Higuchi, L.H., Feiden, A., Maluf, M.L.F., Dallagnol, J.M., Zaminhan, M., Boscolo, W.R., 2011. Avaliação eritrocitária e bioquímica de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos à dieta COM diferentes níveis protéicos e energéticos. *Ciência Anim. Bras.* 12, 70–75. <https://doi.org/10.5216/cab.v12i1.8986>
- Hughes, K.P., Soares Jr, 1998. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis*. *Aquac. Nutr.* 4, 133–140. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1998.00057.x>
- Hung, L.T., Thanh, N.T., Pham, M.A., Browdy, C.L., 2015. 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*). *Aquac. Nutr.* 21, 10–17. <https://doi.org/10.1111/anu.12134>
- Hussain, S.M., Afzal, M., Javid, A., Hussain, A.I., Ali, Q., Mustafa, I., Chatha, S.A.S., Shah, S.Z.H., Hussain, M., Ullah, M.I., 2015. Efficacy of phytase supplementation on growth performance and mineral digestibility of *Labeo rohita* fingerlings fed on cottonseed meal based diet. *Pak. J. Zool.* 47, 699–709.
- Hussain, S.M., Afzal, M., Nasir, S., Javid, A., Makhdoom, S.M., Jabeen, F., Azmat, H., Hussain, M., Shah, S.Z.H., 2016. Efficacy of phytase supplementation in improving mineral digestibility in *Labeo rohita* fingerlings fed on canola meal-based diets. *Iran. J. Fish. Sci.* 15, 645–661. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1091331>

- Knochel, J. P. (2000) Clinical and physiologic phosphate disturbances (Ch.70). In “The Kidney: Physiology & Pathophysiology, 3rd ed. (vol. 2)” (ed. by D. W. Seldin and G. Giebisch), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1905-1934
- Kumar, V., Makkar, H. P. S., Amselgruber, W., & Becker, K. (2010). Physiological, haematological and histopathological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings fed with differently detoxified *Jatropha curcas* kernel meal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2063–2072. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.007>
- Kumar, V., Makkar, H.P.S., Devappa, R.K., Becker, K., 2011. Isolation of phytate from *Jatropha curcas* kernel meal and effects of isolated phytate on growth, digestive physiology and metabolic changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Food Chem. Toxicol.* 49, 2144–2156. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.05.029>
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 96, 335–364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>
- Lall, S.P., 2002. The Minerals. *Fish Nutr.* 259–308. <https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50006-9>
- Leandro, J.D., Rodrigues, O.R., France, A., Slaets, F., Jr, A.F.S., Yaekashi, M.L., 2015. Avaliação da função hepática de peixes *Rhamdia quelen* expostos aos desreguladores endócrinos estriol e estrona. *RevInter* 8, 82–99. <https://doi.org/10.4025/jphyseduc.v28i1.2842>
- Lemos, D., Tacon, A.G.J., 2016. Use of phytases in fish and shrimp feeds: a review. *Rev. Aquac.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/raq.12138>
- Liebert, F., Portz, L., 2005. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture* 248, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.009>
- Liu, L., Luo, Y., Liang, X.F., Wang, W., Wu, J., Pan, J., 2013. Effects of neutral phytase supplementation on biochemical parameters in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, and gibel carp, *Carassius auratus gibelio*, fed different levels of monocalcium phosphate. *J. World Aquac. Soc.* 44, 56–65.

- <https://doi.org/10.1111/jwas.12002>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Dersjant-Li, Y., Schrama, J.W., 2018. The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture* 487, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.040>
- Mai, K., Wan, J., Ai, Q., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, L., Zhang, C., Li, H., 2006. Dietary methionine requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture* 253, 564–572. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.08.010>
- Montanha, F.P., Pimpão, C.T., 2012. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes. *Rev. Científica Eletrônica Med. Veterinária* 9, 58. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2746.1601>
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. <https://doi.org/10.1002/14651858>
- Nie, X., Chen, S., Zhang, X., Dai, B., Qian, L., 2017. Effects of neutral phytase on growth performance and phosphorus utilization in crucian carp (*Carassius auratus*). *J. Zhejiang Univ. B* 18, 886–896. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600280>
- Nwanna, L.C., Liebert, F., 2016. Effect of Varied Levels of Lysine Supplemented with Phytase on the Growth , Nutrient Digestibility , Phosphorus and Nitrogen Load of all Male Nile. *African Sci. Fish. Aquactic Resour. Manag.* 1, 1–12.
- Nwanna, L.C, Olusola, S., 2014. Effect of Supplemental Phytase on Phosphorus Digestibility and Mineral Composition in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int. J. Aquac.* 4, 89–95. <https://doi.org/10.5376/ija.2014.04.0015>
- Orimo, H., Shimada, T., 2008. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Mol. Cell. Biochem.* 315, 51–60. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9788-3>
- Page, J.W., Andrews, J.W., 1973. Interactions of Dietary Levels of Protein and Energy on Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) 1 2 1339–1346.
- Portz, L., Liebert, F., 2004. Growth, nutrient utilization and parameters of mineral metabolism in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed plant-based diets with graded levels of microbial phytase. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*.

88, 311–320.

- Riche, M., Trottier, N.L., Ku, P.K., Garling, D.L., 2001. Apparent digestibility of crude protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets. *Fish Physiol. Biochem.* 25, 181–194. <https://doi.org/10.1023/A:1022222431004>
- Roy, P.K., Lall, S.P., 2003. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture* 221, 451–468. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00065-6)
- Sakamoto, S., Yone, Y., 1978. Effect of dietary phosphorus level on chemical composition of red sea bream. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.*
- SAS, I., 2002. *Statistical Analysis System user's guide*. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute. 2008.
- Shearer, K.D., Hardy, R.W., 1987. Phosphorus deficiency in rainbow trout fed a diet containing deboned fillet scrap. *Progress. Fish-Culturist* 49, 192–197. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1987\)49\[192:PDITRF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1987)49[192:PDITRF]2.0.CO;2)
- Sugiura, S.S., Igashitani, A.H., Asaki, T.S., 2011. Effects of Dietary Phosphorus Restriction on Fillet Fat Deposition and Hepatic Lipid Metabolism in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Crucian Carp (*Carassius auratus grandoculis*)
- Thrall, M.A.; Weiser C., Robin W, A., Campbell, T, W., 2015. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*, 2 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 349 a 360.
- Vielma, J., Lall, S.P., Koskela, J., Schoner, F.J., Mattila, P., 1998. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 163, 309–323. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00240-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00240-3)
- Yang, S., Lin, T., Liu, F., Liou, C., 2006. Influence of dietary phosphorus levels on growth, metabolic response and body composition of juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*) 253,592–601. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09>
- Yigit, N.O., Bahadır Koca, S., Didinen, B.I., Diler, I., 2016. Effect of protease and phytase supplementation on growth performance and nutrient digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fed soybean meal-based diets. *J. Appl. Anim.*

Res. 2119, 1–4. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1256292>

Yoshiko, Y., Candelieri, G.A., Maeda, N., Aubin, J.E., 2007. Osteoblast Autonomous Pi Regulation via Pit1 Plays a Role in Bone Mineralization. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4465–4474. <https://doi.org/10.1128/MCB.00104-07>

Zikic, R. V, Stajn, A.S., Pavlovic, S.Z., Ognjanovic, B.I., Saicic, Z.S., 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.* 50, 105–111 ST–Activities of superoxide dismutase.

#### IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ingredientes de origem vegetal em dietas para peixes são considerados uma fonte econômica alternativa. Porém, a inclusão desses ingredientes deve ser utilizada com atenção, pois a presença de fatores antinutricionais como o ácido fítico pode reduzir o desempenho dos animais.

Entre as alternativas para a redução de fatores antinutricionais tem-se utilizado a adição de fitase. Vários estudos têm mostrado resultados satisfatórios quanto ao aumento no desempenho dos animais e redução na contaminação da água e do solo. No entanto, a atividade da enzima pode ser alterada pela baixa estabilidade e variações no pH no trato gastrointestinal dos animais.

A fitase líquida possui vantagem da maior garantia do teor residual da enzima adicionada, considerando os efeitos negativos do processamento das dietas durante a moagem, extrusão e secagem. Apesar da utilização de gerações de enzimas mais resistentes ao processamento térmico, destaca-se que pode haver grande variação na temperatura durante o processamento resultante de fatores como ingredientes utilizados, grau de moagem, tipos de equipamentos utilizados e tamanho do grânulo do extrusado.

A nova fitase pode ser utilizada como ferramenta para aumentar a disponibilidade do fósforo e minerais catiônicos e também proporcionar melhorias nos valores da energia e nutrientes, com aumento da digestibilidade da proteína e disponibilidade dos aminoácidos. Assim, uma vez conhecendo-se as exigências nutricionais, é possível considerar a maior disponibilidade da energia e nutrientes.

A fitase também pode ser considerada para reduzir a excreção de nutrientes no meio aquático, principalmente nitrogênio e fósforo, considerando a maior disponibilidade da proteína e maior disponibilidade do fósforo. O nitrogênio e o fósforo são nutrientes potencialmente poluentes, que contribuem para o desenvolvimento excessivo de algas,

podendo ocorrer a redução da sua qualidade. Além disso, pode ocorrer a produção de algas que podem resultar em “off-flavor” do filé, reduzindo seu valor comercial.

O fosfato bicálcico é a principal fonte inorgânica de cálcio e fósforo em dietas para tilápias. A redução de sua inclusão é benéfica, considerando que a fitase aumenta a disponibilidade da energia e diversos nutrientes, contribuindo para melhoria do desempenho e redução na emissão de nutrientes ao ambiente aquático.

## ANEXO

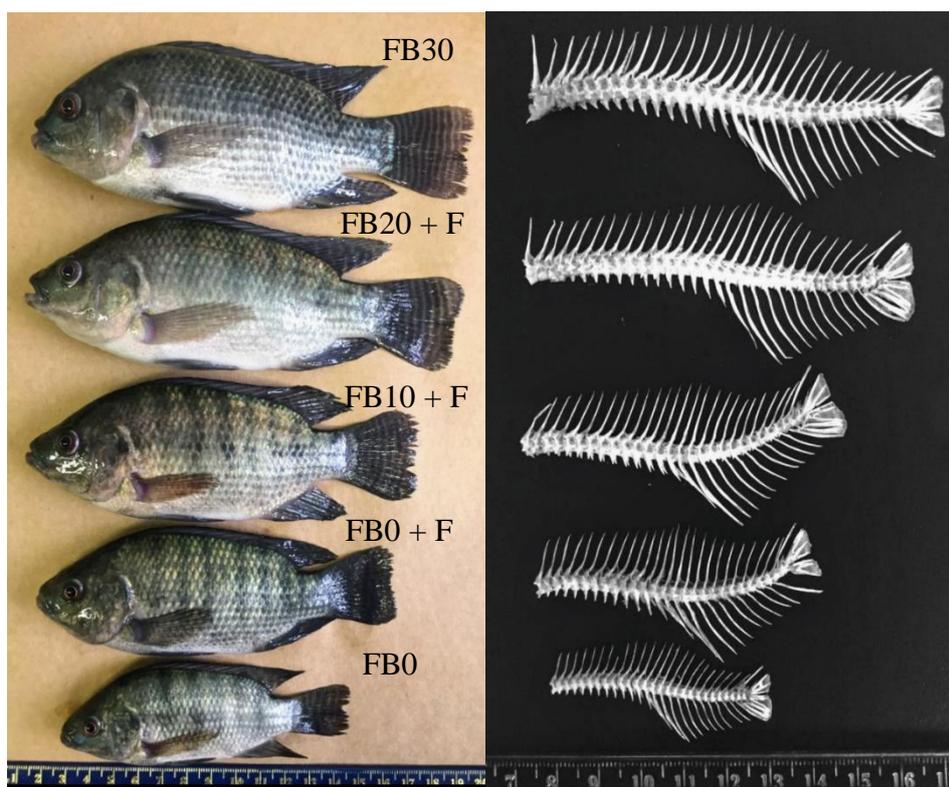


Figura 1. Efeito da adição de fitase no nível de 1000 FTU/kg e redução na inclusão de fosfato bicálcico (FB) em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. Dietas com 30 g/kg de FB; 20 g/kg de FB + 1000 FTU/kg, 10 g/kg de FB + 1000 FTU/kg, FB0 + 1000 FTU/kg e FB0.