

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
NÍVEL: MESTRADO**

ROSANE CARRADORE

**MÉTODOS DE SUPLEMENTAÇÃO DA ENZIMA FITASE EM DIETAS PARA
TILÁPIA DO NILO**

**Marechal Cândido Rondon
2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
NIVEL: MESTRADO**

ROSANE CARRADORE

**MÉTODOS DE SUPLEMENTAÇÃO DA ENZIMA FITSE EM DIETAS PARA
TILÁPIA DO NILO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zootecnia, área de Nutrição Animal.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo.
Co-orientador: Prof. Dr. Aldi Feiden.

**Marechal Cândido Rondon
2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

C312m	Carradore, Rosane Métodos de suplementação da enzima fitse em dietas para tilápia do nilo / Rosane Carradore. – Marechal Cândido Rondon, 2014. 34 p. Orientador: Prof. Ph.D. Wilson Rogério Boscolo Coorientador: Prof. Dr. Aldi Feiden Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2013. 1. Tilápia (Peixe). 2. Tilápia (Peixe) - Alimentação e rações. 3. Peixe - Criação. I. Boscolo, Wilson Rogério. II. Feiden, Aldi. III. Título. CDD 22.ed. 639.31 CIP-NBR 12899
-------	---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

ROSANE CARRADORE

**MÉTODOS DE SUPLEMENTAÇÃO DA ENZIMA FITASE EM DIETAS PARA
TILÁPIA DO NILO**

Dissertação apresentada como ao programa de pós-graduação Stricto Sensu em Zootecnia – nível Mestrado, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia, área de concentração em nutrição e produção animal.

Marechal Cândido Rondon, __ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo(Presidente)
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Leandro Portz
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Fábio Bittencourt
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

DEDICATÓRIA

Dedico esta minha conquista,

A Deus, por ter me dado forças em todas as dificuldades e ter iluminado meu caminho;

A minha mãe, pelo carinho, paciência, apoio e amor em todos os momentos difíceis;

Ao meu filho Bruno, razão especial de todas as minhas batalhas;

À minha irmã Anelise, companheira fiel nos estudos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo, meu orientador, por ter me proporcionado este imenso aprendizado, por ter sido paciente e prestativo. Muito obrigada!

Ao co-orientador Prof. Dr. Aldi Feiden pelos ensinamentos. Obrigada!

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, e ao programa de pós-graduação em Zootecnia pela oportunidade concedida.

Ao grupo de estudos de manejo na aquicultura – GEMaQ, pelo suporte e auxílio na realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Altevir Signor pelos esclarecimentos nos momentos de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Fábio Bittencourt, pela ajuda no experimento.

Ao Prof. Dr. Leandro Portz pela ajuda nas análises.

À minha colega Jackeline Marcante Dallagnol, pela atenção, companhia e por toda ajuda prestada durante o experimento e nas análises.

Ao meu colega Vinicius Ricardo Calcagnolo Bridi pela ajuda, dedicação e incentivo em todos os momentos que decorreu o experimento.

Aos colegas Vagner Geronimo do Nascimento Santos e Dacleu Hertes Neu pela ajuda no experimento.

À todos os professores das disciplinas que cursei, pois me ensinaram muito nesta etapa da minha vida.

LISTA DE TABELAS

1. Composição percentual e química da ração experimental.....	21
2. Parâmetro hematológico	24
3. Parâmetros da água.....	25
4. Coeficiente de digestibilidade aparente das rações com e sem fitase.....	25

SUMÁRIO

Resumo	8
Abstract.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Digestão em tilápias	13
2.2 Fósforo em peixes.....	14
2.3 Fitato.....	16
2.4 Enzima Fitase	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Processamento da ração.....	19
3.2 Experimento.....	21
3.3 Análise da água.....	23
3.4 Análise do sangue.....	23
3.5 Análise estatística.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO.....	28
8. REFERÊNCIAS	28

RESUMO

MÉTODOS DE SUPLEMENTAÇÃO DA ENZIMA FITASE EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes métodos de suplementação da enzima fitase em dietas para tilápia do Nilo. Foram formuladas três dietas, sendo a primeira ausente de fitase (controle), a segunda continha suplementação de fitase anterior ao processamento da dieta onde foi adicionada junto aos ingredientes, misturada, adicionado 20% de água e extrusada a temperatura de 52°C, e uma terceira dieta com a enzima por cobertura, onde se utilizou a pulverização para inseri-la após o processamento, sendo que os tratamentos que receberam a enzima fitase possuíam 1.500 FTU/Kg de ração. Com relação à análise estatística foi realizado um delineamento quadrado latino inteiramente casualizado, utilizando 204 tilápias do Nilo, com aproximadamente 30g. Ao final do estudo foi avaliada a digestibilidade da proteína, energia bruta, extrato etéreo e matéria mineral, as mesmas não apresentaram diferença significativa, porém a digestibilidade do cálcio apresentou diferença significativa entre os tratamentos com a enzima fitase e sem, na digestibilidade do fósforo houve essa diferença com relação a adição da enzima. No final do experimento foi realizada a coleta de sangue de 30 peixes, onde se realizou a análise de fósforo no sangue, a qual não diferiu significativamente nos tratamentos. Foi realizada a análise de fosfato e ortofosfato em ambas não diferiram significativamente entre os tratamentos, em seguida foi realizada.

Palavras-chave: Digestibilidade, fósforo, tilápia do Nilo, fitase

ABSTRACT

METHODS OF ENZYME SUPPLEMENTATION PHYTASE IN DIETS FOR NILE TILAPIA

This study aimed to evaluate different methods of supplementation of phytase in diets for Nile tilapia. Three diets since the third were formulated, the first missing phytase (control), the second contained supplementation prior to processing of the diet which was added phytase from the ingredients mixed, added 20% water and extruded at a temperature of 52°C and a third diet with the enzyme for coverage, which we used the spray to enter it after processing, and the treatments that received the enzyme phytase had 1.500 UFA/kg of feed. Regarding the statistical analysis a latin square randomized design was conducted using 204 Nile tilapia, with approximately 30g. At the end of the study protein digestibility, gross energy, ether extract and ash was evaluated, they showed no significant difference, but the calcium digestibility showed a significant difference between treatments with and without phytase on phosphorus digestibility was this difference with the addition of the enzyme. At the end of the experiment, blood sampling 30 fish, where they performed the analysis of phosphorus in the blood, which did not differ significantly in the treatments was performed. Analysis of both phosphate and orthophosphate did not differ significantly among treatments, then was held was held.

Key words: Digestibility, phosphorus, Nile tilapia, phytase

1 INTRODUÇÃO

A pesca e a aquicultura conjuntamente forneceram em 2013, cerca de 160 milhões de toneladas de peixes (FAO, 2014). O Brasil, detentor de 13% das reservas de água doce do mundo possui um enorme potencial para o desenvolvimento da aquicultura, principalmente, por que a maior diversidade de peixes de água doce encontra-se no país (RESENDE, 2006), sendo, portanto um dos poucos países que tem condições de ampliar a sua produção para suprir a demanda.

Atualmente, os peixes mais cultivados no Brasil são as espécies exóticas, em 2010 a tilápia e a carpa foram às espécies mais cultivadas, as quais somadas representaram 63,4% da produção nacional, destaca-se o tambaqui, tambacu e pacu juntas representaram 24,6%, sendo os 12,0% restante representado pelos demais peixes (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2010).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é nativa de Israel e da Jordânia, na África, as primeiras espécies de tilápia a serem criadas foi na década de 30, em seguida expandindo-se rapidamente pelo sudeste asiático, sul do Pacífico, Europa e sul dos Estados Unidos (HILDSORF, 1995).

Foi introduzida no Brasil em 1971, procedente da Costa do Marfim (CASTAGNOLI, 1992), em açudes do Nordeste e difundiu-se para todo o país (MAIRNARDES-PINTO, 1989).

A tilápia do Nilo é a espécie que vem sendo amplamente utilizada nos diversificados sistemas de produção, onde cada vez mais há uma intensificação, pois é uma espécie que possui um baixo custo, tem grande adaptabilidade e possui um alto desempenho produtivo (LIEBERT et al. 2005).

Elas têm se destacado nos estudos envolvendo a digestibilidade da energia e de nutrientes de fontes convencionais e alternativas (PEZZATO et al. 2002).

Com a atual expansão da aquicultura fica cada vez mais difícil inserir as fontes proteicas convencionais, pois as mesmas não tem grande disponibilidade no mercado e/ou seu custo é alto, afim de reduzir os custos, sem interferir nos nutrientes, pesquisadores encontraram fontes alternativas para inserir na alimentação dos peixes.

Dentre essas fontes o farelo de soja tem um grande destaque, devido a sua grande disponibilidade no mercado.

Apesar dessa disponibilidade e o seu custo ser menor, há um fator que limita a sua utilização nas dietas para os monogástricos, sendo este o ácido fítico.

Os vegetais apresentam grande parte do fósforo como ácido fítico, ou seja, é uma forma que limita a absorção, sendo que esta ocorre em até 30%, assim não supri as necessidades de fósforo nos peixes que é um mineral extremamente importante para a estrutura óssea e quando ocorre a sua carência leva a deficiência na digestibilidade de lipídios, carboidratos, energia, retarda o crescimento e em casos extremos pode levar a morte.

A porcentagem restante do fósforo é excreta ao ambiente, onde gera a contaminação dos meios aquáticos e causa um crescimento exagerado de algas, além de elevar a demanda bioquímica de oxigênio presente na água e alterações no meio, levando a morte de peixes e outros animais (TUNDISI e TUNDISI, 2008).

Para amenizar essa situação houve diversos estudos, até se chegar a produção de uma enzima exógena, chamada de fitase, esta transforma o ácido fítico, em uma forma disponível, para a posterior utilização.

A fitase é capaz de liberar grupos de fosfatos a partir do ácido fítico para obter o Pi (fósforo inorgânico) de uma serie menor de inositol (ELESTAD et al., 2002).

Elas são comuns na natureza, porque eles podem ser encontradas nas plantas e nos animais, mas a atividade nos animais monogástricos é insignificante em comparação a da sua planta (WEREMKO et al., 2007).

De acordo com Cao (2007) BASF® foi a primeira empresa a produzir comercialmente a fitase em 1991, a partir do *A. niger* geneticamente modificado, desde então a atividade da fitase é definida como unidades de fitase FTU ou U, em que FTU é definido como a quantidade de enzima que libera 1 micromol de P inorgânico por minuto a partir do fitato de sódio 1,0015 mol/l a pH 5,5 e a 37°C.

O objetivo deste estudo foi avaliar o melhor método de suplementação da enzima Fitase para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Digestão em tilápias

A microflora do trato gastrointestinal de peixes tem sido amplamente estudada, pois a mesma é rica em nutrientes, tornando um ambiente favorável ao crescimento de bactérias (DAS et al., 2014), onde as massas enzimáticas podem interferir de forma positiva no processo digestivo do peixe (RAY et al. 2010).

Quando o animal captura um alimento, o mesmo passa por um longo processo até a formação de fezes. Mas para que esse procedimento ocorra faz-se necessário a utilização de alguns processos, tais como: o físico, químico e enzimático.

Após a digestão física, química e enzimática o alimento vai para o intestino que se inicia após o piloro e tem como função primordial completar os processos de digestão, iniciados no estômago e absorver nutrientes, água e íons (RONNESTAD, 2011).

Com relação à absorção do fósforo Martini (2006) e Da Silva & Cozzolino (2007) afirmam que ela é feita no intestino delgado. No duodeno é absorvido por mecanismo de transporte ativo com co-transporte do íon sódio.

A taxa de transporte do fósforo nesse caso é dependente principalmente da sua concentração no lúmen e é independente dos níveis de outros nutrientes e da energia. Cerca de dois terços do fósforo total são absorvidos pelo intestino (QUINTEIRO-PINTO et al, 2011) pelos enterócitos que são células especializadas na absorção de nutrientes que ocorrem através dos processos de troca iônica, pinocitose, difusão simples e transporte ativo (SMITH 1989) dependendo dos ingredientes usados na mistura alimentar.

A área superficial absorptiva do intestino pode ser expandida não somente com o aumento do comprimento intestinal, mas também com estruturas acessórias como o ceco pilórico e válvulas espirais (RUST, 2002). Porém as pregas e as microvilosidades constituem o mecanismo mais significativo para o aumento da área superficial de absorção (BUDDINGTON et al., 1997).

Com relação ao fósforo inorgânico ele é facilmente absorvido, com a tendência de ser secretado nas fezes.

O aproveitamento desse mineral é relativamente eficiente, estando entre 2 e 3 % STENFENS, p. 272 1987). Aproximadamente 90% das excreções de fósforo se dão na

forma hidrossolúvel via renal (LALL, 2002). Os níveis de fósforo no plasma são controlados pelos rins, onde é filtrado e reabsorvido, sobrando 0,1 e 20,0% para ser excretado via urina (MARTINI, 2006).

Há uma redução na absorção de fósforo quando há altas doses de carbonato de cálcio, complexo de alumínio, diminuição na temperatura ou a sua baixa ingestão (LALL 2002).

2.2 Fósforo em peixes

Os minerais são nutrientes imprescindíveis para o normal funcionamento dos processos biológicos e para a manutenção da higidez animal (FURUYA et al., 2010).

Atualmente as dietas formuladas a base de vegetais tem sido bastante utilizada para as espécies com grande potencial, nesses alimentos o fósforo é uma molécula orgânica, isso o torna limitante (FURUYA et al., 2010), pois na forma de fitato, está pouco disponível para os peixes (MIRANDA et al., 2000) assim faz-se necessário à suplementação com aditivos alimentares na forma de sais, onde geralmente utiliza-se o fosfato bicálcico para os peixes (SCHAMBER, 2008).

Na natureza o fósforo se encontra amplamente distribuído em combinação com outros elementos, o fosfato se encontra em equilíbrio com o ácido fosfórico, com o dihidrogenofosfato e com o hidrogenofosfato, enquanto no meio ácido predominam o ácido fosfórico. (QUINTEIRO-PINTO et al. 2011).

O fosfato livre também é chamado de fosfato inorgânico, ele está ligado covalentemente aos açúcares, às proteínas e outros componentes da célula.

De acordo com Quinteiro-Pinto (2011) o fósforo é o segundo mineral mais abundante chegando a possuir 0,5% no corpo animal juvenil, e chega a 1,1 % nos adultos, porém a maioria dos compostos naturais de fósforo não é solúvel em água, somente em ácido.

Segundo Da Silva (2007) as concentrações de fósforo total variam nos tecidos entre 7,8 e 20,2 mg/g de proteína, com exceção de células especializadas com alto teor de ácido ribonucleico (RNA) e os tecidos nervosos com alto teor de mielina, onde o fósforo é mais abundante, já no sangue é aproximadamente 40 mg/dL principalmente como fosfolipídios das células vermelhas e lipoproteínas do plasma, sendo que se concentra na forma de fósforo orgânico 3,1mg/dL.

Através de diversas pesquisas verificou-se que o fósforo é um importante constituinte do ácido nucléico e das membranas celulares e é utilizado por todas as espécies e está diretamente envolvido em todas as reações celulares energéticas (ROCHA et al., 2010).

Sendo um macro mineral essencial para o crescimento e reprodução dos peixes (ROY & LALL, 2003) para a formação da estrutura óssea e para o metabolismo corporal, sendo imprescindível que esteja em nível adequado nas rações para atender à exigência nutricional do animal (RIBEIRO, et al. 2006).

É de vital importância o conhecimento da disponibilidade de fósforo em alguns ingredientes que podem compor as dietas comerciais, principalmente quando considerada a necessidade dos peixes desse mineral para seu metabolismo (MIRANDA et al., 2000).

As exigências do peixe em fósforo dependem das características do sistema digestório e da fonte desses minerais (MIRANDA et. al., 2000). De acordo com MCDOWELL (1995), a absorção de fósforo depende da solubilidade do ponto de contato com a membrana abortiva, mas segundo LI (1996) o grau de moagem do alimento pode influenciar a utilização desse mineral.

A exigência nutricional em minerais dos peixes é atendida, pela absorção pelas brânquias e pele. Esta absorção pode ser afetada pela composição química da água e pelas características da espécie (NRE, 1993).

De acordo com Miranda (2000) variam também em função de alguns fatores ambientais, como o nível de concentração dos minerais, a temperatura e o pH da água. Existem evidências de que os minerais absorvidos da água não são suficientes para satisfazer a exigência total, sendo necessário suplementá-los através da ração.

Como via de absorção branquial do fósforo é insignificante, há quase total dependência da absorção intestinal para a satisfação da exigência nutricional de fósforo nos peixes (CYRINO, 2012). A baixa absorção pelas brânquias se deve as baixas concentrações de ortofosfato na água (XU et al., 2012).

A disponibilidade do fósforo em peixes depende, entre outros fatores, da constituição do trato digestório e da fonte de fósforo (STEFFENS, 1987). Espécies que dispõem de estômago podem absorver mais eficientemente os fosfatos de baixa solubilidade em comparação aos peixes sem estômago, porém a eficiência na retenção de fósforo diminui com o aumento na ingestão deste elemento (BUREAU& CHO,

1999) e a taxa de absorção e assimilação varia entre as espécies, portanto suas exigências também variam (HEPHER, 1988)

Outro fator que também afetam a disponibilidade de fósforo é a relação Ca/P, as interações com outros minerais, tais como: Ca, Zn, Cu, Mg, F, Mn da dieta, a vitamina D3, o estado fisiológico do peixe, a fonte de processamento e a relação fítico/fitase (LALL, 2002).

Alves e Baccarin (2005) afirmam que 66% aportado pelo arraçoamento intensivo vão para sedimentos, 11% fica dissolvido na água e 23% são incorporados ao peixe do cultivo.

O fósforo é um mineral essencial, porém 70% do fósforo de origem vegetal é presente em forma de fósforo fitico, ou seja, inadequado para a absorção, sendo eliminado ao ambiente ocasionado eutrofização do meio aquático (MCCUAIG et al, 1972).

Com a eutrofização do ambiente ocorre o desequilíbrio ecológico, pois com a grande quantidade de fósforo na água há uma multiplicação excessiva de algas na superfície, impedindo que a luminosidade chegue ao fundo, gerando uma diminuição significativa de oxigênio, para amenizar este problema faz-se necessário a utilização da enzima fitase.

2.3 Fitato

O fitato está presente em todas as sementes e possivelmente em todas as células de plantas. Serve como um estoque de cátions do grupo fosforil, possui alta energia é um composto natural, ocorrendo durante a maturação de sementes e grãos (KUMAR et al. 2011).

Ele é a principal fonte de fósforo para as rações, de origem vegetal, sendo responsável por cerca de 50 a 80% de todo o fósforo encontrado nos alimentos vegetais (RAVIVDRAN, 1996).

Estudos mostram que o fitato é insolúvel, a não ser que seja atacado por enzimas proteolíticas (RAVINDRAN et al, 1995). De acordo com Nolan (1987) além do fósforo a absorção do cálcio, magnésio, cobre e zinco são significativamente reduzidos.

Os fitatos também podem formar complexos com proteínas diminuindo a disponibilidade de aminoácidos (REDDY et al., 1989).

Durante o amadurecimento das sementes, cereais e legumes acumulam-se ácido fitico que serve como fonte de energia e fósforo para a germinação da semente, sendo

pouco disponível para animais monogástricos, pois esses animais produzem pouca ou nenhuma enzima fitase, é responsável pela hidrólise do fitato, para a posterior absorção de fósforo inorgânico.

Dessa maneira pode reduzir a reabsorção de zinco endógeno, bem como afetar a disponibilidade de zinco, proteínas e aminoácido.

As interações da proteína com o fitato dependem do pH (CHEYAN, 1980), como a molécula de fitato é polianiónica em alguns ambientes ácidos como o estômago da tilápia do Nilo (pH 1-2), a metade da fração do fosfato é carregado negativamente, isso favorece a ligação de proteínas solúveis em grupos de amino lisinas, histidina e arginina. Em meio alcalino como o intestino da tilápia (pH 8,5 – 8,8) os complexos ternários são favorecidos.

A reação do complexo foi descrita como reação bifásica (RYANDRAN et al, 1993), ela se inicia quando o fitato liga-se a proteína através de fortes atrações eletrostáticas e muda a sua conformação da proteína que é seguido por interações proteína-proteína formando a agregação da proteína em complexos que excedem o tamanho.

O fitato sendo um agente quelante, forma complexos derivados de lipídeos, junto com outros nutrientes (VOHR et al., 2003), sendo o complexo cálcio/magnésio/fitato a principal restrição para a utilização da energia derivada de fonte de lipídeos (Leeson et al., 1993).

2.4 Enzima Fitase

A disponibilidade comercial da fitase microbiada ocorreu em 1991 quando a legislação foi introduzida nos países baixos para controlar a poluição de fosfatos, assim tornou-se globalmente utilizado o que gerou uma redução nos preços e facilidade de aplicação (KUMAR et al. 2010).

A fitase é uma enzima exógena ela é definida como proteína de estrutura terciária ou quaternária que age como catalizador biológico, aumentando a velocidade das reações químicas nos organismos, sem serem alteradas. São altamente específicas para seus substratos e dirigem todos os eventos metabólicos.

Essas enzimas possuem sítios que permitem que elas atuem na ruptura de determinada ligação química sob condições favoráveis de pH, umidade e temperatura. Por este motivo na sua utilização aumenta a disponibilidade de nutrientes presentes nos

alimentos. Elas não possuem função nutricional direta, mas auxiliam no processo digestivo, melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta (YIN et al., 2001).

Quimicamente é definida como mio-inositol (1,2,3,4,5,6) hexafosfato fosfoidrolases que catalisam a liberação sequencial do fósforo oriundo da molécula de ácido fítico. A fitase retira do grupamento ortofosfato do anel inositol de ácido fítico para produzir o fósforo inorgânico livre (DEBNATH et al., 2005). O fitato possui seis grupos que podem ser liberados de acordo com a fitase utilizada, em velocidades e ordens diferentes (YISS, 2009).

A fitase forma grupo com hidrolases que catalisam e desfosforilam o ácido fítico a fosfato inorgânico e derivados de inositol fosfatos, promovendo assim a absorção do fósforo indisponível e também contribue para a diminuição da excreção do fósforo no ambiente (DAHIA et al. 2009).

Ela não libera somente fósforo de origem vegetal, mas também torna disponível, cálcio, magnésio, proteínas e lipídeos. Desta maneira pela liberação do fósforo ligado a ingrediente de origem vegetal, tornam o fósforo mais disponível, onde chegam usar até 80% assim protege o meio ambiente contra o excesso de fósforo livre (WYSS et al., 2009).

Algumas das fontes de enzimas que degradam o fitato são:

- Fitase gerada pela mucosa do intestino delgado
- Fitase da planta
- Fitase microbiana

A eficácia da fitase relaciona-se com alguns fatores, sendo eles:

- Em altas temperaturas não é estável ao calor, devendo ser aplicada, evitando o excesso de calor durante a extrusão, pois o tratamento térmico de 100°C a dez minutos resulta na perda da atividade da enzima (CAO et al., 2007). Da mesma forma, temperaturas acima de 70°C causam a inativação parcial ou total da enzima.

- pH ótimo entre 4,5 a 6,0 e a temperatura ideal fica entre 45 a 60°C, fora dessas faixas a ação da enzima fica reduzida (LEI et al., 2000).

- Relação cálcio e fósforo, pois de acordo com os resultados encontrado por Angel (2002) a alta concentração de cálcio quebra o fitato para se tornar um complexo insolúvel. De acordo com Zen (2001) a proporção adequada é de 1.1 -1.4:1 para que a enzima realize a sua função mais eficientemente, caso o contrário a atividade cairá.

Entre outros fatores também se destacam o substrato, espécie, taxa de inclusão e fonte de fitase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Processamento da ração

A fase experimental foi executada no laboratório de digestibilidade do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura (GEMaQ) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Toledo, Paraná.

A realização do experimento decorreu entre os dias 10 de maio e 15 de julho de 2013, totalizando 55 dias, onde foram utilizadas 204 tilápias do Nilo, com peso médio de $30 \pm 4,23$ g, distribuídos em um delineamento de quadrado latino inteiramente casualizado, com três tratamentos e cinco repetições.

As rações foram confeccionadas na fábrica de ração do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, onde inicialmente os ingredientes foram moídos em moinhos tipo ‘martelo’, com peneira de 0,5 mm, passaram pelo processo de extrusão, juntamente com um termômetro digital acoplado ao canhão com o intuito de verificar a temperatura o mesmo, chegando até 52°C, posteriormente foram secas e estufa de aeração forçada a 55°C.

O atendimento de cada nutriente na ração foi expresso com o auxílio do programa SuperCrac® 5.7 Master (TD Software 2005) e com os valores obtidos das exigências de nutricionais para tilápias de acordo com FURUYA (2010).

Tabela 1. Composição percentual e química da ração experimental.

Ingredientes	%
Farelo de Soja	44,432
Farelo de Trigo	22,114
Milho	27,598
Calcário calcítico	1,081
Premix*	0,500
Óleo de Soja	3,498
Sal comum	0,300
Óxido de cromo	0,200
Antifúngico	0,100
Antioxidante	0,020
DL- Metionina	0,083
L – Treonina	0,071
Nutrientes**	
Amido (%)	28,000
Fibra bruta (%)	5,537
Energia digestível (Kcal/Kg)	3.075
Fósforo total (%)	0,574
Gordura (%)	5,537
Lisina total (%)	1,464
Metionina total (%)	0,470
Proteína Bruta (%)	26,800
Treonina total (%)	1,070
Triotofano total (%)	0,357

*Suplemento vitamínico e mineral: Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 24.000 UI; Vit. D3, 6.000 UI; Vit. E, 300 mg; Vit. K3, 30 mg; Vit. B1, 40 mg; Vit. B2, 40 mg; Vit. B6, 35 mg; Vit. B12, 80 mg; Ác. fólico, 12 mg; Pantotenato Ca, 100 mg; Vit. C, 600 mg; Biotina, 2 mg; Colina, 1.000 mg; Niacina, 200 mg; Ferro, 200 mg; Cobre, 35 mg; Manganês, 100 mg; Zinco, 240 mg; Iodo, 1,6 mg; Cobalto, 0,8 mg. 2 Vitamina C monofosfatada 35% de ácido ascórbico.

** Valores calculados

A composição química e percentagem dos três tratamentos foram os mesmos, o que diferiu foi o método de introdução da enzima Fitase, sendo o primeiro tratamento

não havia a enzima, ou seja, tratamento controle, porém o mesmo recebeu o hidrolisado por pulverização.

O segundo tratamento era com enzima por cobertura, sendo que a sua confecção ocorreu da seguinte forma: após a ração estar seca, pesou-se 1,5 g de Fitase Natuphos® 10.000G da BASF, ou seja, 1.500 UF/Kg, em seguida adicionou-se 3% de hidrolisado de tilápia, ambos foram agitados com o agitador magnético por 10 minutos conforme o método de Wang et al., (2009), para a homogeneização da amostra, posteriormente o líquido foi pulverizado na ração e ao seu término a ração foi armazenada sob refrigeração.

No terceiro tratamento foi inserida a enzima, após a adição do óxido de crômio, onde a mesma foi sendo colocada aos poucos e misturando-a com os demais ingredientes antes da extrusão. Porém todos os tratamentos receberam a asperção de óleo de soja e hidrolisado, a fim de manter a homogeneidade entre as dietas.

3.2 Experimento

Os peixes ficaram em doze cubas cônico-cilíndricas, com capacidade de 180 litros e de 90 litros, providas de um copo coletor de fezes na sua parte inferior, em um sistema do tipo Guelph modificado.



Figura 1. Laboratório de digestibilidade Gemaq (2013)

As cubas foram abastecidas duas vezes ao dia, trocando 50% da água, proveniente de poço artesiano e aquecida em uma caixa d'água equipada com sistema de aquecimento, mantendo em média a temperatura em torno de 28°C. Sendo o abastecimento realizado pela parte superior e o escoamento pela inferior.

O sistema possuía aeração individual, realizada por meio de uma pedra porosa acoplada a dispersores de ar para conservação de aproximadamente 5,0 mg L⁻¹ de oxigênio dissolvido em cada unidade experimental.

O arraçoamento foi realizado as 08:30h, 11:00h, 14:00h, 17:00h e as 19:30h até a aparente saciedade. Após a última refeição esperava-se trinta minutos e fazia-se a limpeza de todas as cubas, para posteriormente inserir o coletor de fezes que permanecia das 20:30 às 8:00h do dia seguinte.

Após vários dias de coleta, conseguiu-se uma quantidade considerável de fezes, as quais foram secas em estufa a 55°C, em seguida trituradas e separadas de acordo com cada tratamento.

Com as fezes e as rações foram analisadas a proteína bruta de acordo com o método Kjeldahl o extrato etéreo de acordo com o método de Soxhlet, a matéria mineral seguiu o método de Dumas, onde deixa-se na mufla por 4h a 500°C, o cálcio por absorção atômica e o fósforo por colorimetria.

As determinações da concentração de Cr₂O₃ nas fezes e nas rações foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica segundo Kimura e Miller (1957), para posterior cálculo do coeficiente de digestibilidade (*Dtd*).

Para o cálculo da digestibilidade total da dieta (*Dtd*) na matéria seca (MS) e da disponibilidade do fósforo (*Dand*) foram utilizadas as equações indicadas pelo NRC (1993). Incorporado na proporção de 0,2% da dieta.

$$Dtd = 100 - 100 \left(\frac{\%Id}{\%If} \right)$$

$$Dand = 100 - 100 \left(\frac{\%Id}{\%If} \times \frac{\%Nf}{\%Nd} \right)$$

Em que:

Dtd é a digestibilidade total da dieta referência e da dieta teste (%);

Dand, a digestibilidade aparente dos nutrientes nas dietas referência e teste (%);

Id, o indicador na dieta; *If*, o indicador nas fezes;

Nf, o nutriente nas fezes e *Nd*, o nutriente na dieta;

3.3 Análise da água

A temperatura da água era verificada duas vezes ao dia, através de um termômetro portátil.

As variáveis físicas e químicas da água, tais como: o oxigênio dissolvido, pH, condutividade elétrica e turbidez foram verificadas através do equipamento potenciômetros Hanna Instruments®, onde o mesmo estava calibrado, sendo verificado a cada cinco dias, segundo a metodologia de Koroleff (1976).

No experimento realizou-se uma coleta de água das doze cubas, onde utilizou-se doze garrafas de polietileno, sendo em seis escuras e a seis claras. Para captar a água colocou-se a garrafa no meio da cuba com relação a altura e largura, após a coleta as mesmas ficaram armazenadas no freezer, para posteriormente realizar as análises de fosfato e ortofosfato, segundo a metodologia de Mackreth (1988)

3.4 Análise de sangue

Ao final do estudo foram avaliados os parâmetros hematológicos, a extração do sangue foi realizada, após anestesiados os peixes com benzocaína por punção caudal, foram coletados com o auxílio das seringas descartáveis, contendo EDTA (10%), 2 mL de sangue de cada indivíduo, sendo que foram utilizados 10 peixes de cada tratamento. Para a análise do fósforo sanguíneo foi utilizado o kit portátil Gold Analisa.

3.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo software SAEG, versão 7.0 (1997). Os dados foram submetidos ao delineamento de quadrado latino inteiramente casualizado onde posteriormente utilizou-se o teste de comparações Duncan. As diferenças foram consideradas significativas a $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade da água manteve-se estável durante o experimento e as médias dos parâmetros monitoradas das cubas durante o período experimental foram: temperatura $28,03 \pm 0,52^\circ\text{C}$; pH $7,54 \pm 0,25$, oxigênio dissolvido $6,43 \pm 0,67 \text{ mg/L}^1$. Estes valores médios permaneceram dentro da faixa recomendada para a produção de peixes de clima tropical (BOYD 1990; SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

Logo a baixo tem-se a tabela do fósforo no sangue, onde não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) pela análise de variância e teste Duncan.

Tabela 2. Parâmetro hematológico.

Variáveis	Tratamentos			CV%
	1*	2*	3*	
Fósforo no sangue	5,59 ^a	5,81 ^a	7,17 ^a	59,15 ^{ns}

*($P < 0,05$)

ns – não significativo

*Tratamentos:

1 Controle (hidrolisado por pulverização) sem Fitase

2 Pós-processamento

3 Pré-processamento

A análise hematológica não foi significativa entre os tratamentos, isso se explica, pelo do período de jejum antes da coleta de sangue, sendo-o de 12 horas após a última alimentação. Esses dados vão de encontro com os resultados obtidos por Liebert et al. (2007), onde a concentração do fósforo no plasma possui elevados níveis da atividade de fitase na dieta, porém tendiam a ultrapassar o efeito da alimentação, quando a coleta é realizada após 12 horas da alimentação. Assim os resultados tornam-se inconsistentes, pois refletem uma diminuição do pico de absorção do fósforo com alta variação, gerando uma informação adicional aos variados efeitos.

Outros autores como Nwanna et al. (2007) avaliaram cinco dietas (DO, DP, PHYT 1, PHYT 2 e PHYT 4) e Mai et al. (2002) trabalharam com o efeito da fitase no plasma sanguíneo ambos com *Cyprinus carpio* não encontraram diferenças significativas em seus experimentos com relação ao fósforo no sangue.

Os resultados de fósforo na água não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) pela análise de variância e teste Duncan.

Tabela 3. Parâmetros da água.

Variáveis	Tratamentos			CV%
	1*	2*	3*	
Fosfato total	0,27 ^a	0,23 ^a	0,18 ^a	53,07 ^{ns}
Ortofosfato	0,14 ^a	0,12 ^a	0,09 ^a	58,47 ^{ns}

*(P<0.05)

ns – não significativo

*Tratamentos:

1 Controle (hidrolisado por pulverização) sem Fitase

2 Pós-processamento

3 Pré-processamento

Bock et al. (2007) avaliaram a disponibilidade de fósforo proveniente dos vegetais comparando três níveis de fitase (1.000, 1.500 e 2.000 UF) e uma ração com suplementação de fósforo (4% de fosfato bicálcico) e relataram que o mineral presente nas fezes reduziu com a inclusão dessa enzima.

Signor et al. (2010) quando avaliaram a inclusão de um complexo enzimático com a inclusão (0; 0,33; 0,66 e 0,99%) o mesmo não influenciou na qualidade da água, igual aos resultados obtidos nesse estudo.

Isso ocorreu porque os níveis de fósforo disponíveis intrínseco dos ingredientes somados a enzima fitase garantiram a exigência desse mineral no desempenho produtivo de juvenis de tilápia permitindo uma maior atuação e/ou intensidade da enzima.

Não foi observada a influência da fitase nos diferentes tratamentos sobre a proteína, energia bruta, extrato etéreo e matéria mineral, porém cálcio e fósforo foram afetados a (P>0,05).

Tabela 4. Coeficiente de digestibilidade aparente das rações com e sem fitase.

Coeficientes de Digestibilidade Aparente (%)	Tratamentos			CV (%)
	1*	2*	3*	
Proteína Bruta	89,93 ^a	90,78 ^a	91,14 ^a	0,96 ^{ns}
Energia Bruta	74,15 ^a	75,42 ^a	77,05 ^a	2,94 ^{ns}
Extrato Etéreo	94,02 ^a	95,47 ^a	88,51 ^a	4,59 ^{ns}
Matéria Mineral	51,19 ^a	56,51 ^a	54,52 ^a	12,72 ^{ns}
Cálcio	32,45 ^b	50,63 ^a	48,77 ^a	10,76 ^{**}
Fósforo	47,78 ^b	65,04 ^a	65,73 ^a	12,35 ^{**}

Digestibilidade	Total	da	68,46 ^b	73,00 ^a	74,31 ^a	2,38 ^{**}
Dieta						

Médias na mesma linha separadas por letras distintas diferem ($P < 0.05$), pelo teste de Duncan.

*Tratamentos:

1 Controle (hidrolisado por pulverização) sem Fitase

2 Pós-processamento

3 Pré-processamento

De acordo com Chowdhury et al. (2012) o aumento da absorção de proteína bruta não ocorreu porque quando se utiliza o ácido fítico ele inibe algumas enzimas digestivas. Esse efeito também foi constatado nos trabalhos de Khan et al. (2013), onde as mais sensíveis foram a α -amilase e protease, para a carpa. Cawley e Mitchell (1968) constataram que o ácido fítico inibi a atividade da amilase, consequentemente diminui a digestibilidade do amido, Knuckles et al. (1989) verificaram através da digestão in vitro a inibição da pepsina, caseína e albumina, Denstadli et al. (2006) registrou a baixa atividade de tripsina no *Salmo salar*, Denstadli et al. (2010) não observou diferença significativa para proteína em *Mustela vison*.

Segundo Richardson et al. (1985) o ácido fítico pode formar complexos com as proteínas, assim há uma inibição das enzimas digestivas e posteriormente haverá baixa absorção dos nutrientes na região do ceco piloro como constatou em *Oncorhynchus tshawytscha*, Spinelli et al. (1983) verificaram uma redução da disponibilidade de proteína quando utilizou alimentos contendo IP6 (ácido fítico).

Grynspan e Cheryan (1983) descreveram que a solubilidade do ácido fítico depende do pH, quando baixo tende a precipitar com o cálcio. A solubilidade da proteína depende do pH, à medida que o pH se aproxima do ponto isoeletrico, as cargas positivas e negativas são neutralizadas, resultando na precipitação da proteína, mas quando o pH está acima ou abaixo do ponto isoeletrico pode ocorrer a solubilidade das proteínas (MORALES et al., 2013).

Entretanto Morales et al., (2011) demonstraram que a adição da fitase GAE impediu a formação de tais complexos do ácido fítico em proteína, porém neste experimento utilizando a fitase Natuphos®, da BASF não se obteve o mesmo efeito.

Com a suplementação da enzima fitase nesse experimento não houve uma maior absorção de energia. De acordo com Richie et al., (2004) a atividade da amilase pode diminuir a energia digestível. Os seguintes autores também não observaram diferença significativa para a energia Denstadli et al. (2010) em *Mustela vison*, Furuya et al., (2008), no *Piaractus mesopotamicus* e Yoo et al. (2005) em *Sebastes schlegel*.

Eyae Lovell (1996) com *Ictalurus punctatus* e Roye Lall et al. (2003) com *Melanogrammus aeglefinus* L. os autores afirmaram que o maior teor de gordura em peixes alimentados com rações deficientes em fósforo está relacionado com a inibição do ciclo do ácido cítrico e o acúmulo de acetil-CoA para a biossíntese de lipídeos.

O coeficiente de digestibilidade aparente do cálcio nos dois grupos que foram suplementados com a fitase obtiveram um aumento significativo com relação ao tratamento controle, isso devido a capacidade de quelar os minerais e diminuir a sua biodisponibilidade, porém com a dose suficiente da enzima fitase ocorre uma degradação do fitato gerando uma maior biodisponibilidade do cálcio. O mesmo foi relatado por Liu et al. em (2013) *Ctenopharyngodon idellus*, Vanderberg et al. (2012) com *Oncorhynchus mikiss* e no trabalho de Fortes-Silva et al., (2011) verificaram um aumento significativo com relação ao cálcio e ao fósforo nos ossos.

O cálcio possui alta capacidade de ligação em meio ácido (LAWLOR et al., 2005), por sua vez o estômago das tilápias possui o pH de 2,0 após ocorrer às ligações o cálcio consegue aumentar o pH do intestino luminal (LAINING et al., 2011), porém nesse experimento não fez alterar significativamente o pH gástrico, pois não houve interferência na absorção de fósforo.

Com relação ao coeficiente de digestibilidade do fósforo o pré-processamento e o pós-processamento utilizando a fitase mostrou-se com efeito positivo sobre o tratamento controle, indicando que ambos procedimentos são eficazes com relação a temperatura.

As enzimas fitase possuem a sua faixa de temperatura entre 40°C a 60°C (LEI e STAHL 2000), por este motivo quando ocorre à extrusão deve-se ter um grande cuidado, pois pode ocorrer a inativação da enzima ou a redução de sua atividade. Keis et al. (1999) afirma que a atividade enzimática da fitase é maximizada a 55°C, abaixo dessa temperatura a sua atividade diminui linearmente, cerca de 10% a cada 5°C..

Outro fator de grande importância é o pH estomacal que segundo Kim et al. (2006) geralmente é determinado pela ionização de grupos catalíticos quando são afetados por várias interações envolvendo microambientes de enzima/substrato, onde para obter 100% de sua eficácia é necessário possuir um pH de 5,5 e ficar no estômago de 40 a 120 min, porém quando está em um ambiente de 2,5 sua porcentagem é de eficácia é de 60%.

Apesar do estômago da tilápia possuir um pH menor do que a literatura sugere como ótimo, a temperatura ficou na faixa adequada com relação à enzima o presente experimento apresentou efeito significativo para o nível de fósforo, confirmando que as

fitases retiraram o grupamento ortofosfato do anel inositol de ácido fítico e produziram o fósforo inorgânico livre que foi absorvido pelo peixe.

Os resultados do presente estudo corroboram as conclusões de Cao et al. (2008) avaliaram a enzima fitase em dietas com quatro dietas com o níveis crescente de fosfato monocalcio (25, 18,75, 12,5 6,5) para tilápia do Nilo o nível de fósforo aumentou significativamente com doses crescentes de fitase em pré-tratamento.

5 CONCLUSÃO

Ambos os métodos de suplementação da enzima fitase são eficazes quando utilizados 1.500 FTU/Kg, a temperatura de até 55°C, melhoram a biodisponibilidade de cálcio e fósforo em tilápia do Nilo.

6 REFERÊNCIAS

- ALVES, R.C.P.; BACCARIN, A.L. Efeitos da produção de peixes em tanques-rede sobre sedimentação de material em suspensão e de nutrientes no Córrego da Arribada (UHE Nova Avanhandava), baixo Rio Tietê. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Org.). **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. São Carlos: Rima, 329-347, 2005.
- BOCK, C.L.; PEZZATO, L.E.; CANTELMO, O.A. 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
- BOYD, C.E. **Water Quality in Ponds for Aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, L. 1990.
- CASTAGNOLLI. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal, FUNEP, p. 189, 1992.
- CAO, L.; WANG, W, YANG, C.; YANG, Y; DIANA, D.; YAKUPITIYAGE, A.; LU, Z. LI, D. Application of microbial phytase in fish feed. **Science Direct**, 40:497-507, 2007.
- CAO, L.; YANG, L.; WANG, W.M.; YAKUPITIYAGE, A., YUAN, D.R.; DIANA, J.S. Effects of pretreatment with microbial phytase on phosphorous utilization and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, 14:99–109, 2008.
- CAWLEY, R. W.; MITCHELL, A.J. Inhibition of wheat α -amilase by bran phytic acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 19 (2):106-108, 1968.
- CHERYAN, M.: Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 3:297–335, 1980.

- CHOWDHURY, M. A.K.; TACON, A. G.J.; BUREAU, D.P. Digestibility of amino acids in Indian mustard protein concentrate and Indian mustard meal compared to that of soy protein concentrate in rainbow trout and Atlantic salmon. **Aquaculture**, 356-357: 128-134, 2012.
- COSTELLO, A.J.R., GLONEK, T., MYERS, T.C. ^{31}P nuclear magnetic resonance-pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. **Carbohydr. Res.** 46:159–171, 1976.
- CYRINO, J. E. P. BICUDO, Á. J. A. SADO, R. Y. BORGHESI, R., DAIRICKI, J. K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39:68-87, 2010.
- Das, P.; MANDAL, S.; Khan, A.; MANNA, S. K; GHOSH, K. Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of 4 brackish water fish species. **Turkish Journal of Zoology** 38: 79-88, 2014.
- DEBNATH, D.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; JAIN, K. K; YENGKOKPAM, S. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth and nutrient digestibility *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings. **Aquaculture Research** 36:326–335, 2005.
- DENSTADLI, V.; SKREDE, A.; KROGDAHL, A.; SAHLSTRÖM, S; STOREVAKKEN, T. Feed intake, growth, feed conversion, digestibility, enzyme activities and intestinal structure in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed graded levels of phytic acid. **Aquaculture**, 256, 365:376, 2006.
- DENSTADLI, V.; ROMARHEIM, A.T.; SORENSEN, M.; AHLSTRÖM, O.; SKREDE, A. Effects of dietary phytic acid on digestibility of main nutrients and mineral absorption in mink (*Mustela vison*). **Journal of Animal and Feed Sciences**. v. 19, 1: 104-112, 2010.
- ELLESTAD, L.E.; SOARES, A.J.H Jr. Intestinal phytase II: A comparison of activity and *in vivo* phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. **Fish Physiology and Biochemistry** 26:259–273, 2002.
- EYA, J.C.; LOVELL, R.T. Available phosphorus requirements of food-size channel “catfish” (*Ictalurus punctatus*) fed practical diets in ponds. **Aquaculture**, 154: 283-291, 1986.
- FRANCIS, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, 197-217, 2001.
- FAO. **The State of world Fisheries and Aquaculture**. Rome, 2014
- FORTES-SILVA, R.; SANCHEZ-VASQUES, F.J.; MARTINEZ, F.J. Effects of pretreating a plant-based diet with phytase on diet selection and nutrient utilization in European sea bass. **Aquaculture**, v. 319, 3: 417-422, 2011
- FURUYA, W. M. **Tabelas Brasileiras para nutrição de tilápias**. Toledo, GMF, 2010.
- GRYNSPAN, F.; CHERYAN, M. Calcium phytate: effect of pH and molar ratio on *in vitro*, 1983

- HAN, Y.; LEI, X. G. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (PhyA) in *Pichia pastoris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 364:83–90, 1999.
- HAMM, R. **Biochemistry of meat hydration**. Adv. Food Res. 10:355–423, 1960.
- HELLAND, S., DENSTADLI, V; WITTEN, P.E. Hyperdense vertebrae and mineral content in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with graded levels of phytic acid. **Aquaculture**, 261:603-614, 2006.
- HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes**. Cambridge: Cambridge University Press, 386p 1988.
- HEPHER, B. **Nutricion de peces comerciales en estanques**. Primeira Edición. México. Ed. Limusa S.A. p. 407, 1993.
- HILSDORF, A.W.S. Genética e cultivo de tilápias-vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.22, p.73-84, 1995.
- KHAN, A.; GHOSH, K. Phytic acid-induced inhibition of digestive protease and α -amylase in three indian major carps: An in Vitro study. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.44, n.6, 2013.
- KIES, A.K.; DE JONGE, L.H.; KEMME, P.A. & JONGBLOED, A.W. (2006) Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies. **J. Agriculture Food Chemistry**, 54, 1753–1758, 2006.
- KIM, T.; MULLANEY, E.; PORRES, J. M.; KARL, R.; CROWE, S.; RICE, S.; KO, T.; ULLAH, A.U.J; DALY, C.B.; WELS, R.; LEI, X.G. Feed additive enhances its effectiveness as an Animal phy A phytase to match the stomach ph. **Applied and Environmental Microbiology**, 72(6)4397, 2006.
- KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASHOF, K. Ed. Methods of seawater analysis. Verlag Chemie Weinheim, p. 117-191, 1976.
- KUNCKES, B. E.; KUZMICKY, D. D.; GUMBMAN, M. R. BETSCHART, A.A. Effect of myo-inositol phosphatase esters on in vitro and in vivo digestion of protein. **Journal of Food Science**, 54:1348-1350, 1989
- KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: a review. **Food Chemistry** 120:945–959, 2010.
- KUMAR, V.; SINHA, A.K.; MAKAR, H.P.S.; DE BOECK, D.; BECKER, K. Phytate and phytase in fish nutrition. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.** 96:335–364, 2011.
- LAINING, A.; ISHIKAWA, M. KOSHIO, S.; LIDMAN & YOKOYAMA, S. Dietary inorganic phosphorus or microbial phytase supplementation improves growth nutrient utilization in phosphorus mineralization of juvenile red sea bream *Pagrus major*, fed soybean based diets. **Aquaculture Nutrition**, 18:502-511, 2012.
- LALL, S.P.. THE MINERALS. In: HALVER, J.E.; ARDI, R.W. **Fish Nutrition**. (USA), 2002.

- LEI, X.G.; STAHL, C.H. Nutricional benefits of phytase and dietary determinants of its efficacy. **J Applied Animal Reseach** 17: 97-112, 2000.
- LEESON, S. Recent advances in fat utilisation by poultry. In: Farrell D. J. (ed), **Recent Advances in Animal Nutrition in Australia**. The University of New England, Armidale, NSW, 170-1981, 1993.
- LI, M.H.; ROBINETE, H.R.; ROBINSON, E.H. Efficacy of dicalcium and defluorinated rock phosphates as dietary phosphorus sources for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, 147:107-114, 1996.
- LIEBERT, F. PORTZ, L. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. **Aquaculture**, 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 phytase degradation. **Aquaculture**, 267:292-299, 2007.
- LIU, L.W.; LUO, Y. L.; HOU, H. L.; PAN, J.; ZHANG, W. Partial replacement of monocalcium phosphate with neutral phytase in diets for grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. **Journal Applied Ichthyology**, 29: 520-525, 2013.
- LOVSHIN, L.L. Tilapia farming: A Growing Worldwide. **Aquaculture Industry**. In: Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes. Piracicaba:CBNA, 137-167, 1997.
- MACKERETH, J.F.H.; HERON, J.; TALLING, J.F. Water analysis: some revised methods for limnologists. **Freshwater Biological Association**, n.36, p.121, 1978.
- MAI, K.; ZHAO, J & BRIRD. Effect of dietary phytase on plasma inorganic phosphorus concentration and phytase phosphorus utilization in common carp. In: Abstract, **Proceedings of the world Aquaculture Conference**, p. 471, 2002.
- MAGA, J.A. PHYTASE: Its chemistry, occurrence, food interactions nutritional significance, and methods of analysis. **J. Agriculture Food Chemistry**. 30: 1-9, 1982.
- MARTINI, L. A.. **Cálcio e fósforo**. In: Vannucchi, H. Cardoso, M.A. (Eds). *Nutrição Humana*. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1:219-236, 2006
- MAINARDES-PINTO, C.S.R.; VERANI, J.R.; ANTONIUTTI, D.M. Estudo comparativo do crescimento de machos de *Oreochromis niloticus* em diferentes períodos de cultivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, 16:19-27, 1989.
- MAKKAR, H.P.S.; Antinutrition factors in foods for livestock. Antinutritional factors in foods for livestock. In: Gill, M., Owen, E., Pollot, G.E., Lawrence, T.L.J. (Eds.), *Animal Production in Developing Countries*. Occasional publication. **British Society of Animal Production**, 16: 69-85, 1993
- McDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. London: Academic Press, p. 524, 1995.
- MCCUAIG, L.W. et al. Intestinal alkaline phosphatase and phytase of chicks: effect of dietary magnesium, calcium, phosphorus and thyriactive casein. **Poult Science Savoy**. 51:526-530, 1972.

- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasil, 2010.
- MIRANDA, E. C.; PEZZATO, A. C.; PEZZATO, L. E.; GRANER, C. F.; ROSA, G. J.; PINTO L. G. Q. Relação de cálcio e fósforo disponível em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia** 29:2162, 2000.
- MORALES, G.A.; MOYANO, F.J.; MARQUEZ, L. In vitro assessment of the effects of phytate and phytase on nitrogen and phosphorus bioaccessibility within fish digestive tract. **Animal Feed Science and Technology** 170:209–221, 2011.
- MORALES, G.A.; RODRIGANEZ, S.; MÁRQUES, M.; DIAZ, F.; MOYANO, J. Solubilisation of protein fraction induced by *Escherichia coli* phytase and its effects on in vivo fish digestion of plant proteins. **Animal Feed Science and Technology**, 181: 54-84, 2013
- NWANNA, L. C.; SCHWARZ, F. Effect of supplemental phytase on growth, phosphorus digestibility and bone mineralization of common carp (*Cyprinus carpio* L). **Aquaculture Research**, 38:1037:1044, 2007.
- NOLAN, K.B., DUFFIN, P.A., MCWEENY, D.J. Effects of phytate on mineral bioavailability- in vitro studies on Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} (also Cd^{2+}) solubilities in the presence of phytate. **Journal Science Food Agriculture** 40:79–85, 1987.
- NRC - National Research Council - *Nutritional Requirements of fishes*. Washington: Academic Press. 114p., 1993.
- OLIVA-TELES, A.; PEREIRA, J.P.; GOUVEIA, A. Utilisation of diets supplemented with microbial phytase by seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquatic Living Resource**, 11: 255-259, 1998.
- PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M.; FURUYA, V.R.B.; PEZZATO, A.C. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31: 1595-1604, 2002.
- PRATTLE, C.A.; STANLEY, D.W.; VAN DER VOORT, F.R. Protein–phytate interactions in soybeans. II. Mechanism of protein–phytate binding as affected by calcium. **J. Food Biochemistry** . 6:255–271, 1982.
- POTRICH, F. R. Farelo de soja certificado orgânico na alimentação de tilapia do nilo (*Oreochromis niloticus*), Dissertação apresentada ao mestrado em zootecnia de Marechal Candido Rondon, 2012.
- QUINTERO-PINTO. L. G.; PARDO-GAMBOA B. S.; QUINTERO-PRADO A. M. C. PEZZATO, L. E. Exigência e disponibilidade de fontes de fósforo para tilápias. **Revista de Zootecnia**. v. 5 nº 2. p. 30-43, 2011.
- RAVINDRAN, V.; KOMEYAY, E. T. Acidification of weaner pig diets: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 62:313–322, 1993.
- RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L.; KOMEYAY, E. T. Phytates: occurrence, bioavailability, and implications in poultry nutrition. **Poultry and Avian Biology Reviews** 6:125–143, 1995.

- RAVINDRAN, V. Phytases in poultry nutrition. An overview. **Australian Poultry Science Symposium**. 7: 135–139, 1996
- RAY, A.K; ROY, T; MONDAL, S.; RINGG, E. Identification of gut-associated amylase, cellulase, and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. **Aquaculture Research**. 41:1462–1469, 2010.
- RESENDE, E. K. Bases Tecnológicas para o desenvolvimento da aquicultura no Brasil. **Embrapa**. Macroprograma 1, Grandes Desafios Nacionais. 2006.
- RIBEIRO, F. B.; LANNA E. A.T.; BONFIM, M.A. D.; DONZELE. J. L.; FREITAS, A. S.; SOUSA, M. P.; QUADROS, M. Níveis de fósforo total em dietas para alevinos de tilápia-do-nilo. **Revista brasileira de Zootecnia**, 35, 2006.
- RICHARDSON, N. L.; HIGGS, D. A.; BEAMES, R. M.; McBRIDE, J.R. Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytase on cataract incidence growth and histopathology in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Nutrition** 115: 553-267, 1985.
- RICHE, M.; GARLING, D.L.JR.Effect of phytic acid on growth and nitrogen retention in tilapia *Oreochromis niloticus* L, **Aquaculture Nutrition**, 10:389-400, 2004.
- REDDY, N.R.; SATHE, S.K.; SAINKHE, D.K. Phytase in legumes and cereals. **Adv. Food Research**. 28: 1-92, 1982.
- ROCHA, C. B.; PORTELINHA, M. K.; FERNANDES, J.M.; BRITTO, A. C. SANTOS, J.; POUEY, J L.O. Exigência de fósforo disponível para alevinos de peixe-rei (*Odontheistes bonariensis*) em uma dieta prática. **XIX Congresso de iniciação científica**. 2010.
- ROY, P.K.; LALL, S.P. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). **Aquaculture**, 221:451-468, 2003.
- SATOH, S.; TAKANEZAWA, M.; AKIMOTO, A.; KIRON, V.; WATANABE, T.; Changes of phosphorus absorption from several feed ingredients in rainbow trout during growing stages and effect of extrusion of soybean meal. **Fischeries Science**, 68:325-331, 2002.
- SCHAMBER. C. R. **Exigência de Fósforo para a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na terminação**. Dissertação. Universidade Estadual de Maringá, 2008.
- SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, ALDI; GONÇALVES, G. S.; FREITAS, J. M. A. Desempenho de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n. 5, p.1455-1461, 2010.
- SIGNOR, A. A.; FEIDEN, A.; BITTENCOURT, F.; POTRICH, F.R.; DEPARIS. A. BOSCOLO, W. R. Fósforo na alimentação de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40:2646- 2650, 2011.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H. S. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: Funep, p. 72, 1995.

- SPINELLI, J.; HOULE, C. R.; WEKELL, J.C. The effect of phytase on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium. **Aquaculture**, 8:30-71, 1983
- SMITH, L.S. Digestive function in teleost fish. **Fish nutrition**, p. 2-29, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1989.
- STEFFENS, W. **Principios fundamentales de la alimentación de los peces**. Zaragoza: Editora Acribia, 1987.
- TUNDISI, J.G.; TUNDISI, T.M. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, p. 631, 2008.
- USMANI, N. et al. Nutrient digestibility studies in Heteropneustes fossilis (Bloch), Clarias batrachus (Linnaeus) and C. gariepinus (Burchell). **Aquaculture Research**, 34:1247-1253, 2003.
- VANDENBERG, G.W.; SCOTT, S.L.; NOUE, J.DE A. Factor affecting nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant protein-based diet supplemented with microbial phytase. **Aquaculture nutrition** 18: 369-379, 2012.
- VOHRA, A.; SATANARAYANA, T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology** 23:29–60, 2003.
- WANG, F., YANG, Y.H., HAN, Z.Z., DONG, H.W., YANG, C.H. & ZOU, Z.Y. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase-sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquacult. Int.*, 17, 143–157, 2009.
- WEREMKO, D.; FANDREJEWSKI, H.; ZEBRIWSKA, T. HAN, K.; KIM, J.H.; CHO, W.T. Bioavailability of phosphorus in feeds of plant origin of pigs. *Review Asian, Aust Journal Animal Science*, 10:551-66, 1997.
- WILSON, R.P.; ROBINSON, E.H.; GATLIN, D.M. et al. Dietary phosphorus requirement of channel catfish. **Journal of Nutrition**, 112:1197-1202, 2011
- XU, J.; YIN, K.; LEE, J. H. W.; LIU, H.; HO, A. Y. T.; YUAN, X. Long-term and seasonal changes in nutrients, phytoplankton biomass, and dissolved oxygen in Deep Bay, Hong Kong. **Estuaries and Coasts**, 33:399–416, 2010.
- XU, J.; GLIBERT, P. M.; LIU, H.; YIN, K.; YUAN, X.; CHEN, M. Nitrogen sources and rates of phytoplankton uptake in different regions of Hong Kong waters in summer. **Estuaries and Coasts**, 35:559–571, 2012.
- YIN, K. Influence of monsoons and oceanographic processes on red tides in Hong Kong waters. **Marine Ecology Progress Series**, 262:27–41, 2003.
- YIN, K.; QIAN, P. Y.; WU, M. C. S.; CHEN, J. C.; HUANG, L.; SONG, X. Shift from P to N limitation of phytoplankton growth across the Pearl River estuarine plume during summer. **Marine Ecology Progress Series**, 221:17–28, 2001.
- YOO, G. Y.; WANG, X.J.; CHOI, S.; HAN, K.; KANG, J.C.; BAI, S.C. Dietary microbial phytase increased the phosphorus digestibility in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegelii* fed diets containing soybean meal. **Aquaculture**, 243: 215-322, 2005.

ZEN, H.; YAO, B. ZHOU, W.H.; FAN, Z.Y. Advance in microbial phytase reaearch.J **Aquaculture**, China 15:87, 2001.