



**DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES EM  
RAÇÃO COM COMPLEXO ENZIMÁTICO  
PARA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

**GIOVANNI RESENDE DE OLIVEIRA**

**2006**

**GIOVANNI RESENDE DE OLIVEIRA**

**DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES EM RAÇÃO COM COMPLEXO  
ENZIMÁTICO PARA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa Logato

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Oliveira, Giovanni Resende.

Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Giovanni Resende Oliveira. -- Lavras : UFLA, 2006.

90 p. : il.

Orientadora: Priscila Vieira Rosa Logato.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Aquicultura. 2. Suplementação alimentar. 3. Farelo de soja. 4. Milho. Enzima exógena. 5. Peixe. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-639.3758

**GIOVANNI RESENDE DE OLIVEIRA**

**DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES EM RAÇÃO COM COMPLEXO  
ENZIMÁTICO PARA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de  
Monogástricos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 24 de março de 2006

Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas  
(Co-orientador)

DZO - UFLA

Prof. Dr. Elias Tadeu Fialho

DZO - UFLA

Prof. Dr. Paulo Borges Rodrigues

DZO - UFLA

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

DMV - UFLA

**Profa Dra. Priscila Vieira Rosa Logato**  
**UFLA**  
**(Orientadora)**

A Deus,

por me dar saúde, força de vontade e intuição.

Aos meus tios e padrinhos,

pela orientação e compreensão.

A família Vianna,

pelo apoio e consideração.

**OFEREÇO.**

A minha mãe,

Ao primo Geraldo,

Ao amigo Bruno,

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do mestrado.

A Empresa Alltech, pela doação do complexo enzimático utilizado no presente trabalho.

A minha orientadora, professora Priscila Vieira Rosa Logato, pela oportunidade, confiança, orientação e apoio imprescindíveis.

Aos meus co-orientadores e professores, Rilke Tadeu Fonseca de Freitas, Elias Tadeu Fialho e Paulo Borges Rodrigues, pelas importantes sugestões e auxílio na realização do presente trabalho.

Ao professor José Augusto de Freitas Lima, pelo exemplo como pessoa e oportunidade inicial na iniciação científica.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da UFLA, Elecí Pereira, José Roberto e Wagner, pela valiosa colaboração na condução do experimento.

A todos os funcionários do Departamento de Zootecnia da UFLA pela convivência e favores prestados, em especial a Keyla, Kekey, Márcio e Gilberto.

Aos participantes do NAQUA e demais núcleos de estudo, PET e CA da Zootecnia (GT-ZOO), pela confiança, espírito de equipe e realizações.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação, Thiago, Vander, Flávia, Alexmiliano, Jodnes, Rafael, Leonardo Boscoli e Patrícia pela amizade e apoio na preparação e condução do experimento.

Aos companheiros de república, Neto, Virgílio e Keneth, pela boa convivência e amizade.

A Danielle, pelo companheirismo, apoio e compreensão.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Giovanni Resende de Oliveira, filho de Anita Maria de Oliveira e Moacir de Fátima Pinto, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 7 de fevereiro de 1979.

Concluiu o ensino médio em Belo Horizonte, em 1997. Em 1999, ingressou na Universidade Federal de Lavras, graduando-se em Zootecnia, em fevereiro de 2004.

Iniciou o mestrado em Zootecnia em março de 2004, na mesma Universidade, na área de Nutrição de Monogástricos, defendendo dissertação em março de 2006.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS .....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	03
2.1 Características da espécie .....	03
2.2 Milho e farelo de soja na alimentação de peixes .....	04
2.3 Enzimas .....	12
2.3.1 Produção de enzimas endógenas digestivas pelos peixes e sua microbiota .....	13
2.3.1.1 Proteases e peptidases.....	17
2.3.1.2 Amilases e maltase .....	18
2.3.1.3 Celulases.....	20
2.3.2 Produção de enzimas digestivas exógenas .....	23
2.3.3 Estabilidade das enzimas.....	26
2.3.4 Adição de enzimas exógenas às rações de monogástricos .....	29
2.3.5 Outros efeitos das enzimas exógenas .....	32
2.3.6 Adição de enzimas exógenas às rações de peixes .....	36
2.3.7 Relação custo/benefício .....	39
2.4 Digestibilidade dos nutrientes .....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 Localização e período experimental.....	44
3.2 Estrutura física, equipamentos e acessórios.....	44
3.3 Qualidade da água.....	47
3.4 Material biológico.....	47



3.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	47
3.6 Rações experimentais .....	48
3.7 Manejo experimental .....	50
3.8 Metodologia utilizada nos ensaios metabólicos.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1 Parâmetros físico-químicos .....	54
4.1.1 Temperatura.....	54
4.1.2 Oxigênio dissolvido (DO <sub>2</sub> ) .....	54
4.1.3 Potencial hidrogeniônico (pH).....	54
4.2 Digestibilidade aparente dos nutrientes .....	55
5. CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
ANEXOS.....	88

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- CDA** – Coeficiente de digestibilidade aparente
- CDAAM** – Coeficiente de digestibilidade aparente do amido
- CDAEB** – Coeficiente de digestibilidade aparente da energia bruta
- CDAMS** – Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca
- CDAPB** – Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta
- CDACa** – Coeficiente de digestibilidade aparente do cálcio
- CDAP** – Coeficiente de digestibilidade aparente do fósforo
- CE** – Complexo enzimático
- EM** – Energia metabolizável
- EMA** – Energia metabolizável aparente
- EMV** – Energia metabolizável verdadeira
- Kcal** – kilocaloria
- mg** – Miligrama
- MN** – Matéria natural
- MS** – Matéria seca
- NRC** – National Research Council
- PNA** – Polissacarídeos não amiláceos
- UI** – Unidade internacional

## RESUMO

OLIVEIRA, Giovanni Resende. **Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

Um ensaio de digestibilidade foi conduzido na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) para avaliar os efeitos da suplementação de ração com um complexo enzimático contendo celulase, protease e amilase sobre a digestibilidade dos nutrientes, em juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). As rações experimentais foram à base de farelo de soja e milho, isoprotéicas (30% PB), isoenergéticas (4.243 kcal/kg de EB) e suplementadas com um complexo enzimático comercial contendo celulase, protease e amilase, nos níveis de 0,0%; 0,025%; 0,050%; 0,075% e 0,1%. A determinação da digestibilidade aparente foi realizado pelo método indireto, com emprego de óxido de cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) como indicador de indigestibilidade. No ensaio foram utilizados 50 juvenis machos de tilápia-do-Nilo, com peso médio de 90 g, distribuídos aleatoriamente em dez incubadoras adaptadas para ensaio de digestibilidade. O experimento foi conduzido em 3 períodos experimentais, sendo 5 tratamentos e 2 repetições por período. Para a avaliação estatística, foi utilizado o modelo de regressão por meio do programa estatístico SISVAR. A adição do complexo enzimático à ração melhorou o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS), proteína bruta (CDAPB), energia bruta (CDAEB), amido (CDAAM), cálcio (CDACa) e fósforo (CDAP), tendo o nível de 0,05% sido aquele que proporcionou os valores mais expressivos.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Priscila Vieira Rosa Logato - UFLA (Orientadora), Rilke Tadeu Fonseca de Freitas - UFLA (co-orientador)

## ABSTRACT

**OLIVEIRA, Giovanni Resende. Digestibility of nutrients in diets with enzyme complex for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 2006. 90 p. Dissertation (Master in Animal Science) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.<sup>2</sup>**

A digestibility trial was conducted in the Pisciculture Station at the Federal University of Lavras (UFLA) with the purpose of evaluating the effects of the diet supplementation with an enzyme complex upon the nutrient digestibility in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The experimental diets were on the basis of soybean meal and corn, isoprotein (30% of CP), isoenergy (4,243 kcal/kg of GE) and supplemented with the enzyme complex at the levels of 0.0%; 0.025%; 0.050%; 0.075% and 0.1%. The determination of apparent digestibility was performed through the indirect method with use of chrome oxide (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) as a reference substance. The trials utilized 50 male Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*), weighing on average 90g, distributed randomly in ten digestibility tanks. The experiment was conducted in three experimental periods, with five treatments and two repetitions for period. For statistical evaluation, the regression model through the statistic program SISVAR was employed. The addition of the enzyme complex to the diet improved the apparent digestibility coefficient of dry matter (CDAMS), crude protein (CDAPB), gross energy (CDAEB), starch (CDAAM), calcium (CDACa) and phosphorus (CDAP). The best results were observed at the level of 0.050% of diet supplementation.

---

<sup>2</sup> Guidance committee: Priscila Vieira Rosa Logato - UFLA (Adviser); Rilke Tadeu Fonseca de Freitas.

## 1 INTRODUÇÃO

Programas alimentares eficientes e a máxima utilização dos nutrientes alimentares constituem a principal preocupação do segmento da aquicultura, frente à previsão de uma alta demanda mundial de pescados no curto e no médio prazos.

Os ingredientes de origem vegetal mais utilizados em dietas para monogástricos são relativamente ricos em energia e proteína, mas contêm nutrientes não digeríveis presentes na parede celular, como os polissacarídeos não-amiláceos (PNAs), os oligossacarídeos e outros não-carboidratos (glicoproteínas, ésteres fenólicos, lignina). A hemicelulose também não é totalmente digerível.

Os PNAs são responsáveis por exercerem um “efeito barreira” à ação das enzimas hidrolíticas, ao aprisionarem os grãos de amido no interior das células do endosperma e ou outros nutrientes, como as proteínas nas paredes celulares. Os tratamentos térmicos não são capazes, por si só, de liberar os nutrientes não digeríveis presentes em ingredientes de origem vegetal, como a soja, havendo a necessidade da adoção de outras estratégias para remover os efeitos deletérios dessas substâncias.

Estas situações representam uma grande limitação ao uso de ingredientes de origem vegetal em dietas para peixes, como é o caso do farelo de soja, especialmente nos animais jovens.

Entretanto, pesquisas recentes têm mostrado que a degradação das paredes celulares dos ingredientes de origem vegetal permite uma maximização da ação enzimática endógena do animal sobre a degradação do amido, gordura e da proteína, aumentando sua digestibilidade.

Considerando que a tilápia aproveita bem os aminoácidos e monossacarídeos livres, supõe-se que a suplementação das rações com complexo enzimático tenha um papel importante no maior aproveitamento do conteúdo protéico e energético, expressos nas consideráveis frações de PNA e amido presentes em ingredientes de origem vegetal, como farelo de soja e milho, respectivamente.

Nesse sentido, o presente estudo foi conduzido para avaliar os efeitos da suplementação da ração com complexo enzimático contendo celulase, protease e amilase sobre a digestibilidade dos nutrientes, em juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Características da espécie

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de grande interesse na piscicultura atual, pois, é o segundo grupo de peixes de água doce cultivado no mundo, ficando atrás apenas das carpas (Lovshin, 1997; Alceste & Jorry, 1998). No Brasil, é a espécie mais cultivada, respondendo por cerca da metade da produção anual de peixes cultivados (Lovshin & Cyrino, 1998). O destaque alcançado por esta espécie advém de sua resistência ao baixo nível de oxigênio e altos níveis de amônia dissolvidos na água (Alceste & Jorry, 1998), do seu rápido crescimento, da boa conversão alimentar e do consumo de ração artificial desde a fase larval (Meurer et al., 2000). Sobressai-se também por adequar-se à indústria de filetagem, devido à ausência de espinhos musculares em “Y”, por ter ótima aceitação no mercado consumidor, pelas características organolépticas de seu filé e por mostrar-se bastante apreciada nos pesque-pagues (Meurer et al., 2003).

Os peixes onívoros possuem adaptações morfológicas e fisiológicas que possibilitam a utilização de rações com elevadas porcentagens de ingredientes vegetais, pois utilizam melhor os carboidratos (Kubarik, 1997) e a proteína dessas fontes (Tengjaroenkul et al., 2000), em relação aos carnívoros. Isso possibilita redução no custo com a alimentação (Degani et al., 1997), principalmente com as tilápias (Degani & Revach, 1991), que se destacam entre as espécies onívoras na utilização dos aminoácidos das fontes protéicas convencionais e alternativas de origem vegetal (Fagbenro, 1998; Furuya et al., 1999).

## **2.2 Milho e farelo de soja na alimentação de peixes**

A utilização de complexos enzimáticos na indústria avícola europeia é uma constante, desde a década de 1980, para dietas com matérias-primas de alta viscosidade, apresentando resultados econômicos e técnicos positivos (Zanella, 1998). O novo desafio está sendo o lançamento de enzimas para dietas de baixa viscosidade, formuladas com milho ou sorgo e farelo de soja, que representam os principais ingredientes de origem vegetal utilizados nas rações para peixes no Brasil.

O uso de ingredientes de origem vegetal, como sementes de leguminosas, tortas de sementes oleaginosas, farelos, concentrados protéicos e tubérculos, entre outros, como alimentos para peixes, é limitado devido à presença de uma grande variedade de substâncias antinutricionais. Dentre algumas mais relevantes estão taninos, saponinas, lectinas, fitoestrógenos, alcalóides, compostos antigênicos, gossipol, cianogênicos, mimosina, ácidos graxos ciclopropenos, canavanina, antivitaminas, ésteres, glicosinolatos, inibidores de proteases, fitatos, oligossacarídeos e polissacarídeos não-amiláceos (PNAs) (Francis et al., 2001).

Os fatores anti-nutricionais não são tóxicos para os animais, mas, sua presença no alimento pode resultar em crescimento reduzido, conversão alimentar ruim, alterações hormonais e esporádicas lesões nos órgãos (Henn, 2002).

Os PNAs são um grupo complexo, composto predominantemente por monômeros de hexoses e pentoses, galactose, glicose, arabinose, xilose e manose (Dudley-Cash, 1997; Stone, 1996; Van Barneveld, 1999). Além da baixa digestibilidade, os PNAs, quando não digeridos, aumentam a viscosidade do quimo intestinal, causando prejuízos ao desempenho produtivo, uma vez que apresentam características antinutricionais que diminuem a velocidade de



passagem dos alimentos ao longo do trato digestivo (Guenter 1993). Os efeitos antinutricionais da fibra dietética solúvel podem ser diminuídos por meio da redução na solubilidade, com a redução no comprimento da cadeia do PNA (Chesson 1993; Dudley-Cash, 1997).

Os PNAs não existem como componentes separados nos alimentos. A maioria é parte da parede celular e está intimamente ligada a outros polissacarídeos ou proteínas e ligninas (Fincher e Stone, 1986), conforme a Figura 1.

<b>Solúveis em H<sub>2</sub>O</b>	- Monossacarídeos	- Glicose - Frutose - Xilose - Arabinose
	- Sacarose - Lactose - α-galactosídeos	- Rafinose - Estaquiase - Verbascose
	- *PNAs.....	- β-glucanos - Pentosanos - Arabinogalactanos - Galactomananos - Substâncias pécicas
<b>Insolúveis em H<sub>2</sub>O</b>	- *PNAs.....	- Celulose - Hemicelulose - Substâncias pécicas
		- β-glucanos - Xilanos - Manose

FIGURA 1 - Classificação dos carboidratos não-amiláceos presentes nas dietas de monogástricos

\*PNA= Polissacarídeo não-amiláceo

Fonte: adaptado de Carré (1991).

O alto custo dos alimentos protéicos, associado ao uso excessivo de fontes nitrogenadas em dietas para peixes, exige reavaliação urgente e mais precisa da qualidade e do nível de proteína a ser utilizado em formulações comerciais (De Silva & Anderson, 1995). Dentre os inúmeros produtos de origem vegetal, considerados potenciais substitutos da fração protéica de origem animal para peixes, o farelo de soja é o que vem recebendo maior atenção por parte dos nutricionistas (Kubitza, 1990). A proteína da farinha de soja integral foi considerada, por Lim & Akiyama (1992), como a melhor fonte de proteína de origem vegetal para suprir as necessidades de aminoácidos essenciais para peixes.

Os farelos de soja são formados por 40% de carboidratos (National Research Council, 1998). Os carboidratos são classificados em não-estruturais e estruturais. Os carboidratos não-estruturais são representados pelos açúcares de baixo peso molecular, oligossacarídeos e polissacarídeos de reserva (amido).

A concentração total de açúcar na soja integral é de, aproximadamente, 14% na MS, compreendendo 40% a 45% do total de carboidratos. Quando transformada em farelo de soja, o conteúdo total aumenta para aproximadamente 17% na MS, constituindo, aproximadamente, 50% do total de carboidratos, conforme apresentado na Tabela 1. Isso inclui os açúcares de baixo peso molecular, como também os oligossacarídeos.

Enquanto os açúcares livres são removidos ou destruídos durante o processamento, não sendo praticamente encontrados na sua forma solúvel no farelo de soja, os galacto-oligossacarídeos não sofrem remoção ou destruição (Grieshop et al., 2003).

TABELA 1. Composição dos polissacarídeos não amiláceos (PNA) na dieta (% MS) em que o farelo de soja foi a única fonte de PNA<sup>a</sup>.

Açúcar <sup>b</sup>	Polissacarídeos não amiláceos		
	Fração insolúvel em água	Fração solúvel em água	Total
Rafinose	0,07	- <sup>c</sup>	0,07
Fucose	0,12	- <sup>c</sup>	0,12
Arabinose	1,18	0,128	1,31
Xilose	0,16	0,023	0,64
Manose	0,16	0,135	0,30
Galactose	2,14	0,180	2,32
Glicose	1,90	0,017	1,92
Ácidos urônicos	1,41	0,174	1,58
Total	7,59	0,657	8,26

<sup>a</sup> Carre et al. (1990)

<sup>b</sup> o conteúdo de açúcares foi calculado com base em sua forma anidro-polimérica.

<sup>c</sup> Não detectado.

Em relação ao conteúdo de glicose da fibra dos principais ingredientes utilizados em rações práticas, é importante ressaltar que quase metade da fibra do milho é composta por glicose (Finnfeed, 1999) e aproximadamente 2%, de um total de 8,26% do conteúdo de PNA do farelo de soja, também o são (Carre, et al., 1990).

Os polissacarídeos estruturais são representados pela fibra dietética que é composta por celulose, pectinas e hemiceluloses, juntamente com mananos, galactanos e xiloglucanos (Karr-Lilienthal et al., 2005). Conforme Brillouet e Carré (1983), as paredes celulares da soja integral são compostas por 80% de PNA, sendo o restante formado por substâncias não-carboidrato encapsuladas, como proteína, fenóis e minerais.

A soja, ao contrário do que se pensava, possui quantidade apreciável de polissacarídeos não amiláceos na forma de pectinas, hemicelulases e oligossacarídeos (rafinose e estaquiose), conforme mostrado na Tabela 2. Desses PNAs, 20% são de digestibilidade nula, sendo 2% de xilanos (Cleophas et al., 1995).

TABELA 2. Composição de polissacarídeos não-amiláceos (PNA) em alguns ingredientes de rações.

Ingredientes	Tipo de PNA	%	Autor
Farelo de soja	PNA totais	27,0	Schutte (1991)
	Polímeros complexos	13,9	Carré (1992)
Milho	PNA totais	8,0	Schutte (1991)
	Arabinosilanos	4,2	Annison (1991)
	B-glucanos	0,1	Annison (1991)
Sorgo	Arabinosilanos	2,8	Annison (1991)
	B-glucanos	0,1	Annison (1991)
Glúten de milho	PNA totais	42,0	Carré (1992)
Farelo de trigo	PNA	44,0	Schutte (1991)

Fonte: Adaptado da Revista Alimentação Animal.

Pesquisas têm evidenciado que o aumento na inclusão de ingredientes com alta concentração de PNA diminui a digestibilidade da matéria seca em algumas espécies de peixes (McGoogan & Reigh, 1996; Omeregie & Ogbemudia, 1993; Refstie et al., 1999; Shiao e Liang, 1994; Sullivan & Reigh, 1995; Schwarz & Kirchgessner, 1995; Wen-Zhang et al., 1995). Além disso, os PNAs reduzem a utilização de carboidratos digestíveis, proteínas e lipídios *in vivo* (Schwarz & Kirchgessner, 1995) como também a digestibilidade de proteína *in vitro* (Ryu et al., 1992). Um estudo *in vitro* sobre o efeito da pectina, goma Karaya, alginato e celulose mostrou que todos esses PNAs podem inibir a hidrólise da proteína (Kroghdahl et al., 2005).

Além desses PNAs, fatores antinutricionais, como inibidores de proteases e lectinas, estão amplamente distribuídos na soja e não podem ser degradados pelo sistema digestivo das aves (Cleophas et al., 1995).

De acordo com Jorge Neto (1992), os inibidores de protease são compostos protéicos que se complexam com a tripsina e a quimiotripsina, prejudicando todo o processo de digestão das proteínas alimentares já desdobradas pela pepsina. Esta complexação, normalmente, causa hipertrofia do pâncreas. As lectinas (hemaglutininas) são glicoprotéinas que possuem a capacidade de se aglutinarem com os eritrócitos e, na sua presença, as células do epitélio intestinal tendem a se unir, prejudicando a absorção de nutrientes.

Embora a indústria de rações utilize o tratamento térmico para eliminar esses fatores antinutricionais, Soto-Salanova et al. (1996) relataram que níveis residuais de lectinas e atividades de inibidores de proteases mostraram-se bastantes razoáveis em diferentes amostras de farelo de soja. Hessing et al. (1995) comprovaram que amostras de farelos continham níveis de lectina residual suficientes para deprimir a digestibilidade da proteína e mostraram que 0,2 g/kg de inibidor de tripsina deprimem em 15% a digestibilidade da proteína.

Webster (1992) supõe que a diminuição do ganho de peso de peixes alimentados com farelo de soja, em substituição à farinha de peixe, pode ocorrer tanto pela atividade dos inibidores de proteases como pelo menor conteúdo de energia da dieta.

Porém, experimentalmente, inibidores de protease, fitatos, compostos antigênicos e alcalóides, presentes em níveis usuais nas dietas para peixes que contêm fontes de proteína de origem vegetal disponíveis no mercado, provavelmente não afetam a performance de crescimento dos peixes. Já glicosinolatos, saponinas, taninos, gossipol, alguns ésteres e PNA solúveis são muito importantes, do ponto de vista prático. A eficiência de técnicas de processamento, como as de secagem, aquecimento úmido e extração de solvente

e o tratamento com enzimas na remoção dos efeitos deletérios dessas substâncias antinutricionais do alimento, é discutida (Francis et al., 2001).

Nesse sentido, Stech (1999), ao estudar a substituição da farinha de peixe por quaisquer produtos de soja em dietas práticas para o crescimento do pacu, concluiu que o tratamento térmico melhora a qualidade nutricional da soja, muito mais pelo fato de melhorar a digestibilidade da proteína do que pela inativação dos fatores antinutricionais.

Leibowitz (1981), ao estudar a substituição da farinha de peixe por farelo de soja, em dietas práticas para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), verificou que, atendidas às exigências de energia e fósforo, o farelo de soja pode substituir toda a farinha de peixe. Murray (1982), em estudo semelhante, encontrou os mesmos resultados e indicou que o perfil de aminoácidos na proteína da soja atende às exigências para o desempenho deste peixe. Viola et al. (1981) relataram que a substituição da farinha de peixe pelo farelo de soja em até 50%, na alimentação de carpas (*Cyprinus carpio*), não causou efeitos negativos no desempenho dos peixes. Shiau et al. (1990) relataram que farelos de soja, integrais ou desengordurados, foram usados eficientemente para substituir até 30% da farinha de peixe, em dietas para tilápias híbridas (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*), contendo um nível de proteína bruta de 24%. Stech (1999), ao substituir a farinha de peixe por quaisquer dos produtos de soja estudados em dietas práticas para o crescimento de pacu, não observou diferenças no desempenho de produção, composição corporal e metabolismo dos peixes.

A principal fonte energética utilizada na formulação de rações para peixes é o milho, o qual contém, em média, 87,1% de matéria seca, 8,26% de proteína bruta, 3,61% de extrato etéreo, 3.925 kcal/kg de energia bruta, 0,03% de cálcio, 0,24% de fósforo total e 1,73% de fibra bruta (Rostagno, 2005). Tem como principais proteínas a gluteína (germe) e a zeína (endosperma),

consideradas de baixo valor nutricional por apresentarem baixos teores em aminoácidos essenciais. Possui 9% de polissacarídeos não amiláceos (PNA) e, desse percentual, 50% são xilanos (Teixeira, 1998). Em média, o milho contém 72,28% de amido, o qual é constituído de amilose (25%) e amilopectina (75%).

O amido é um importante ingrediente da dieta de peixes de água doce, como a carpa e a tilapia (Takeuchi, 1991). Representando em média 60% a 70% do peso dos grãos de cereais, o amido é o componente mais importante, do ponto de vista nutricional. Está localizado dentro das paredes do endosperma que, por sua vez, está envolvido por várias camadas de células protetoras, formando a aleurona. Envolvendo a aleurona, na parede externa, está o pericarpo, que é uma estrutura protetora que envolve completamente o grão. Para que um animal monogástrico consiga digerir o amido, é necessário que ocorra a ruptura tanto do pericarpo, como da aleurona, sendo esta mais difícil de ser rompida (Giacometti, 2002).

As paredes celulares do pericarpo, aleurona e endosperma são semelhantes, em virtude de todas conterem celulose, PNAs, compostos fenólicos, pectinas e proteínas, os quais diferem nas proporções relativas de cada componente (Bedford et al., 1991a). Ainda que exista pouca variação na estrutura da celulose entre as espécies vegetais, este não é o caso dos monossacarídeos e do peso molecular da fração PNA, os quais constituem a maior parte da parede do endosperma nos grãos de cereais. Dessa forma, os PNAs têm sido responsabilizados por exercerem um efeito barreira à ação das enzimas hidrolíticas, ao aprisionarem o amido das células do endosperma do grão e impedirem que as enzimas hidrolíticas possam acessá-lo (Carré et al., 1990).

Além disso, a quantidade total de proteína na parede celular de ingredientes de origem vegetal pode somar de 10% a 30% do total da fibra. Na maioria dos casos, esta proteína pode permanecer encapsulada dentro da matriz

de polissacarídeos, fazendo com que a mesma não seja disponível para o animal, devido ao fato dos monogástricos carecerem das enzimas necessárias para digerir esses polissacarídeos.

### **2.3 Enzimas**

Um dos primeiros e particularmente importantes experimentos com enzimas foi o isolamento do complexo enzimático do malte, por Payen e Persoz, em 1833. A origem do termo “enzima” se deu quando, em 1876, William Kuhne propôs que ele fosse adotado como uma nova forma de designar fenômenos previamente conhecidos como “fermentações organizadas”, que eram, o isolamento de fermentos de organismos viáveis, a partir dos quais eram formadas as enzimas. A palavra significa ‘*in yeast*’ e é derivada do grego ‘*en*’, que significa ‘*in*’ e ‘*zime*’, significa ‘*yeast*’ ou ‘*leaven*’ (Fox, 1991).

As enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem como catalisadores biológicos, possibilitando e ou aumentando a velocidade das reações químicas no organismo (Champe & Harvey, 1989). A estrutura molecular das enzimas é bastante frágil e, conseqüentemente, pode ser desnaturada por calor, álcalis, metais pesados e outros agentes oxidantes (Graham & Inborr, 1991).

De acordo com Vanbelle (1992), todas as enzimas possuem as seguintes características: não apresentam modificações ao final da reação, atuam em quantidades muito pequenas e aceleram a velocidade da reação sem modificar a posição de equilíbrio de uma reação reversível.



### **2.3.1 Produção de enzimas digestivas endógenas pelos peixes e sua microbiota**

As pesquisas têm mostrado uma ampla convergência entre as atividades digestivas nos peixes teleósteos adultos (Barrington, 1957; Fange & Grove, 1979; Kapoor et al., 1975) e as existentes nos vertebrados superiores, o que sugere que o equipamento enzimático é, em grande parte, análogo. As diferentes células glandulares do estômago secretam proteases (pepsina, tripsina, quimiotripsina) e ácido clorídrico (Holstein, 1975; Noaillac-Depeyre & Gás, 1978; Smit, 1967), sendo a pepsina dos peixes considerada análoga à dos mamíferos.

A digestão no intestino ocorre devido à ação de distintos produtos secretados pela parede intestinal e também por glândulas anexas (pâncreas e fígado). O pâncreas lança no intestino enzimas digestivas diversas: proteases, carboidrases e lipases. A bÍlis proveniente do fígado aporta, primordialmente, os sais biliares e parece ter uma composição e função análogos à bÍlis de vertebrados superiores (Fange & Grove, 1979; Hidalgo & Alliot, 1987).

Nos mamíferos, a amilase é produzida por células salivares ou pancreáticas, enquanto a única fonte de  $\alpha$ -amilase em peixes parece ser o pâncreas exócrino, visto que os mesmos não possuem glândulas salivares. Alta atividade de amilase ocorre no fígado e bÍles de algumas espécies de carpa e goldfish que possuem hepatopâncreas (Krogdahl et al., 2005).

Várias enzimas intestinais envolvidas nos processos de digestão e absorção têm sido reportadas em tilápia, como amilase, pepsina, tripsina, esterases e fosfatase alcalina (Cockson & Bourne, 1972; Nagase, 1964; Klaren et al., 1993; Li & Fan, 1997; Moriarty, 1973). Como outros peixes onÍvoros, a tilápia apresenta maior atividade de carboidrase do que de protease e uma

pequena atividade de lipase, comparada aos peixes carnívoros (Agrawal et al., 1975; Das & Tripathi, 1991; Fish, 1960; Opuszynski & Shireman, 1995).

As enzimas intestinais demonstram uma diferença marcante na sua distribuição e localização ao longo do extenso intestino da tilápia (*Oreochromis niloticus*), como pode ser observado na Figura 2 e na Tabela 3. A maior parte destas atividades enzimáticas foram localizadas ao longo da borda em escova do enterócito, mas, esterases não específicas também estavam presentes no citoplasma de enterócitos e leucina aminopeptidase IV (DAP IV) foi detectada na lâmina basal de todos os segmentos (Tengjaroenkul et al., 2000).

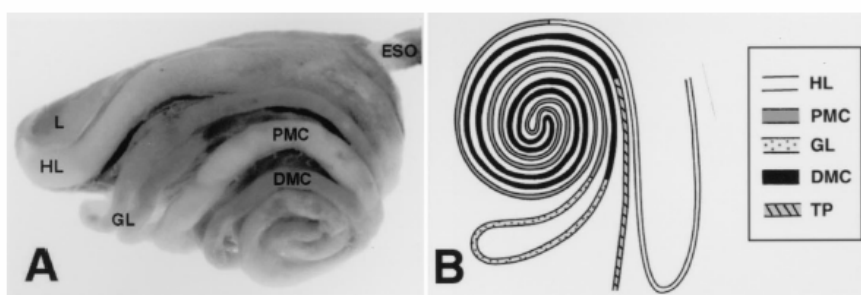


FIGURA 2. Fotomicrografia (A) e desenho esquemático (B) de cinco segmentos intestinais de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). HL, alças hepática; PMC, espiral proximal maior; GL, alça gástrica; DMC, espiral distal maior; TP, porção terminal do intestino.  
Fonte: Tengjaroenkul et al. (2000)

TABELA 3. Distribuição e localização de enzimas ao longo do trato intestinal de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

	Segmento do intestino				
	Alça hepática	Espiral proximal	Alça gástrica	Espiral distal	Porção terminal
Enzimas borda em escova:					
Maltase	+	+	++	+	-
LAP	++	++	++	+	-
DAP IV	++	++	++	+	-
Lípase	++	++	+	-	-
NSE	++	++	++	++	-
IAP	++	++	++	+	-
Enzima citoplasmática:					
NSE	++	++	++	++	-
Enzima basal: <sup>a</sup>					
DAP IV	+	+	+	+	+

Nível de intensidade do corante: ++ (forte), + (fraco), - (ausente).

LAP - leucina aminopeptidase; DAP IV - dipeptidil aminopeptidase; NSE - esterases não específicas; IAP - alcalina fosfatase.

<sup>a</sup> na lâmina basal.

Fonte: Tengjaroenkul et al. (2000)

A fosfatase alcalina intestinal está envolvida na absorção de nutrientes, como lipídeos, glicose, cálcio e fosfato inorgânico (Dupuis et al., 1991; Malagelada et al., 1977; Mahmood et al., 1994; Harris, 1989; Roubaty & Portman, 1988). A distribuição geral desta enzima correlaciona-se bem com a localização e a intensidade de maltase, lipase e peptidases, incluindo amilase e proteases, reportadas em outras tilápias (Cockson & Bourne, 1972; Moriarty, 1973; Fish, 1960; Nagase, 1964). Assim, a fosfatase alcalina está presente no mesmo local das enzimas digestivas, permitindo a absorção de pequenas partículas, à medida que elas são produzidas (Tengjaroenkul et al., 2000).

Na porção terminal do intestino de tilápia nilótica, provavelmente, são predominantes atividades como reabsorção de eletrólitos e ou água (Tengjaroenkul et al., 2000).

Porém, existem enzimas que não são secretadas, mesmo na presença de substrato. Entre estas enzimas, destacam-se a celulase, a hemicelulase, a xilanase e a fitase, dentre outras. Essas enzimas não são secretadas devido ao fato de os monogástricos não possuírem os respectivos genes responsáveis (Penz Júnior, 1998).

Como o trato digestivo dos peixes está em constante contato com a água, a microflora da água exerce um importante papel na formação da microflora do trato digestivo de peixes (Hansen, et al., 1992; Strom & Olafsen, 1990). Sendo rico em nutrientes, o ambiente do trato digestivo de peixes, em comparação com o da água, confere um ambiente mais favorável para o crescimento dos microorganismos. Recentemente, diversas comunidades microbianas têm sido reportadas no intestino de vários peixes (Bairagi et al., 2002; Clements et al., 1989; Clements, 1991; Ghosh et al., 2002; Luczkovich & Stellwag, 1993; Rimmer & Wiebe, 1987).

Enzimas provenientes dessa microflora intestinal podem ter um papel significativo no processo de digestão, especialmente para substratos como a celulose, que poucos animais podem digerir e também para outros substratos (Smith, 1989).

Assim como as dietas geralmente são compostas por carboidratos resistentes às enzimas digestivas endógenas (Annison, 1993), a fermentação microbiana e a síntese de nutrientes são mecanismos importantes para os organismos que utilizam dietas ricas em fibra (Stevens, 1988). O uso de ingredientes de origem vegetal como fonte de proteína não convencional, para substituir a onerosa farinha de peixe na formulação de dietas para peixes, dá origem a uma nova área de pesquisa para produzir alimentos com uma melhor

relação custo/benefício. Devido ao aumento da escassez de farinha de peixe de boa qualidade, pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de analisar o valor nutricional de ingredientes de origem vegetal e aumentar a biodisponibilidade de nutrientes por meio da degradação fermentativa (Saha et al., 2006).

### **2.3.1.1 Proteases e peptidases**

A digestão de proteína em tilápia começa com a hidrólise de proteínas e polipeptídeos pela ação das proteases; pepsina, tripsina e quimiotripsina (Cockson & Bourne, 1972; Fang & Chiou, 1989; Fish, 1960; Moriarty, 1973; Nagase, 1964). Longas cadeias de polipeptídeos são, então, quebradas por peptidases como as LAP e DAP IV, tornando-se pequenos peptídeos e aminoácidos (Jobling, 1995). Nesse sentido, mais da metade do intestino de tilápia (*Oreochromis niloticus*) exerce um importante papel na degradação de peptídeos. Conforme Tengjaroenkul et al. (2000), a distribuição e a intensidade das peptidases observadas em seu estudo estão bem correlacionadas com a presença e a atividade de proteases, reportadas em outras tilápias. Assim, as peptidases estão presentes no mesmo local que as proteases, permitindo que elas possam agir imediatamente sobre as curtas cadeias de peptídeos, produzidas pela ação das proteases.

Já em peixes agástricos, como a carpa (*Cyprinus carpio sp*), as proteases e peptidases pancreáticas parecem ser os únicos responsáveis pela degradação de proteína, que estaria caracterizada pela ausência de proteólises em meio ácido (Hidalgo & Alliot, 1987).

As observações de Saha & Ray (1998), Ghosh et al. (2002) e Bairagi et al. (2002) fortalecem a idéia de que os peixes abrigam bactérias celulíticas, como também amilolíticas e proteolíticas em seu trato intestinal.

Em estudos in vitro sobre a capacidade de produção de enzimas, Ghosh et al. (2002) observaram que a flora bacteriana presente no trato gastrointestinal de carpa indiana (*Labeo rohita*) é boa produtora de enzimas proteolíticas.

Dentre algumas bactérias encontradas no trato digestivo de tilápia (*Oreochromis mossambica*) e de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), Saha et al. (2006) observaram que *B. circulans* foi a que apresentou maior atividade de amilase, enquanto que *B. megaterium* foi a que exibiu máxima atividade de protease (Tabela 4).

TABELA 4. Atividades de amilase e protease das cepas isoladas do intestino de carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*) e tilápia (*Oreochromis mossambica*).

Isolados	Atividade de amilase (U)*	Atividade de protease (U)**
<i>B. megaterium</i> ( <i>C. idella</i> )	45,66	65,45
<i>B. circulans</i> ( <i>O. mossambica</i> )	85,64	9,32

\* Microgramas de maltose liberadas por minuto.

\*\* Microgramas de tirosina liberadas por minuto.

Fonte: Saha et al. (2006)

Os mesmos autores afirmam que ambos os isolados de organismos são capazes de hidrolizar proteínas, como caseína e gelatina.

### 2.3.1.2 Amilases e maltase

A  $\alpha$ -amilase digestiva tem sido localizada em todo o trato gastrointestinal de algumas espécies de peixes (Alarcón et al., 2001; Chadrabarti et al., 1995; Chiu & Benitez, 1981; De Seixas et al., 1999; Fagbenro et al., 2000; Fagbenro, 1990; Fernandez et al., 2001; Hidalgo et al., 1999; Kawai & Ikeda, 1972; Kuz'mina, 1996a; Peres et al., 1998; Sabapathy & Teo 1993; Tengjaroenkul et

al., 2000; Ugwumba, 1993). A atividade de amilase nos tecidos e no conteúdo intestinal varia entre as espécies e parece ser mais alta em herbívoros e onívoros do que em peixes carnívoros (Hidalgo et al., 1999; Hoffer & Sturmbauer, 1985; Sabapathy & Teo, 1993; Ugolev & Kuz'mina, 1994).

A amilase pode ser inibida por fatores protéicos presentes em certos grãos de vegetais (leguminosas, trigo, etc.) que podem ser destruídos mediante um adequado tratamento térmico. A ação dos inibidores depende da espécie de peixe considerada, de sua atividade amilásica e da presença ou não de estômago no animal, já que os inibidores são degradados pela pepsina, o que favorece as espécies com digestão estomacal (Hofer & Sturmbauer, 1985).

A partir da observação de uma alta atividade de maltase na alça gástrica de tilápia-do-Nilo, por meio do estudo de Tengjaroenkul et al. (2000), sugere-se que a região do intestino médio seja a mais ativa em relação à formação de glicose. A distribuição da atividade de maltase corresponde bem aos trabalhos sobre atividade de amilase, enzima que hidroliza maltose em glicose (Horn, 1998; Stevens & Hume, 1995). Nagase (1964) reportou uma alta atividade de amilase na porção do intestino médio de tilápia mossambica. Essa similaridade quanto aos locais de ação de amilase e maltase no intestino de tilápia pode ter um significado funcional, no qual a amilase produziria o substrato para a atuação da maltase, refletindo numa ação sinérgica e complementar, na busca de um maior aproveitamento do conteúdo energético da dieta.

Até o presente, não é possível identificar a real fonte de amilase, ou seja, distinguir entre a contribuição da dieta e ou o refluxo do baixo intestino. Além disso, a amilase também pode ser produzida pela microflora do trato digestivo (Sugita et al., 1997).

Os microrganismos anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos são predominantes no trato intestinal de tilapia (*Oreochromis spp*) e de carpa (*Cyprinus spp*). Mais de 50% das linhagens (cepas) de *Aeromonas*,

*Bacteriodaceae* e *Clostridium* produzem eficientemente amilase, o que demonstra que bactérias produtoras de amilase estão amplamente distribuídas no intestino de peixes de água doce. Dessa forma, os microrganismos anaeróbios, juntamente com os aeróbios, devem ser importantes produtores de amilase no intestino de peixes. Entretanto, cepas de bactérias capazes de alta produção de amilase ( $\geq 0,05$  U ml<sup>-1</sup>) somente foram observadas entre as bactérias aeróbias. Contudo, a produção de amilase pela microflora intestinal exerce um importante papel na digestão de amido em peixes de água doce, até certo ponto (Sugita et al., 1997).

Embora as pesquisas com atividade de amilase no intestino de peixes sejam escassas (Bairagi et al., 2002; Ghosh et al., 2002), é evidente que existe atividade de amilase endógena em peixes.

### **2.3.1.3 Celulases**

As celulases são o mais importante grupo de enzimas necessárias para a degradação de paredes celulares de plantas vasculares, sendo, conseqüentemente, alvo de estudos com o objetivo de minimizar o custo na formulação de dietas para peixes (Saha et al., 2006).

Os peixes são incapazes de produzir celulase endogenamente, mas, abrigam populações microbianas em seu trato digestivo (Bairagi et al., 2002; Lesel et al., 1986; Lindsay & Harris, 1980; Saha e Ray, 1998; Trust & Sparow, 1974) que ajudam na digestão de materiais oriundos de plantas.

Atividades de celulases têm sido observadas em várias espécies de peixes, indicando que o trato gastrintestinal possa utilizar celulose e carboidratos fibrosos similares (Chakrabarti et al., 1995).

Ao isolarem três estratos de bacilos do intestino de carpa indiana (*Labeo rohita*) e estudarem sua capacidade em produzir enzimas, Ghosh et al.(2002)



observaram que as *B.Circulans*, *B.Pumilus* e *B.cereus* são boas produtoras de enzimas proteolíticas e que podem também produzir celulase em quantidades moderadas.

Investigando as atividades de enzimas envolvidas na quebra de polissacarídeos não amiláceos no intestino de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), Taniguchi & Takano (2004) detectaram atividades de  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -frutossidase e celulase, conforme mostrado na Tabela 5.

TABELA 5. Digestão de polissacarídeos não amiláceos com enzimas brutas do intestino de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Polissacarídeos (1%)	Atividade relativa (%)
Galactano	100
Goma arábica	88
Pectina	67
Inulina	53
Agarose	11
Celulose	0,5
Carboximetilcelulose	45

Fonte: Taniguchi & Takano (2004)

Entretanto, enquanto os demais polissacarídeos sofreram degradação significativa, a celulose quase não foi degradada.

Num estudo sobre caracterização de bactérias produtoras de celulase, encontradas no trato digestivo de tilápia (*Oreochromis mossambica*) e de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), Saha et al. (2006) observaram que o *B. circulans* (TM1) e o *B. megaterium* (CI3) foram aquelas que mostraram máxima atividade celulítica (Tabela 6).

TABELA 6. Isolados de bactérias do intestino de peixe e sua atividade de celulase.

Peixes examinados	Contagem de bactérias em placa de		Atividade de celulase (U)*
	CMC (x 10 <sup>4</sup> ) (CFU g <sup>-1</sup> tecido intestinal)	Isolados	
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	7,5	CI1	5,8
		CI2	7,2
		CI3	35,8
		CI4	9,2
<i>Oreochromis mossambicus</i>	6,0	TM1	67,02
		TM2	15,32
		TM3	9,86
		TM4	11,35

\*Micrograma de glicose liberada por mL de cultura por minuto.

CMC – carboximetilcelulose

Fonte: Saha et al. (2006)

Em condições experimentais, determinou-se que a celulose foi pobremente utilizada pela tilápia (*O. niloticus*) (Anderson et al., 1984) e *O. niloticus* x *O. aureus* (Shiau et al., 1989).

Enzimas microbianas simbióticas que hidrolizam celulose requerem, geralmente, um longo tempo de digestão (Kristensen, 1972). Em ruminantes, a presença de uma grande câmara de fermentação e uma baixa taxa de transferência permitem tempo e espaço suficiente para uma digestão efetiva. Como os peixes não possuem uma câmara especializada para fermentação bacteriana, a celulose é, algumas vezes, utilizada pobremente pelos peixes, apesar da presença de bactérias celulíticas (Saha et al., 2006).

Nesse sentido, apenas a presença de bactérias celulíticas não é capaz de evidenciar que os peixes sejam capazes de utilizar eficientemente materiais de origem vegetal e ou celulose.

Entretanto, a glicose proveniente da celulose e a galactose dos galactosídeos podem ser utilizados prontamente pela maioria dos animais (Schutte et al., 1991,1992) e esse fato pode trazer grande aporte de energia para os peixes se os mesmos forem capazes de utilizar a celulose.

### **2.3.2 Produção de enzimas digestivas exógenas**

O processo fermentativo é responsável pela produção de enzimas exógenas digestivas, que consiste na aplicação do inóculo (levedura) sobre um substrato, sob condições ideais de ambiente, que permitam o processo fermentativo. Ao final da fermentação, é realizada uma separação da biomassa, com um posterior resfriamento, centrifugação e concentração. Finalmente, realizam-se as etapas de filtração, padronização e controle de qualidade, conforme a apresentação do produto comercial, líquido ou sólido (Cowan, 1993).

Até recentemente, as enzimas usadas na indústria de rações eram subprodutos da indústria de alimentos. Os componentes das atuais enzimas, sua estabilidade e atividade eram questionados quanto à forma de fabricação. Avanços nas áreas de biotecnologia e bioquímica permitiram melhorias significativas na estrutura e produção de enzimas (Tabela 7). Os fatores limitantes em gêneros alimentícios, como os componentes de parede celular e fatores antinutricionais, foram caracterizados bioquimicamente. Enzimas microbianas que atuam sobre esses substratos foram identificadas e testadas. Descobriram enzimas com características específicas e que são produzidas sob condições controladas (Behrends, 2000).

TABELA 7. Desenvolvimento do processo de produção enzimática.

<b>Fase</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Tempo requerido</b>
Seleção de uma enzima	pH correto, boa estabilidade	Meses
Seleção do organismo produtor	Estável, termotolerante, bom secretor de enzimas	Meses
Melhoria da cepa	Máximo rendimento	De 1 a 3 anos
Otimização do processo	Crescimento em meio equilibrado, condições ótimas, indutores corretos.	Até um ano
Desenvolvimento do processo “dow stream”	Concentração, purificação, estabilização, formulação do produto.	Meses

Adaptada de Inbarr et al. (1991)

De acordo com a sua finalidade, as enzimas usadas em rações para monogástricos podem se dividir em dois tipos: enzimas destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas digestórias endógenas dos animais (proteases, amilases, fitases, etc.) e enzimas que esses animais não podem sintetizar ( $\beta$ -glucanases, pentosanases e  $\alpha$ -galactosidases) (Henn, 2002).

As enzimas comercialmente produzidas são provenientes, geralmente, de bactérias do gênero *Bacillus sp*, fungos do gênero *Aspergillus sp* e leveduras (Fireman & Fireman, 1998), portanto, os microrganismos são a principal fonte de enzimas exógenas produzidas industrialmente por laboratórios especializados, por meio de culturas aeróbias, sendo derivadas da fermentação.

A enzima xilanase é sintetizada a partir do *Trichoderma longibrachiatum* e atua rompendo as paredes celulares da fibra para liberar os xilo-oligômeros (Giacometti, 2002). A degradação das paredes celulares dos cereais permite uma maximização da ação enzimática endógena do animal sobre a degradação do amido, do lipídio e da proteína, aumentando sua digestibilidade.

A amilase é produzida a partir do *Bacillus amyloliquifaciens*, a qual atua para aumentar a digestibilidade do amido, enquanto a protease é sintetizada a partir do *Bacillus subtilis* e caracteriza-se por uma alta eficiência catalítica (Giacometti, 2002). De acordo com Garcia (1997), esta protease degrada proteínas da soja, especificamente as proteínas de armazenamento, como a conglucina e  $\beta$ -conglucina e os fatores antinutricionais, inibidores de tripsina, lectinas e proteínas antigênicas.

As hemicelulases são responsáveis pela quebra da hemicelulose componente de farelo de soja. Hemiceluloses são carboidratos estruturais de sementes de soja e incluem as galactomanoses e galacto-oligossacarídeos. As enzimas incluem a  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -manoses e celulasas.

A celulase é obtida pela extração da fermentação do *Trichoderma viride* e tem atividade de 250 unidades de celulase ativa (UCA/g). Este produto é em pó e pode ser misturado ao amido de milho com corante amarelo. A UCA é definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glicose em uma solução com 5% (peso/volume) de celulose, em uma hora, a pH 5,0 e 37°C (duas horas de incubação).

Segundo Zanella (2001), existem três grupos de enzimas disponíveis no mercado: enzimas para alimentos com baixa viscosidade (milho, sorgo e soja), enzimas para alimento de alta viscosidade (trigo, centeio, cevada, aveia, tritcale e farelo de arroz) e enzima para degradar o ácido fítico dos grãos vegetais (melhora a utilização do fósforo dos vegetais).

Para dietas à base de cereais de alta viscosidade, os complexos enzimáticos, na maioria das vezes, são compostos pelas enzimas glucanase, amilase, xilanase, celulase e hemicelulases, enquanto os compostos por amilase, protease e xilanases são usados nas dietas de baixa viscosidade.

Nesse sentido, as indústrias produtoras de enzimas comercializam enzimas específicas ou complexos multienzimáticos para serem adicionados em

matérias-primas ou para serem suplementados nas dietas, buscando melhorar o valor nutritivo dos alimentos (Giacometti, 2002).

### **2.3.3 Estabilidade das enzimas**

As enzimas utilizadas na alimentação de não-ruminantes devem resistir e conservar atividade considerável depois dos processos de fabricação e digestão. Os fatores que podem influenciar sua estabilidade, entre outros, são: a origem (microrganismo), o tipo de atividade, a composição da dieta, a condição de processamento (temperatura), o armazenamento, as condições durante o processo digestivo e a ação de enzimas endógenas (Francesch, 1996).

Chesson (1987) cita que, além do baixo pH, as enzimas exógenas estão expostas a uma variedade de enzimas proteolíticas presentes no proventrículo e intestino delgado das aves. Estas enzimas exógenas são resistentes às proteases microbianas, mas não necessariamente às proteases do trato digestivo das aves.

A estrutura molecular da enzima é bastante frágil e, conseqüentemente, pode ser desnaturada por calor, álcalis, metais pesados e outros agentes oxidantes (Classem, 1996; Graham & Inborr, 1991).

Quanto à origem, as polissacaridases fúngicas possuem atividade ótima em pH mais baixo (4,0 a 5,5), enquanto as bacterianas atuam em pH próximo da neutralidade, de modo que a mistura de enzimas bacterianas e fúngicas pode ser mais efetiva do que uma fonte simples (Kernkamp & Duran, 1991).

A maioria das enzimas utilizada na alimentação animal é de origem fúngica, sendo estáveis à temperatura ambiente, porém, inativam-se rapidamente sob temperaturas superiores a 60°C, ainda que a estabilidade da enzima seja superior quando se incorpora ao alimento (Francesch, 1996). Segundo Graham e Inborr (1991), o calor pode inativar permanentemente as enzimas. Assim, uma enzima ideal deve ser capaz de suportar temperaturas entre 70 °C e 90°C,

normalmente alcançadas durante o processo de peletização (Enzimas... 1991). Colier e Hardy (1986) mostraram que, depois do processo de peletização, a atividade residual para  $\alpha$ -amilase e proteases fúngicas e bacterianas foi de 52 a 77% e 34% a 65% da atividade original, respectivamente.

Algumas técnicas para proteger as enzimas têm sido desenvolvidas, como adsorção em carreadores, encapsulação ou sua inclusão após o processamento das rações (Ferket, 1993).

Ao testar o efeito da temperatura da peletização (60°C a 100°C) sobre a atividade das enzimas exógenas celulase, amilase produzida por fungos e por bactérias e pentosanase, em dietas à base de trigo e cevada, Spring et al. (1996) concluíram que elas mantêm sua atividade enzimática a uma temperatura de peletização de 80°C e que a amilase proveniente de bactérias suporta até 90°C.

Bedford (1996) afirma que o complexo enzimático Avizyme 1500, formado pelas enzimas amilase, protease e xilanase, resiste à temperatura de 85°C durante 15 minutos e a 2 minutos quando submetido a 90°C, durante o processo de peletização e pode ser armazenado durante 12 meses em temperatura de 22°C.

Dias et al. (2002) avaliaram a atividade enzimática *in vitro* de uma protease comercial componente do complexo enzimático (Allzyme Vegpro), que possui atividades de protease e celulase. Para avaliar a estabilidade térmica, a enzima foi incubada a 80°C, por seis tempos (0; 0,5; 1,0; 5; 10 e 15 minutos). Para estimar o efeito do pH, os tratamentos foram: pH 5,0, pH 2,3 sem pepsina e pH 2,3 com pepsina. Para avaliar o efeito dos íons metálicos, incubou-se a enzima em soluções contendo cálcio, cobre, cobalto, manganês, magnésio e ferro. Os resultados sugerem que essa enzima pode ser capaz de suportar as temperaturas normalmente alcançadas durante o processo de peletização, permanecendo ativa. Quanto ao pH, mesmo que tenha havido perda de atividade, parte da atividade relativa obtida no tratamento-controle ainda foi mantida,

indicando que, possivelmente, nas condições normais do trato gastrintestinal, a enzima pode exercer sua atividade catalítica. Em relação aos íons metálicos, os resultados não são conclusivos para os elementos Cu e Fe, provavelmente atribuídos à metodologia utilizada. Os demais íons testados praticamente não afetaram a estabilidade enzimática.

A extrusão é um processo de cozimento baseado em alta pressão, umidade controlada e temperatura elevada (em torno de 150°C) (Logato, 1999). As rações extrusadas são as mais utilizadas nos cultivos intensivos de peixes. Nesse sentido, são necessárias pesquisas sobre estratégias que permitam a adição de enzimas exógenas às rações extrusadas, visto que as temperaturas alcançadas nesse processo representam uma grande limitação à estabilidade térmica das enzimas exógenas.

Yu e Tsen (2003) avaliaram a eficiência de várias enzimas para uso como suplementos em rações para coelhos. Os resultados mostraram que, em meio ácido (glicina-HCl e pH 3.2), a celulase, a papaína e a bromelina eram tolerantes, enquanto a amilase bacteriana e a protease não. Mesmo em pH 2,0, a celulase e papaína mostraram-se ainda resistentes, enquanto a bromelina foi completamente inativada. Ao submeter a pepsina às mesmas condições, foram obtidos resultados semelhantes. No sistema com conteúdo gástrico com pH 2,0, todas as enzimas testadas foram instáveis, porém, quando o pH foi igual a 3,2, a celulase ficou bastante estável. Em relação à estabilidade térmica, concluiu-se que, com exceção da papaína, as estabilidades térmicas de todas as enzimas testadas poderiam ser aumentadas significativamente se fossem misturadas ao alimento. Considerando que premix mineral tem um efeito inibitório sobre bromelina e papaína, o efeito de estabilização enzimática do alimento poderia ser causado por diferentes componentes presentes no premix mineral.

O nível de atividade enzimática é mantido durante três meses em produtos líquidos e por seis meses na forma em pó, quando estocados em



temperaturas inferiores a 25°C. Quando a enzima se encontra misturada na dieta, sua atividade pode ser mantida por, no mínimo, três meses, a 25°C (Cowan, 1993).

#### **2.3.4 Adição de enzimas exógenas às rações de monogástricos**

A maioria das enzimas endógenas é substrato dependente, ou seja, a secreção enzimática é ativada pela presença do substrato, o que explica a deficiência de enzimas nas primeiras semanas de vida de aves, suínos e algumas espécies de peixes. Entretanto, existem enzimas que não são secretadas, mesmo na presença de substrato, como celulase, hemicelulase, xilanase, pentosanase,  $\beta$ -glucanase, galactosidase, fitase, etc., porque o código genético não dispõe da indicação para a sua síntese (Giacometti, 2002).

A suplementação das rações com enzimas digestivas exógenas, isoladas de plantas e bactérias, tem sido realizada com sucesso pelas indústrias de suínos e aves para vencer os efeitos negativos do PNA dietético (Batterham, 1992; Bedford & Morgan, 1996; Bedford et al., 1998; Bernard & Mc Nab, 1997; Brenes et al., 1993; Broz & Frigg, 1990; Campbell & Bedford 1992; Carre et al., 1994; Chesson, 1993; Classen et al., 1985; Dudley-Cash, 1997; Elwinger & Saterby, 1987; Elwinger & Teglof, 1991; Farrell, 1992; Ghazi et al., 1996; Gipperd et al., 1989; Huyghebaert et al., 1995; Jongbloed et al., 1997; Kemme et al., 1999; Kornegay et al., 1997; Marquardt et al., 1994; Marsmann et al., 1997; Newman et al., 1992; Pack e Bedford, 1997; Ravindran et al., 2000; Scott et al., 1995; Simon et al., 1990; Soto-Salanova, 1996; Zanella et al., 1999; Zanella, 1998).

Os principais fatores de atuação que as enzimas exógenas digestivas apresentam são: provocam a ruptura das paredes celulares das fibras; reduzem a viscosidade, devido à fibra solúvel na digesta do intestino proximal; degradam

as proteínas, por exemplo, do farelo de soja; reduzindo os efeitos dos fatores antinutricionais tais como os inibidores de protease, tornando-os mais disponíveis ao animal; suplementam a produção de enzimas endógenas do animal (proteases, amilases e outras) e cuja ação é mais importante em animais jovens (Soto-Salanova, 1996); manipulam as populações da microflora (Bedford, 1996) e disponibilizam enzimas que os animais não podem sintetizar (celulases, hemicelulases, xilanases, fitases, B-glucanases, pentosanases e outras) (Pens Júnior, 1998).

Os aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas, auxiliam o processo digestivo, melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta (Henn, 2002).

As enzimas digestivas exógenas atuam da mesma forma que as endógenas, apresentando um sítio ativo com a capacidade de atuar sobre um substrato específico, hidrolizando-o (Henn, 2002) conforme mostrado na Tabela 8.

TABELA 8. Enzimas, substratos e efeitos das enzimas utilizadas em dietas para suínos e aves.

<b>Enzima</b>	<b>Substrato</b>	<b>Efeitos</b>
Xilanases	Arabinoxilanas	Redução da viscosidade da digesta.
Glucanases	$\beta$ -glucanos	Redução da viscosidade da digesta. Menor umidade na cama.
Pectinases	Pectinas	Redução da viscosidade da digesta.
Celulases	Celulose	Degradação da celulose e liberação de nutrientes.
Proteases	Proteínas	Suplementação das enzimas endógenas. Degradação mais eficiente de proteínas.
Amilases	Amido	Suplementação das enzimas endógenas. Degradação mais eficiente do amido.
Fitase	Ácido fítico	Melhora a utilização do fósforo dos vegetais. Remoção do ácido fítico.
Galactosidases	Galactosídios	Remoção de galactosídios.
Lipases	Lipídios e ácidos graxos	Melhora a utilização de gorduras animais e vegetais.

Fonte: adaptado de Cleophas et al. (1995)

O tratamento de cascas e cotilédones de soja com enzimas degradadoras de parede celular (pectinase, xilanase e celulase) resultou na liberação de, pelo menos, 7% dos monossacarídeos componentes das frações não solúveis em água (Ouhida et al., 2002).

Existem poucos trabalhos sobre a melhora do valor nutritivo de cereais como milho e sorgo, mediante a adição de enzimas exógenas. Madaesi et al. (1988) demonstraram que a adição de  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -glucanase e protease melhoraram os parâmetros produtivos em aves, embora de forma não-significativa.

Há uma significativa variabilidade no valor nutritivo nas diferentes espécies de milho, como aquela observada para o trigo e a cevada (Collins et al., 1998; Leeson et al., 1993). As enzimas podem reduzir essa variação e acelerar a taxa de digestão de dietas à base de milho e sorgo (Wyatt et al., 1997a,b, 1999; Pack et al., 1998a).

O fato de as enzimas serem específicas em suas reações determina que os produtos que tenham só uma enzima sejam insuficientes para produzir o máximo benefício. Isto sugere que misturas de enzimas sejam mais eficientes no aproveitamento dos nutrientes das dietas, pois, atuam sobre uma série de substratos, sendo mais efetivas ainda em animais jovens (Borges, 1997).

Behrends (2000) afirma que os complexos enzimáticos podem conter xilanases, proteases, amilases, celulasas e galactosidasas que, por sua vez, são responsáveis pela quebra de PNAs, proteínas e o aumento da digestibilidade de amidos. A vantagem dos complexos enzimáticos é a sua habilidade em liberar vários componentes do material estrutural de origem vegetal em vez de apenas um polissacarídeo específico.

Entretanto, as pesquisas devem ser realizadas usando combinações diferentes de enzimas puras, isto é, não somente enzimas com ações similares. Para isso, é importante determinar se as principais enzimas que compõem o

complexo enzimático têm um efeito sinérgico, antagônico ou aditivo. Como exemplo, a habilidade das enzimas de reduzir a viscosidade dos arabinoxilanos solúveis em água no trigo ou centeio pode depender da quantidade, não somente de endo-xilanase, mas também de arabinofuranosidase e, possivelmente, de glucanases, acetil-xilano esterase e de feruloil esterase, na preparação (Forsberg et al., 1993). As preparações enzimáticas com elevadas atividades de protease podem também ter um efeito negativo, porque realçariam a digestão das proteínas, incluindo a digestão das próprias enzimas adicionadas (Marquardt & Bedford, 1996).

As principais limitações para maior uso das enzimas são disponibilidade limitada, custo elevado, estabilidade operacional e necessidade de coenzimas (Inborr et al., 1991).

### **2.3.5 Outros efeitos causados pelas enzimas exógenas**

É importante ressaltar que, nem sempre, a suplementação de enzimas digestivas exógenas proporciona resposta positiva na performance dos animais. Para uma enzima atuar, é necessário ter: o substrato específico na dieta, uma dosagem correta de enzimas, a capacidade das enzimas em ultrapassar barreiras encontradas no estômago (ex. baixo pH e ação de enzimas proteolíticas como a pepsina) além de observar a temperatura à qual a ração é submetida durante o processamento (Henn, 2002).

Em algumas situações, a inclusão de enzimas digestivas exógenas nas dietas avícolas reduziu a síntese de enzimas endógenas. Zanella et al. (1999) observaram que tripsina, quimiotripsina, lipase e  $\alpha$ -amilase tiveram redução de 40% da secreção duodenal quando as dietas foram suplementadas com estas enzimas exógenas e que a suplementação de amilase e protease na dieta à base

de milho e farelo de soja para frangos de corte reduziu a síntese destas enzimas endógenas em 23,4% e 35,5%, respectivamente.

A adição de enzimas exógenas às dietas de frangos resultou, em alguns casos, em um decréscimo no coeficiente de digestibilidade aparente de nutrientes, sendo tal fato evidenciado por métodos de alimentação precisa (Cowieson, 2002; Ferraz de Oliveira, 1998; Naveed et al., 1999). Há um número de possíveis explicações para estes, aparentemente, efeitos anômalos, como: liberação de componentes indesejáveis que estavam previamente encapsulados; ocorrência de desbalanços de nutrientes e liberação e absorção de componentes de valor nutricional negativo (como a xilose). É também possível que a adição de enzimas exógenas, talvez enzimas incorretas ou em concentrações excessivas, cause uma perda de material endógeno, devido a uma interação direta com o trato gastrintestinal (Cowieson, 2006).

Para determinar a eficácia de enzimas exógenas sobre a excreção de materiais endógenos do trato gastrintestinal de galinhas, Cowieson et al. (2006) observaram que algumas enzimas exógenas podem aumentar a excreção dos mesmos. A excreção de matéria seca e energia endógenos foi aumentada ( $P < 0,05$ ) com a administração de pectinase, protease e celulase, comparada às aves que receberam o tratamento controle (glicose). A adição de protease aumentou ( $P < 0,05$ ) a excreção de todos os aminoácidos, com exceção de histidina, isoleucina, leucina, tirosina e valina.

O aumento na excreção de nutrientes devido ao uso de enzimas pode ser o resultado da hidrólise de oligossacarídeos componentes de ligaduras bacterianas. Essas ligaduras constituem num mecanismo de vantagem competitiva usado para ligar as bactérias às paredes do íleo distal, intestino e, possivelmente, o ceco do hospedeiro (Savage, 1977). A pectinase pode romper essas ligaduras, o que acarreta num aumento do fluxo de bactérias em direção à porção final do intestino e ao exterior, juntamente com a excreta, mesmo que,

por um pequeno intervalo de tempo, essa perda de microrganismos do TGI possa causar um aumento nas mensurações de perdas endógenas de energia, nitrogênio, aminoácidos e matéria seca, na excreta (Cowieson et al., 2006).

Tem sido observado que aves alimentadas com dietas contendo enzimas apresentam, freqüentemente, em seus TGIs, morfologia, produção de enzimas pancreáticas e populações microbianas diferentes, comparadas às aves que foram criadas com dietas livres de enzimas (Bedford & Schulze, 1998; Cowieson., 2003; Marquardt et al., 1996).

Especula-se que o aumento na produção de mucina pode ocorrer na presença de proteínas biologicamente ativas, com o objetivo de proteger o epitélio intestinal. A mucina contribui significativamente para a perda endógena em frangos (Montagne et al., 2000). Essa hipótese pode ser suportada pelo fato de que, dentre os aminoácidos excretados em resposta à adição de enzimas, estão aqueles constituintes da mucina intestinal (Cowieson et al., 2006).

A variabilidade de substratos e fatores interativos apresenta influência significativa na resposta à adição de enzimas exógenas. Além dos conhecidos efeitos benéficos da adição de enzimas, como a melhora na digestibilidade de nutrientes e a redução de atividade microbiana no íleo de aves, resultante da limitação de substrato (Figura 3), surgiu, recentemente, um outro mecanismo benéfico conhecido por “alimentação ativa de espécies específicas de bactérias” (Bedford, 2000).

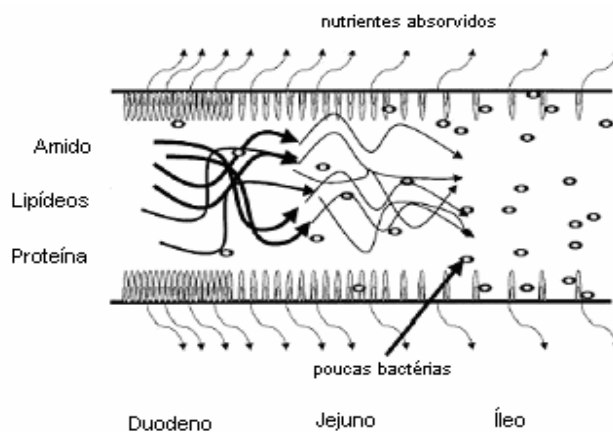


FIGURA 3. Relação entre a taxa de digestão da dieta e a densidade da população microbiana. Uma rápida taxa de digestão acarreta em menos microrganismos no íleo.  
Fonte: Bedford, 2000.

A atividade de enzimas sobre polímeros viscosos e parede celular dos carboidratos produz açúcares e oligossacarídeos, que são utilizados, preferencialmente, por certas espécies de bactérias presentes no íleo e no ceco. Elas desenvolvem-se à custa de outras, possivelmente, espécies prejudiciais ao ótimo crescimento ou à saúde dos animais (Apajalahti & Bedford, 1999).

Assim, parece que tanto os fruto-oligossacarídeos quanto os oligossacarídeos da soja são preferencialmente utilizados por bifidobactérias e lactobacilos, que os utilizam mais rapidamente que outros microrganismos, favorecendo seu desenvolvimento (Stewart et al., 1993). Tanto as bifidobactérias quanto os lactobacilos têm sido relacionados positivamente com a saúde dos animais (Fuller, 1989) e constituem a base de muitos probióticos.

A literatura tem estabelecido que algumas espécies microbianas do intestino podem ter influência positiva sobre a performance (Irianto & Austin, 2002) e que a composição da dieta é capaz de influenciar a microflora intestinal dos peixes (Ringo et al., 1998; Ringo & Olsen, 1999).

### 2.3.6 Adição de enzimas exógenas às rações de peixes

As principais enzimas para a degradação dos PNAs são as xilanases, as celulases e as glucanases, as quais não são sintetizadas pelos não-ruminantes (Henn, 2002).

Em peixes, as enzimas digestivas que atuam sobre os PNAs, como as  $\beta$ -glucanases ou  $\beta$ -xylanases, são escassas ou inexistentes (Chakrabarti et al., 1995; Kuz'mina, 1996; Lindsay & Harris, 1980; Smith, 1989; Stickney & Shumway, 1974). Da mesma forma, baixos níveis de celulase (1,4- $\beta$ -D-glucanohidrolase) têm sido reportados em espécies herbívoras, como a carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*) e milkfish (*Chanos chanos*) (Chakrabarti et al., 1995; Das & Tripathi, 1991; Kuz'mina, 1996; Lindsay & Harris 1980; Smith, 1989) e atividade insignificante tem sido reportada em espécies onívoras e carnívoras (Chakrabarti et al., 1995; Kuz'mina, 1996; Lindsay & Harris, 1980; Smith, 1989; Stickney & Shumway, 1974; Taniguchi & Takano, 2004).

Conseqüentemente, os PNAs permanecem indigestíveis e, portanto, constituem uma fonte de energia indisponível para as espécies carnívoras e maioria das onívoras (Stone et al., 2003).

As PNAases podem também hidrolisar o PNA componente de paredes celulares e liberar outros nutrientes não disponíveis, como proteína e amido (Chesson, 1993; Dudley-Cash, 1997). As hemicelulases e os complexos enzimáticos são capazes de aumentar a energia metabolizável e a digestibilidade de proteína graças ao desarranjo da parede celular e a fatores antinutricionais (Behrends, 2000).

O efeito das enzimas digestivas exógenas depende da idade, da espécie e do tipo de enzima utilizado, bem como do hábito alimentar do peixe (Kolkovski, 2001). Outro importante fator que influencia o efeito de enzimas exógenas é o desenvolvimento específico da borda em escova, como as aminopeptidases.



Essas enzimas têm substancial participação na digestão, especialmente quando o sistema digestivo e as glândulas gástricas não estão totalmente desenvolvidos (Kurokawa & Suzuki, 1998).

A adição de enzimas proteolíticas às dietas resultou em pequenos efeitos positivos em carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Dabrowski & Glogowski, 1977 a,b; Dabrowski et al., 1979). Entretanto, esses estudos foram conduzidos com extratos de enzimas dos tecidos intestinais de peixes.

Carter et al. (1992, 1994) investigaram o efeito de amilase dietética e mistura de enzimas pancreáticas dietéticas em juvenis de salmão (*Salmo salar*). Não houve efeitos sobre o crescimento ou utilização de proteína quando a amilase dietética foi usada, mas houve efeitos positivos no crescimento e utilização de proteína quando as enzimas pancreáticas foram usadas.

A adição de enzimas exógenas carboidrases em dietas para peixes tem sido responsável pelo aumento da utilização de outros carboidratos dietéticos não disponíveis em salmão-do-atlântico (*Salmo salar*), larvas de seabream (*Sparus arata*) e *Penaeus monodon* (Buchanan et al., 1997; Carter et al., 1994; Kolkovski et al., 1993).

Kolkovski et al. (1994), avaliando a suplementação de microdietas com enzima pancreática de suíno, concluíram que a inclusão de enzimas digestivas exógenas em microdietas para larvas de seabream (*S. aurata*) melhorou a digestibilidade. Em outros dois experimentos, Kolkovski et al. (1997c, 2000a) não encontraram efeito significativo quando a microdieta foi suplementada com pancreatina para juvenis de seabass (*D. labrax*) ou juvenis de *Perca Flavescens*.

Esses resultados são confirmados por Cahu & Zambonino (1994, 1995) que encontraram altos níveis de atividade de protease em larvas de seabass (*D. labrax*), sugerindo que a suplementação de microdietas com enzimas no estágio inicial de desenvolvimento é desnecessária para essas espécies. Entretanto, essas informações contrariam os resultados prévios de Kolkovski et al. (1993) que

avaliando a suplementação de microdietas com pancreatina, encontraram aumentos significativos da assimilação e taxas de crescimento em larvas de Seabream (*Sparus aurata*).

Estudando os efeitos da  $\alpha$ -amilase sobre o crescimento e a utilização de alimento em alevinos de rohu (*Labeo rohita*), Ghosh et al. (2001) observaram que os alevinos que receberam a suplementação enzimática obtiveram melhor performance. A dieta com 700 U de  $\alpha$ -amilase foi aquela que apresentou o melhor ganho de peso, conversão alimentar e taxa de eficiência protéica. Os valores de digestibilidade aparente dos nutrientes indicaram uma correlação linear com a performance de crescimento dos alevinos.

Ng et al. (2002) avaliaram o efeito do pré-tratamento do farelo de miolo de palma (PKM) com o complexo enzimático comercial (Allzyme Vegpro™) e com fermentado sólido de fungos *Trichoderma koningii*, a fim de melhorar o valor nutritivo do PKM cru em dietas para tilápia-vermelha (*Oreochromis sp*). Os peixes alimentados com 40% de PKM pré-tratado com enzima (EPKM) mostraram maior crescimento e eficiência na utilização de alimento do que os peixes alimentados com 40% de PKM cru, permitindo uma melhoria na digestibilidade de matéria seca, proteína, lipídeo e energia nas dietas com EPKM. Concluíram que, por meio do tratamento enzimático, altos níveis de PKM podem ser incluídos às dietas de tilápia vermelha, além de diminuir o impacto e custos na alimentação de tilápia.

Stone et al. (2003) avaliaram os efeitos da adição de enzimas exógenas (Natustarch®, suplemento de  $\alpha$ -amilase; Natugrain-blend®, suplemento enzimático contendo  $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -xilase, específicos para PNAs) sobre a digestibilidade de amido de trigo ou dietas contendo outros tipos de amido para Silver Perch (*Bidyanus bidyanus*). A adição de Natustarch® às dietas contendo amido de trigo cru e gelatinizado levou a um aumento considerável no conteúdo de açúcar reduzido nas dietas de 67% e 340%, respectivamente. A adição de

Natustarch® às dietas em níveis superiores a 50 mg/kg levou a um aumento significativo na digestibilidade do amido do trigo cru, enquanto que, no amido gelatinizado, não foi observada melhoria. A adição de Natugrain-blend® não mostrou efeito sobre a digestibilidade da matéria seca, energia ou proteína dos ingredientes da dieta.

Ogunkoya et al. (2005), ao estudarem a incorporação de farelo de soja e um complexo enzimático (Superzime CS)<sup>3</sup> à dieta de trutas arco-íris, observaram um pequeno efeito sobre a digestibilidade e nenhum efeito sobre o crescimento. A suplementação enzimática teve um efeito significativo sobre os coeficientes de digestibilidade aparente de matéria seca, proteína bruta, lipídeo, fósforo e energia, e nenhum efeito nas cinzas da dieta. A suplementação enzimática teve um efeito significativo sobre o conteúdo de energia bruta da carcaça (P<0,05) e sobre a eficiência na retenção de fósforo (P<0,001).

Ao estudar os efeitos da adição de amilase, lipase e protease, isoladamente, na ração de juvenis de Pirarucu (*Arapaima gigas*), Cavero et al. (2006) não encontraram efeito significativo sobre o crescimento, enquanto que o uso combinado de 0,1% de lipase + protease apresentou um efeito positivo.

### **2.3.7 Relação custo/benefício**

A melhora significativa na digestibilidade dos alimentos obtida com o uso de enzimas nas dietas permite alterações nas formulações das rações de forma a minimizar o custo, maximizando o uso dos ingredientes energéticos e protéicos das rações. O emprego de enzimas possibilita, ainda, a utilização de alimentos alternativos regionais ou sazonais de menor custo em substituição ao

---

<sup>3</sup> O complexo enzimático Superzime CS possui atividades de xilanase, amilase, celulase, protease e  $\beta$ -glucanase.

milho e à soja, tradicionalmente utilizados como fontes de energia e proteína, respectivamente. O uso ou não das enzimas deve ser determinado por meio de um estudo econômico para cada empresa, levando em consideração a relação “custo/benefício”.

Nesse sentido, Zhang et al. (1996) mostraram que pode prever a resposta das aves domésticas à suplementação de qualquer quantidade de uma determinada enzima e em qualquer proporção de dois cereais por meio de um modelo linear simples. Este modelo pode ser prontamente adaptado à análise de “custo/benefício”, desde que os dados de entrada exatos estejam disponíveis, fornecendo uma base para estimar o retorno econômico por unidade de enzima adicionada a uma dieta.

Além disso, deve-se considerar a questão da preservação do meio ambiente, não menos importante, porém, bem mais difícil de incluir nos cálculos econômicos (Sartori...). Um melhor aproveitamento de nutrientes e ou minerais presentes na dieta, principalmente do fósforo, permite uma redução do seu efeito poluidor sobre a água.

Assim, o custo do uso de enzimas, frente à competitividade do mercado de carnes, é o fator mais limitante para a sua utilização.

#### **2.4 Digestibilidade dos nutrientes**

A determinação da digestibilidade dos nutrientes da matéria-prima é o primeiro cuidado quando se pretende avaliar seu potencial em uma dieta para peixes (Cho, 1987).

Segundo Hopher (1988), a digestão do alimento depende de três fatores principais: o diâmetro das partículas que constituem o alimento ingerido, pelos quais se torna susceptível à ação das enzimas digestivas, a atividade dessas enzimas e o tempo de exposição do alimento ao sistema digestório.

É de suma importância um conhecimento preciso da digestibilidade de ingredientes alimentares empregados na formulação de dietas. Na atualidade, são requeridas investigações adicionais com relação à exigência nutricional de cada espécie e uma rigorosa formulação da ração. Sem dados precisos de digestibilidade, os nutricionistas de peixes arriscam-se em superdosagens que podem elevar o custo de produção ou em uma subdosagem, que pode reduzir a taxa de crescimento e outras medidas de performance do peixe. Utilizar ingredientes altamente digestíveis é especialmente importante em condições de cultivo de alta densidade em que a acumulação de alimentos não digeridos polui a água, aumentando o custo de tratamento da mesma, além de elevar a chance de ocorrerem patologias nos peixes, o que pode ocasionar a sua mortalidade (Albernaz, 2000).

O ambiente aquático dificulta a separação das fezes dos peixes da água e a mensuração do consumo de alimento, além de facilitar a contaminação da dieta que não foi digerida. Devido a esses problemas, torna-se necessário o uso de técnicas distintas das utilizadas para medir a digestibilidade em animais de hábitos terrestres.

Inicialmente, a metodologia utilizada para avaliar a digestibilidade envolvia a filtração de água, técnicas de análise e quantificação total das excretas e urina. Entretanto, esse método não fornecia resultados confiáveis, uma vez que ocasionava perdas das fezes e alimentos e a ingestão do material fecal pelos próprios peixes. Além disso, poderia haver alguma contaminação das fezes pela ração ou vice-versa.

Existem várias metodologias para coleta de fezes em estudos de nutrição de peixes. De acordo com Sallum (2000), o seu desenvolvimento visa, principalmente, contornar situações, tais como o estresse dos animais pelo manuseio nos métodos de pressão abdominal, sucção anal, contenção em câmara metabólica ou alimentação forçada, o sacrifício dos animais no método de

dissecação intestinal e a lixiviação de nutrientes e de energia, principalmente das fezes.

Nesse sentido, diante das dificuldades na determinação da quantidade total da ração ingerida e das fezes excretadas no meio aquático, a metodologia indireta com o uso de indicador inerte é preferida à direta (De La Noue & Choubert, 1986; Morales et al., 1999; Zimmerman & Jost, 1998, citados por Meurer et al., 2003). Esses indicadores inertes apresentam várias aplicações em estudos nutricionais, como estimar a quantidade de alimento ou nutriente consumido e medir o tempo e a taxa de passagem da ingesta pelo trato digestório. Dentre os indicadores externos, o óxido crômico III ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) se apresenta como o mais utilizado e é um dos mais aceitos nos estudos de digestibilidade em peixes (Austreng, 1978).

De acordo com Austreng (1978), citado por Albernaz (2000), o óxido crômico, como indicador, apresenta várias vantagens sobre outros métodos de estimação de digestibilidade para peixes, isto é, a alimentação quantitativa e a coleta de fezes são secundários; os peixes não precisam ser sacrificados para se obter os resultados. Além disso, um grande número de peixes pode ser incluído no experimento, o que elimina um possível efeito das diferenças entre indivíduos e facilita a obtenção de uma quantidade suficiente de fezes para análise.

Estudando níveis de óxido crômico em dietas contendo amido gelatinizado, como fonte de carboidrato, para alevinos de Sea Bream (*Sparus aurata*), Fernandez et al. (1999) não observaram efeitos sobre a digestibilidade de carbono, nitrogênio ou matéria seca. Não houve efeito sobre a taxa de crescimento específico, conversão alimentar, taxa de eficiência alimentar, eficiência na utilização de proteína ou retenção de proteína ou nitrogênio nos peixes. Entretanto, a digestibilidade de cálcio e fósforo foi maior nos peixes que receberam a dieta suplementada com 5g/kg de óxido crômico quando

comparados aos peixes alimentados com a dieta controle e com as outras dietas suplementadas.

Por outro lado, Sallum (2000) observou que somente o nível de 0,1% de óxido crômico apresentou menor consistência dos coeficientes de digestibilidade, por meio de altos erros padrões obtidos na determinação dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca e proteína bruta.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Localização e período experimental**

O experimento foi conduzido na Estação de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, MG, no período de 15 de abril a 15 de setembro de 2005.

### **3.2 Estrutura física, equipamentos e acessórios**

O experimento foi realizado na Sala de Metabolismo de Peixes da Estação de Piscicultura da UFLA. A sala possui 10 incubadoras adaptadas para ensaio de digestibilidade, sendo cada uma constituída por: uma incubadora, um tanque-rede, uma bomba propulsora de ar, um termostato de 100 W, um comedouro, um termômetro de bulbo de mercúrio, uma válvula de PVC de fecho rápido e um coletor de fezes, conforme ilustrado na Figura 4.

A incubadora possui forma de cone, 200L de volume útil e é fabricada em fibra de vidro. É semelhante às cubas utilizadas na larvicultura de peixes reofílicos, isto é, possui um fundo cônico que é ligado a um recipiente coletor de fezes por meio de uma válvula de PVC de fecho rápido.

Os tanques-rede eram constituídos de malha plástica de 2,0 cm, possuíam forma cônica, volume de 100L e permaneciam no interior das incubadoras. Com o objetivo de evitar o acesso e a ingestão pelos peixes de resíduos de fezes, ração e ou lodo, que ocasionalmente poderiam estar aderidos às paredes e fundo das incubadoras, os peixes foram acondicionados dentro dos tanques-rede.



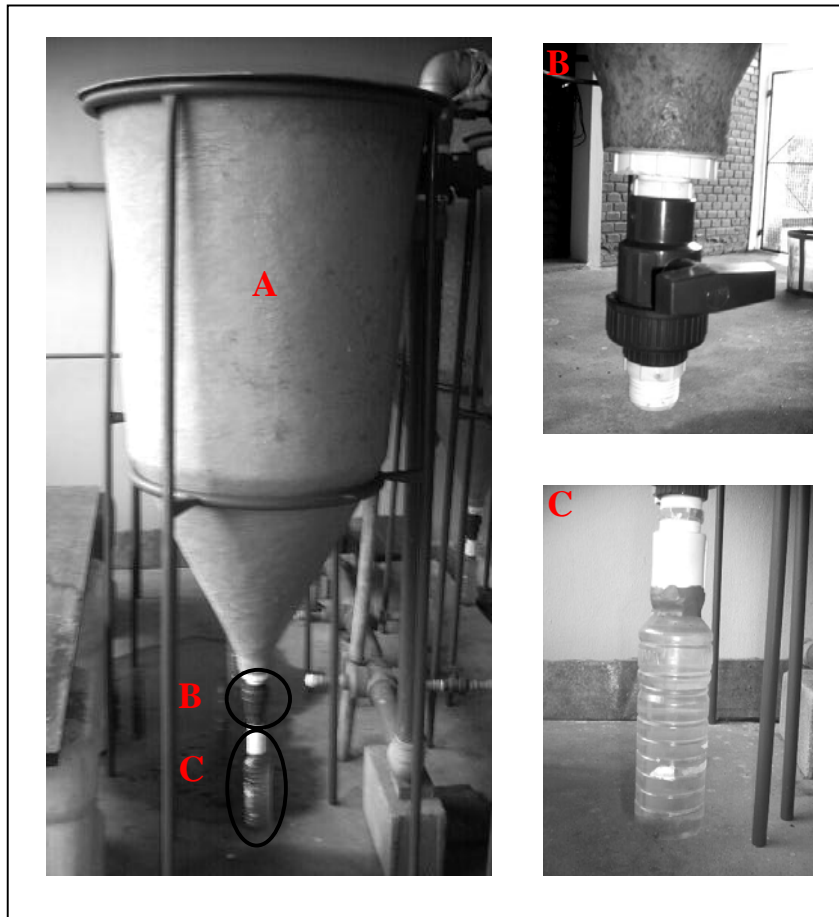


FIGURA 4. Incubadora adaptada para ensaio de digestibilidade: A - Incubadora, B - Válvula de PVC e C - Coletor de fezes.

Os comedouros utilizados foram confeccionados com malha tipo sombrite em suas laterais e malha de plâncton no fundo, a fim de evitar que a ração fosse “lançada” para fora dos mesmos, devido à movimentação dos peixes no momento das refeições.

Todos os tanques de digestibilidade eram providos de um sistema de aeração e de controle de temperatura constantes, por meio do uso de bombas propulsoras de ar e termostatos calibrados para 25°C, respectivamente.

A água que abastecia as incubadoras era previamente aquecida nas caixas d'água (capacidade máxima de 2.000 L), que se localizavam externamente à Sala de Metabolismo, por meio de uma resistência de 500W e um termostato.

Na tomada de água de cada incubadora, era acoplada à torneira uma peça confeccionada com malha de plâncton (< 75 Mc ) que tinha a função de impedir a entrada de zooplâncton e plâncton no sistema.

Pelo fato de o experimento ter sido realizado no período de inverno, utilizou-se um aquecedor elétrico para evitar altas amplitudes da temperatura ambiente do interior da Sala de Metabolismo, principalmente à noite.

Para as pesagens de peixes, utilizou-se uma balança digital com precisão de 5 g. Na limpeza e troca de água diária das incubadoras foi utilizado um sifão, feito a partir de um cano articulado acoplado a um cano de PVC que, por sua vez, tinha em sua extremidade um bico coletor.

O monitoramento dos parâmetros limnológicos (T°C, oxigênio e pH) foi realizado com o uso do kit “Laboratório de Medição Portátil F-1003”, da Bernauer, enquanto que, para a temperatura ambiental, foi usado um termômetro de máxima e mínima.

### **3.3 Qualidade da água**

A água usada para o abastecimento dos tanques de digestibilidade é proveniente de nascente localizada próxima ao setor de piscicultura. A temperatura e o teor de oxigênio dissolvido (OD) da água dos tanques de digestibilidade foram registrados diariamente, por meio de um oxigenômetro digital portátil. As temperaturas máxima e mínima ambiente foram registradas diariamente pela manhã e o pH (potencial hidrogeniônico) foi aferido a cada semana, durante o período experimental.

### **3.4 Material biológico**

Foram utilizados 50 machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com um peso médio de  $90 \pm 15\text{g}$ , provenientes da Estação de Piscicultura da UFLA e selecionados pelo processo de sexagem.

### **3.5 Delineamento experimental e análises estatísticas**

Como o número de incubadoras adaptadas para ensaio de digestibilidade permitia apenas a realização de duas repetições por tratamento, este experimento foi conduzido em três períodos experimentais. Os tratamentos constituíram-se de cinco rações com 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 g de complexo enzimático por kg, respectivamente. A unidade experimental foi de cinco peixes por incubadora, com duas repetições por período.

Devido ao pequeno volume de fezes restante para a realização das análises de amido, cálcio e fósforo de cada tratamento, dentro do período experimental, fez-se um pool de duas repetições. Portanto, para essas variáveis obteve-se uma repetição por período, em vez de duas.

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas por meio do software SISVAR - versão 4.3 (Ferreira, 2003) e o modelo estatístico adotado para análise dos dados foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + e_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$  = valor observado no tratamento  $i$  no bloco  $j$ ;

$\mu$  = constante associada a todas observações;

$T_i$  = efeito do nível de complexo enzimático  $i$ , com  $i = 1,2,3,4,5$ ;

$P_j$  = efeito do período  $j$ , com  $j = 1,2,3$ ;

$e_{ij}$  = erro experimental associado a  $y_{ij}$  que, por hipótese, tem distribuição normal com média  $\mu = 0$  e variância  $\sigma^2$ .

O melhor nível do complexo enzimático foi determinado por meio de análise de regressão, adotando-se a equação que melhor se ajustou aos dados.

### 3.6 Rações experimentais

Para se determinar o efeito da suplementação da ração com complexo enzimático (CE) sobre os coeficientes de digestibilidade aparente de nutrientes em juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), foi utilizada uma ração farelada à base de farelo de soja e milho, elaborada de acordo com os níveis mínimos recomendados pelo NRC (1993) (Tabela 9). Às rações experimentais, foram adicionadas quantidades crescentes de complexo enzimático (Allzyme Vegpro-Alltech<sup>4</sup>) composto por celulase, protease e amilase, nos níveis de 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 g/kg, o que corresponde às porcentagens de 0,0%, 0,025%, 0,050%, 0,075% e 0,1%, respectivamente. O tratamento controle constituiu-se daquele isento do complexo enzimático.

---

<sup>4</sup> O complexo enzimático foi cedido pela Empresa Multinacional Alltech.

As rações experimentais ficaram assim esquematizadas:

1. Dieta + 0,0% de CE (controle);
2. Dieta + 0,025% de CE;
3. Dieta + 0,050% de CE;
4. Dieta + 0,075% de CE;
5. Dieta + 0,1% de CE.

TABELA 9. Composição percentual e nível nutricional das rações experimentais utilizadas, em matéria natural.

INGREDIENTES	TRATAMENTOS				
	1	2	3	4	5
<b>Farelo de soja</b>	59,18%	59,18%	59,18%	59,18%	59,18%
<b>Milho</b>	39,62%	39,62%	39,62%	39,62%	39,62%
<b>Suplemento min./vit.</b>	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
<b>Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
<b>Comp. enzimático</b>	0,00%	0,025%	0,050%	0,075%	0,100%
<b>Caulim</b>	0,1%	0,075%	0,050%	0,025%	0,0%
<b>Total</b>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

NÍVEL NUTRICIONAL ANALISADO	
Matéria seca (%)	91,01
Energia bruta (kcal/kg)	4243,5
Proteína bruta (%)	30,01
Amido (%)	44,61
Matéria mineral (%)	4,39
Cálcio (%)	0,5
Fósforo total (%)	0,72

<sup>1</sup> Suplemento vitamínico e mineral: composição por quilo de produto: Vit. A = 1.200.000 UI; vit. D<sub>3</sub> = 12.000 mg; vit. K<sub>3</sub> = 2.400 mg; vit. B<sub>1</sub> = 4800 mg; vit. B<sub>2</sub> = 4800 mg; vit. B<sub>6</sub> = 4000 mg; vit. B<sub>12</sub> = 4800 mg; ac. Fólico = 1200 mg; pantotenato de cálcio = 12.000 mg; vit. C = 48.000 mg; biotina = 48 mg; colina = 65.000 mg; ácido nicotínico = 24.000 mg; Fe = 10.000 mg; Cu = 600 mg; Mn = 4000 mg; Zn = 6000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg e Se = 20 mg.

<sup>2</sup> Allzyme VegPro®: Composição básica: protease, amilase e celulase. Veículo q.s.p. Níveis de garantia por quilograma do produto: Protease (3%), Celulase (3%). N° de lote 40508.

Fonte: Dados da Pesquisa

Para a confecção das rações experimentais, os componentes destas foram moídos em triturador tipo faca, com peneira de 1,0 mm (Hayashi et al., 1999 citados por Meurer et al., 2003). Após a pesagem e a homogeneização dos ingredientes, incluindo o complexo enzimático, foi acrescida água na proporção de 60% do peso total de cada ração para proporcionar maleabilidade. A mistura resultante foi “peletizada” em moinho de carne e desidratada na estufa de ventilação forçada, a 55°C.

Para o desintegramento e homogeneização dos grânulos em diâmetros entre 2 e 5 mm, aproximadamente, as dietas foram transferidas para sacos plásticos preenchidos de ar e sofreram pequena agitação. Em seguida, as dietas foram armazenadas em locais frescos e protegidos do sol, para conservação.

### **3.7 Manejo experimental**

Fez-se, previamente, uma sanitização da sala de metabolismo, das incubadoras adaptadas para ensaio de digestibilidade e equipamentos com o uso de hipoclorito de sódio. O período de adaptação dos peixes às instalações, ao ambiente, à ração granulada e ao manejo geral (alimentação em comedouros, limpeza e troca de água das incubadoras) foi de, aproximadamente, 30 dias.

O período de adaptação utilizado para cada tratamento foi de cinco dias (Meurer et al., 2003), durante os quais os peixes permaneceram nas próprias incubadoras, recebendo uma dieta a 3% do peso vivo.

A iluminação artificial e complementar do ambiente foi realizada por meio de lâmpadas fluorescentes durante o dia, até o fim do processo de limpeza (por volta das 18:00h), sendo desligadas durante a noite.

Na montagem dos blocos, foram distribuídos 5 juvenis em cada uma das 10 (dez) incubadoras. Durante todo o período experimental, os peixes foram acondicionados nos tanques redes.

A renovação de água das incubadoras foi feita para repor o nível de água que saía do sistema devido ao processo de limpeza e de descarga na fase experimental. Cada fase de coleta de fezes variou conforme o atendimento da quantidade mínima requerida para os ensaios laboratoriais.

As dietas foram fornecidas três vezes ao dia, a 3% do peso vivo, para cada lote de peixes, nos horários de 8, 12 e 16 horas.

Após a última refeição do dia, aguardavam-se aproximadamente 30 minutos antes de se fazer a limpeza das incubadoras, a fim de evitar regurgitações causadas pelo efeito de estresse. Dessa forma, era realizada a sifonagem das paredes e fundos das incubadoras e, de forma simultânea, estas eram esvaziadas em 30% da sua capacidade de volume de água para a retirada de qualquer resíduo. Em seguida, os coletores de fezes e comedouros eram esgotados e limpos.

Ao término de cada fase, os peixes foram pesados e redistribuídos ao acaso entre as incubadoras, de modo que o peso total dos lotes fosse o mais uniforme possível e que cada peixe não recebesse o mesmo tratamento do período anterior. Em seguida, os peixes eram submetidos a um período pré-experimental de cinco dias, a fim de adaptarem-se à dieta experimental.

A coleta de fezes foi realizada diariamente, pela manhã, às 7:00h, mantendo-se um intervalo de 24 horas entre as coletas e 16 horas após a última alimentação. Para isso foi utilizada uma peneira de malha plástica e uma bacia, por meio das quais fazia-se a separação das fezes da fração líquida presente nos coletores. Os materiais coletados foram transferidos diariamente, durante a fase de coleta, para potes plásticos devidamente identificados e, em seguida, seu conteúdo congelado à temperatura de -10°C.

### **3.8 Metodologia utilizada nos ensaios metabólicos**

A digestibilidade das rações foi determinada utilizando-se o método indireto, no qual a ingestão de alimentos e as coletas de excreta foram parciais, utilizando-se o óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), na proporção de 0,1%, como marcador inerte.

Ao final de todo o experimento, as amostras referentes a cada tratamento foram descongeladas à temperatura ambiente e levadas ao Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFLA. Em seguida, foram pesadas, identificadas e levadas à estufa de ventilação forçada a  $55^\circ\text{C}$ , por 72 horas, para a obtenção da excreta seca ao ar, sendo novamente pesadas.

As fezes pré-secas foram maceradas no cadinho de porcelana e pistilo e, em seguida, foi realizada a retirada de impurezas. Após este procedimento, as excretas pré-secas foram identificadas de acordo com o tratamento, a incubadora e o período experimental.

As rações e as fezes foram submetidas a análises químicas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFLA. As análises de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), foram determinadas de acordo com os métodos descritos por AOAC (1995). A energia bruta (EB) foi determinada em bomba calorimétrica (Parr Instrument Co 1994), utilizando-se a metodologia de Silva (1990).

O cálcio (Ca) e o fósforo total (Pt) foram determinados no Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Ciência dos Solos, por meio da metodologia de espectrometria de absorção atômica, segundo Zagatto et al.(1979).

O amido foi determinado no Laboratório do Departamento de Ciência dos Alimentos, de acordo com a metodologia redutométrica de Somogy, modificada por Nelson (1944).



A partir do conhecimento dos teores de nutrientes e  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , nas fezes e nas rações, realizou-se o cálculo do fator de indigestibilidade, segundo a seguinte equação, conforme Nose (1966), citado por Albermaz (2000):

Digestibilidade (D):

$$D(\%) = 100 - 100 * \frac{[ \% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ na ração } * \% \text{ nutriente nas fezes } ]}{[ \% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ nas fezes } \quad \% \text{ nutriente na ração } ]}$$

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Parâmetros físico-químicos da água**

#### **4.1.1 Temperatura**

A variação da temperatura média dos dez tanques de digestibilidade, aferidas na altura média dos mesmos, está apresentada na Tabela 1A do anexo. A média geral para os tratamentos foi de 24,9°C.

Cyrino & Kubitza (1996) afirmam que espécies de clima tropical necessitam de uma temperatura média da água acima de 25°C. Portanto, acredita-se que a temperatura média registrada durante o experimento não deve ter influenciado no desenvolvimento dos peixes.

#### **4.1.2 Oxigênio**

O teor médio de oxigênio dissolvido na água (Tabela 2A do anexo) sofreu uma variação de 4,0 a 5,8 mg/l entre as unidades experimentais. O teor médio geral para os tratamentos foi de 4,9 mg/l, que pode ser considerado como um bom teor para os peixes, estando bem acima do mínimo recomendado, conforme Gruber (1960).

#### **4.1.3 Potencial hidrogeniônico (pH)**

Na Tabela 3A do anexo observa-se a variação do pH da água dos tanques de digestibilidade, durante o período experimental. Os valores médios de pH variaram de 6,80 a 7,06. Swingle (1969), citado por Boyd (1982), atribui uma faixa ideal de pH entre 6,5 a 9,0 para um bom crescimento dos peixes e, no

presente experimento, o pH registrado situou-se dentro da faixa indicada pelo referido autor.

Os parâmetros físico-químicos da água dos tanques de digestibilidade apresentaram valores dentro dos exigidos para o cultivo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e, portanto, possivelmente, não influenciaram os resultados encontrados ao final do ensaio.

#### 4.2 Digestibilidade aparente dos nutrientes

Os resultados referentes aos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS), da proteína bruta (CDAPB) e da energia bruta (CDAEB) estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS), da proteína bruta (CDAPB) e da energia bruta (CDAEB) de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de complexo enzimático.

Nível do complexo enzimático (%)	CDAMS (%) <sup>1</sup>	CDAPB (%) <sup>1</sup>	CDAEB (%) <sup>1</sup>
0,0	75,88	52,04	73,52
0,025	78,42	59,00	76,05
0,050	81,92	64,91	79,35
0,075	81,47	64,31	79,53
0,1	74,03	50,75	71,63

<sup>1</sup> Efeito Quadrático (P< 0,05)

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que houve efeito quadrático significativo ( $P < 0,05$ ) da adição do complexo enzimático sobre os CDAMS, CDAPB e CDAEB, em juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Os níveis do complexo enzimático que proporcionaram melhores valores ( $P < 0,05$ ) de coeficiente de digestibilidade aparente foram os de 0,0495%, 0,051% e 0,0498%, para CDAMS, CDAPB e CDAEB, respectivamente (Figuras 5, 6 e 7).

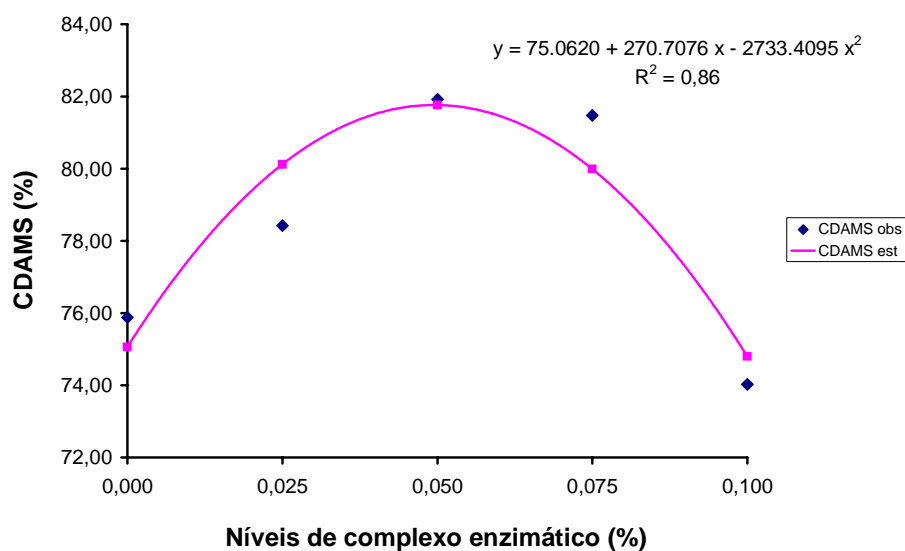


FIGURA 5. Digestibilidade da matéria seca, em função dos níveis de complexo enzimático adicionados à ração.

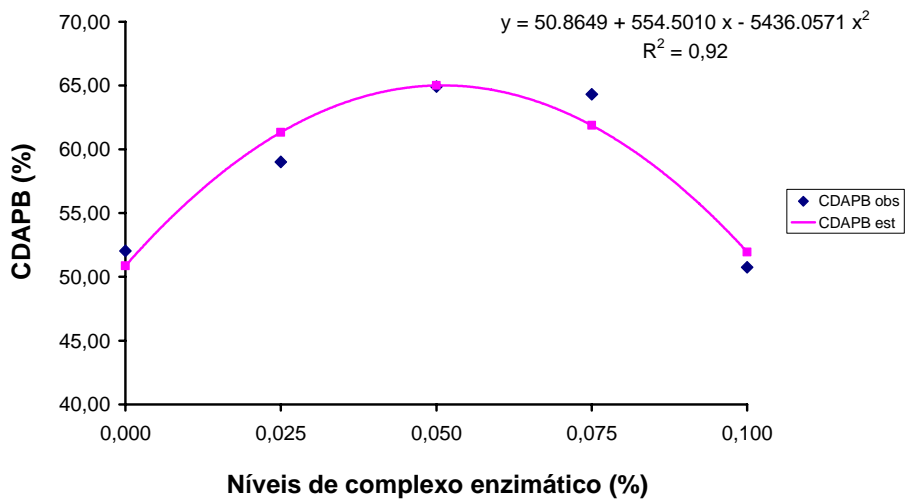


FIGURA 6. Digestibilidade da proteína bruta, em função dos níveis de complexo enzimático adicionados à ração.

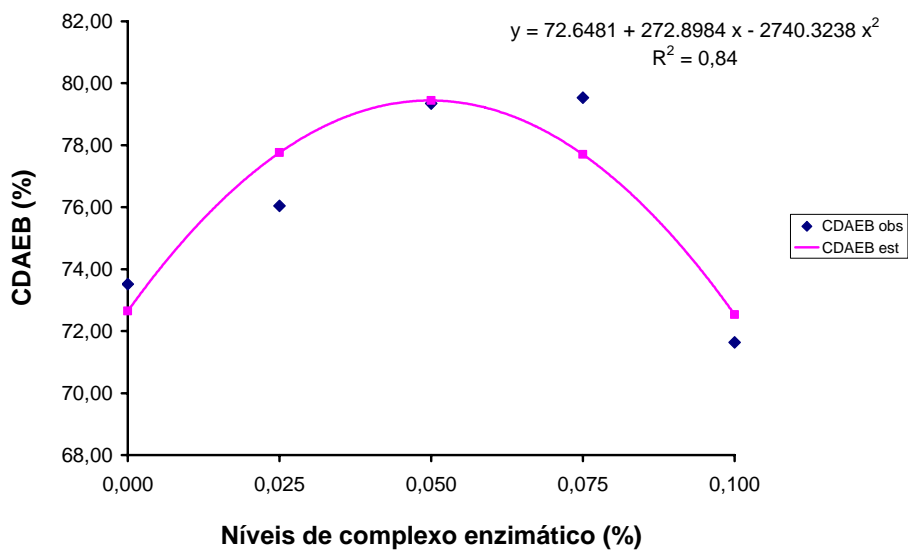


FIGURA 7. Digestibilidade da energia bruta, em função dos níveis de complexo enzimático adicionados à ração.

Pelo melhor nível estimado, observa-se que a suplementação enzimática das rações aumentou ( $P < 0,05$ ) o CDAMS, o CDAPB e o CDAEB em cerca de 8,0%, 24,7% e 7,9%, respectivamente, em relação ao tratamento controle.

Assim, verifica-se que a adição simultânea de enzimas exógenas (celulase, protease e amilase) à dieta foi benéfico, até o nível de 0,05%, visto que permitiu um maior aproveitamento de seu conteúdo protéico e energético pelos juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Os resultados encontrados estão de acordo com aqueles obtidos em trabalho conduzido por Ng et al. (2002) que, ao avaliarem o efeito do pré-tratamento do farelo de miolo de palma (PKM) com o complexo enzimático comercial (Allzyme Vegpro™), observaram uma melhoria na digestibilidade da matéria seca, proteína, lipídeo e energia para a tilápia-vermelha (*Oreochromis sp*).

Ogunkoya et al. (2005) também verificaram um efeito positivo sobre os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta, lipídeo, fósforo e energia, ao estudarem a incorporação de farelo de soja e um complexo enzimático composto por xilanase, amilase, celulase, protease e  $\beta$ -glucanase à dieta de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Porém, Stone et al. (2003), ao usarem o complexo enzimático composto pelas enzimas  $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -xilanase, que são específicas para PNAs, em rações para Silver Perch (*Bidyanus bidyanus*), não observaram nenhum efeito sobre a digestibilidade aparente da matéria seca, energia ou proteína.

Ouhida et al. (2002) citam que o tratamento de cascas e cotilédones de soja com enzimas degradadoras de parede celular (pectinase, xilanase e celulase) resultou na liberação de, pelo menos, 7% dos monossacarídeos componentes das frações não solúveis em água, enquanto que as misturas de enzimas (complexos) ajudam na digestão de amidos e proteínas. Nesse sentido, Forsberg et al. (1993) afirmam que as pesquisas devem ser realizadas utilizando-se combinações

diferentes de enzimas puras, isto é, não somente aquelas enzimas com ações sinérgicas.

Essas considerações fortalecem a idéia de que os complexos enzimáticos formados por enzimas com características sinérgicas e aditivas são mais efetivos no aproveitamento do conteúdo energético e protéico da dieta, pelo fato de agirem de forma complementar e simultânea.

As celulasas destacam-se como o mais importante grupo de enzimas necessárias para a degradação de paredes celulares de plantas vasculares (Saha, et al., 2006) e possibilitam uma maximização da ação enzimática endógena do animal sobre a hidrólise do amido, lipídio e proteína, aumentando a sua digestibilidade.

Mono e dissacarídeos mostram alta digestibilidade em diversas espécies de peixes, independente de seu nível na dieta (Hilton et al., 1982; Singh & Nose, 1967; Storebakken et al., 1998). As tilápias se destacam, entre as espécies onívoras, na utilização dos aminoácidos das fontes protéicas convencionais e alternativas de origem vegetal (Fagbenro, 1998; Furuya et al., 1999).

Nesse sentido, a escolha da enzima celulase para compor complexos enzimáticos pode significar um fator preponderável para o alcance de resultados positivos sobre a digestibilidade aparente de matéria seca (CDAMS), proteína bruta (CDAPB) e, principalmente, da energia bruta (CDAEB), bem como, de outros nutrientes para a tilápia-do-Nilo. Entretanto, para confirmar isso, seria necessário verificar os efeitos da adição de celulase, isoladamente, em rações para juvenis de tilápia-do-Nilo, a fim de determinar se esta enzima é capaz de aumentar o CDAEB por meio do maior aproveitamento do conteúdo de energia da fibra, mais especificamente da glicose.

Pressupõe-se, dessa forma, que o comportamento do complexo enzimático, no presente estudo, pode ser melhor explicado por meio da ação da celulase na destruição das barreiras à ação enzimática (parede celular) (Carré et

al., 1990) e da participação da amilase e protease na transformação do amido e proteína, então disponibilizados em seus respectivos constituintes (monômeros).

Apesar de não terem utilizado complexos enzimáticos, Ghosh (2001) e Stone et al. (2003), ao adicionarem a enzima  $\alpha$ -amilase nas dietas de alevinos de Rohu (*Labeo rohita*) e juvenis de Silver Perch (*Bidyanus bidyanus*), respectivamente, também observaram melhora significativa nos coeficientes de digestibilidade da matéria seca e proteína bruta. Tal fato pode ser explicado por um efeito poupador de energia, decorrente do maior aproveitamento de amido.

Entretanto, no estudo de Stone et al. (2003) com Silver Perch (*Bidyanus bidyanus*), os efeitos positivos da adição de  $\alpha$ -amilase só foram verificados para a dieta à base de amido de trigo cru, enquanto que, para amido gelatinizado, não foi observada melhoria significativa. Isso evidencia que materiais de origem vegetal com menor grau de processamento podem apresentar maior potencial de resposta à adição de enzimas exógenas, o que permitiria, em alguns casos, uma melhor relação custo/benefício na fabricação de rações caseiras para peixes.

Observa-se que, na maioria das pesquisas envolvendo a adição de enzimas exógenas em dietas para peixes, os CDAs apresentaram respostas positivas e crescentes até um determinado nível de inclusão, tendo, a partir desse ponto, demonstrado uma tendência de estabilização ou declínio. Um comportamento parecido foi observado no presente estudo, podendo indicar que a concentração excessiva de enzimas, ou de uma enzima específica, pode ter uma influência negativa sobre a digestibilidade dos nutrientes.

O uso de enzimas inadequadas ou em concentrações excessivas pode causar uma perda de material endógeno, devido a uma interação direta com o trato gastrointestinal de aves (Cowieson et al., 2006). Da mesma forma, essa interação poderia resultar na diminuição da capacidade de absorção de nutrientes pelo trato digestivo de peixes, devido à lesão de enterócitos, microvilosidades e ou outras estruturas relacionadas à absorção.



Outra provável explicação para esse comportamento baseia-se no fato de que as preparações enzimáticas com elevadas atividades de protease podem apresentar um efeito negativo, visto que realçariam a digestão das proteínas, incluindo a digestão das próprias enzimas adicionadas.

Os resultados referentes aos coeficientes de digestibilidade aparente do amido (CDAAMI), do cálcio (CDACa) e do fósforo (CDAP) estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11. Coeficientes de digestibilidade aparente do amido (CDAAMI), do cálcio (CDACa) e do fósforo (CDAP) de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de complexo enzimático.

Nível do complexo enzimático (%)	CDAAMI (%) <sup>1</sup>	CDACa (%) <sup>1</sup>	CDAP (%) <sup>1</sup>
0,0	61,93	96,81	88,01
0,025	64,98	96,70	89,07
0,050	71,60	97,50	90,64
0,075	73,05	97,50	90,70
0,1	61,12	96,27	87,17

<sup>1</sup> Efeito Quadrático (P<0,05)

Pela Tabela 11, pode-se observar que houve efeito quadrático (P<0,05) da adição do complexo enzimático sobre o coeficiente de digestibilidade aparente do amido (CDAAMI), do cálcio (CDACa) e do fósforo (CDAP), em juvenis de tilápia-do-Nilo.

O nível do complexo enzimático que proporcionou melhores valores de CDAAMI, CDACa e CDAP foi, em média, o de 0,05%, conforme se observa nas Figuras 8, 9 e 10.

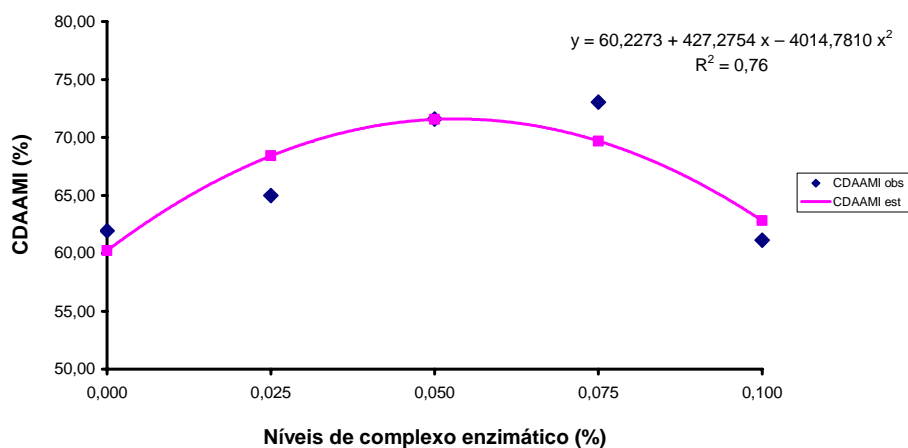


FIGURA 8. Digestibilidade do amido, em função dos níveis de complexo enzimático adicionados à ração.

A suplementação enzimática das rações aumentou o CDAAMI, o CDACa e o CDAP, em 15,6%, 0,7% e 3,0%, respectivamente, em relação ao tratamento controle.

Os resultados estão de acordo com o trabalho de Stone et al. (2003) que, ao adicionarem a enzima  $\alpha$ -amilase nas dietas de juvenis de Silver Perch (*Bidyanus bidyanus*), também observaram melhores coeficientes de digestibilidade aparente de amido.

Sabe-se que algumas espécies de peixes apresentam diminuição na digestibilidade do amido, quando se aumenta o nível desse nutriente na dieta (Arnesen et al., 1995; Buddington et al., 1987; Burel et al., 2000; Grisdale-Helland & Helland, 1998; Hemre et al., 1989, 1995; Hillestad et al., 2001; Krogdahl et al., 2003; Singh & Nose, 1967). Denota-se que a dependência da digestibilidade do amido em relação ao nível de inclusão na dieta, deve-se à capacidade limitada de algumas espécies de peixes em digerir esse nutriente (Krogdahl et al., 2005).

Noy & Sklan (1995) verificaram baixa digestibilidade ileal do amido e gordura em pintos alimentados com milho e farelo de soja, propondo que a inclusão de enzimas exógenas melhora a digestibilidade deste nutriente. Wyatt e Bedford (1998) relataram, em seu estudo, que um dos principais efeitos das enzimas ocorre sobre a taxa de digestão do amido no intestino delgado. Eles confirmaram a digestão incompleta do amido até o final do íleo e mostraram, com inclusão de enzimas, uma melhora significativa da ordem de 2% na digestão do amido.

Considerando que a amilase sofre inibição de fatores protéicos presentes em leguminosas e que os mesmos são inativados pela ação de pepsinas no estômago de peixes e por meio de tratamentos térmicos, faz-se necessária a realização de pesquisas envolvendo peixes agástricos, a fim de determinar o grau de inibição que a amilase pode sofrer ao serem utilizadas rações práticas com menor grau de processamento.

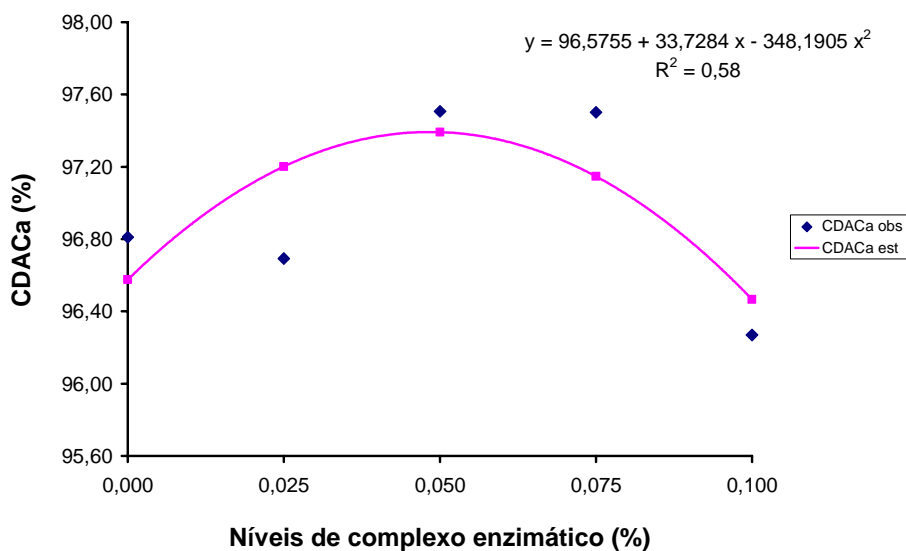


FIGURA 9. Digestibilidade do cálcio, em função dos níveis de complexo enzimático adicionados à ração.

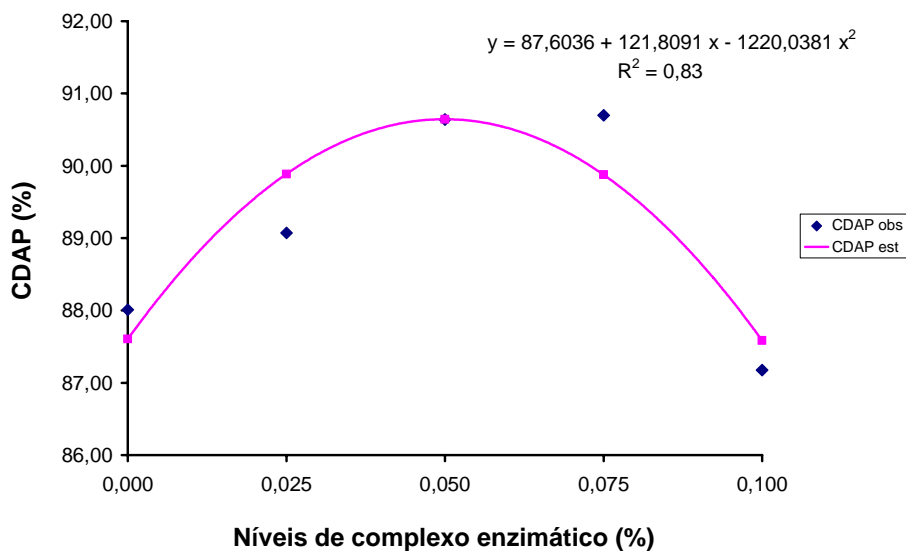


FIGURA 10. Digestibilidade de fósforo, em função dos níveis de complexo enzimático adicionados à ração.

Na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos envolvendo a digestibilidade aparente de cálcio para peixes. Entretanto, para aves, há alguns relatos de pesquisas sobre o aumento na digestibilidade do cálcio em consequência da adição de enzimas exógenas à ração.

No presente estudo, foi constatado um efeito positivo sobre os CDA dos nutrientes para a tilápia-do-Nilo, ao utilizarmos ração prática suplementada com complexo enzimático em sua alimentação, destacando-se um aumento na digestibilidade aparente de fósforo (CDAP), mesmo sem a presença de fitase.

Ogunkoya et al. (2005) também verificaram um efeito positivo sobre os coeficientes de digestibilidade aparente do fósforo, ao estudarem a incorporação de farelo de soja e um complexo enzimático à dieta de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

As diferentes respostas à adição de enzimas exógenas podem advir, também, da variabilidade na atividade e da presença de carboidrases endógenas nas diferentes espécies de peixes (Hidalgo et al., 1999; Kuz'mina, 1996; Smith, 1989). A produção de amilase pela microflora intestinal exerce um importante papel na digestão de amido em peixes de água doce, até certo ponto (Sugita et al., 1997). Taniguchi & Takano (2004) detectaram alta atividade de  $\beta$ -galactosidase no intestino de tilápia-do-Nilo, com capacidade de degradar vários polissacarídeos.

Conforme Tengjaroenkul et al. (2000), a distribuição e intensidade das peptidases e maltase ao longo do trato intestinal de tilápia-do-Nilo estão bem correlacionadas com a presença e atividade de proteases e amilases endógenas, respectivamente, reportadas em outras tilápias.

Evidencia-se, dessa forma, que podem ocorrer “efeitos aditivos”, também, entre as enzimas endógenas (aminopeptidases, peptidases e maltase) e as enzimas exógenas (proteases e amilases), em peixes como a tilápia-do-Nilo.

Por outro lado, peixes como o Silver Perch (*Bidyanus bidyanus*) possuem menor tolerância a altos níveis de dissacarídeos, como galactose, xilose e maltose no sangue (Stone et al., 2003c). Em tilápia-vermelha (*Oreochromis sp.*), não houve aumento das dissacaridases intestinais em resposta à ingestão de carboidratos (Shiau & Liang, 1995).

A eficiência das enzimas digestivas e de absorção endógenas em atuarem sobre seus respectivos substratos, bem como a capacidade dos peixes em metabolizar os nutrientes, podem acarretar em um fator limitante aos efeitos benéficos da adição de enzimas exógenas às dietas para peixes. Isso poderia ser causado pela formação de fluxos muito intensos de nutrientes e ou saturação dos sítios de absorção ao longo do trato gastrintestinal dos peixes.

Esse tipo de informação é de extrema importância para a fabricação de complexos enzimáticos específicos e mais eficazes para cada espécie e ou fase de vida dos peixes.

## 5 CONCLUSÃO

A adição de 0,05% de um complexo enzimático contendo celulase, protease e amilase à ração de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) melhora a digestibilidade dos nutrientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, V. P.; SASTRY, K. V.; KAUSHAB, S. K. S. Digestive enzymes of three teleost fishes. **Acta Physiology Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapeste, v. 46, n. 2, p. 93-98, 1975.

AKYAMA, D. M. Utilización de la pasta de soya en los alimentos acuícolas. **Soya Noticias**, México, n. 230, p. 1-8, 1992.

ALARCÓN, F. J.; MARTINEZ, T. L. F.; DIAZ, M.; MOYANO, F. J. Characterization of digestive carbohydrase activity in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 445, n. 1/3, p. 199-204, 2001.

ALBERNAZ, N. D. S. **Efeito do processamento da ração sobre os valores de digestibilidade aparente dos nutrientes para Piau Verdadeiro (*Leporinus elongatus* Cuv & Val, 1864)**. 2000. 54 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, MG.

ALCESTE, C.; JORRY, D. Análisis de las tendencias actuales en comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norteamérica y la Union Europea. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE AQUICULTURA, 1., 1998, Recife. **Anais...** Recife: SIMBRAQ, 1998. p. 349.

ANDERSON, J.; JACKSON, A. J.; MATTY, A. J.; CAPPER, B. S. Effects of dietary carbohydrates and fibre on the tilapia, *Oreochromis niloticus* (LINN). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 303-314, 1984.

ANISSON, G. The role of wheat non-starch polysaccharides in broiler nutrition. **Australian Journal Agricultura Research**, Islamabad, v. 44, n. 3, p. 405-422, 1993.

ANNISON, G.; MOUGHAN, P. J.; THOMAS, D. V. Nutritive activity of soluble rice bran arabinoxylans in broiler diets. **British Poultry Science**, Edinburgh, v. 36, n. 3, p. 479-488, July 1995.

APAJAHATI, J.; BEDFORD, M. R. Improve bird performance by feeding its microflora. **World Poultry**, Surrey, v. 15, n. 2, p. 20-23, 1999.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of AOA international**. 16. ed. Arlington, 1995.



AUSTRENG, E. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 265-272, 1978.

BAIRAGI, A.; SARKAR GOSH, K.; SEM, S. K.; RAY, A. K. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 10, n. 2, p. 109-121, 2002.

BAKER, D. H.; PARSONS, C. M.; FERNANDEZ, S.; AOYAGI, S.; HAN, Y. Digestible amino acid requirements of broiler chickens based upon ideal protein considerations. **Zootechnica International**, v. 19, p. 60-65, 1996.

BARRINGTON, E. J. W. The alimentary canal and digestion. In: BROWN, M. E. (Ed.). **The Physiology of Fishes**. New York: Academic Press, 1957. v. 1, p. 149-150.

BEDFORD, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits. Review article. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 86, n. 1/2, p. 1-13, 2000.

BEDFORD, M. R. The effect of enzymes on digestion. **Journal Applied Poultry Research**, Athens, v. 5, n. 4, p. 370-378, Sept./Dec. 1996a.

BEDFORD, M. R. Interaction between ingested feed and the digestive system in poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 5, n. 1, p. 6-95, 1996b.

BEDFORD, M. R.; MORGAN, A. J. The use of enzymes in poultry diets. **World's Poultry Science Journal**, Wallingford, v. 52, n. 1, p. p. 61-68, Mar. 1996.

BEDFORD, M. R.; SCHULZE, H. Exogenous enzymes for pigs and poultry. **Nutrition Research Review**, Wallingford, v. 11, n. 1, p. 91-114, June 1998.

BEDFORD, M. R.; SCOTT, T. A.; SILVERSIDES, F. G.; CLASSEN, H. L.; SWIFT, M. L.; PACK, M. The effect of wheat cultivar, growing environment, and enzyme supplementation on digestibility of amino acids by broilers. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 78, n. 3, p. 335-342, Sept. 1998.

BEDFORD, M. Restriciones digestivas de los ingredientes alimentarios e oportunidades teóricas para a suplementação de enzimas. In: SEMINARIO SOBRE EL EMPLEO DE ENZIMAS EN LA NUTRICION ANIMAL, Madrid. **Anais...** Madrid, 1991. p. 1-5.

BERNARD, K.; Mc Nab, J. M. Effect of Vegpro on true amino acid digestibilities of 48% crude protein soybean meal fed to either three week old chicks or adult cockerels. In: Biotechnology in the Feed Industry - Proceedings of Alltech's 13th Symposium, 1997.

BORGES, F. M. Utilização de enzimas em dietas avícolas. **Cadernos Tecnicos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, n. 20, p. 5-30, 1997.

BRENES, A. Influencia de la adición de enzimas sobre el valor nutritivo de las raciones en la alimentación ariar. **Selecciones Avícolas**, Salamanca, v. 22, p. 787-794, 1992.

BRENES, A.; LAZARO, R.; GARCIA, M.; MATEOS, G. G. Utilizacion practica de complejos enzimáticos en avicultura. In: CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA, 12., 1996, Madrid.

BRENES, A.; SMITH, M.; GUENTER, W.; MARQUARDT, R. R. Effects of enzyme supplementation on the performance and digestive-tract size of Broiler-chickens fed wheat-based and barley-based diets. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, n. 9, p. 1731-1739, Sept. 1993.

BUDDINGTON, R. K.; KROGDAHL, A.; BAKKE-McKELLEP, A. M. The intestine of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiology Scandinavica**, Oxford, v. 161, n. 2, 67-80, Oct. 1997.

BUREL, C.; BOUJARD, T.; CORRAZE, G.; KAUSHIK, S. J.; BOEUF, G.; MOL, K. A.; VAN DER GEYTEN, S.; KUHN, E. R. Incorporation of high levels of extruded lupin in diets rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Nutritional value and effect on thyroid status. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 188, n. 3/4, p. 285-298, Sept. 2000.

CAHU, C. L.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L. Early weaning of sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. **Comparative Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 109, n. 2, 213-222, Oct. 1994.

CAHU, C. L.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L. Effect of molecular from of dietary nitrogen supply in sea bas larvae: response of pancreatic enzymes and intestinal peptidase. **Fish Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 209-214, June 1995.

CAMPBELL, G. L., BEDFORD, M. R. Enzyme applications for monogastric feeds: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 72, n. 2, p. 449-466, June 1992.

CARRE, B.; BEAUFILS, E.; MELCIONS, J. P. Evaluation of Protein and Starch Digestibilities and Energy Value of Pelleted or Unpelleted Pea Seeds from Winter or Spring Cultivars in Adult and Young Chickens. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 3, p. 460-472, Mar. 1991.

CARRE, B.; DELROUET, L.; LECLERCQ, B. The digestibility of cell-wall polysaccharides from wheat (bran or whole grain), soybean meal, and white lupin meal in cockrels, muscovy ducks, and rats. **Poultry Science**, Champaign, v. 69, n. 4, 623-633, Apr. 1990.

CARRE, B.; GOMEZ, J.; MELCION, J. P. GIBOULOT, B.; La viscosite des aliments destines a l'aviculture. Utilisation pour predire la consommation et l'excretion d'eau. **INRA Production Animale**, Paris, v. 7, p. 369-379, 1994.

CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F.; BUCHANAN, B.; McCARTHY, I. A. Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon *Salmo salar* feed a diet containing supplementary enzyme. **Comparative Biochemistry Aquaculture Fish Management**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 37-46, 1994.

CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F.; McCARTHY, I. A. Feed utilization efficiencies of Atlantic salmon *Salmo salar* L. parr: effect of a single supplementary enzyme. **Comparative Biochemistry Aquaculture**, Oxford, v. 101, n. 2, p. 369-374, Feb. 1992.

CAVERO, B. A. S. Efeito da inclusão de enzimas exógenas sobre o desempenho de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) Disponível em: <[http://www.alltech.com/Brasil/artigos/Pics/cavero\\_fish.pdf](http://www.alltech.com/Brasil/artigos/Pics/cavero_fish.pdf)>. Acesso em 10 fev. 2006.

CHADRABARTI, I.; GANI, M. A.; CHAKI, K. K.; SUR, R.; MISRA, K. K. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. **Comparative Biochemistry Aquaculture**, Oxford, v. 112, n. 1, p. 167-177, Sept. 1995.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. Enzimas. In: \_\_\_\_\_. **Bioquímica Ilustrada**. 2. ed. São Paulo: Artes médicas, 1989. p. 53-66.

CHESSON, A. Feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 45, n. 1, p. 65-79, Dec. 1993.

CHESSON, A. Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In: HARESING, W.; COLE, P. J. A. (Ed.). **Recent advances in animal nutrition**. London: Butterworths, 1987. p. 71-87.

CHIU, SHIEH-TSUNG AND PAN, BONNIE SUN. Digestive protease activities of juvenile and adult eel (*Anguilla japonica*) fed with floating feed. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 205, n. 1/2, p. 141-156, Feb. 2002.

CHIU, Y. N.; BENITEZ, L. V. Studies on the carbohydrates in the digestive tract of the milkfish *Chanos chanos*. **Marine Biology**, New York, v. 61, n. 2/3, p. 247-254, 1981.

CHO, C. Y. La energía en la nutrición de los peces. In: ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J.; LABARTA, U. (Ed.) **Nutrición en Acuicultura II**. Madrid, 1987.

CLASSEN, H. L. Enzimas usadas en el alimento. **Avicultura Professional**, Athens, v. 10, n. 4, p. 162-168, 1993.

CLASSEN, L. H. Enzymes in action. **Feed Mix**, Doetinchem, v. 4, n. 1, p. 22-28, 1996.

CLEMENTS, K. D. Endosymbiotic communities of two herbivorous labroid fishes. *Odax cyanomelas*, and *O. Pullus*. **Marine Biology**, New York, v. 109, n. 2, p. 223-229, 1991.

CLEMENTS, K. D.; SUTTON, D. C.; CHOAT, J. H. Occurrence and characteristics of unusual protistan symbiosis from surgeonfishes (Acanthuridae) of the Great Barrier Reef, Australia. **Marine Biology**, New York, v. 102, n. 3, p. 403-412, 1989.

CLEÓPHAS, G. M. L.; Van HARTINGSVELDT, W.; SOMERS, W. A. C. et al. Enzymes can play an important role in poultry nutrition. **World Poultry Science Journal**, Wallingford, v. 11, n. 4, p. 12-15, 1995.

COCKSON, A.; BOURNE, D. Enzymes in the digestive tract of two species of euryhaline fish. **Comparative Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 715-718, 1972.

COLIER, B.; HARDY, B. The use of enzymes in the pig and poultry feeds. **Feed Comp**, v. 6, p. 14-19, 1986.

COWAN, W. D. Understanding the manufacturing, distribution, application, and overall, quality of enzymes in poultry feeds. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 2, n. 1, p. 93-9, 1993.

COWIESON, A. J. **The effect of exogenous enzymes on the nutritive value of camelina, lunaria, pea and lupin meals for broilers**. 2002. Thesis (Ph. D.) - University of Aberdeen, aberdeen.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Supplementation of diets containing pea meal with exogenous enzymes: Effects on weight gain, feed conversion, nutrient digestibility and gross morphology of the gastrointestinal tract of growing broiler chicks. **British Poultry Science**, Cambridge, v. 44, n. 3, p. 427-437, July 2003.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Using the precision-feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes – A new perspective. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, 2006. (article in press)

CYRINO, J. E. P.; KUBITZA, F. **Piscicultura**. [S. l. ]: SEBRAE, 1996. 82 p. (Coleção Agroindústria, 08).

DABROWSKI, I.; GLOGOWSKI, J. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 54, p. 129-134, 1977a.

DABROWSKI, K.; GLOGOWSKI, J. A study of the application of proteolytic enzymes to fish food. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 12, p. 349-360, 1977b.

DABROWSKI, K.; KOZAK, B. The use of meal and soybean meal as a protein source in the diet of grass carp fry. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 107-144, 1979.

DE SILVA, S. S.; ANDERSON, T. A. **Fish nutrition in aquaculture**. London: Chapman & Hall, 1995. 319 p.

DEGANI, G.; REVACH, A. Digestive capabilities of three commensal fish species: carp, *Cyprinus carpio* L., tilapia, *Oreochromis aureus* x *O. niloticus*, and African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1882). **Aquaculture and Fisheries Management**, Abeokuta, v. 22, p. 397-403, 1991.

DEGANI, G.; VIOLA, S.; YEHUDA, Y. Apparent digestibility of protein and carbohydrate in feed ingredients for adult tilapia (*Oreochromis aureus* x *O. niloticus*). **Israeli Journal Aquaculture**, Bamidgah, v. 49, n. 3, p. 115-123, Sept. 1997.

DIAS, J. C. C. A.; SANTIAGO, G. S.; FERREIRA, W. M.; SALIBA, E. O. S.; NARANJO, A. P. Avaliação da estabilidade *in vitro* de uma protease comercial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária, e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54 n. 6, p. 618-622, dez. 2002.

DUDLEY-CASH, W. A. NSP: a simple classification for a complex group of chemicals. **Feedstuffs**, Mineapolis, v. 69, n. 18, p. 11, May 1997.

ENZYMES in animal nutrition: technical support manual. **Feed International**, Illinois, v. 12, n. 1, p. 11-16, 1991.

FAGBENRO, O. A. Food composition and digestive enzymes in the gut of pond-cultured *Clarias isheriensis* (Sydenham 1980), (*Siluriformes clariidae*). **Journal of Applied Ichthyology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 91-98, 1990.

FAGBENRO, O. Apparent digestibility of various legumes seed meals in Nile tilapia diets. **Aquaculture International**, Dodrecht, v. 6, n. 1, p. 83-87, 1998.

FAGBENRO, O.; ADEDIRE, C. O.; AYOTUNDE, E. O.; FAMINU, E. O. Haematological profile, food composition and digestive enzyme assay in the gut of the African bony-tongue fish, *Heterotis (Clupisudis) niloticus* (Cuvier 1829) (Osteoglossidae). **Tropical Zoology**, Florence, v. 13, n. 1, p. 1-9, May 2000.

FANG, L. S.; CHIOU, S. F. Effect of salinity on the activities of digestive proteases from the tilapia fish, *Oreochromis niloticus* in different culture environments. **Comparative Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 439-443, 1989.

FERKET, P. R. Practical use of feed enzymes for turkeus and broiler. **Journal Applied Poultry Research**, Athens, v. 1, n. 1, p. 75-81, 1993.

FERNANDEZ, F.; MIGUEL, A. G.; MARTINEZ, R.; SERRA, E.; GUINEA, J.; NARBAIZA, F. J.; CASERAS, A.; BAANANTE, I. V. Dietary chromic oxide does not affect the utilization of organic compounds but can alter the utilization of mineral salts in Gilthead Sea Bream *Sparus aurata*. **American Society for Nutritional Sciences**, 1999.

FERNANDEZ, I.; MOYANO, F. J.; DIAZ, M.; MARTINEZ, T. Characterization of alpha-amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (sparidae, Teleostei). **Journal of Experimental Marine Biology Ecology**, Amsterdam, v. 262, n. 1, p. 1-12, July 2001.

FERRAZ DE OLIVEIRA, M. I. **Enzyme treated Lupinus spp. Seeds as alternative source of protein for broilers**. 1998. Thesis (Ph. D.) - University of Aberdeen, Aberdeen.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A. *Advances Cereal Science and Technology*. St. Paul, 8, 207-295, 1986.

FINFEEDS INTERNATIONAL. Enzymes in animal nutrition. In: **Feed enzymes: technical support manual**. England, 1991. p. 11-16.

FIREMAN, F. A. T.; FIREMANN, A. K. B. A. T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 173-178, jan./mar. 1998.

FISH, G. R. Contribution to the physiology of digestion in *tilapia Mossambica* digestion enzymes and the effects of diets on their activity. **Zeitschrift fuer Vergleichende Physiologie**, New York, v. 49, 270-284, 1960.

FORSBERG, B. R.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; MARTINELLI, L. A. VICTORIA, R. L.; BONASSI, J. A. Autotrophic Carbon Sources for Fish of the Central Amazon. **Ecology**, Washibgton, v. 74, n. 3, p. 643-652, Apr. 1993.

FOX, P. F. **Food enzymology**. London: Elsevier Applied Science, 1991. 378 p. 1991.

FRANCESCH, M. Bases de la utilización de complejos enzimaticos en avicultura. In: CURSO DE ESPECIALIZACION AVANCES EN NUTRICION ALIMENTACION ANIMAL, 12., 1996, Madrid. **Anais...** Madrid: FEDNA, 1996. p. 118-131.

FRANCIS, G.; MAKKAR, HPS; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquacultura**, Amsterdam, n. 3/4, p. 197-227, Aug. 2001.

FULLER, R. Probiotics in man dan animals. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, May 1989.

FURUYA, W. M. *et al.* Digestibilidade aparente da proteína e aminoácidos do farelo de canola pela tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. In: ACUICULTURA VENEZUELA, 1999, Puerto La Cruz. **Anais....** Puerto La Cruz: WAS/LAC, 1999. p. 206-217.

GARCIA, O. Enzimas: recentes contribuições para a sua aplicação em nutrição animal. In: ENCONTRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 3., 1997, São Paulo-SP. **Anais...** São Paulo-SP, 1997. p. 1-9.

GHOSH, K.; CHADRABORTY, K.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Effects of thermostable bacterial  $\alpha$ -amylase on growth and feed utilization in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. **Israeli Journal Aquaculture**, Bamidgeh, v. 53, n. 3/4, p. 101-109, Sept./Dec. 2001.

GHOSH, K.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Characterization of Bacilli isolated from the gut of rohu *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. **Journal of Applied Aquaculture**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 33-42, 2002.

GIACOMETTI, R. A. **Valores energéticos e digestibilidade de nutrientes do farelo de arroz integral suplementado com complexos enzimáticos para frangos de corte.** 2002. 54 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

GRAHAM, H.; INBORR, J. Enzymes in monogastric feeding. **Agro-Ind. Hi-tech**, v. 2, 1991.

GRIESHOP, C. M.; KADZERE, C. T. CLAPPER, G. M.; FRAZIER, R. L. FAHEY JR, G. C. Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 26, p. 7684-7691, Dec. 2003.

GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S. J. Macronutrient utilization by Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): diet digestibility and growth of 1 kg fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 166, n. 1/2, 57-65, July 1998.



GRUBER, R. Consideration sur l'amélioration des rendements en pisciculture congolaise. **Bulletin Congo Belea**, v. 51, n. 1, p. 139-157, 1960.

GUENTER, M. Impact of feed enzymes on nutrient utilization of ingredient in growing poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 2, n. 1, p. 82-84, 1993.

HANSEN, G. H.; STROM, E.; OLAFSEN, J. A. Effect of different holding regimes on the intestinal microflora of herring (*Clupea harengus*) larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 2, p. 461-470, Feb. 1992.

HARRIS, H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. **Clinical Chimica Acta**, v. 186, p. 133-150, 1989.

HEMRE, G. I.; LIE, OL; LIED, E.; LAMBERTSEN, G. Starch as an energy source in feed for cod (*Gadus morhua*): digestibility and retention. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 80, n. 3/4, p. 261-270, Sept. 1989.

HENN, J. D. Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, 2002.

HEPHER, B. **Nutrición de Peces Comerciales em Estanques**. México: Balderas, 1993.

HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 388 p.

HIDALGO, F.; ALLIOT, E. La digestión en los peces. In: ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J.; LABARTA, U. (Ed.). **Nutrición en acuicultura I. Madrid**: plan de formación de técnicos superiores en acuicultura. Madrid, 1987. p. 85-107.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 170, n. 3/4, p. 267-283, Jan. 1999.

HOFER, R. AND STURMBAUER, C. Inhibition of trout and carp alpha-amylase by wheat. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 48, n. 3/4, p. 277-283, 1985.

HONIG, D. H.; RACKIS, J. J. Determination of the total pepsin pancreatic indigestible content (dietary fiber) of soybean products, wheat bran, and corn bran. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 27, n. 2, p. 1262-1266, Feb. 1979.

HORN, M. H. Feeding and digestion. In: EVANS, D. H. (Ed.). **The Physiology of Fishes**. New York: CRC Press LLC, 1989. p. 54-55.

INBORN, J.; GRAHAM, H.; NISSINEN, V. Selección, producción, estabilización y control de calidad de las enzimas alimentarias. In: SEMINARIO SOBRE EL EMPLEO DE ENZIMAS EN LA NUTRICION ANIMAL, 1991, Madrid. **Anais**. . . Madrid, 1991. p. 1-5.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. New York: Chapman & Hall, 1995. 455 p.

JORGE NETO, G. Soja integral na alimentação de aves e suínos. **Avicultura e Suinocultura Industrial**, Porto Feliz, v. 82, n. 988, p. 4-15, jun. 1992.

KARR-LLIENTHAL, L. K.; KADZERE, C. T.; GRIESHOP, C. M. FAHEY JR, G. C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 97, n. 1, p. 1-12, Oct. 2005.

KAWAI, S.; IKEDA, S. Studies of digestive enzymes of fishes: I. Carbohydrases in digestive organ of several fishes. **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 37, n. 4, p. 333-337, 1971.

KERNKANP, G.; DURAN, R. La cebada: una materia prima util para aves. In: SEMINARIO SOBRE EL EMPLEO DE ENZIMAS EN LA NUTRICION ANIMAL, Barcelona, 1991. **Anais**...Barcelona: FEDNA, 1991.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles - implications and applications to formulated diets. **Aquaculture** Amsterdam, v. 200, n. 1/2), p. 181-201, Aug. 2001.

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A.; IZQUIERDO, M. S. Effects of live food, dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass *Dicentrarchus labrax* larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 148, n. 4, p. 313-322, Feb. 1997c.

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A.; KISSIL, G.; GERTLER, A. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion assimilation, growth and survival of gilthead seabream *Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus larvae. **Fish Physiology Biochemistry**, Lelystd, v. 12, n. 3, 203-209, Oct. 1993.

KOLKOVSKI, S.; YACKEY, C.; CZENY, S.; DABROWSKI, K. The effect of microdiets supplementation of dietary digestive enzymes and hormones on growth and enzyme activity in yellow perch juveniles. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 62, n. 2, p. 130-134, Apr. 2000a

KROGDAHL, A.; HEMRE, G. I.; MOMMSEN, T. P. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 103-122, Apr. 2005.

KUBARIK, J. Tilapia on highly flexible diets. **Feed International**, Illinois, v. 6, p. 16-18, 1997.

KUBITZA, F. **Substituição total da farinha de peixe pelo farelo de soja em rações para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), suplementados com metionina.** 1990. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

KUROKAWA, T.; SHIRAIISHI, M.; SUZUKI, T. Qualification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine *Sardinops melanoticus* larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, n. 1/4, p. 491-499, Feb. 1998.

LEIBOWITZ, H. E. **Replacing fish meal with soybean meal in practical catfish diets.** 1981. 55 p. Thesis (Master's) - Auburn University, Auburn. AL.

LESEL, R.; FROMAGEOT, C.; LESEL, M. Cellulose digestibility in grass carp. *Ctenopharyngodon idella* and in goldfish *Carassius auratus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 54, n. 1/2, p. 11-17, May 1986.

LESSON, S. A.; YERSIN, L.; VOLKER. Nutritive value of 1992 corn orgs. **Journal Applied Poultry Research**, Athens, v. 2, n. 3, p. 208-213, 1993.

LI, S. N.; FAN, D. F. Activity of esterases from different tissues of freshwater fish and responses of their isoenzymes to inhibitors. **Journal Toxicology Environmental Health**, Bristol, v. 51, n. 2, p. 149-157, June 1997.

LIM, C.; AKIYAMA, D. M. Full-fat soybean meal utilization by fish. **Asian Fisheries Science**, Swer, v. 5, p. 181-197, 1992.

LINDSAY, G. J. H.; HARRIS, J. E. Carboxymethylcellulase activity in the digestive tract of fish. **Journal of Fish Biology**, London, v. 16, n. 3, p. 219-233, 1980.

LOGATO, P. V. R. **Nutrição e alimentação de peixes de água doce**. Lavras: Editora UFLA, 1999. v. 1. 79 p.

LOVSHIN, L. L. Tilápia farming: a growing worldwild aquaculture industry. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO E PEIXES, 1., 1997, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1997. p. 137.

MALAGELADA, J. R.; LINSCHER, W. G.; FISCHAMAN, W. H. The effect of fatty acid perfusion on intestinal alkaline phosphatase: In. Studies on the rat. **American Journal Digest Disease**, New York, v. 22, n. 7, p. 516-523, 1977.

MARQUARDT, R. R.; BRENES A.; ZHANG, Z.; BOROS, D. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 60, n. 3/4, p. 321-330, Aug. 1996.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Digestibilidade aparente de alguns alimentos protéicos pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1801-1809, 2003. Suplemento 2.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; BOSCOLO, W. R. Utilização de levedura *spray dried* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 22, n. 2, p. 479-484, June 2000.

MONTAGNE, L.; TOULLEC, R.; LALLES, J. P. Calf intestinal mucin: isolation, partial characterization, and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 3, 507-517, Mar. 2000.

MORIARTY, D. J. W. The physiology of digestion of blue-green algae in the cichlid fish, *Tilapia nilotica*. **Journal Zoology**, London, v. 171, n. 1, p. 25-39, 1973.

MURRAY, M. G. **Replacement of fish meal with soybean meal diets fed to channel catfish in ponds.** 1982. 40 p. Thesis (Master's) - Auburn University – Auburn A. L.

NAGASE, G. Contribution to physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters: digestive enzymes and the effects of diets on their activity. **Zeitschrift Vergleichende Physiologie**, New York, v. 49, p. 270-284, 1964.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of swine.** 10. rev. ed. Washington, DC: National Research Council/National Academy of Sciences. National Academy Press, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutritional Requirements of Fishes.** Washington: Academic Press. 1993. 114 p.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 153, p. 375-380, 1944.

NG, W. K.; LIM, H. A.; LIM, S. L.; IBRAHIM, C. O. Nutritive value of palm kernel meal pretreated with enzyme or fermented with *Trichoderma koningii* (Oudemans) as a dietary ingredient for red hybrid tilapia (*Oreochromis sp.*). **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 33, n. 15, p. 1199-1207, Dec. 2002.

OGUNKOYA, A. E.; PAGE, G. I.; ADEWOLU, M. A.; BUREAU, D. P. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, 2005. (IN PRESS)

OMOREGIE, E.; OGBEMUDIA, F. I. Effect of substituting fish meal with palm kernel meal on growth and food utilization of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Israeli Journal of Aquaculture**, Bamidegl, v. 45, n. 3, p. 113-119, Sept. 1993.

OPUSZYNSKI, K.; SHIREMAN, I. V. Digestive mechanisms. In: Opuszynski, K., Shireman, J. V. (Ed.). **Herbivorous fishes: culture and use for weed management.** Boca Raton, FL: CRC Press, 1995. p. 21-31.

OUHIDA, I.; PEREZ, J. F.; GASA, J. Soybean (*Glycine max*) cell wall composition and availability to feed enzymes. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 7, p. 1933-1938, Mar. 2002.

OUHIDA, I.; PEREZ, J. F.; GASA, J.; PUCHAL, F. Enzymes ( $\beta$ -glucanases and arabinoxylanase) and/or sepiolite supplementation improve the nutritive value of barley-wheat based diets for broiler chickens. **Bristh Poultry Science**, Cambridge, v. 41, n. 5, p. 617-624, Dec. 2000.

PACK, C.; GROSSBERG, S.; MINGOLLA, E. How does cortical area MST use optic flow to navigate? **ARVO Abstracts**, v. 39, p. 1520, 1998a.

PACK, M.; BERDFORD, M. Feed enzymes for corn-soybean broiler diets. A new concept to improve nutritional value and economics. **World's Poultry Science Journal**, London, v. 13, n. 1, p. 87-93, Mara. 1997. Faaborg, Denmark.

PARR INSTRUMENT COMPANY. Moline, Illinois: "Manual No. 119: Operating Instructions for the **Parr** Series 3910 Catalytic Hydrogenation Apparatus, Low Pressure, . . .

PENZ JÚNIOR, A. M. Enzimas em rações para aves e suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu-SP. **Anais...** Botucatu-SP, 1998. p. 165-178.

PERES, A.; INFANTE, J. L. Z.; CAHU, C. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology Biochemistry**, Dordrecht, v. 19, n. 2, p. 145-152, Sept. 1998.

REFSTIE, S.; SVIHUS, B.; SHEARER, K. D.; STOREBAKKEN, T. Nutrient digestibility in Atlantic salmon and broiler chickens related to viscosity and non-starch polysaccharide content in different soyabean products. **Animal Feed Science Technology**, Amstrdam, v. 79, n. 4, p. 331-345, June.

RINGO, E.; BENDIKSEN, H. R.; GAUSEN, S. J.; SUNDSFJORK, A.; OLSEN, R. E. The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, n. 5, p. 855-864, Nov. 1998.

RINGO, E.; OLSEN, R. E. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 22-28, Jan. 1999.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2. Ed. Viçosa-MG: UFV, 2005. 186 p.

ROUBATY, C.; PORTMAN, P. Relation between intestinal alkaline phosphatase activity and brush border membrane transport of inorganic phosphate glucose, and o-glucose-6-phosphate. **Pfluegers Arch**, 412, 482-490, 1988.

RYU, K.; DORDICK, J. S. How do organic solvents affect peroxidase structure and function? **Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 9, p. 2588-2598, Mar. 1992.

SABAPATHY, D.; TEO, L. H. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 42, n. 4, p. 595-602, Apr. 1993.

SAHA, A. K.; RAY, A. K. Cellulase activity in rohu fingerlings. **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 6, n. 4, p. 281-291, Aug. 1998.

SAHA, S.; ROY, R. N.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Characterization of cellulose producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2006.

SALLUM, W. B. **Óxido crômico III como indicador externo em ensaios metabólicos para o matrinhã (*Bricon cephalus*, Gunther 1869) (Teleostei, Characidae)**. 2000. 116 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SAVAGE, D. C. Interactions between the host and its microbes. In: CLARKE, R. T. J.; BAUCHOP, T. (Ed.). **Microbial Ecology of the Gut**. London: Academic Press, 1977. p. 277-310.

SHIAU, S. Y.; KWOK, C. C.; CHEN, C. J.; HONG, H. T.; HSIEH, H. B. Effects of dietary fibre on the intestinal absorption of dextrin, blood sugar level and growth of tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 34, n. 6, p. 929-935, June 1989.

SHIAU, S. Y.; LIANG, H. S. Nutrient digestibility and growth of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, as influenced by agar supplementation at two dietary protein levels. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 41-48, Oct. 1994.

SHIAU, S.; LIN, S. F.; YU, S. L.; LIN, A. L.; KWOK, C. C. Deffated and full-fat soybean meal as partial replacement for fish meal in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) diets at low protein level. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 86, N. 4, p. 401-407, May 1990.

SHUTTE, J. B.; JONG, J.; LANGHOUT, D. J. Effect of endo-xylanase preparation in wheat-based rations for broilers. **Feed Compounder**, Derbys, v. 15, n. 1, 20-24, 1995.

SHUTTE, J. B.; JONG, J.; VAN WEERDEN, E. J. Nutritional implications of L-arabinose in pigs. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 68, n. 1, p. 195-207, July 1992.

SHUTTE, J. B.; VAN LEEUWEN, PL; LICHTENDONK, W. J. Ileal digestibility and urinary excretion of D-xylose and L-arabinose in ileostomised adult roosters. **Poultry Science**, Champaign, v. 70, n. 4, p. 884-891, Apr. 1991.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1990. 165 p.

SIMONS, P. C. M.; VERSTEEGH, H. A. J.; JONGBLOED, A. W.; KEMME, P. A.; SUMP, P.; BOS, K. D.; WALTERS, M. G. E.; BEUDEKER, R. F.; VERSCHOOR, G. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 64, 5, n. 2, p. 525-540, Sept. 1990.

SINGH, R. P.; NOSE, T. Digestibility of carbohydrates in young rainbow trout. **Bulletin Freshwater Fish Research**, Tokyo, v. 17, n. 1, p. 21-25, 1967.

SMITH, B. J.; SMITH, S. A.; TENGJAROENKUL, B. Gross morphology of the intestinal tract of the tilapia *Oreochromis niloticus*. **Cells Tissue Organs**, Besel, v. 166, n. 3, 2000. in press.

SMITH, L. S. Digestive functions in teleost fish. In: HALVER, J. E. (Ed.). **Fish nutrition**. 2. ed. London: Academic Press, 1989. p. 332-423.

SOTO-SALANOVA, M. S. The use of enzymes to improve the nutritional value of corn-soy diets for poultry and swine. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO DE SUINOS E AVES, 1996, Campinas. **Proceedings...** Campinas: CBNA, 1996. p. 13.



STECH, M. R. **Utilização da soja integral processada em dietas para o crescimento de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 1999. 90 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

STEVENS, C. E. and HUME, I. D. **Comparative physiology of the vertebrate digestive system**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

STEVENS, C. E. **Comparative physiology of the vertebrate digestive system**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

STEWART, C. S.; HILLMAN, K.; MAXWELL, F.; KELLY, D.; KING, T. P. In: **Recent advances in animal nutrition**. 1993. p. 197-220.

STONE, B. A. Cereal grain carbohydrates. In: HENRY, R. J.; KETTLEWELL, P. S. (Ed.). **Cereal grain quality**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 251-288.

STONE, D. A. J.; ALLAN, G. L.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 109-121, Jan. 2003a.

STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K. D.; REFSTIE, S.; LAGOCKI, S.; MCCOOL, J. Interactions between salinity, dietary carbohydrate source and carbohydrate concentration on the digestibility of macronutrients and energy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 163, n. 3/4, p. 347-359, Apr. 1998.

STROM, E.; OLAFSEN, J. A. The indigenous microflora of wildcaptured cod in net-pen rearing. In: **Microbiology of Poecilotherms**. 1990.

STWART, E. A. **Chemical analysis of ecological materials**. 2. ed. Boston: Black Well Scientific Publications, 1993.

SUGITA, H.; TOKUYARNA, K.; DEGUCHI, Y. The intestinal microflora of carp *Cyprinus carpio*, grass carp *Ctenophmyngodon idella* and tilapia *Sarotherodon niloticus*. **Bulletin Japanese Society Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 51, n. 8, p. 1325-1329, 1985.

TAKEUCHI, T. Digestion and nutrition of fish. In: ITAZAWA, Y.; HANYU, I. (Ed.). **Fish physiology**. Tokyo: Koseisha Koseikaku 1991. p. 67-101.

TANIGUCHI, A. Y.; TAKANO, K. Purification and properties of  $\beta$ -gactosidase from *Tilapia* intestine: Digestive enzyme to *Tilapia*-X. **Fisheries Science**, Washington, v. 70, n. 4, p. 688-694, Aug. 2004.

TEIXEIRA, A. S. **Alimentos e alimentação dos animais**. 4. ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 402 p.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B. J.; CACECI, T.; SMITH, S. A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 182, n. 3/4, p. 317-327, Feb. 2000.

UGOLEV, A. M.; KUZ'MINA, V. V. Fish enterocyte hydrosases. Nutrition adaptations. **Comparative Biochemistry Physiology A**, Oxford, v. 107, n. 1, p. 187-193, Jan. 1994.

UGWUMBA, A. A. A. Carbohydases in the digetive tract of the African bony-tongue *Heterosis niloticus* (Pisces: Osteoglossidae). **Hydrobiology**, Dordrecht, v. 257, n. 1, p. 95-100, 1993.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **SAEG Sistema para análises estatísticas e genéticas. (Manual do usuário). Versão 7. 1**. Viçosa: Editora Universitária, 1997.

VAN BARNEVELD, R. J. Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus spp.*) seed to improve livestock production efficiency. **Nutrition Research Review**, New York, v. 12, p. 203-230, 1999.

VANBELLE, M. **Les enzymes probiotiques**: Curso Superior de Nutrición y Alimentación Animal, Instituto Agronômico Mediterraneo de Zaragoza, 1992. (Documento interno).

VIELMA, J.; LALL, S. P.; KOSKELA, J.; SCHÖNER, F. J.; MATTILA, P. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 163, n. 3/4, p. 309-323, Apr. 1998.

VIOLA, S.; ARIELI, J.; RAPPAPORT, Y.; MOKADY, S. Experiments in the nutrition of carp replacement of fish meal by soybean meal. **Israeli Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 33, n. 2, p. 35-49, 1981.

WEBSTER, C. D.; YANCEY, D. H.; TIDWELL, J. H. Effect of partially or totally replacing fish meal with soybean meal on growth of blue catfish (*Ictalurus furcatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 103, N. 2, p. 141-150, May 1992.

YU, B.; TSEN, H. Y. An *in vitro* assessment of several enzymes for the supplementation of rabbit diets. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 40, n. 4, p. 309-320, Feb. 1993.

ZAGATTO, E. A. G.; KRUG, F. J.; BERGAMIN FILHO, H.; JORGENSEN, S. S.; REIS, B. F. Merging zones in flow injection analysis. Part 2. Determination of calcium, magnesium and potassium in plant materials by continuous flow injection atomic absorption and flame emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 104, n. 2, p. 279-284, 1979.

ZANELLA, I. **Suplementação enzimática em dietas a base de milho e sojas processadas sobre a digestibilidade de nutrientes e desempenho de frangos e corte**. 1998. 179 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

ZANELLA, I.; SAKAMURA, N. K.; SILVERSIDES, F. G.; FIQUEIRO, P. M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets base don corn and soybeans. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, n. 4, p. 561-568, Apr. 1999.

ZHANG, Z.; MARQUARDT, R. R.; WANG, G.; GUENTER, W.; CROW, G. H.; HAN, Z.; BEDFORD, M. R. A simple model for predicting the response of chicks to dietary enzyme supplementation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 2, 394-402, Feb. 1996.

## ANEXOS

<b>ANEXO A</b>	<b>Página</b>
TABELA 1A. Temperatura da água das incubadoras registradas durante o experimento.....	89
TABELA 2A. Medidas de oxigênio dissolvido (DO <sub>2</sub> ) da água das incubadoras registrado durante o experimento.....	89
TABELA 3A. Potencial hidrogeniônico (pH) da água das incubadoras registrado durante o experimento.....	90

TABELA 1A. Temperatura da água das incubadoras.

Temperaturas (°C)				
Tanque de digestibilidade	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Média
1	25,3	25,1	24,1	24,8
2	25,1	23,3	24,6	24,3
3	25,4	25,2	24,9	25,2
4	25,0	24,4	24,8	24,7
5	25,4	25,5	24,9	25,3
6	25,8	26,3	23,2	25,1
7	24,7	25,5	26,1	25,4
8	24,8	25,4	25,1	25,1
9	24,7	26	24,4	25,0
10	25,5	24,7	22,8	24,3
Média	25,2	25,1	24,5	<b>24,9</b>

TABELA 2A. Medidas de oxigênio dissolvido (DO<sub>2</sub>) da água das incubadoras.

Oxigênio dissolvido (mg/L)				
Tanque de digestibilidade	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Média
1	5,2	5,5	3,9	4,9
2	5,4	5,6	4,0	5,0
3	5,0	5,6	4,0	4,9
4	4,8	5,2	4,0	4,7
5	5,3	5,4	4,0	4,9
6	4,9	5,8	4,8	5,2
7	5,1	5,5	4,0	4,9
8	4,9	4,5	4,0	4,5
9	5,2	5,0	4,0	4,7
10	5,6	5,4	4,3	5,1
Média	5,1	5,3	4,1	<b>4,9</b>

TABELA 3A. Potencial hidrogeniônico (pH) da água das incubadoras.

Potencial hidrogeniônico (pH)				
Tanque de digestibilidade	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Média
1	6,75	6,86	7,04	6,88
2	6,84	6,97	6,96	6,92
3	6,90	6,88	7,06	6,95
4	6,95	6,93	6,84	6,91
5	6,85	6,81	7,02	6,89
6	6,82	6,92	6,97	6,90
7	6,97	6,81	6,85	6,88
8	6,92	6,99	6,80	6,90
9	6,92	7,04	6,82	6,93
10	6,84	6,74	7,06	6,88
Média	6,88	6,90	6,94	<b>6,90</b>