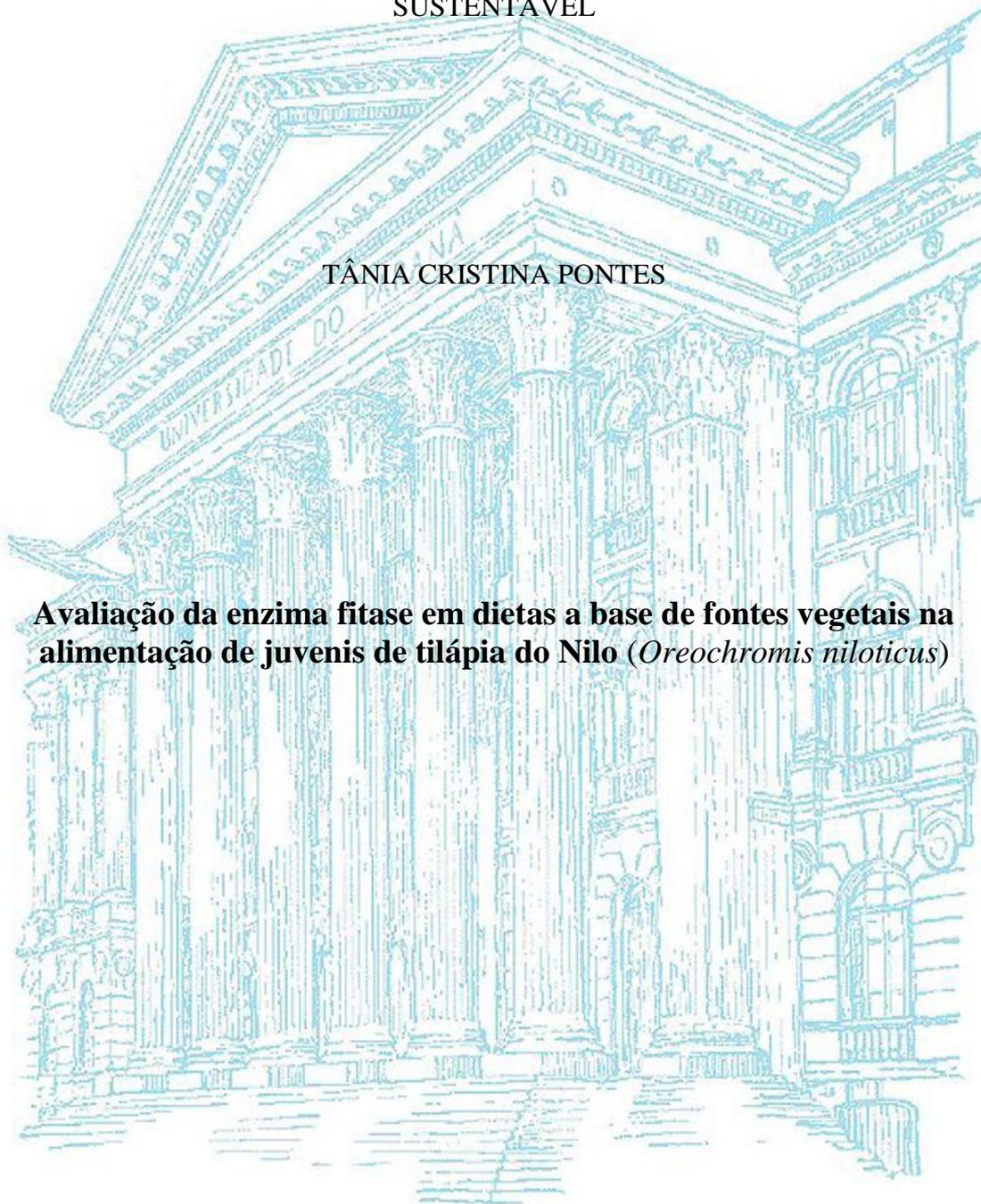


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL

TÂNIA CRISTINA PONTES

**Avaliação da enzima fitase em dietas a base de fontes vegetais na  
alimentação de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**



Palotina

2015

TÂNIA CRISTINA PONTES

**Avaliação da enzima fitase em dietas a base de fontes vegetais na  
alimentação de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável do Setor Palotina, Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável. Área de concentração: Produção de organismos aquáticos e impactos ambientais da atividade de Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. Leandro Portz

Palotina  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P814 Pontes, Tânia Cristina  
Avaliação da enzima fitase em dietas a base de fontes vegetais na alimentação de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Orientador, Leandro Portz . - Palotina, PR, 2015.  
36p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR -- Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, 2015.

1. Fitato 2. Nutrição. 3. Piscicultura. 4. *Oreochromis niloticus*  
I. Leandro Portz. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável. III. Título

CDU 639.3.043



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Código CAPES: 40001016078P2

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor PALOTINA  
Programa de Pós Graduação em AQUICULTURA E  
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

### PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **TANIA CRISTINA PONTES**, intitulada: "**AVALIAÇÃO DA ENZIMA FITASE EM DIETAS A BASE DE FONTES VEGETAIS NA ALIMENTAÇÃO DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua <sup>ADULTO CAP</sup>....., completando-se assim todos os requisitos previstos nas normas desta Instituição para a obtenção do Grau de **Mestre em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL**.

Palotina, 07 de Agosto de 2015.

Prof LEANDRO PÓRTZ  
(Presidente da Banca Examinadora)

  
Prof CECÍLIA SILVA DE CASTRO  
Prof WILSON ROGERIO BOSCOLO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo a Deus que me deu forças para nunca desistir.

Aos meus pais Ana Maria dos Santos Pontes e Antônio Roberto Pontes e minha irmã Josiane Aparecida Pontes que sempre me apoiaram e incentivaram. Obrigado por acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro Portz, pela confiança, respeito e amizade. Meus sinceros agradecimentos pelo incentivo e pela valorização do meu trabalho. Muito obrigado!

Agradeço em especial aos meus amigos Rennan Oliveira Meira, Nathalia Lopez Pereira e Viviane Wruck Trovato, por estarem comigo em todos os momentos, me aconselhando e me dando forças. Agradeço pela amizade e pelo apoio incondicional que me dão. Com certeza se cheguei até aqui é graças a amizades como a de vocês. Meu muito obrigado!

Aos colegas de mestrado Luana Cagol e Welliton França de Oliveira pela recepção, pelo companheirismo e pelo apoio nos momentos difíceis.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester, pelo apoio, pelos conselhos, pela amizade, pela ajuda que me disponibilizou para que eu concluísse meu trabalho.

A CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Ao colega Pedro Argel Zadinelo Moreira, pela colaboração com as análises.

A colega Dircelei Sponchiado pela ajuda concedida em todos os momentos em que solicitei. Meus sinceros agradecimentos!

Aos colegas Fabricio Dutra, Ademir Heldt e Leandro Pegas pela ajuda na finalização do meu experimento.

A Bruno Wernick pela colaboração com o trabalho.

A BASF por fornecer a enzima.

A Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina e ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável por me dar a oportunidade de crescer e aprimorar meus conhecimentos.

Aos membros da banca, por aceitarem prontamente o convite para avaliação deste trabalho.

Agradeço de coração a todas as pessoas que de uma forma ou de outra colaboraram para que este trabalho fosse realizado. Enfim muito obrigado por tudo!

## EPÍGRAFE

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

*(Martin Luther King)*

## **Avaliação da enzima fitase em dietas a base de fontes vegetais na alimentação de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

### **RESUMO**

Com a expansão da aquicultura têm-se priorizado o equilíbrio adequado de rações que aumente a produtividade e reduza o impacto ambiental. O fósforo é um mineral que participa de diversas funções metabólicas e fisiológicas importantes na nutrição de peixes. Em ingredientes de origem vegetal encontra-se parcialmente complexado como fitato, pouco disponível. A adição da enzima fitase em rações pode reduzir a necessidade de adição deste mineral em dietas para peixes podendo minimizar a descarga deste nos efluentes de piscicultura. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da fitase em diferentes níveis e formas (granulada e líquida) no desempenho produtivo de tilápia do Nilo. Foram utilizados 600 juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidos para machos, com peso médio inicial de  $11,72 \pm 2,21$ g e comprimento inicial de  $9,46 \pm 0,64$  cm, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições. Os peixes foram distribuídos em 30 caixas de polietileno com volume de 300 litros. As dietas experimentais foram isoenergéticas, com 3100 kcal/kg de energia digestível e isoproteicas com 28% de proteína bruta, suplementadas com diferentes níveis e formas de fitase (granulada e líquida), sendo adicionada antes e após a extrusão, T<sub>1</sub> – Controle negativo (dieta sem fosfato inorgânico e sem adição de fitase), T<sub>2</sub> – Controle positivo (dieta com fosfato inorgânico e sem adição de fitase), T<sub>3</sub> – Dieta com fitase granulada (1500 UFA/kg) adicionada antes da extrusão, T<sub>4</sub> – Dieta com fitase granulada (3000 UFA/kg) adicionada antes da extrusão, T<sub>5</sub> – Dieta com fitase líquida (1500 UFA/kg) adicionada após a extrusão e T<sub>6</sub> – Dieta com fitase líquida (3000 UFA/kg) adicionada após a extrusão. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (8 e 17h) *ad libitum* durante um período de 64 dias. Os parâmetros analisados foram: desempenho zootécnico, plasma sanguíneo, retenção de fósforo nas vértebras e composição química da carcaça. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, sendo posteriormente realizado o teste de comparação múltipla de médias Tukey ( $p < 0,05$ ). Ao término do período experimental foram observados efeitos ( $p < 0,05$ ) nas dietas suplementados com a enzima fitase. O estudo demonstrou que houve redução da atividade da enzima na forma granulada adicionada antes do processamento, melhora no desempenho, aumento da concentração fósforo plasmático, composição química da carcaça para proteína bruta, extrato etéreo, cinzas e retenção de fósforo nas vértebras nos tratamentos suplementados com fitase líquida adicionada após a extrusão nos níveis de 1500 e 3000 UFA/kg para juvenis de tilápia do Nilo.

**Palavras-chave:** fitato, suplementação, nutrição, piscicultura.

## **The enzyme phytase evaluation in diets based on plant sources in feeding of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

### **ABSTRACT**

With the expansion of aquaculture have been prioritized the proper balance of feed that increase productivity and reduce environmental impact. Phosphorus is a mineral that participates in several important physiological and metabolic functions in fish nutrition. In ingredients of plant origin is partially complexed phytate as little available. The addition of phytase in feed can reduce the need for addition of this mineral in fish diets can minimize the discharge of this effluent in fish farming. The objective of this study was to evaluate the effect of phytase at different levels and forms (granulated and liquid) in the productive performance of Nile tilapia. 600 juveniles were used in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reversed for males, with average weight of  $11.72 \pm 2.21$ g and initial length of  $9.46 \pm 0.64$  cm, in a completely randomized design with six treatments and five replicates. Fish were distributed in 30 polythene containers with a volume of 300 liters. The experimental diets were isoenergetic with 3100 kcal/kg of digestible energy and isonitrogenous with 28% crude protein, supplemented with different levels and forms of phytase (granular and liquid), being added before and after extrusion, T1 - negative control (diet without inorganic phosphate and without addition of phytase), T2 - Positive Control (inorganic phosphate diet with and without addition of phytase), T3 - Diet with Phytase granulated (1500 UFA / kg) is added before extrusion, T4 - Diet with Phytase granulated (3000 UFA / kg) is added before extrusion, T5 - Liquid Diet with Phytase (1500 UFA / kg) is added after extrusion and T6 - Liquid Diet with Phytase (3000 UFA / kg) is added after extrusion. The fish were fed twice a day (8 and 17h) *ad libitum* for a period of 64 days. The parameters analyzed were: growth performance, blood plasma, phosphorus retention in the vertebrae and chemical composition of the carcass. The data were submitted to ANOVA, and later held the multiple comparison test of Tukey average ( $p < 0.05$ ). At the end of the experimental period effects were observed ( $p < 0.05$ ) in the diets supplemented with phytase enzyme. The study showed that there was a reduction of enzyme activity in granulated form added before processing, improved performance, increased serum phosphorus concentration, chemical composition of housing for crude protein, ether extract, ash and phosphorus retention in the vertebrae in the supplemented treatments liquid phytase added after extrusion in the levels of 1500 and 3000 UFA / kg for juvenile Nile tilapia.

**Keywords:** phytate, supplementation, nutrition, pisciculture.

Dissertação elaborada conforme as normas da  
ABNT, disponível em:  
<<http://www.campuspalotina.ufpr.br/sites/default/files/RefABNT.pdf>>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios dos parâmetros de qualidade da água durante os 64 dias de experimento. ....	15
Tabela 2 - Ingredientes e níveis nutricionais analisados nas rações testadas. Valores expressos em 100% da matéria original. ....	16
Tabela 3 - Atividade de fitase analisada em cada dieta experimental. ....	20
Tabela 4 - Valores de Desempenho produtivo de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ), submetidas a uma dieta isoenergética 3100 Kcal/kg de ED e isoprotéica 28% PB sobre diferentes níveis de fitase granulada e líquida. ....	20
Tabela 5 - Concentração de fósforo no plasma e nas vértebras. ....	21
Tabela 6 - Composição centesimal das carcaças com base na matéria seca de juvenis de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) em função dos níveis de suplementação de fitase na dieta. .	21

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2.1 Objetivos Específicos.....	14
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
3.1 Acondicionamento e manejo dos peixes.....	14
3.2 Parâmetros de qualidade de água.....	15
3.3 Preparo e composição das dietas .....	15
3.4 Análise de desempenho zootécnico .....	17
3.5 Análise do plasma sanguíneo.....	18
3.6 Análise de fósforo nas vértebras .....	19
3.7 Análise Estatística.....	19
<b>4 RESULTADOS</b> .....	19
4.1 Atividade da enzima fitase adicionada antes e após o processamento da ração.....	19
4.2 Desempenho zootécnico .....	20
4.3 Fósforo plasmático e nas vértebras.....	21
4.4 Composição da carcaça.....	21
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	22
5.1 Atividade da enzima fitase adicionada antes e após o processamento da ração.....	22
5.3 Desempenho zootécnico .....	24
5.4 Fósforo Plasmático e nas vértebras.....	26
5.5 Composição da carcaça.....	28
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	30

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas cinco décadas a produção de peixes aumentou de forma considerável, a uma taxa anual de 3,2%, ultrapassando o crescimento da população mundial de 1,6% (FAO, 2014). Segundo MPA (2011) a produção de pescado nacional para o ano de 2011 foi de 1.431.974,4 t, registrando-se um incremento de aproximadamente 13,2% em relação ao ano de 2010.

A criação de tilápias representa 39% da produção da piscicultura continental brasileira, destacando-se a região Nordeste como maior produtor com cerca de 37,88% (MPA, 2011). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) destaca-se na piscicultura continental por apresentar características desejáveis, como facilidade de manejo, resistência às mudanças ambientais, alta aceitação no mercado consumidor e alta taxa de crescimento, além de permitir a utilização de elevadas porcentagens de ingredientes de origem vegetal, fato que torna a tilapicultura a mais consolidada das criações de peixes do Brasil (ZIMMERMANN; HASPER, 2003; FURUYA et al., 2010).

Nos sistemas de produção de peixes a alimentação representa mais de 50% do custo operacional (EL-SAYED, 1999). Dentre os ingredientes mais utilizados destacam-se os de origem animal, e normalmente as fontes de proteína de origem animal possuem elevada relação P:N (TEIXEIRA et al., 2006). Assim, com o aumento da pressão sobre a necessidade de reduzir a poluição aquática, têm-se priorizado pesquisas com o objetivo de diminuir as excreções de nitrogênio (N) e fósforo (P) que são considerados os principais responsáveis pela eutrofização do ambiente aquático (FURUYA et al., 2005).

Com a expansão da aquicultura observa-se a busca pela otimização nas formulações de rações, crescendo o número de pesquisas sobre exigências nutricionais (BOMFIM et al., 2010; SIGNOR et al., 2010), substituição de fontes alimentares (MELO et al., 2012; SILVA et al., 2014) e utilização de enzimas exógenas que atuam aumentando a biodisponibilidade de alguns nutrientes (PORTZ et al., 2003; SILVA et al., 2007), melhorando o desempenho produtivo e reduzindo os impactos ambientais (ROCHA et al., 2008; MELO et al., 2012).

O fósforo é um mineral exigido para manutenção de diversas funções metabólicas, produtivas e fisiológicas. Na dieta a concentração de P inorgânico deve atender as exigências necessárias para o desempenho adequado, sem afetar a qualidade da água de produção (ROCHA et al., 2010; DIEMER et al., 2011). A maior parte dos ingredientes utilizados em rações para peixes são de origem vegetal onde o P ocorre principalmente na forma

complexada de fitato (hexafosfato de inositol) pouco disponível para animais monogástricos, devido à ausência da enzima fitase (COSTA et al., 2007).

Assim, um dos principais problemas que limitam a utilização de ingredientes de origem vegetal em nutrição de peixes é a presença do fitato (CAO et al., 2007), que além de apresentar baixa disponibilidade, também pode ser considerado um fator antinutricional, pois atua como quelante de diversos cátions bivalentes dentre eles Ca, Fe, Mg, Zn (SUREK et al., 2008). Este composto orgânico possui um grupo ortofosfato altamente ionizado que se complexa com uma variedade de cátions, como o cálcio (Ca), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e magnésio (Mg) e a fração protéica do alimento, formando complexos insolúveis, diminuindo a energia metabolizável da ração devido a influencia negativa na digestão dos nutrientes (KESHAVARZ, 1999; LUDKE et al., 2001). Portanto, devido à baixa disponibilidade de fósforo nos ingredientes de origem vegetal, este mineral é adicionado em forma de fosfato dicálcico (DCP) ou fosfato monocálcico (MCP) em rações para atender a exigência de fósforo dos peixes (HUNG et al., 2015).

O uso da enzima fitase em rações contendo ingredientes de origem vegetal é tema de vários estudos, com o objetivo de aumentar a disponibilidade dos nutrientes e diminuir a excreção de P e N no ambiente aquático. De acordo com Denstadli et al. (2007) e Souza (2008) a enzima fitase age sobre o fitato destruindo as ligações químicas de fósforo, proporcionando maior disponibilidade para ser absorvido no intestino. A atividade da enzima fitase é expressa em UFA (unidade de fitase ativa), sendo 1 UFA a quantidade de fósforo inorgânico liberado ( $\mu\text{mol}$ ) no período de um minuto de reação numa solução de fitato de sódio na concentração de  $5,1 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 5,5 e temperatura de  $37^\circ\text{C}$  (ENGELLEN et al., 1994).

A inclusão de fitase em rações deve passar por manuseio adequado devido à sua estabilidade a altas temperaturas, pois o tratamento térmico pode destruir o seu efeito. A enzima pode ser incluída em rações para peixes na forma de pó, granulada ou líquida, adicionada antes ou após o processamento. A adição pós-processamento pode evitar problemas de termoestabilidade a temperaturas elevadas de revestimento ( $>80^\circ\text{C}$ ) (CAO et al., 2007). Devido ao problema de inativação da enzima fitase durante o processamento das rações, há necessidade de se comparar a inclusão e ação desta enzima na forma granulada e líquida antes e depois do processamento, respectivamente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da suplementação da enzima fitase no desempenho zootécnico de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em rações contendo ingredientes de origem vegetal.

#### 2.2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar e comparar a influência da suplementação de diferentes níveis de fitase granulada e líquida no desempenho produtivo da espécie;
- Determinar se houve redução da atividade da enzima fitase após o processo de extrusão;
- Verificar a retenção de fósforo plasmático e nas vértebras;
- Caracterizar o efeito da suplementação de fitase na composição da carcaça.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Acondicionamento e manejo dos peixes

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Peixes da Universidade Federal do Paraná-UFPR-Setor Palotina, entre os meses de setembro a novembro de 2014, tendo duração total de 64 dias.

Foram utilizados 600 juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidos sexualmente para machos, com peso inicial médio de  $11,72 \pm 2,21$ g e comprimento inicial médio de  $9,46 \pm 0,64$  cm, adquiridos de piscicultores da região. Antes do período experimental os peixes passaram por um período de 10 dias de adaptação nas unidades experimentais. Os peixes foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições, utilizando como unidades experimentais 30 caixas de polietileno com volume útil de 300 litros, em sistema de recirculação com

filtragem biológica, aeração individual constante e fotoperíodo natural, totalizando assim 20 peixes por unidade experimental.

### 3.2 Parâmetros de qualidade de água

A temperatura foi mensurada duas vezes ao dia por meio de termômetro digital (INCOTERM<sup>®</sup> modelo 6132). O oxigênio foi aferido diariamente por meio de oxímetro (ALFAKIT<sup>®</sup> modelo AT 170). O pH foi determinado semanalmente através de pHmetro digital portátil (ALFAKIT<sup>®</sup> modelo AT 315). Os tanques foram sifonados semanalmente de acordo com a necessidade e as análises de amônia, nitrito, alcalinidade e dureza foram realizadas semanalmente seguindo metodologias descritas respectivamente por APHA (1980) e BOYD (1982). Os valores médios de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia e nitrito estão apresentados na tabela 1. Através da análise da qualidade da água foi possível observar que está permaneceu dentro da faixa adequada para o desenvolvimento da espécie em estudo (SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

Tabela 1 - Valores médios dos parâmetros de qualidade da água durante os 64 dias de experimento.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP</b>
<b>Temperatura (°C)</b>	27,04 ± 1,76
<b>Oxigênio dissolvido (mg/L)</b>	7,42 ± 0,56
<b>pH</b>	7,36 ± 0,63
<b>Amônia total</b>	0,03 ± 0,03
<b>Nitrito</b>	0,08 ± 0,18
<b>Alcalinidade</b>	71,25 ± 5,99
<b>Dureza</b>	70,00 ± 23,98

\*Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.

### 3.3 Preparo e composição das dietas

As rações foram formuladas com auxílio do programa WinFumi 4 da empresa HYBRIMIN<sup>®</sup>, constituídas a base de farelo de milho e farelo de soja e formuladas de modo a conter diferentes níveis de fitase (Natuphos<sup>®</sup> – BASF), granulada e líquida na seguinte ordem:

- T<sub>1</sub> – Controle negativo (dieta sem fosfato inorgânico e sem adição de fitase);
- T<sub>2</sub> – Controle positivo (dieta com fosfato inorgânico e sem adição de fitase);
- T<sub>3</sub> – Dieta com fitase granulada (1500 UFA/kg) adicionada antes da extrusão;

- T<sub>4</sub> – Dieta com fitase granulada (3000 UFA/kg) adicionada antes da extrusão;
- T<sub>5</sub> – Dieta com fitase líquida (1500 UFA/kg) adicionada após a extrusão;
- T<sub>6</sub> – Dieta com fitase líquida (3000 UFA/kg) adicionada após a extrusão.

As dietas experimentais utilizadas nesse estudo foram isoenergéticas 3100 kcal/kg de energia digestível (ED) de acordo com Boscolo et al., (2006) e isoproteicas com 28% de proteína bruta. As dietas foram submetidas a análises bromatológicas para determinação da matéria seca, matéria mineral, extrato etéreo e proteína bruta (Tabela 1). As análises de atividade enzimática da fitase nas rações foram realizadas segundo metodologia descrita por Engelen et al. (1994) por HPLC e espectrofotometria de absorção atômica no laboratório da CBO (BASF®) em Campinas-SP.

Tabela 2 - Ingredientes e níveis nutricionais analisados nas rações testadas. Valores expressos em 100% da matéria original.

Ingredientes	Níveis de Fitase (UFA/kg)					
	T <sub>1</sub> Controle Negativo	T <sub>2</sub> Controle Positivo	T <sub>3</sub> (1500UFA/k) Granulada	T <sub>4</sub> (3000UFA/k) Granulada	T <sub>5</sub> (1500UFA/kg) Líquida	T <sub>6</sub> (3000UFA/g) Líquida
<b>Farelo de milho</b>	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6
<b>Farelo de soja</b>	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6	46,6
<b>Óleo de soja</b>	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
<b>Metionina</b>	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
<b>Premix®<sup>a</sup></b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>NaCl</b>	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
<b>Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
<b>Amido de milho</b>	2,00	0,00	1,97	1,95	1,99	1,97
<b>Fitase</b>	0,00	0,00	0,03	0,06	0,01	0,02
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Composição em nutrientes						
<b>Proteína Bruta</b>	28,17	28,02	27,92	28,59	27,81	27,68
<b>Extrato etéreo</b>	4,16	4,18	4,28	4,61	4,60	4,61
<b>Umidade</b>	7,97	9,48	8,05	8,93	8,32	7,97
<b>Matéria Mineral</b>	5,77	6,25	6,47	4,97	5,40	5,47
<b>Cálcio</b>	0,59	0,55	0,58	0,60	0,54	0,55
<b>Fósforo Total</b>	0,42	0,75	0,43	0,39	0,41	0,39

\*T<sub>1</sub> Controle negativo (sem fosfato inorgânico e sem fitase), T<sub>2</sub> Controle positivo (com fosfato inorgânico e sem adição de fitase)

<sup>a</sup>Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.750.000UI; Vit. D3, 375.000UI; Vit. E, 20.000UI; Vit. K3, 500mg; Vit. B1, 2.000mg; Vit. B2, 2.500mg; Vit. B6, 2.500mg; Vit. B12, 5.000mg; Ác. Fólico, 625mg; Pantotenato Ca, 7.500mg; Vit. C, 37.500mg; Biotina, 50mg; Inositol, 12.500mg; Niacina, 8.750mg; Colina, 100.000mg; Co, 50mg; Cu, 1.250mg; Fe, 15.000mg; I, 100mg; Mn, 3.750mg; Se, 75mg; Zn, 17.500mg.

Os ingredientes foram homogeneizados por meio de um misturador experimental (G.PANIZ<sup>®</sup> modelo BP 12C) com capacidade de 8 kg.h<sup>-1</sup> e a mistura foi processada em extrusora experimental (EXTEEC<sup>®</sup>) com capacidade de produção para 15 kg.h<sup>-1</sup>, utilizando matriz de 3,0 mm. A extrusão foi realizada no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos da UFPR a temperatura de extrusão foi de 75°C. Posteriormente, a secagem foi realizada em estufa de recirculação, a temperatura de 55°C por um período de 24 horas. Em seguida foram retiradas, resfriadas à temperatura ambiente, identificadas conforme cada dieta, ensacadas e armazenadas em refrigerador a 4°C até o uso.

A fitase (Natuphos<sup>®</sup> – BASF) incorporada apresentava concentração de 5000 UFA/g para fitase granulada e 10000 UFA/L para fitase líquida. A forma granulada foi adicionada na mistura dos ingredientes na proporção de 1500 UFA/kg e 3000 UFA/kg. A adição da fitase líquida foi realizada após a extrusão e secagem dos grânulos, diluída em 4 mL de água por quilograma de ração e adicionada por aspersão com bomba manual de acordo com Silva et al. (2007) na proporção de 1500 UFA/kg e 3000 UFA/kg.

O arraçoamento foi realizado em duas refeições diárias às 8:00 e às 17:00 horas *ad libitum*. Durante o período experimental a quantidade de ração foi avaliada semanalmente de modo a realizar os cálculos de conversão alimentar.

#### 3.4 Análise de desempenho zootécnico

No início e no final do experimento os peixes foram pesados em balança analítica (MARTEL<sup>®</sup> AY220) para determinação do comprimento final (CF), ganho de peso (GP), ganho de peso relativo (GDPr), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de eficiência proteica (TEP) e sobrevivência (S). Para obtenção desses índices foram utilizadas as seguintes fórmulas.

$$GP = PF - PI$$

Onde:

GP = Ganho de peso (g);

PF = Peso final (g);

PI = Peso inicial (g).

$$C.A.A = \frac{C.R}{G.P}$$

Onde:

C.A.A = Conversão alimentar aparente;

CR = Consumo de ração;

GP = Ganho de peso.

$$TEP = 100 \times \left( \frac{GP}{PB_c} \right)$$

Onde:

TEP (%) = Taxa de eficiência proteica;

PB<sub>c</sub> = Quantidade de proteína consumida.

$$TCE = 100 \times \frac{(\ln PF) - (\ln PI)}{PER}$$

Onde:

TCE (%) = Taxa de crescimento específico;

PER = Período experimental.

ln = Logaritmo neperiano.

Para a pesagem final os animais foram anestesiados com Eugenol<sup>®</sup> (solução de óleo de cravo) na dose de 150 mg.L<sup>-1</sup> de acordo com Simões et al. (2012). Posteriormente 5 peixes de cada tratamento foram eutanasiados, separados e moídos inteiros para análise da composição química da carcaça, seguindo metodologia em AOAC (2000). As análises de umidade (UM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM) na carcaça foram realizadas no laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos - LQA, da UNIOESTE, Toledo-PR, de acordo com os protocolos aprovados pela AOAC (1999). O conteúdo de PB dos ingredientes das dietas foi analisado pelo método micro-kjeldahl. O teor de lipídios foi determinado pela extração com éter de petróleo, pelo método Soxhlet.

### 3.5 Análise do plasma sanguíneo

Os peixes foram mantidos em jejum por período de 12 horas antes da realização da biometria final. Após a biometria os peixes foram encaminhados para coleta de sangue, utilizando seringas de 1 ml com agulhas heparinizadas (0,60 x 25mm). Foram coletados 500 µl de sangue por punção do vaso caudal, de três peixes de cada unidade experimental, totalizando 15 peixes por tratamento. Após a coleta, o sangue foi centrifugado sob refrigeração a 13.000 rpm por 10 minutos para separação do plasma e em seguida armazenado

a -20°C. A análise de fósforo plasmático foi realizada por espectrofotometria em analisador bioquímico automático modelo (MINDRAY BS120) utilizando um kit comercial de fósforo UV (BIOTÉCNICA®).

### 3.6 Análise de fósforo nas vértebras

A análise de retenção de fósforo nas vértebras foi realizada em triplicata pelo método de calorimetria do metavanadato por digestão nitro-perclórica de acordo com metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). Os peixes foram sacrificados e em seguida submetidos à cocção em forno de micro-ondas, retirando-se cuidadosamente a coluna vertebral e em seguida estas foram lavadas com água deionizada para remoção de tecido residual.

### 3.7 Análise Estatística

Para análise estatística, os dados foram submetidos à verificação de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Lilliefors e verificação de homogeneidade pelo teste de Levene. Quando essas duas exigências foram cumpridas, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para determinar diferenças estatísticas entre os tratamentos, utilizando o software *Statística*®, versão 7.0 (Statsoft, 2004).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Atividade da enzima fitase adicionada antes e após o processamento da ração.

Os resultados da atividade da enzima na forma granulada e líquida adicionada antes e após a extrusão, respectivamente, estão apresentados na tabela 3. Os tratamentos controle negativo e positivo apresentaram atividade de fitase nativa menor que 100 UFA/kg, o mesmo foi verificado no tratamento 3, com a suplementação de 1500 UFA/kg na forma granulada adicionada antes da extrusão. O tratamento 4, contendo 3000 UFA/kg granulada, também sofreu redução na atividade enzimática devido ao tratamento térmico, porém a atividade foi maior do que no tratamento 3. Os tratamentos 5 e 6, suplementados com fitase líquida após a extrusão, não sofreram redução da atividade enzimática.

Tabela 3 - Atividade de fitase analisada em cada dieta experimental.

Dietas	Atividade total de fitase (UFA <sup>a</sup> /kg)
T <sub>1</sub> - Controle negativo	<100
T <sub>2</sub> - Controle positivo	<100
T <sub>3</sub> - 1500 UFA/kg granulada	<100
T <sub>4</sub> - 3000 UFA/kg granulada	140
T <sub>5</sub> - 1500 UFA/kg líquida	1650
T <sub>6</sub> - 3000 UFA/kg líquida	2720

<sup>a</sup>Unidade de fitase ativa.

#### 4.2 Desempenho zootécnico

A sobrevivência dos peixes não foi afetada pela suplementação de fitase na dieta. Os valores de peso final, comprimento final, ganho de peso, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência proteica e conversão alimentar aparente, estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Valores de Desempenho produtivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidas a uma dieta isoenergética 3100 Kcal/kg de ED e isoprotéica 28% PB sobre diferentes níveis de fitase granulada e líquida.

Parâmetros	Valores de fitase granulada e líquida UFA <sup>a</sup> /kg					
	Controle		Granulada		Líquida	
	T <sub>1</sub> Controle Negativo	T <sub>2</sub> Controle Positivo	T <sub>3</sub> 1500(UFA/kg) Granulada	T <sub>4</sub> 3000(UFA/kg) Granulada	T <sub>5</sub> 1500(UFA/kg) Líquida	T <sub>6</sub> 1500(UFA/kg) Líquida
PF (g)	34,8 ± 2,7 <sup>ab</sup>	42,5 ± 3,5 <sup>a</sup>	32,8 ± 1,9 <sup>b</sup>	35,8 ± 7,4 <sup>ab</sup>	35,9 ± 3,9 <sup>ab</sup>	35,3 ± 3,5 <sup>ab</sup>
CF (cm)	12,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	13,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	12,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	12,4 ± 0,7 <sup>b</sup>	12,5 ± 0,4 <sup>ab</sup>	12,4 ± 0,2 <sup>b</sup>
GPA (g)	23,1 ± 2,7 <sup>ab</sup>	30,8 ± 3,5 <sup>a</sup>	21,0 ± 1,9 <sup>b</sup>	24,0 ± 7,4 <sup>ab</sup>	23,5 ± 3,9 <sup>ab</sup>	23,6 ± 3,5 <sup>ab</sup>
TCE (%)	1,7 ± 0,12 <sup>ab</sup>	2,0 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,7 ± 0,31 <sup>ab</sup>	1,7 ± 0,17 <sup>ab</sup>	1,7 ± 0,15 <sup>ab</sup>
TEP (%)	8,9 ± 1,0 <sup>ab</sup>	11,9 ± 1,4 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,5 <sup>b</sup>	9,7 ± 2,9 <sup>ab</sup>	9,0 ± 1,5 <sup>ab</sup>	9,1 ± 1,40 <sup>ab</sup>
CAA (g/g)	1,3 ± 0,1 <sup>ab</sup>	1,1 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>ab</sup>	1,3 ± 0,06 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>Unidade de fitase ativa.

\* Valores médios comparados pelo teste de Tukey (p<0,05), referente ao Peso Final (PF), Comprimento Final (CF), Ganho de Peso Aparente (GPA), Taxa de Crescimento Específico (TCE), Taxa de Eficiência Proteica (TEP), e Conversão Alimentar Aparente (CAA).

Os parâmetros de peso final, comprimento final, ganho de peso, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência proteica e conversão alimentar aparente no tratamento 2 com

adição de fósforo inorgânico (controle positivo) apresentaram os melhores resultados, em relação aos outros tratamentos. O tratamento 3 apresentou os menores resultados para os parâmetros avaliados. Para os tratamentos 1, 4, 5 e 6 os parâmetros peso final, ganho de peso médio, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência proteica não diferiram estatisticamente. Para os resultados de conversão alimentar aparente os tratamentos com fitase granulada apresentaram os piores resultados.

#### 4.3 Fósforo plasmático e nas vértebras.

Os valores de fósforo (P) no plasma e nas vértebras estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Concentração de fósforo no plasma e nas vértebras

Tratamentos	Concentração mg/dL	Vértebras (%)
T <sub>1</sub> – Controle negativo*	16,5 ± 1,9 <sup>b</sup>	0,61 ± 0,05 <sup>b</sup>
T <sub>2</sub> – Controle positivo*	18,7 ± 3,2 <sup>b</sup>	0,90 ± 0,03 <sup>a</sup>
T <sub>3</sub> – 1500 UFA/kg granulada	17,4 ± 3,5 <sup>b</sup>	0,64 ± 0,03 <sup>ab</sup>
T <sub>4</sub> – 3000 UFA/kg granulada	26,8 ± 2,6 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,07 <sup>ab</sup>
T <sub>5</sub> – 1500 UFA/kg líquida	28,1 ± 4,1 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,18 <sup>ab</sup>
T <sub>6</sub> – 3000 UFA/kg líquida	25,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,01 <sup>ab</sup>

\*T<sub>1</sub> Controle negativo (sem fosfato inorgânico e sem fitase), T<sub>2</sub> Controle positivo (com fosfato inorgânico e sem fitase).

\*Valores médios comparados pelo teste Tukey (p<0,05), referente à quantidade de fósforo plasmático e nas vértebras.

O tratamento 1, 2 e 3 apresentaram os menores valores de P no plasma. Os maiores resultados foram encontrados nos tratamentos 5 seguido do tratamento 4 e 6 respectivamente. Entre esses tratamentos não houve diferenças estatísticas apenas numéricas.

A concentração de P nas vértebras foi menor no tratamento 1. Os tratamentos suplementados com fitase apresentaram aumento na concentração de P nas vértebras. Apesar da concentração desse mineral nas vértebras não diferirem estatisticamente entre si, a forma líquida apresentou maior retenção de P nas vértebras com valores próximos ao encontrado no tratamento 2 controle positivo.

#### 4.4 Composição da carcaça

Os valores de proteína bruta, extrato etéreo e cinzas na carcaça dos peixes alimentados com dietas contendo diferentes níveis de fitase granulada e líquida adicionada antes e após a extrusão, respectivamente, estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Composição centesimal das carcaças com base na matéria seca de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em função dos níveis de suplementação de fitase na dieta.

Variáveis	Valores de fitase granulada e líquida UFA <sup>3</sup> /kg
-----------	--

	Controle		Granulada		Líquida	
	T <sub>1</sub> Controle Negativo	T <sub>2</sub> Controle Positivo	T <sub>3</sub> 1500(UFA/kg) Granulada	T <sub>4</sub> 3000(UFA/kg) Granulada	T <sub>5</sub> 1500(UFA/kg) Líquida	T <sub>6</sub> 3000 (UFA/kg) Líquida
<b>Proteína Bruta</b>	52,63±3,73 <sup>b</sup>	65,23± 2,25 <sup>a</sup>	62,14±6,13 <sup>a</sup>	58,26±4,97 <sup>ab</sup>	65,42±6,06 <sup>a</sup>	67,28±3,95 <sup>a</sup>
<b>Extrato Etéreo</b>	22,29±1,67 <sup>b</sup>	23,58±2,89 <sup>ab</sup>	24,79±2,59 <sup>ab</sup>	26,98±2,78 <sup>a</sup>	25,99±1,87 <sup>ab</sup>	25,26±2,12 <sup>ab</sup>
<b>Cinzas</b>	9,95±0,59 <sup>c</sup>	14,82±1,45 <sup>a</sup>	11,67±0,71 <sup>bc</sup>	11,35±1,76 <sup>bc</sup>	12,14±0,69 <sup>bc</sup>	12,74±1,19 <sup>ab</sup>
<b>Umidade</b>	69,34±4,68 <sup>b</sup>	73,98±1,76 <sup>a</sup>	73,59±2,03 <sup>a</sup>	71,30±5,83 <sup>ab</sup>	73,22±2,34 <sup>a</sup>	74,25±1,28 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas do desvio-padrão

Os melhores resultados para proteína e umidade na carcaça foram registrados nos tratamentos 2, 3, 5 e 6. No tratamento 3 houve redução da atividade de fitase devido ao processamento térmico, porém este apresentou maior retenção de proteína na carcaça quando comparado ao tratamento 4 que apresentou maior atividade da enzima após a extrusão (Tabela 6).

A menor deposição de extrato etéreo na carcaça foi observada no tratamento 1, e aumentou, nos outros tratamentos. A maior deposição de gordura foi observada no tratamento 4, reduzindo nos tratamentos 2, 3, 5 e 6. As cinzas na carcaça foi maior no tratamento 2 (controle positivo), 6 foi o segundo tratamento com maior retenção de cinzas no corpo inteiro. Os tratamentos 3, 4 e 5 não diferiram entre si.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Atividade da enzima fitase adicionada antes e após o processamento da ração.

A fitase, ou mioinositol-hexafosfato fosfohidrolase, pertence ao grupo das fosfatases de histidina que hidrolisam o fitato para mioinositol e ácido ortofosfato, necessário para o processo metabólico celular (STOREBAKKEN et al., 1998). Na natureza é encontrada nas sementes, plantas, fungos, bactérias, leveduras e microorganismos do rúmen (CAO et al., 2007). Alguns alimentos são ricos em fitase tais como farelo de trigo e de arroz, porém os ingredientes mais utilizados na fabricação de rações como o farelo de soja e de milho, contém pouca ou nenhuma atividade (SELLE, 1997).

O processo de extrusão das rações pode desnaturar a enzima devido às altas temperaturas, fazendo com que essa perca sua atividade catalítica (KORNEGAY, 2001). No presente trabalho fica evidente que o processamento térmico reduziu a atividade enzimática, nos tratamentos 3 e 4 com fitase granulada adicionada antes da extrusão (Tabela 3). Heinzl

(1996) demonstrou que a fitase microbiana é estável a um amplo limite de temperatura e que sua atividade máxima é próxima a 60°C. Segundo Jermutus et al. (2001) para a maioria das fitases, o pH ótimo encontra-se em 4,5-6,0 e a temperatura em torno de 45-60 °C.

No presente estudo a temperatura de extrusão foi de 75°C o que justifica a desnaturação da enzima na forma granulada adicionada antes do processamento térmico. Naves et al. (2012) avaliaram a atividade de fitase de diferentes origens *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes temperaturas e pH, os resultados mostraram que as três enzimas foram inativadas em temperatura acima de 60°C.

Ramos et al. (2012) avaliaram o efeito da atividade da fitase de *Aspergillus niger* 11T53A9 submetida a temperatura de 50°C, armazenamento sob refrigeração (3,6°C) e congelamento (-16°C) e observaram que a fitase permaneceu estável a temperatura de 3,6°C e -16°C por seis meses e manteve 86% de sua atividade após 24 horas na temperatura de 50°C.

A adição da enzima na forma líquida é uma alternativa que vem sendo utilizada para evitar a perda de atividade da fitase em temperaturas elevadas, principalmente no processo de extrusão. Geralmente a adição é realizada através de mistura da enzima concentrada com um estabilizante, em seguida esta é pulverizada na dieta já extrusada ou peletizada (KUMAR et al., 2011). A inclusão de fitase em rações deve passar por manuseio adequado devido à estabilidade da enzima a altas temperaturas. O tratamento térmico pode destruir o efeito da fitase.

A enzima pode ser incluída em rações para peixes na forma de pó, granulada ou líquida, adicionada antes ou após o processamento, a adição pós-processamento pode evitar problemas de termoestabilidade a temperaturas elevadas de revestimento (>80°C) (CAO et al., 2007). A estabilidade da enzima fitase é afetada por altas temperaturas, quando condicionadas em temperaturas a 50°C e extrusão a 78°C a atividade da enzima se mantém em 96%, entretanto com o aumento da temperatura para 60 e 87°C, respectivamente, a estabilidade pode ser reduzida a 54% (SIMONS et al., 1990). Este trabalho compara a adição da enzima fitase granulada antes do processo de extrusão e a adição da fitase líquida após o processamento, para testar a estabilidade da enzima sob temperaturas elevadas.

De acordo com os resultados a inclusão da fitase na forma líquida adicionada após a extrusão seria uma alternativa viável, podendo está ser adicionada em menores quantidades.

### 5.3 Desempenho zootécnico

A adição de fitase em rações elaboradas com ingredientes de origem vegetal pode permitir melhor aproveitamento de nutrientes como proteínas, aminoácidos entre outros, melhorando assim o desempenho do peixe e reduzindo a excreção de fósforo no meio ambiente (FURUYA et al., 2001; YAN et al., 2002).

A suplementação de fitase na dieta no presente experimento não interferiu na taxa de sobrevivência (S) dos juvenis de tilápia do Nilo, comprovando que os níveis utilizados de suplementação não apresentaram efeito negativo sobre essa variável. Resultado semelhante foi observado por Bock et al. (2006) para tilápia do Nilo.

No presente estudo a adição de 1500 UFA/kg granulada adicionada antes do processamento apresentou os piores resultados de desempenho produtivo, devido à redução da atividade da enzima quando submetida ao tratamento térmico. Resultados semelhantes foram encontrados por Melo et al. (2012), que não observaram melhora no desempenho produtivo de alevinos de tilápia do Nilo utilizando nível de até 2000 UFA/kg, na forma granulada adicionada antes da peletização. Para juvenis de tilápia do Nilo, Silva et al. (2007) observaram melhora no desempenho produtivo com a concentração de 500 UFA/kg na forma líquida adicionada após a extrusão.

Neste estudo foi observado que o tratamento térmico, provocado pelo processo físico de extrusão, reduziu significativamente a atividade da enzima quando incorporada a dieta na forma granulada nos tratamentos 3 e 4. Este fato pode explicar os melhores valores de desempenho produtivo observados em todos os parâmetros avaliados, porém foram significativamente iguais entre a fitase granulada com maior concentração (tratamento 4) e os tratamentos com fitase líquida nas diferentes dosagens. Assim, a adição de fitase granulada antes do processamento não é viável, e a adição de fitase líquida é eficaz quando adicionada pós-processamento podendo ser adicionada em menores concentrações. No entanto é necessário mais estudos com adição de fitase líquida com menor dosagem para avaliar melhor o efeito econômico.

Para efeito de conversão alimentar, os melhores resultados foram observados nos tratamentos controle positivo com suplementação de fósforo inorgânico (altamente absorvível), seguido pelos tratamentos 1500 e 3000 UFA/kg com fitase líquida. Como inclusão alternativa de fitase granulada, resultados semelhantes foram observados por Bock et al. (2007), utilizando concentrações de fitase de 1000, 1500 e 2000 UFA/kg dissolvida em água destilada e borrifada após a peletização em estudos com tilápia do Nilo. Estes autores

não encontraram resultados positivos para ganho de peso e conversão alimentar dos peixes alimentados com rações contendo fitase.

Liebert e Portz (2005), avaliando a eficiência da fitase sobre a utilização de nutrientes para tilápia do Nilo em dietas com concentrações 500, 750, 1000 e 1250 UFA/kg na forma granulada adicionada antes da peletização, encontraram resultados significativos ( $p < 0,05$ ) para taxa de crescimento específico, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica, com o nível de 750 UFA/kg. No presente estudo não foi observado diferenças na taxa de crescimento específico entre os tratamentos, o mesmo foi observado por Signor et al. (2010) avaliando um complexo enzimático contendo fitase granulada adicionada antes da peletização sobre o desempenho de juvenis de tilápia do Nilo.

Rocha et al. (2008) avaliando concentrações de 500 e 1500 UFA/kg granulada adicionada antes da peletização para juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) não encontraram efeitos positivos para desempenho da espécie. Rocha et al. (2010) em estudos com alevinos de carpa húngara (*Cyprinus carpio*) com níveis de 500, 1000 e 1500 UFA/kg na forma granulada adicionada antes da peletização, observaram que os níveis de fitase não proporcionaram melhora no desempenho dos peixes.

Utilizando a espécie tambaqui (*Colossoma macropomum*) Mendonça et al. (2012) compararam as doses de 700, 1400, 2100 e 2800 UFA/kg granulada adicionada antes da peletização e obtiveram efeito positivo sobre o desenvolvimento dos juvenis a partir da dose estimada de 1540 UFA/kg. A atividade da enzima pode ser reduzida com o processo de extrusão, porém mesmo em pequenas quantidades pode influenciar no desempenho do animal. Os resultados de desempenho podem ser positivos com baixas doses de fitase na dieta desde que está seja adicionada após o processamento. Apesar de bons resultados com a utilização de fitase em rações peletizadas, seu uso é limitado quando comparado às rações extrusadas que é a forma mais frequentemente comercializada, por isso são necessários mais estudos com a inclusão da enzima em rações extrusadas.

É importante que o manuseio da fitase tenha rígidos controles na sua inclusão na mistura e processamento da ração, pois sem esses cuidados o efeito da enzima estará comprometido e não terá qualquer ação sobre o desempenho e absorção dos minerais. Esta teoria foi confirmada com os resultados do presente estudo, pois quando comparada a enzima na forma granulada antes do processamento os resultados mostraram que houve desnaturação da enzima, o que não foi observado com a suplementação de fitase líquida pós-processamento que se manteve estável e conservada.

#### 5.4 Fósforo Plasmático e nas vértebras

A concentração normal de fósforo total sanguíneo é de aproximadamente 40 mg/dL, como fosfolipídios das células vermelhas e lipoproteínas do plasma (QUINTERO-PINTO, 2008). Segundo Da Silva e Cozzolino (2007), aproximadamente 3,1 mg/dL se concentra na forma de fósforo inorgânico.

A retirada do sangue no presente estudo foi realizada 12 horas após a alimentação, apresentando os melhores resultados as dietas contendo 1500 UFA/kg de fitase líquida adicionada após a extrusão, seguido da dieta com 3000 UFA/kg de fitase granulada adicionada antes do processamento térmico e 3000 UFA/kg de fitase líquida. A dieta contendo 3000 UFA/kg granulada sofreu redução da atividade da enzima devido ao processamento térmico passando a conter apenas 140 UFA/kg. Os resultados mostram que mesmo havendo redução na atividade da fitase, observou-se aumento na concentração de fósforo plasmático.

Os níveis de fósforo plasmático no presente estudo foram superiores aos encontrados por Liebert e Portz (2007) em tilápia do Nilo com níveis de fitase granulada adicionada antes da peletização e inferiores aos encontrados por Sardar et al. (2007) em trabalho realizado com carpa comum (*Cyprinus carpio*) com o nível de 500 UFA/kg granulada adicionada antes da peletização. Apesar dos resultados encontrados serem diferentes, estes seguiram um mesmo padrão quanto ao acúmulo de fósforo no sangue quando comparados diferentes níveis de fitase. Vielma et al. (1998) avaliaram o efeito da fitase no plasma sanguíneo com o nível de 1500 UFA/kg na forma líquida adicionada após a peletização para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e observaram aumento na concentração de fósforo no plasma.

Os resultados obtidos no estudo corroboram com os encontrados por Ferreira (2011) com o nível de 1500 UFA/kg granulada adicionada antes do processamento para juvenis de Jundiá (*Rhamdia quelen*), que não observou aumento na concentração de fósforo no plasma. Nwanna e Schwarz (2008) avaliando o efeito da fitase granulada nos níveis de 500, 750 e 1000 UFA/kg adicionada antes da peletização também não observaram diferenças na concentração de fósforo plasmático em carpa comum. Segundo Lall (2002) a baixa ingestão de fósforo faz com que ocorra baixa absorção desse mineral diminuindo os níveis de fósforo no plasma.

Nos tratamentos sem a suplementação de fitase e com o nível de 3000 UFA/kg granulada adicionada após a extrusão houve redução na concentração de fósforo plasmático, que pode estar relacionado à quantidade de fitato presente nesses tratamentos, Laining et al.

(2010) avaliaram o efeito da suplementação de diferentes níveis de ácido fítico 0; 5,1; 10,4; 13,5 e 20,6 IP6 (g/kg) no desempenho e utilização de nutrientes em juvenis de linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) esses autores relataram que os níveis de fósforo plasmático diminuiu com o aumento do ácido fítico na dieta. Estes resultados evidenciam o efeito negativo do ácido fítico sobre o desempenho dos peixes.

O aumento no teor de fósforo na dieta proporciona aumento desse mineral na estrutura óssea e conseqüentemente o aumento de vários minerais nos ossos (BORLONGAN; SATOH, 2001). Cerca de 99% do cálcio e 80% do fósforo no organismo é encontrado nos ossos e dentes, sendo o esqueleto ósseo considerado um reservatório desses minerais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

No presente estudo houve aumento na concentração de fósforo nos ossos dos peixes alimentados com as dietas contendo fitase, mostrando que a adição da enzima proporcionou maior disponibilidade desse mineral. A suplementação de fitase granulada e líquida aumentou a concentração de fósforo nas vértebras, os tratamentos 3, 4, 5 e 6 mostraram-se semelhantes estatisticamente, porém numericamente os resultados dos tratamentos com a fitase na forma líquida foram mais próximos ao tratamento 2 (com P inorgânico).

Maior retenção de fósforo nos ossos também foi encontrado por Furuya et al. (2005) em tilápia do Nilo na fase de terminação com o nível de 500 UFA/kg granulada adicionada antes da peletização. Silva et al. (2007) em estudo avaliando a inclusão de diferentes níveis de fitase 250, 500 e 1000 UFA/kg na forma líquida adicionada após a extrusão, encontraram resultados positivos com o nível de 500 UFA/kg para retenção de fósforo nos ossos, disponibilidade do fósforo e digestibilidade da proteína em tilápia do Nilo.

O aumento na concentração de fósforo nos ossos também foi obtido por Tudkaew et al. (2008) avaliando diferentes concentrações e fosfato dicálcico e fitase T<sub>1</sub>- tratamento controle sem fosfato e sem fitase, T<sub>2</sub>- 1,5% de fosfato, T<sub>3</sub>- 750 UFA/kg e T<sub>4</sub>- 0,5% de fosfato e 750 UFA/kg na forma granulada após a peletização, encontraram maior retenção de fósforo nos ossos de tilápia vermelha no tratamento contendo somente fitase. Resultados semelhantes também foi relatado por Phromkunthong et al. (2010) em estudo da interação de fitase adicionada na forma granulada após a peletização e ácido cítrico sobre a utilização de fósforo para carpa comum (*Cyprinus carpio*).

Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que houve déficit de fósforo entre os tratamentos com a inclusão de fitase, porém mostrou que a fitase adicionada na forma líquida foi mais eficiente em relação à fitase granulada, proporcionando resultados

semelhantes ao tratamento 2 (com fósforo inorgânico). Talvez menores concentrações de fitase líquida na dieta possam proporcionar maior biodisponibilidade de fósforo para peixes.

### 5.5 Composição da carcaça

Os resultados do presente trabalho mostram que houve aumento na retenção de proteína na carcaça dos peixes alimentados com as dietas contendo fitase líquida, valor próximo encontrado no tratamento controle positivo com a inclusão de fósforo inorgânico (Tabela 6). O aumento da retenção de proteína na carcaça pode ser justificado pela redução do complexo proteína fitato, aumentando a disponibilidade de nutrientes (LIEBERT; PORTZ., 2005).

A suplementação de fitase melhorou a quantidade de cinzas no corpo inteiro dos peixes, a forma líquida com concentração de 3000 UFA/kg mostrou-se mais eficaz assemelhando-se ao tratamento controle positivo (suplementado com P inorgânico). Os tratamentos suplementados com a enzima na forma granulada foram insuficientes para aumentar o teor de cinzas na carcaça dos peixes. Para Hung et al. (2015), a concentração de 1500 UFA/kg granulada adicionada antes da peletização foi suficiente para aumentar a concentração de cinzas no corpo inteiro de catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), nesse estudo a temperatura de peletização não ultrapassou 60°C o que deve ter mantido a atividade da enzima.

Silva et al. (2007) avaliando o efeito da fitase líquida adicionada após a extrusão nos níveis de 250, 500 e 1000 UFA/kg não observaram efeito da fitase sobre os teores de umidade, proteína bruta e cinzas na carcaça de tilápia do Nilo. Resultados semelhantes foram relatados por Bock et al. (2007) com as concentrações de 1000, 1500 e 2000 UFA/kg granulada adicionada após a peletização não influenciou os conteúdos de matéria seca, proteína bruta e lipídios da carcaça de tilápia do Nilo.

No presente experimento houve redução na deposição de lipídios na carcaça dos peixes alimentados com as dietas controle negativo e positivo, fitase granulada 1500 UFA/kg e nos tratamentos com adição de fitase líquida. A menor concentração de lipídios na carcaça dos peixes alimentados com o tratamento controle negativo pode estar associada à presença da fitase nativa, que mesmo havendo deficiência de fósforo pode ter disponibilizado esse mineral através da hidrólise do fitato.

Ferreira (2011) observou redução na deposição de gordura corporal com a inclusão de 1500 UFA/kg, na forma granulada adicionada antes do processamento, porém não

encontraram diferenças nas porcentagens de matéria seca, proteína e cinzas com a inclusão da enzima para juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). A alta deposição de lipídios no corpo inteiro dos peixes alimentados no tratamento 4 pode estar relacionada à deficiência de fósforo nesse tratamento devido à desnaturação da enzima durante a extrusão. Lall (2002) relata que a deficiência em fósforo na dieta pode provocar a inibição da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, o que aumenta a acumulação de lipídios no corpo.

O efeito positivo da inclusão de fitase em dietas para peixes é relatado por alguns autores em diversas espécies como, panga (*Pangasius pangasius*), (DEBNATH et al., 2005); pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (FURUYA et al., 2008); carpa comum (*Cyprinus carpio* L.) (SARDAR et al., 2007), outros autores não encontraram nenhum efeito da inclusão da enzima sobre a umidade, proteína bruta, lipídios e cinzas na carcaça de algumas espécies incluindo red sea bream (*Pagrus major*), (BISWAS et al., 2007); jundiá (ROCHA et al., 2007) e carpa comum (NWANNA; SCHWARZ., 2008). Para a maioria dos estudos a adição da fitase tem sido realizada na forma granulada adicionada antes do processamento, o que pode interferir nos resultado devido à inativação da enzima.

Portanto, a suplementação da enzima fitase na forma líquida adicionada após o processamento parece ser uma alternativa viável para a utilização de fósforo. Com os resultados apresentados concluímos que a indústria deve observar e optar na decisão em utilizar a dosagem e forma de apresentação da enzima, pois testes com esses dois tipos de formas ainda são escassos, e os resultados de desempenho podem ser diferentes quando o processamento térmico afeta a atividade desta enzima.

## **6 CONCLUSÃO**

O estudo demonstrou que houve redução da atividade da enzima na forma granulada adicionada antes do processamento, melhora no desempenho, aumento da concentração fósforo plasmático, composição química da carcaça para proteína bruta, extrato etéreo, cinzas e retenção de fósforo nas vértebras nos tratamentos suplementados com fitase líquida adicionada após a extrusão nos níveis de 1500 e 3000 UFA/kg para juvenis de tilápia do Nilo.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standart methods: for the examination of water and wastewater**. 15.ed. Washington, D.C.: 1980. 1134p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**, 16th edition. AOAC, Washington 1999, DC, USA.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS- AOAC. **Official Methods of Analysis** of AOAC International. 17th. v. II., 2000.
- BISWAS, A.K. et al. Comparison of apparent digestibility coefficient among replicates and different stocking density in red sea bream *Pagrus major*. **Fish. Science**. v.73, 19–26, 2007.
- BOCK, C.L. et al. Fitase e digestibilidade aparente de nutrientes de rações por tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2197-2202, 2006.
- BOCK, C.L. et al. Fitase em rações para tilápia do Nilo na fase de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.1455-1461, 2007.
- BOMFIM, M.A.D. et al. Níveis de lisina, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.39, n.1, p.1-8, 2010.
- BORLONGAN, I.G.; SATOH, S. Dietary phosphorus requirement of juvenile milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal). **Aquaculture Res., Oxford**, v. 32, p. 26-32, 2001.
- BOSCOLO, W.R. Energia digestível para alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira Zootecnia**, v.35, n.3, p.629-633, 2006.
- BOYD, C.E. **Water quality mangement for pond fish culture**. Amsterdam: Elsevier Scientific. Publishing, 1982. pp.730.
- CAO, L. et al. Application of microbial phytase in fish feed. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.497–507, 2007.
- COSTA, F. G. P.; BRANDÃO, P. A.; BRANDÃO, J. S.; SILVA, J. H. V. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciência e agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 865-870, 2007.
- DA SILVA, A.Y.H.; COZZOLINO, S.M.F. **Fósforo**. In: Cozzolino, S.M.F. Biodisponibilidade de nutrientes. 2ª Ed. Manole Interesse Geral: Barueri, SP, 2007. p.447-458.

DEBNATH, D. et al. Mineral status of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings in relation to supplemental phytase: absorption, whole-body and bone mineral content. **Aquacultura Research**, v.36, p.326–335, 2005.

DENSTADLI, V.; STOREBAKKEN, T.; SVIHUS, B.; SKREDE, A. A comparison of online phytase pre-treatment of vegetable feed ingredients and phytase coating in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) reared in cold water. **Aquaculture**, v.269, p.414–426, 2007.

DIEMER, O. et al. Níveis de fósforo total na alimentação de juvenis de jundiá criados em tanques-rede. - *www.agro.ufg.br/pat* - **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 4, p. 559-563, 2011.

EL-SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* **Aquaculture**, v.179, p.149-168, 1999.

ENGELLEN, A.J. et al. **Simple and rapid determination of phytase activity**. J. AOAC Int. 77, 760–764, 1994.

FERREIRA, C.C. **Farelos de arroz desfitinizados na nutrição de jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Santa Maria, 2011. 66f., il. Dissertação (Mestrado em zootecnia)- Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria, , Santa Maria, RS, Brasil. 66p, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, 2014.

FURUYA, W.M. et al. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira Zootecnia**, v.30 p. 1143-1149. 2001.

FURUYA , W.M. et al. Níveis de proteína e fitase em rações de terminação para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivos de ciências veterinárias e zoologia da UNIPAR**, v,8(1): p.11-17, 2005.

FURUYA, W.M. et al. Exigência de fósforo disponível para juvenis de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.9, p.1517-1522, 2008.

FURUYA, W. M. et al. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Ajinomoto Animal Nutrition, São Paulo. 2010. 98p.

HEINZL, W. **Technical specifications of natuphos**. BASF Technical Symposium. World Congress Center. Atlanta Georgia. January 23, p. 39-70, 1996.

HUNG, L. T. et al. A comparison of the effect of dietary fungal phytase and dicalcium phosphate supplementation on growth performances, feed and phosphorus utilization of tra

catfish juveniles (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage, 1878). **Aquaculture Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 10-17, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 1020.

JERMUTUS, L. et al. Structurebased chimeric enzymes as an alternative to directed enzyme evolution: phytase as a test case. **Journal of Biotechnology**, v.85, p. 15–24, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Tecido ósseo**. In: Histologia Básica. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Ganabara Koogan S.A., 2004. cap. 8 p. 148 - 149.

KESHAVARZ, K. **Por que “es necesario emplear la fitasa en la dieta de las ponedoras?** *Indústria Avícola*, v.46, n.10, p.13- 14, 1999.

KORNEGAY, E. T. **Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity**. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. *Enzymes in farm animal nutrition*. Wallingford: CABI. p. 237 – 271, 2001.

KUMAR, V. et al. REVIEW ARTICLE: Phytate and phytase in fish nutrition. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, p. 335–364, 2011.

LAINING, A. et al. Influence of Dietary Phytic Acid on Growth, Feed Intake, and Nutrient al. Utilization in Juvenile Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Journal of the world Aquaculture Society**. v. 41, No. 5 October, 2010.

LALL, S.P. **The Minerals**. In: Halver, J.E. & Hardy, R.W. (Eds.). *Fish Nutrition*, Third Edition, Elsevier Science (USA), 2002. San Diego: Academic Press, 2002. p. 260-308. p.259-308.

LIEBERT, F.; PORTZ, L. Nutrient utilization of Nile tilapia fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. **Aquaculture (Amsterdam)**. v. 248, p. 111-119, 2005.

LIEBERT, F.; PORTZ, L. Different sources of microbial phytase in plant based low phosphorus diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* may provide different effects on phytate degradation. **Aquaculture**, v. 267, p. 292–299, 2007.

LUDKE, M. C.; LUDKE, M.; LUDKE, J. V.; LÓPEZ, J. Fitase em dietas para suínos e seus efeitos sobre a redução da poluição ambiental. **Embrapa Suínos e Aves**. Documentos, 68 ISSN: 0101-6245, 2001.

MELO, K. D. M. et al. Adição de fitase em rações para tilápia-do-Nilo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. RPCV 111 (581-582) 85-89, 2012.

MENDONÇA, P.P.; COSTA, P.C.; POLESE, M.F. ; VIDAL Jr, M.V.; ANDRADE, D.R. Efeito da suplementação de fitase na alimentação de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Archivos de Zootecnia**, v, 61 (235), p. 437-448. 2012.

MPA – Ministério da pesca e aquicultura. **Estatística da Pesca e Aquicultura 2011**. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL3.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL3.pdf)>. Acessado em: 13/06/2014.

NAVES, L.P. et al. Effect of ph and Temperature on the Activity of Phytase Products Used in Broiler Nutrition. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v.14 / n.3 / 159-232, 2012.

NWANNA, L.C.; SCHWARZ, F.J. Effect of different levels of phytase on growth and mineral deposition in common carp (*Cyprinus carpio*, L.). **Journal Applied Ichthyology**, v.24, p.574-580, 2008.

PHROMKUNTHONGL, W.; NUNTAPONG, N.; GABAUDAN, J. Interaction of phytase RONOZYME®P(L) and citric acid on the utilization of phosphorus by common carp (*Cyprinus carpio*). **Science Technology**, v. 32 (6), 547 – 554, 2010.

PORTZ, L., BENKENDORFF, K., LIEBERT, F. Growth and mineral absorption of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed a plant based diet supplemented with microbial phytase. In: Cooksey, J. (Ed.), **Proceedings of the World Aquaculture Society**, Salvador, Brazil, v. 1, p. 592, 2003.

QUINTERO-PINTO, L.G. **Exigências dietarias e disponibilidade de fontes de fósforo para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Botucatu, 2008, 90f., il. Tese (Doutorado em Zootecnia) – UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, Botucatu, 2008.

RAMOS, G. D. M. et al. Estabilidade da fitase de *Aspergillus niger* 11T53A9 ao armazenamento e sua aplicação na hidrólise do ácido fítico na farinha de sorgo. **Revista Brasileira Agrociência**, v.18 n. 2-4, p.95-106 , abr-jun, 2012.

ROCHA, C.B. et al. Suplementação de fitase microbiana na dieta de alevinos de jundiá: efeito sobre o desempenho produtivo e as características de carcaça. **Ciência Rural**, v.37 p.1772-1778, 2007.

ROCHA, C. B. et al. Suplementação da enzima fitase e o desempenho e retenção mineral em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 34(1): 151 - 157, 2008.

ROCHA, C. B. et al. Fitase na dieta de alevinos de carpa húngara: desempenho e características de carcaça. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootenia**, v.62, n.6, p.1462-1468, 2010.

SARDAR, P. et al. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization, body compositions and haemato-biochemical profiles of *Cyprinus carpio* (L.) fingerlings fed soyprotein-based diet. **Aquaculture Nutrition**, v,13, p. 444–456, 2007.

SELLE, P.H. **The potential of microbial phytase the sustainable production of pigs and poultry**. In: Short Course on feed Technology, 7, 1997, Ansong. Proceedings. Korea: Korean Society of Animal. Nutrition and Feedstuffs, 1997. p. 1-39.

SIGNOR, A.A. et al. Proteína e energia na alimentação de pacus criados em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.11, p.2336-2341, 2010.

SILVA, T.S.C. et al. Fitase líquida em dieta extrusada para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum Animal Science**. Maringá, v. 29, n. 4, p. 449-455, 2007.

SILVA, T. R. M et al. Substituição parcial do milho pelo resíduo de macarrão em dietas para tilápia-do-nilo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v, 40(4), p. 669 – 676, 2014.

SIMÕES, L. N. et al. O uso do óleo de cravo como anestésico em juvenis avançados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 34, n. 2, p. 175-181, Apr.-June, 2012.

SIMONS, P.C.M. et al. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pig. **British Journal of Nutrition**, v.64, p.525-540, 1990.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada à aqüicultura**. Jaboticabal: Funep, 1995. 72p.

SOUZA, S.R. 2008. **Fitase em dietas para Matrinxã (*Brycon cephalus*) e Piavuçu (*Leporinus macrocephalus*)**. Maringá. 2008. 34f., il. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR, 2008.

STATSOFT INC. (2004). Statistica (data analysis software system). Version 7.0.

STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K.D.; ROEM, A.J. Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein-concentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture, Amsterdam**, v. 161: 365–379, 1998.

SUREK, D. et al. Uso de fitase em dietas de diferentes granulometrias para frangos de corte na fase inicial. **Ciência Rural**, v. 38, 1725–1729, 2008.

TEIXEIRA, E. de. A. et al. Substituição de farinha de peixes em rações para peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p.118-125, 2006.

TUDKAEW, J.; GABAUDAN, J.; PHROMKUNTHONG, W. The supplementation of phytase RONOZYME\_P on the growth and the utilisation of phosphorus by sex-reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). **Songklanakarín Journal Science Technology**, v. 30 (1), 17-24, 2008.

VIELMA, J.; LALL, S.P.; KOSKELA, J.; SCHONER, F.J.; MATTILA, P. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 163, p.309–323, 1998.

YAN, W.; REIGH, R.C.; XU, Z. Effects of Fungal Phytase on Utilization of Dietary Protein and Minerals, and Dephosphorylation of Phytic Acid in the Alimentary tract of Channel Catfish *Ictalurus punctatus* fed an All-Plant-Protein Diet. **Journal of the World Aquaculture Society**. v.33, No. 1, 2002.

ZIMMERMANN, S.; HASPER, T.O.B. Piscicultura no Brasil: o processo de intensificação da tilapicultura. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 40, 2003, Santa Maria. **Anais eletrônicos...** [Santa Maria]: SBZ. 2003. 1.CD - ROM.