

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

JANAINA FERNANDA ROSSETTO

Blends de proteases em dietas para tilápias (*Oreochromis niloticus*)

Toledo

2024

JANAINA FERNANDA ROSSETTO

Blends de proteases em dietas para tilápias (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. Altevir Signor

Co-orientador: Prof. Dra. Luisa Helena Cazarolli

Toledo

2024

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Rossetto, Janaina Fernanda

Blends de proteases em dietas para tilápias (*Oreochromis niloticus*) / Janaina Fernanda Rossetto; orientador Altevir Signor; coorientadora Luisa Helena Cazarolli. -- Toledo, 2024.

39 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2024.

1. Aquicultura. 2. Aditivos. 3. Exigências Nutricionais. I. Signor, Altevir, orient. II. Cazarolli, Luisa Helena, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

JANAINA FERNANDA ROSSETTO

Blends de proteases em dietas para tilápias (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Altevir Signor
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dr. Aldi Feiden
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dra. Joana D'Arc Mauricio Rocha
Universidade Estadual do Amapá

Aprovada em: Toledo, 29 de fevereiro de 2024.
Local da Defesa: Unioeste/*Campus* de Toledo.

Dedico este trabalho a Deus. A minha família, meu orientador, e aos amigos e colegas que contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

Institucionais

CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Unioeste por disponibilizar estruturas necessárias para realização desse estudo.

Tectron Nutrição e Saúde Animal empresa parceira deste estudo, por disponibilizar os produtos, análise e o apoio, que foram fundamentais para execução deste estudo.

Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) por disponibilizar os laboratórios e por todo o apoio da professora Luisa Helena Cazarolli e colegas para execução das análises laboratoriais.

Agradeço ao Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia por disponibilizar o laboratório para a fabricação das dietas experimentais e por todo o apoio do professor Arcangelo Signor e colegas.

Especial

Agradeço a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus familiares, meu pai Ladir, minha mãe Neuza e meu irmão Edimar, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

Agradeço de coração ao meu orientador professor Doutor Altevir Signor que desde a graduação vem me acompanhando e aconselhando-me nas minhas decisões e minha co-orientadora professora Doutora Luisa Helena Cazarolli, pelas orientações que foram muito importantes durante esta jornada de aprendizado, muito obrigado!

Agradeço aos meus amigos, colegas e professores do Grupo de Estudos e Manejo na Aquicultura – GEMaQ, pelos momentos de descontração, trabalho e dedicação, em especial aos professores Aldi Feiden, Wilson Rogério Boscolo, Fabio Bittencourt e Antônio Cesar Godoy, pelo apoio e por disponibilizar as estruturas, equipamentos e laboratórios para execução deste estudo, a equipe de trabalho que foram fundamentais: Jessica Luciane Nascimento, Leonan de Carvalho Oliveira, Bruna Alessandra Von Dentz, Alan Luis, Anderson Nogueira, Lukas Emanuel Carvalho, Eduarda Escobar Langer, Matheus Esper Maziero e demais amigos: Juliana, Leone, Herivelton, Alessandra, Silmara, Vanessa, Gean, Carlos, Luci, Marcia, Pedro, Felipe, Suzana, Debora e Vitor.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca (PREP), aos professores, colegas e a secretária Carla Muerer que não poupou esforços para nos atender de forma ágil. Obrigado!

E a todos que de alguma forma colaboraram. Meu muito obrigado!

Blends de proteases em dietas para tilápias (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a inclusão de diferentes níveis de blend de protease ácida e alcalina em dietas para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sob os aspectos de desempenho produtivo, rendimento de filé e respostas histológicas e enzimáticas. O experimento foi conduzido no laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos e Manejo na Aquicultura (GEMAQ) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Toledo/PR, durante 71 dias. Foram distribuídos inteiramente ao acaso 300 peixes com peso médio inicial de $117,89 \pm 5,69$ g em 20 aquários cônico-cilíndricos totalizando cinco tratamentos e quatro repetições com 15 animais por unidade experimental. Foram formuladas cinco dietas experimentais com diferentes níveis de inclusão de proteases ácida e alcalina, sendo uma ração controle positivo (CP) com condições suplementares de aminoácidos mais elevados, um controle negativo (CN) com condições suplementares de aminoácidos normais e valorização da protease, e três rações teste contendo 100, 200 e 400 gramas/toneladas de protease ácida e alcalina. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia (07h40, 11h40, 14h40 e 17h00 horas) e durante o período experimental foram monitoradas as variáveis físico-químicas da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia total, amônia tóxica, dureza e nitrito). Ao final do ensaio experimental foram avaliados o desempenho produtivo, rendimento de filé e os índices viscerossomáticos. Também foram realizadas as análises centesimais dos peixes e das dietas experimentais, a histologia dos órgãos e tecidos coletados (fígado e músculo) e as análises das enzimas digestivas e do metabolismo de aminoácidos do intestino e músculo dos peixes. O blend de protease influenciou na conversão alimentar aparente, taxa de eficiência proteica e nas fibras musculares. Os demais parâmetros avaliados não tiveram efeito do blend de protease. Recomenda-se a inclusão de 200 a 400 g/t de blend de protease ácida e alcalina em dietas para tilápia na fase final de desenvolvimento.

Palavras-chave: Aquicultura, Aditivos, Exigências Nutricionais.

Protease blends in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the inclusion of different levels of acid and alkaline protease blends in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), from the aspects of productive performance, fillet yield and histological and enzymatic responses. The experiment was conducted in the Aquaculture laboratory of the Aquaculture Studies and Management Group (GEMAg) at the State University of Western Paraná (UNIOESTE), Toledo/PR campus, for 71 days. 300 fish with an initial average weight of 117.89 ± 5.69 g were distributed completely at random in 20 conical-cylindrical aquariums, totaling five treatments and four replications with 15 animals per experimental unit. Five experimental diets were formulated with different inclusion levels of acid and alkaline proteases, being a positive control diet (CP) with supplementary conditions of higher amino acids, a negative control (CN) with supplementary conditions of normal amino acids and protease enhancement, and three test rations containing 100, 200 and 400 grams/tons of acid and alkaline protease. The animals were fed four times a day (7:40 am, 11:40 am, 2:40 pm and 5:00 pm) and during the experimental period the physical-chemical variables of the water were monitored (temperature, dissolved oxygen, pH, total ammonia, toxic ammonia, hardness and nitrite). At the end of the experimental trial, productive performance, fillet yield and viscerosomatic indices were evaluated. Proximate analyzes of the fish and experimental diets, the histology of the organs and tissues collected (liver and muscle) and the analysis of digestive enzymes and amino acid metabolism in the intestine and muscle of the fish were also carried out. The protease blend influenced apparent feed conversion, protein efficiency rate and muscle fibers. The other parameters evaluated had no effect of the protease blend. It is recommended to include 200 to 400 g/t of acid and alkaline protease blend in diets for tilapia in the final stage of development.

Keywords: Aquaculture, Additives, Nutritional Requirements.

Dissertação elaborada e formatada conforme as
normas da ABNT NBR 10520:2023.

SUMARIO

BLENDOS DE PROTEASES EM DIETAS PARA TILÁPIAS (<i>Oreochromis niloticus</i>) ...	6
Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	12
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. Metodologia	15
3.1. Elaboração das dietas experimentais	15
3.2. Delineamento experimental: desempenho produtivo e rendimento de filé	17
3.3. Análises centesimais	18
3.4. Análises histológicas	18
3.5. Análises enzimáticas	19
3.5.1. Amilase e lipase	19
3.5.2. Tripsina e quimotripsina	19
3.5.3. Maltase e sacarase	20
3.6. Análises estatísticas	21
4. Resultados e Discussão	21
4.1. Composição centesimal dos peixes	21
4.2. Desempenho produtivo, índices viscerossomáticos e rendimento de filé	22
4.3. Análises histológicas	26
4.4. Análises enzimáticas	28
5. Conclusão	32
6. Agradecimentos	32
7. Referências	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (base na matéria natural) com diferentes concentrações de blends de proteases ácidas e alcalinas para alimentação de tilápia do Nilo, durante 71 dias de cultivo.	16
Tabela 2. Composição centesimal das dietas experimentais (com base na matéria natural) com diferentes concentrações de blends de proteases ácidas e alcalinas na alimentação de tilápias do Nilo, durante 71 dias de cultivo.	18
Tabela 3. Composição centesimal (média \pm desvio padrão) dos peixes alimentados com diferentes concentrações de blends de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo (com base na matéria natural).	21
Tabela 4. Valores de desempenho produtivo e rendimento de filé (média \pm desvio padrão) de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>), alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo.	22
Tabela 5. Índices viscerossomáticos (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo.	24
Tabela 6. Histologia do fígado e músculo (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentadas com diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo.	26
Tabela 7. Atividade das enzimas digestivas no intestino (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentadas com diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo.	28
Tabela 8. Atividade das enzimas do metabolismo de aminoácidos no fígado (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentadas com diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hepatócitos (H.E. 40X). a) hepatócitos do tratamento controle positivo (T1); b) hepatócitos do tratamento controle negativo com valorização da enzima (T2); c) hepatócitos do tratamento com inclusão de 100 g/t de protease (T3); d) hepatócitos do tratamento com inclusão de 200 g/t de protease (T4) e e) hepatócitos do tratamento com inclusão de 400 g/t de protease (T5).27

1. INTRODUÇÃO

Originária da África, Israel e Jordânia, a tilápia foi introduzida no Brasil na década de 1970 pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) com objetivo de controle de plantas aquáticas, pesca, fins de pesquisa e alimentação humana (Pilay, 1990). É um peixe teleosteo de água doce, pertencente à família *Cichilidae*, da ordem Peciformes, com 75 espécies descritas e 100 subespécies (El-Sayed, 2006), das quais cerca de 22 são produzidas comercialmente (Gomes *et al.*, 2018), e três sobressaem na aquicultura, *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia* (Popma; Masser, 1999; McAndrew, 2000).

Atualmente a tilápia (*Oreochromis niloticus*) tem se estabelecido como a principal espécie da piscicultura brasileira, representando 60% (311 toneladas) da produção nacional de peixes no ano de 2018 (EMBRAPA, 2022). Está distribuída em grande parte do país, com maior relevância no Estado do Paraná com uma produção de 187,800 toneladas, seguido de São Paulo (77,300 toneladas), Minas Gerais (51,700 toneladas), Santa Catarina (42,500 toneladas) e Mato Grosso do Sul (32,200 toneladas) (Peixe BR, 2023).

Esta espécie tem despertado grande interesse comercial para o país pois apresenta características zootécnicas favoráveis para a produção como: hábito alimentar diversificado, com itens básicos da cadeia trófica (Furuya, 2010) e aceitação de alimento inerte após a absorção do saco vitelínico, apresenta fácil adaptação em ambientes com alta densidade de estocagem, são resistentes à enfermidades (Pontes, 2011), toleram baixos níveis de temperatura e oxigênio, variando desde 22 e 30 °C, e até 1,2 mg/L de oxigênio dissolvido (O.D) respectivamente e pH de 5 a 9 (Ostrensky *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2017). Apresenta também, carne de excelente qualidade nutricional, com textura firme e ausência de espinho em forma de “Y” (Kubitza, 2000).

Neste contexto, com o crescimento e desenvolvimento da piscicultura, os sistemas de criação tornam-se cada vez mais intensificados e umas das principais exigências são a utilização de rações com níveis adequados de nutrientes, que apresentem alta digestibilidade, visando o desempenho dos peixes e reduzindo as perdas pelo processo de lixiviação de nutrientes nos ambientes aquáticos, os quais comprometem a qualidade de água do cultivo e prejudicam o desenvolvimento dos animais (Cruz, 2017). Assim a utilização de enzimas exógenas na alimentação de peixes pode ser uma alternativa para melhorar as dietas e o aproveitamento dos nutrientes pelos animais (Silva *et al.*, 2017).

As enzimas são proteínas formadas pela união de aminoácidos ligados covalentemente entre si (Torres *et al.*, 2014) e atuam como catalizadores biológicos,

catalisando as centenas de reações sucessivas pelas quais as moléculas de nutrientes são degradadas, aumentando a velocidade das reações celulares através da diminuição da energia de ativação, sem alterarem o equilíbrio químico (Nelson; Cox, 2019). De maneira geral, a ação das enzimas depende de diversos fatores como: a concentração do substrato e de enzima, da temperatura, da variação do pH, da umidade, da presença de coenzimas, da resistência a atividade proteolítica e inibidores (Officer, 2000).

Considerando-se o uso de enzimas exógenas na alimentação de organismos aquáticos, estas moléculas podem se divididas em dois grupos: enzimas destinadas a complementar quantitativamente as enzimas endógenas dos animais (proteases, amilases, lipases, entre outros) e as enzimas que os animais não podem sintetizar (β -glucanases, pentosanases e α -galactosidases) (Henn, 2002).

A maioria das enzimas exógenas são provenientes da fermentação de microrganismos, principalmente dos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Cruz, 2017) que caracterizam-se por apresentar alta produção, baixo custo, maior variabilidade e estabilidade (Costa *et al.*, 2004). Dentro deste grupo, as proteases são as mais utilizadas na alimentação animal (Cruz, 2017), atuando principalmente na degradação das proteínas adquiridas na dieta, até que seus peptídeos e aminoácidos possam ser absorvidos e disponibilizados às células, sendo utilizados na síntese de novas proteínas (Berg *et al.*, 2004).

As proteases podem ser divididas conforme seu local de ação: endopeptidases os quais clivam ligações peptídicas no interior da molécula e exopeptidases que clivam ligações peptídicas nos grupos terminais (Rao *et al.*, 1998). Além disso, podem ser classificadas de acordo com seu pH ótimo de atuação em: ácidas com pH ótimo entre 4,0 e 4,5, neutras com pH ótimo de 7,0 e alcalinas com pH ótimo entre 9,0 e 10,0 (Cruz, 2017).

Segundo Espósito (2006), a secreção de HCl e pepsinogênio (forma inativa) ocorre no estômago. Estes zimogênios são ativados por autocatálise, os quais, liberam resíduos de aminoácidos na sua região N-terminal (Espósito, 2006). As proteases digestivas do pâncreas são produzidas sob a forma de zimogênios (tripsinogênio), e ativadas no lúmen do intestino através da ação da enteroquinase (enteropeptidase), protease do intestino delgado que hidrolisa uma ligação peptídica específica no tripsinogênio, transformando-o em tripsina (Espósito, 2006). A partir daí, as moléculas de enteroquinase juntamente com as tripsinas promovem um efeito cascata, responsável pela ativação de novos tripsinogênios e outros zimogênios (quimiotripsinogênio, procarboxipeptidase, proelastase e profosforilase) (Brody, 1994).

Na nutrição dos peixes, as proteases podem ser introduzidas as rações na forma de complexos enzimáticos, sendo recomendado para dietas que apresentam uma grande variedade de fatores antinutricionais (Cruz, 2017). Também podem ser incorporadas na forma de blends que consistem em misturas físicas de enzimas que podem ou não atuar sobre o mesmo substrato, diferenciando dos demais por apresentarem uma mistura de enzimas produzidas separadamente (Carvalho, 2013).

Atualmente, o uso de complexos ou blends enzimáticos estão sendo muito difundidos em dietas para diversos tipos de animais, sendo poucos os estudos em dietas para peixes. No Brasil, a aplicabilidade das enzimas teve grandes avanços, principalmente como forma de reduzir os problemas dos fatores antinutricionais que deterioram a qualidade de água dos cultivos (Dourado *et al.*, 2014).

Segundo Yang *et al.* (2011) os fatores antinutricionais incluem os inibidores de proteases (tripsina, quimiotripsina, plasmina, pronase, trombina, subtilisina, endopeptidase, proteases de insetos, papaína, elastina, proteases microbianas), hemoaglutinantes (lectina), antifatores de vitaminas E, A, D e B12, alérgenos, polissacarídeos não amiláceos (PNAs), oligossacarídeos, tiaminase, gossiplo, fitoestrógenos, alcaloides e ácido fítico, que estão presentes principalmente em dietas que possuem alimentos de origem vegetal, com níveis adequados de proteína e nutrientes indigeríveis presentes na parede celular (Oliveira *et al.*, 2007). Porém, um dos principais problemas são que peixes não possuem enzimas suficientes para digerir os fatores antinutricionais em dietas vegetais, desta forma, o uso de complexos ou blends de proteases em rações para peixes são de extrema importância (Cruz, 2017).

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar o uso de diferentes níveis de blends de proteases em dietas para tilápias do Nilo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a inclusão de diferentes níveis de blends de proteases ácidas e alcalina em dietas para alimentação de tilápias (*O. niloticus*).

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho produtivo, rendimento de filé e índices viscerossomáticos de tilápias alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de blends de proteases;
- Determinar a composição centesimal das dietas experimentais e dos peixes alimentados com rações contendo diferentes níveis de blends de proteases;
- Caracterizar a histomorfologia das fibras musculares e dos hepatócitos de peixes alimentados com dietas contendo diferentes níveis de blends de proteases;
- Avaliar o efeito do blends de proteases nas enzimas digestivas e nas enzimas do metabolismo de aminoácidos dos peixes alimentados com este aditivo.

3. METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos e Manejo na Aquicultura (GEMAQ), na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* Toledo/PR, Brasil, nos meses de março a maio de 2022, com duração de 71 dias. Os procedimentos adotados na condução deste trabalho foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais de produção da instituição (protocolo nº20/2022 CEUAP).

3.1. *Elaboração das dietas experimentais*

As rações foram formuladas com blends de proteases ácidas e alcalinas a base de fungos filamentos do gênero *Aspergillus niger* (Rocha, 2010) e bactérias gram-positivas não patogênicas do gênero *Bacillus subtilis* (Alves *et al.*, 2018), fornecidos pela empresa Tectron®.

Foram elaboradas cinco dietas experimentais, sendo: T₁: controle positivo (CP) com condições suplementares de aminoácidos mais elevados, T₂: controle negativo (CN) com condições suplementares de aminoácidos normais e valorização da protease, T₃: 100, T₄: 200 e T₅: 400 gramas/toneladas de proteases (Tabela 1).

As dietas foram processadas na fábrica de ração do GEMAQ, onde inicialmente os ingredientes foram triturados em moinho tipo martelo (modelo MCs 280, Vieira Moinhos e Martelos, Tatuí/SP, Brasil), peneirados em peneira de 0,3 mm, pesados, misturados durante 15 minutos em um misturador mecânico do tipo “Y” (modelo MA 200, Marconi Equipamentos Laboratoriais, Piracicaba/SP, Brasil), extrusadas em uma extrusora (modelo E-62 Ferraz Máquinas e Engenharia Ltda), com matriz de 4,0 mm de diâmetro e secas em um

secador tubular rotativo (modelo TE-394/3-D, Tecnal Equipamentos Científicos para Laboratórios, Piracicaba/SP, Brasil). Após o processamento e extrusão das dietas experimentais, as mesmas foram armazenadas em câmara fria (4 °C) até sua utilização.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (base na matéria natural) com diferentes concentrações de blends de proteases ácidas e alcalinas para alimentação de tilápia do Nilo, durante 71 dias de cultivo.

Ingredientes	Tratamentos				
	T1 – CP	T2 – CN	T3 – CN + 100 g/t	T4 – CN + 200 g/t	T5 – CN + 400 g/t
Farelo de soja 46% PB	161,43	205,69	205,69	205,69	205,69
Milho Moído fino	267,32	300,42	300,42	300,42	300,42
Far. Vísceras Aves 16,5% EE	230,58	100,00	100,00	100,00	100,00
Flo. Trigo	180,00	180,00	180,00	180,00	180,00
Far. Carne/ossos 40% PB	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Far. Penas 82% PB	14,74	58,14	58,14	58,14	58,14
Calcário Calcítico 36%	19,98	28,82	28,82	28,82	28,82
Sal Comum moído	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Bentonita	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
¹ PX VM PEIXE PRODUTOR 2,0-6,0 kg	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
L-Lisina 80%	1,20	2,72	2,72	2,72	2,72
DL-Metionina 98%	0,76	0,21	0,21	0,21	0,21
Propionato de Cálcio 98%	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
FC-TECMAX PRO FC (0,125 kg)	-	-	0,10	0,20	0,40
Caulim-Big Bag	0,40	0,40	0,30	0,20	-
CaP- Sunphase P5000 Granular	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
TOTAL	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00
Níveis Nutricionais					
E. Met Aves kcal/kg	2600,00	2520,00	2520,00	2520,00	2520,00
Proteína Disponível Total %	32,00	30,03	30,03	30,03	30,03
Gordura Bruta %	6,48	5,12	5,12	5,12	5,12
Fibra Bruta %	3,56	3,86	3,86	3,86	3,86
Amido %	24,91	27,38	27,38	27,38	27,38
Cinzas %	13,30	12,41	12,40	12,40	12,40
Cálcio Total %	3,42	3,23	3,23	3,23	3,23
Fosforo Total %	1,74	1,41	1,41	1,41	1,41
Lisina Total %	1,68	1,63	1,63	1,63	1,63
Met Total %	0,55	0,43	0,43	0,43	0,43
Met + Cist Total %	1,01	0,97	0,97	0,97	0,97
Treonina Total %	1,15	1,12	1,12	1,12	1,12
Sódio %	0,55	0,51	0,51	0,51	0,51
Cloro %	0,82	0,80	0,80	0,80	0,80

¹Composição qualitativa do premix: Veículo Q.S.P., vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina, biotina, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de ferro, sulfato de cobre, sulfato de cobalto, iodato de cálcio, selenito de sódio, aditivo antioxidante (B.H.T. - hidróxido de tolueno butilado). Níveis de garantia: Vitamina A (mín.) 2.000.000UI/kg, vitamina D3 (mín.) 640.000UI/kg, vitamina E (mín.) 2.400UI/kg, vitamina K3 (mín.) 680mg/kg, vitamina B1 (mín.) 400mg/kg, vitamina B2 (mín.) 1.000mg/kg, vitamina B6 (mín.) 1.200mg/kg, vitamina B12 (mín.) 4.000mcg/kg, vitamina C (mín.) 40g/kg, niacina (mín.) 9.000mg/kg, ácido pantotênico (mín.) 3.000mg/kg, ácido fólico (mín.) 400mg/kg,

biotina (mín.) 35mg/kg, manganês (mín.) 14g/kg, zinco (mín.) 11g/kg, ferro (mín.) 10g/kg, cobre (mín.) 2.000mg/kg, iodo (mín.) 200mg/kg, cobalto (mín.) 40mg/kg, selênio (mín.) 40mg/kg, B.H.T (mín.) 300mg/kg.

3.2. *Delineamento experimental: desempenho produtivo e rendimento de filé*

Utilizou-se 300 exemplares de tilápias com peso inicial médio de $117,89 \pm 5,69$ g e comprimento inicial médio de $24,36 \pm 0,58$ cm. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 20 aquários cônico-cilíndricos apropriados para coletas de fezes com capacidade para 500 litros em um delineamento experimental com cinco tratamentos e quatro repetições, totalizando 15 animais por unidade experimental. O sistema foi equipado com filtro mecânico, aeração constante, aquecimento e sistema de recirculação de água.

O manejo alimentar foi realizado por meio de quatro alimentações diárias, onde as dietas foram fornecidas às 07h40, 11h40, 14h40 e 17h00 horas. Ao final do dia, foram realizadas as coletas das rações depositadas no fundo dos aquários para ajuste da conversão alimentar e sifonamento das caixas para retirada de resíduos de excretas dos peixes.

Durante o período experimental, foram monitoradas as variáveis físico-químicas da água utilizando a sonda multiparâmetro (modelo YSI-PRO PLUS) e os kits de qualidade de água (Labcon Test), mensurando a temperatura ($27,46 \pm 0,11$ °C), oxigênio dissolvido ($6,17 \pm 0,47$ mg/L), pH ($6,90 \pm 0,03$), amônia total ($1,33 \pm 0,02$ mg/L) amônia tóxica ($0,03 \pm 0,0014$ mg/L), dureza ($42,03 \pm 0,93$) e nitrito ($2,08 \pm 0,05$ mg/L), sendo que estes mantiveram-se dentro dos valores recomendados para a produção de peixes de água doce (Arana, 2004).

Após o período experimental, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, posteriormente anestesiados com 100 mg de eugenol/L (Okamura *et al.*, 2010) para a determinação de medidas individuais de peso (g) e comprimento total (cm) e para os cálculos de desempenho produtivo, os quais foram determinados de acordo com o NRC (2011).

Foram avaliados: peso médio inicial (g) (PI); peso médio final (g) (PF); ganho em peso (g) (GP) = (peso médio final – peso médio inicial); ganho de peso diário (g) (GPD) = (ganho de peso final/quantidade de dias experimentais); conversão alimentar aparente (g) (CAA) = (consumo de ração/ganho de peso); taxa de eficiência proteica (%) (TEP) = ((ganho em peso/proteína bruta consumida) * 100); taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) (TCE) = ((ln peso médio final) – (ln peso médio inicial)/período experimental); sobrevivência (%) (S) e rendimento final (%) (RF) = ((peso do filé/peso do peixe inteiro)* 100).

Três peixes de cada unidade experimental foram eutanasiados com 200 mg de eugenol/L (Okamura *et al.*, 2010) para a coleta de material da cavidade celomática para os cálculos dos índices hepatossomático (%) (IHS) = (peso do fígado * 100 / peso final); índice

de gordura visceral (%) (IGV) = (peso da gordura / peso do peixe); índices viscerossomático (%) (IVS) = (peso do visceral / peso do peixe) e comprimento do intestino (cm) (CI).

3.3. Análises centesimais

As dietas experimentais (Tabela 2) e três carcaças de peixes eviscerados de cada unidade experimental foram submetidas as análises centesimais, realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimentos (LQA) no GEMaQ, de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2004), com exceção da energia bruta que foi determinada com auxílio de uma bomba calorimétrica (IKA[®]C2000).

Tabela 2. Composição centesimal das dietas experimentais (com base na matéria natural) com diferentes concentrações de blends de proteases ácidas e alcalinas na alimentação de tilápias do Nilo, durante 71 dias de cultivo.

Parâmetros	Tratamento				
	T1	T2	T3	T4	T5
¹ UV (%)	9,94	4,68	4,48	3,64	5,24
² PB (%)	30,80	30,82	31,33	31,55	30,74
³ EE (%)	7,40	6,54	6,49	6,54	6,37
⁴ FB (%)	5,54	7,48	5,17	5,18	4,41
⁵ MM (%)	12,60	12,25	12,68	12,53	13,32
⁶ CT (%)	3,42	3,42	3,52	3,55	3,87
⁷ FT (%)	2,31	1,67	1,98	1,28	1,66

¹Umidade e voláteis (UV), ²proteína bruta (PB), ³extrato etéreo por hidrólise ácida (EE), ⁴fibra bruta (FB); ⁵materia mineral (MM), ⁶calcio total (CT), ⁷fosforo total (FT). Valores médios na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey e Duncan a 5% de probabilidade (n=4).

3.4. Análises histológicas

Foram retiradas amostras de fígado e de fibras musculares (porção superior, acima da linha lateral) de três peixes de cada unidade experimental, fixadas em solução Alfac (álcool 80°, ácido acético glacial 99,8% P.A e formaldeído 37%) durante 24 horas e conservados em álcool 70°. As amostras de tecidos e órgãos foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois (80, 90 e 100°), clarificados em xilol e incluídos em parafina. Em seguida, foram realizados os cortes histológicos utilizando micrótomo, em secções seriadas de 7 µm e coradas em Hematoxilina-Eosina (HE).

Nas amostras de fígado, os hepatócitos foram analisados em microscopia de luz utilizando objetiva de 40X, quantificando o número de hepatócitos presentes na amostra. Já as fibras musculares foram analisadas em microscopia de luz utilizando uma objetiva de 40X,

mensurando o menor diâmetro de 200 fibras por amostra (Alami-Durante *et al.*, 2010). Para avaliação do crescimento das fibras musculares, estas foram classificadas em i) menor que 20 μm (<20 μm), ii) de 20 a 50 μm e iii) maior de 50 μm (>50 μm) (Luczinski, 2019).

Para as análises histológicas, as lâminas foram analisadas utilizando-se o software cellSens Standard 1.15[®] para obtenção das imagens e posterior avaliação.

3.5. Análises enzimáticas

Para a avaliação das enzimas digestivas e das enzimas do metabolismo de aminoácidos, os peixes foram alimentados uma hora antes de serem submetidos a anestesia e eutanásia. Após este processo, realizou-se a retirada imediata de uma porção do músculo e a parte anterior do intestino de três peixes de cada unidade experimental e armazenou-se em microtubos, os quais foram imediatamente congelados individualmente em ultra-freezer a -80 °C e mantidos nestas condições até o momento das análises.

As amostras foram homogeneizadas em tampão PBS (Tampão Fosfato Salina) pH 7,4 com homogeneizador (IKA T10 Basic) e centrifugado a 12.000 x g por 10 min (4 °C), o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas. A quantificação dos níveis de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5.1. Amilase e lipase

A determinação da atividade da amilase e lipase foi realizada por meio de kit comercial, seguindo as recomendações do fabricante adaptado para microplaca de 96 poços de fundo chato (Seixas-Filho, 2003). A leitura foi realizada em leitora de microplaca (Multiskan FC- Thermo Scientific).

3.5.2. Tripsina e quimotripsina

A atividade da tripsina foi determinada segundo o método de Hummel (1959) adaptado para microplaca. Para a determinação da atividade dessa enzima utilizou-se o substrato α -*p*-toluenesulphonyl- *L*-arginine methyl ester hydrochloride (TAME). A incubação dos extratos foi realizada por dois minutos em microplaca ultravioleta de fundo chato com leituras de 10 segundos, utilizando tampão Tris/CaCl₂ em pH 8,1. As análises foram

realizadas em triplicata e as leituras foram realizadas em leitora de microplaca (Multiskan FC- Thermo Scientific) com comprimento de onda ajustado para 247 nm e 30 °C. Foi utilizada uma unidade de tripsina para definir a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de Na-p-Tosyl-L-Arginine/minuto. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo da enzima foi de 540 M e o resultado expresso em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

A atividade da quimotripsina foi determinada segundo o método de Hummel (1959) adaptado para microplaca. Para a determinação da atividade dessa enzima utilizou-se o substrato *benzoyl tyrosine ethyl ester* (BTEE). A incubação dos extratos foi realizada por dois minutos em microplaca ultravioleta de fundo chato com leituras de 10 segundos, utilizando tampão Tris/ CaCl_2 em pH 7,8. As análises foram realizadas em triplicata e as leituras foram realizadas em leitora de microplaca (Multiskan FC- Thermo Scientific) com comprimento de onda ajustado para 256 nm e 30 °C. Foi utilizada uma unidade de quimotripsina para definir a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de etanol/minuto. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo da enzima foi de 964 M e o resultado foi expresso em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

3.5.3. *Maltase e sacarase*

A determinação da atividade das dissacaridasas/glicosidasas foi realizada em microplaca de fundo chato de 96 poços com leitura em 505 nm. As amostras foram incubadas em banho-maria com controle de temperatura a 25 °C. Para o início da dosagem 50 μL do sobrenadante dos homogenatos de intestino foi incubado com 20 μL de tampão maleato 86,7 mM (pH 6,0) por 5 minutos, posteriormente foi adicionado 30 μL de substrato (maltose ou sacarose) na concentração de 0,112 μM e o meio de reação foi incubado por 5 minutos a 25 °C. Para identificação da atividade das enzimas, foi realizada a dosagem de glicose ao final do período de incubação, utilizando kit colorimétrico comercial seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína, onde 1 U= 1 μmol de glicose/ min/ mg de proteína (Dahlqvist, 1984, Pereira *et al.*, 2011).

A atividade das enzimas do metabolismo de aminoácidos no fígado dos peixes, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) foram mensuradas via kit colorimétrico comercial de acordo com as instruções do fabricante (Gold Analisa[®]).

3.6. Análises estatísticas

Para fins estatísticos, os dados foram submetidos ao teste de ANOVA e quando diferentes ($p < 0,05$) aplicado o teste de média de Tukey ao nível de 5% de significância e o teste de Dunnet para comparar os diferentes tratamentos com o controle.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição centesimal dos peixes:

As diferentes concentrações de blend de protease ácida e alcalina incluídas nas dietas para as tilápias, durante 71 dias experimentais não tiveram efeito ($p > 0,05$) na composição centesimal dos peixes (Tabela 3).

Tabela 3. Composição centesimal (média \pm desvio padrão) dos peixes alimentados com diferentes concentrações de blends de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo (com base na matéria natural).

Parâmetros	Tratamento				
	T1	T2	T3	T4	T5
¹ PB (%)	16,27 \pm 1,09	16,09 \pm 0,53	16,08 \pm 0,59	16,24 \pm 0,58	15,84 \pm 0,92
² EE (%)	11,13 \pm 0,19	11,39 \pm 0,23	11,84 \pm 0,01	13,16 \pm 1,52	12,26 \pm 0,56
³ UM (%)	66,94 \pm 1,38	67,43 \pm 0,89	66,57 \pm 0,16	66,71 \pm 0,95	69,61 \pm 3,02
⁴ MM (%)	4,93 \pm 0,61	4,29 \pm 0,03	4,74 \pm 0,11	3,96 \pm 0,77	5,84 \pm 0,93
⁵ MS (%)	33,05 \pm 1,38	32,56 \pm 0,89	33,42 \pm 0,16	33,28 \pm 0,95	30,38 \pm 3,02

¹Proteína bruta (PB), ²extrato etéreo por hidrólise ácida (EE), ³umidade (UM), ⁴materia mineral (MM), ⁵ matérias seca (MS). Valores médios na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey e Duncam a 5% de probabilidade (n=4).

Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo foram obtidos por Koch *et al.* (2011), que avaliaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como pronutriente em dietas (sem levedura, 1% de levedura integra e 1% de levedura autolisada) para matrizes de tilápia, e não observaram efeito do ingrediente teste na composição centesimal dos peixes. Os autores obtiveram valores de 3,14% a 3,40% para matéria mineral, 14,75% a 15,62% de proteína bruta e 4,90% a 6,32% para extrato etéreo.

Também no estudo realizado por Cruz (2017) onde avaliou o efeito da suplementação de um complexo enzimático comercial formado por celulase e proteases, em dietas extrusadas para juvenis de tilápia do Nilo em sistema de recirculação de água sobre o desempenho produtivo e composição centesimal dos peixes, não observou efeito do ingrediente teste na

composição centesimal dos peixes. O autor obteve valores que variaram de 15,00 a 17,28% para matéria mineral, 55,00 a 57,10% de proteína bruta e 19,00 a 21,96% para extrato etéreo.

4.2. Desempenho produtivo, índices viscerossomáticos e rendimento de filé

Na tabela 4 estão descritos os valores referentes ao desempenho produtivo e rendimento de filé dos peixes alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de blend de protease, durante 71 dias de cultivo.

Tabela 4. Valores de desempenho produtivo e rendimento de filé (média \pm desvio padrão) de tilápia (*O. niloticus*), alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo.

Parâmetros	Tratamento					Valor de p^3	CV (%) ⁴
	T1	T2	T3	T4	T5		
¹ PI (g)	117,27 \pm 3,81	117,52 \pm 4,36	117,25 \pm 3,16	116,45 \pm 1,81	120,96 \pm 7,77	0,85443	5,21
² PF (g)	354,93 \pm 17,20	352,10 \pm 7,72	338,38 \pm 16,26	351,24 \pm 7,58	360,54 \pm 10,45	0,49847	4,92
³ GP (g)	237,65 \pm 17,83	234,57 \pm 7,51	221,13 \pm 13,10	234,78 \pm 7,17	239,57 \pm 5,73	0,49944	6,62
⁴ GPD (g dia ⁻¹)	3,34 \pm 0,25	3,30 \pm 0,11	3,11 \pm 0,18	3,30 \pm 0,10	3,37 \pm 0,08	0,49944	6,62
⁵ CAA (g)	1,46 \pm 0,12a	1,18 \pm 0,04b	1,15 \pm 0,06b	1,12 \pm 0,05b	1,10 \pm 0,05b	0,00001	6,01
⁶ TEP (%)	2,25 \pm 0,13b	2,76 \pm 0,08a	2,79 \pm 0,10a	2,85 \pm 0,10a	2,97 \pm 0,11a	0,00443	5,26
⁷ TCE (%)	1,55 \pm 0,08	1,54 \pm 0,06	1,49 \pm 0,03	1,55 \pm 0,03	1,54 \pm 0,05	0,69461	4,74
⁸ SO (%)	98,33 \pm 2,50	84,44 \pm 12,22	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00	91,66 \pm 9,17	0,15823	10,29
⁹ RF (%)	31,19 \pm 1,18	32,08 \pm 0,52	32,37 \pm 0,57	32,37 \pm 1,80	32,54 \pm 0,40	0,65500	4,28

¹Peso inicial (PI), ²peso final (PF), ³ganho de peso (GP), ⁴ganho de peso diário (GPD), ⁵conversão alimentar aparente (CAA), ⁶taxa de eficiência proteica (TEP), ⁷taxa de crescimento específico (TCE), ⁸sobrevivência (SO) e ⁹rendimento de filé (RF). Valores médios na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey e Dunnet a 5% de probabilidade (n=4). ³Valor de p determinado por Análise de Variância (ANOVA); ⁴Coefficiente de variação (CV).

Os valores de desempenho produtivo tiveram efeito ($p > 0,05$) do blend de protease, na conversão alimentar aparente (CAA) e na taxa de eficiência proteica (TEP), sendo que, os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Observa-se que, conforme aumento da inclusão do blend de proteases, os parâmetros de conversão alimentar e taxa de eficiência proteica melhoram, sendo que, o tratamento (T5) com inclusão de 400 g/t de protease apresentou a menor conversão alimentar e a melhor taxa de eficiência proteica.

Isso pode ter ocorrido, pois as dietas suplementadas com complexos ou blends enzimáticos, permitem que diversas enzimas exógenas atuem de forma simultânea e

complementar cada qual em seu substrato específico, possibilitando maior disponibilidade de aminoácidos e energia na dieta, e com isso, maior aproveitamento desses nutrientes pelos peixes (Oliveira, 2007).

Segundo Signor *et al.* (2010) a inclusão de blends ou enzimas exógenas representam uma alternativa viável para dietas de peixes, pois permite que alguns nutrientes sejam mais bem disponibilizados para a absorção pelo organismo animal, promovendo resultados positivos de desempenho produtivo.

Resultados semelhantes aos encontrados neste estudo foram obtidos por Cruz (2017) onde avaliou o efeito da suplementação de um complexo enzimático formado por celulase e protease, em dietas extrusadas para juvenis de tilápia. O autor verificou efeito do complexo enzimático no desempenho dos peixes, principalmente na conversão alimentar aparente.

Também Delziovo (2023) que avaliou o efeito de dois tipos de dietas (proteína vegetal e proteína animal) e três níveis de inclusão de blend enzimático (0, 50 e 75 mg/kg) sobre o desempenho de juvenis de tilápia do Nilo, verificou que, o blend enzimático na proporção de 75 mg/kg proporcionou os melhores resultados de peso final, ganho de peso e consumo individual.

Soares *et al.* (2008) em seu estudo onde avaliaram o desempenho produtivo de juvenis de tucunaré-paca alimentados com dietas contendo 0; 0,05; 0,10 e 0,15% de inclusão de proteases exógenas, verificou que, dietas contendo 0,10% de proteases proporcionaram os melhores resultados de ganho de peso, conversão alimentar e crescimento específico.

Nunes *et al.* (2006) ao avaliar o efeito da adição de enzimas digestivas exógenas (amilase, lipase e protease) no desempenho de juvenis de tambaqui em níveis de 0; 0,05; 0,1 e 0,2%, verificaram que as enzimas amilase a 0,05% e a lipase a 0,2% influenciaram no desempenho dos peixes, sendo que, o ganho em peso, a conversão alimentar aparente e crescimento específico apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Também Martins *et al.* (2016) que avaliaram o efeito a inclusão de 0; 200; 400; 600; 800 e 1000 ppm/ton de complexo enzimático em tambacu. O autor não encontrou efeito do ingrediente teste na sobrevivência, peso final, ganho em peso, comprimento total, biomassa final, ganho em biomassa e comprimento padrão.

No parâmetro de sobrevivência, observa-se que o percentual foi elevado, apresentando um valor acima de 80% para todos os grupos experimentais. O fato de não ter sido verificado uma alta mortalidade indica que as dietas atenderam as necessidades nutricionais dos peixes.

Resultados semelhantes ao obtido neste estudo foram encontrados por Delziovo (2023) que avaliou o efeito de dois tipos de dietas (proteína vegetal e proteína animal) e três níveis de

inclusão de blend enzimático (0, 50 e 75 mg/kg) sobre o desempenho de juvenis de tilápia do Nilo e verificou que não houve efeito do ingrediente teste na sobrevivência dos peixes. O autor obteve valores que variaram de 87,5 a 91,25%.

Em relação ao rendimento de filé, o blend de proteases ácida e alcalina não teve efeito ($p>0,05$) neste parâmetro, porém os peixes apresentaram um percentual de rendimento médio de 32,11%. Este percentual está dentro dos valores encontrados na literatura que varia de 25,4 até 42% (Clement e Lovell, 1994; Macedo-Viegas *et al.*, 1997; Souza e Macedo-Viegas, 2001; Souza *et al.*, 2002).

Resultados semelhantes ao obtido neste estudo foram encontrados no trabalho realizado por Dias *et al.* (2022) onde avaliaram o rendimento de carcaça e filé de tilápias do Nilo em sistemas de recirculação fechado e obtiveram valores de 32,01% para ambos os parâmetros avaliados.

Também no trabalho realizado por Santos *et al.* (2022) onde avaliaram o rendimento de filé de tilápias com peso inicial médio de 750 e 706 g produzidas em viveiros escavado e tanques-rede e obtiveram valores de rendimento de 34,39 e 33,33% respectivamente.

Na tabela 5 estão descritos os valores referentes aos índices viscerossomáticos dos peixes alimentados com diferentes concentrações de blend de protease, durante 71 dias de cultivo.

Tabela 5. Índices viscerossomáticos (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo.

Parâmetros	Tratamento					Valor de p^3	CV (%) ⁴
	T1	T2	T3	T4	T5		
¹ PE(g)	11,68 \pm 2,67	11,03 \pm 2,67	12,60 \pm 1,83	10,70 \pm 2,30	16,44 \pm 0,32	0,34194	5,59
² IHS (%)	2,24 \pm 0,45	2,70 \pm 0,28	2,17 \pm 0,35	2,02 \pm 0,39	2,14 \pm 0,12	0,25729	19,01
³ IGV (%)	3,79 \pm 0,85	3,68 \pm 0,71	3,05 \pm 0,36	3,32 \pm 0,38	3,33 \pm 0,38	0,59821	20,65
⁴ IVS (%)	8,32 \pm 1,20	9,90 \pm 1,49	11,22 \pm 1,93	10,14 \pm 1,39	10,14 \pm 0,73	0,34450	19,01
⁵ CI (cm)	142,66 \pm 20,17	135,45 \pm 10,79	154,00 \pm 15,00	147,33 \pm 13,83	149,66 \pm 13,83	0,73316	13,70

¹Peso eviscerado (PE), ²índice hepatossômico (IHS), ³índice de gordura visceral (IGV), ⁴índice viscerossômico (IVS) ⁵comprimento do intestino (CI). Valores médios na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey e Duncan a 5% de probabilidade (n=4). ³Valor de p determinado por Análise de Variância (ANOVA); ⁴Coefficiente de variação (CV).

As diferentes concentrações de blend de protease ácida e alcalina incluídas nas dietas para as tilápias, durante 71 dias experimentais não tiveram efeito ($p>0,05$) nos índices viscerossomáticos dos peixes.

Observa-se que, a inclusão do ingrediente teste proporcionou aumento nos valores dos índices viscerossomáticos, principalmente no tratamento (T3) com 100 g/t de proteases. Com isso, percebe-se que, o blend de protease ácida e alcalina influenciou de forma indireta no aumento dos índices viscerossomáticos dos peixes, onde o ingrediente teste estimulou a produção de enzimas endógenas nos peixes, permitindo que os nutrientes fossem melhor metabolizados e absorvidos pelo organismo, refletindo no crescimento dos peixes e consequentemente no aumento do volume das vísceras.

Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo foram obtidos por Gomes *et al.* (2018) que avaliaram o desempenho produtivo, índices viscerossomáticos e a composição química da carcaça de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas com grande proporção de ingredientes vegetais, suplementadas com níveis de 0; 100 ppm de fitase + 200 ppm de protease; 100 ppm de fitase + 400 ppm de protease e 200 ppm de fitase + 400 ppm de protease + 200 ppm de alfa amilase. O autor verificou que os ingredientes testes não influenciaram nos índices viscerossomáticos dos peixes.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, sugere-se novos trabalhos mais detalhados sobre o efeito da inclusão de diferentes níveis de blends de proteases sobre os índices viscerossomáticos dos peixes.

Em relação aos índices hepatossomáticos, o blend de proteases não teve efeito ($p > 0,05$) neste parâmetro. Porém observa-se que, os peixes alimentados com dietas contendo o ingrediente teste apresentaram baixos índices hepatossomáticos, sendo que, o tratamento (T4) com inclusão de 200 g de protease/ton apresentou o menor peso do fígado.

Segundo Honorato *et al.*, (2013) o fígado é um órgão muito importante no metabolismo de nutrientes. Alterações em suas estruturas (aparência, tamanho e histologia) estão associadas às atividades realizadas pelas células hepáticas em decorrência da presença de compostos químicos ou ausência de algumas substâncias (Takashima & Hibiya, 1995).

Em relação ao índice de gordura visceral, o blend de protease não teve efeito ($p > 0,05$) neste parâmetro, porém os tratamentos com inclusão do blend de protease apresentaram baixos valores, sendo que o tratamento (T3) com dietas contendo 100 g/ton de proteases, apresentou o menor valor de gordura visceral. Isso pode estar relacionado a atuação das lipases na degradação de lipídios provenientes da alimentação, através da liberação de ácidos graxos e glicerol no lúmen do intestino (Moura *et al.*, 2012).

Segundo Figueiredo *et al.* (2014) uma quantidade considerável de gordura visceral pode ser destinada as reservas energéticas dos peixes, o que sugere um desbalanço na relação de energia/proteína das dietas.

Com base no exposto, sugere-se novos estudos mais detalhados avaliando o efeito da inclusão de diferentes concentrações de blend de proteases nos índices viscerossomáticos, hepatossomáticos e gordura visceral dos peixes.

4.3. Análises histológicas

A inclusão de diferentes concentrações de blend de protease ácida e alcalina na alimentação de tilápias durante 71 dias experimentais, não tiveram efeito ($p > 0,05$) no número de hepatócitos avaliados (Tabela 6). Porém observa-se que os tratamentos com inclusão dos ingredientes testes apresentaram valores maiores comparado com os controles, principalmente o tratamento (T4) com 200 g/t de protease.

O fígado é um órgão muito importante no processo de digestão dos animais, isso porque exerce inúmeras funções no organismo como: armazenar glicogênio, produz a bile, mantém a homeostase corporal e tem papel importante na síntese de proteínas do plasma (Genten *et al.*, 2009). Também é um indicador do estado nutricional e fisiológico em peixes (Caballero *et al.*, 1999).

O aumento no número de hepatócitos pode estar relacionado a produção e desempenho do fígado no processo metabólico dos nutrientes. Já que, os hepatócitos estão diretamente ligados as funções metabólicas do fígado (Randall *et al.*, 2000).

Tabela 6. Histologia do fígado e músculo (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo.

Parâmetros	Tratamento					Valor de p^3	CV (%) ⁴
	T1	T2	T3	T4	T5		
¹ Hepatócitos	983,45 \pm 142,41	1044,64 \pm 95,84	1094,39,16 \pm 88,42	1196,16 \pm 150,54	1082,47 \pm 150,31	0,5867	16,91

Parâmetros	Tratamento					Valor de p^3	CV (%) ⁴
	T1	T2	T3	T4	T5		
² Fibras < 20 μ m	85,25 \pm 3,30a	62,55 \pm 8,35b	74,87 \pm 4,03ab	71,27 \pm 10,48ab	79,95 \pm 7,98ab	0,0432	12,89
20 a 50 μ m	14,35 \pm 3,00	22,97 \pm 2,46	23,82 \pm 3,43	28,27 \pm 10,13	19,37 \pm 7,51	0,1801	35,66
Fibras > 50 μ m	0,40 \pm 0,30b	14,47 \pm 6,84a	1,30 \pm 0,90b	0,45 \pm 0,35b	0,67 \pm 0,48b	0,0018	132,47

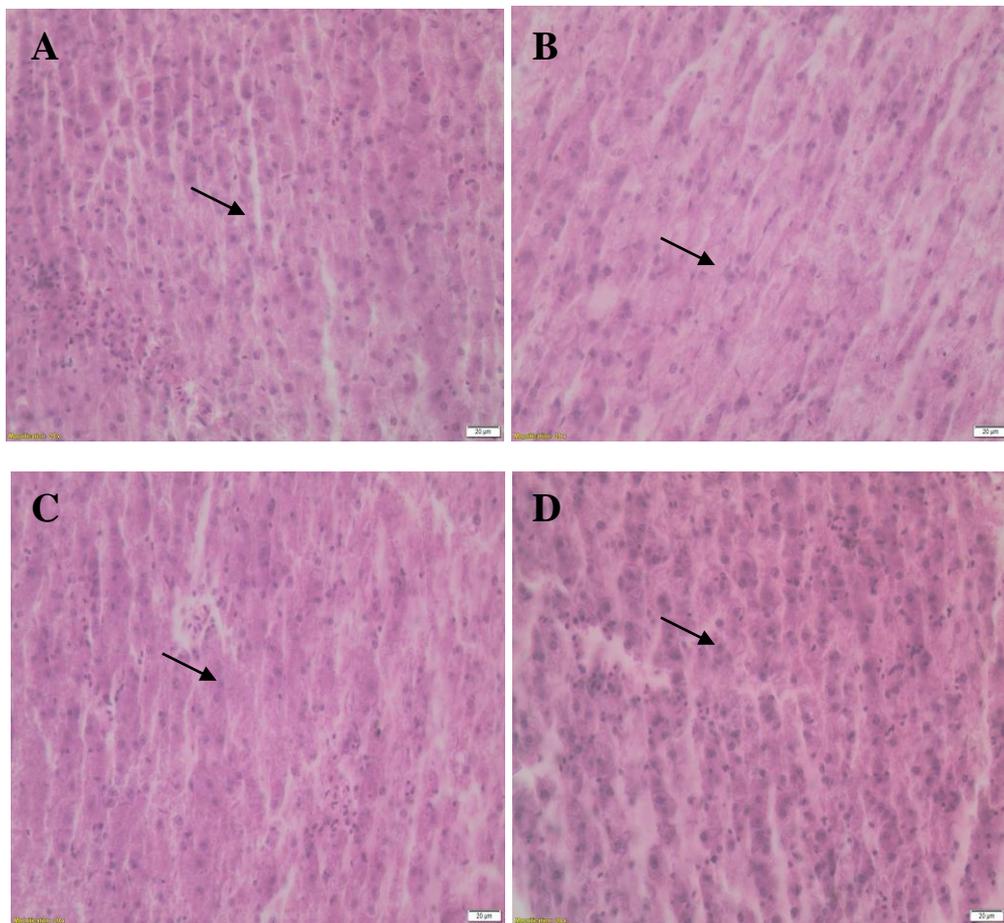
¹Hepatocitos (μ m) e ²fibras musculares (μ m). Valores médios na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey e Duncan a 5% de probabilidade (n=4). ³Valor de p determinado por Análise de Variância (ANOVA); ⁴Coefficiente de variação (CV).

Em relação ao músculo dos peixes, as fibras musculares menores de 20 μ m e maiores de 50 μ m tiveram efeito do blend de protease ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Se compararmos estas duas classes, percebe-se que, existem uma porcentagem maior de fibras menores que 20

μm do que de fibras maiores de $50 \mu\text{m}$. Neste sentido, estes resultados mostram uma tendencia de crescimento das fibras menores que $20 \mu\text{m}$, devido ao potencial do blend de protease, refletindo no crescimento muscular dos animais e no rendimento de filé dos peixes.

Segundo Signor *et al.* (2010) esta tendencia pode estar relacionada a atuação da protease em permite que alguns nutrientes sejam mais bem disponibilizados para a absorção pelo organismo animal, promovendo o crescimento dos peixes.

Já as fibras entre 20 e $50 \mu\text{m}$, não tiveram efeito ($p>0,05$) blend de protease ácida e alcalina entre os tratamentos, porem percebe-se que também apresentaram um percentual alto, principalmente no tratamento (T4) com 200 g/t de protease. Desta forma, observa-se uma tendencia de crescimento porem menor quando comparado com a classe de fibras menores de $20 \mu\text{m}$.



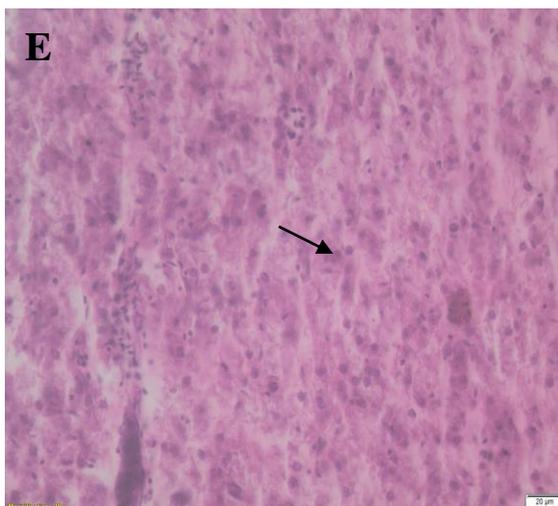


Figura 1. Hepatócitos (H.E. 40X). a) hepatócitos do tratamento controle positivo (T1); b) hepatócitos do tratamento controle negativo com valorização da enzima (T2); c) hepatócitos do tratamento com inclusão de 100 g/t de protease (T3); d) hepatócitos do tratamento com inclusão de 200 g/t de protease (T4) e e) hepatócitos do tratamento com inclusão de 400 g/t de protease (T5).

4.4. Análises enzimáticas

Na tabela 7 estão descritos os valores referentes a atividade das enzimas digestivas dos peixes alimentados com diferentes concentrações de blend de protease, durante 71 dias de cultivo.

Tabela 7. Atividade das enzimas digestivas no intestino (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo.

Parâmetros	Tratamento					Valor de p^3	CV (%) ⁴
	T1	T2	T3	T4	T5		
¹ Tripsina	0,00283 \pm 0,0015	0,00283 \pm 0,0007	0,00455 \pm 0,0011	0,00400 \pm 0,0013	0,00448 \pm 0,0014	0,4189	44,99
² Quimiotripsina	0,00243 \pm 0,00035	0,00228 \pm 0,00029	0,00232 \pm 0,00119	0,00266 \pm 0,00085	0,00332 \pm 0,00055	0,5813	38,05
³ Sacarase	164,17 \pm 81,73	395,48 \pm 76,05	302,72 \pm 214,51	457,10 \pm 118,27	488,40 \pm 227,12	0,2687	60,41
⁴ Amilase	720,71 \pm 172,63	776,03 \pm 137,40	684,08 \pm 106,43	896,71 \pm 196,08	744,09 \pm 155,61	0,6457	26,70
⁴ Maltase	751,80 \pm 103,19	795,77 \pm 206,53	681,34 \pm 116,75	775,73 \pm 211,98	1070,80 \pm 344,05	0,364	33,91
⁵ Lipase	9,36 \pm 1,26	9,31 \pm 0,89	10,29 \pm 1,03	11,17 \pm 3,12	9,67 \pm 1,29	0,7256	21,76

¹Tripsina (nmol/min/mg de proteína); ²quimiotripsina (nmol/min/mg de proteína); ³sacarase (U/mg de proteína); ⁴amilase (U/L/mg de proteína); ⁵maltase (U/mg de proteína); ⁵lipase (U/L/mg de proteína). Valores médios na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey e Duncam a 5% de probabilidade (n=4). ³Valor de p determinado por Análise de Variância (ANOVA); ⁴Coefficiente de variação (CV).

A inclusão de dietas com diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas não tiveram efeito ($p>0,05$) nas enzimas digestivas no intestino dos peixes. Porém

todas as enzimas digestivas avaliadas apresentaram uma tendência de aumento de atividade em relação aos tratamentos controles. Com isso, podemos sugerir que, o blend de protease incluído nas dietas experimentais promoveu aumento das enzimas endógenas, melhorando assim a digestão e absorção dos nutrientes, resultando em uma melhor conversão alimentar aparente e taxa de eficiência proteica.

Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo foram obtidos por Delziovo (2023) que avaliou o efeito de dois tipos de dietas (proteína vegetal e proteína animal) e três níveis de inclusão de blend enzimático (0, 50 e 75 mg/kg) sobre o desempenho de juvenis de tilápia do Nilo e verificou que a atividade da amilase, protease e lipase dos peixes não foi afetada pela suplementação com blend enzimático, porém o autor observou uma tendência de aumento na atividade das proteases, resultando em uma melhora no desempenho dos peixes.

Porém resultados dispares ao encontrado neste estudo foram obtidos por Pessini *et al.* (2021) onde avaliaram a influência do aditivo alimentar VILIGEN™ constituído de levedura hidrolisada desidratada (nas dosagens de 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g/kg), no perfil da comunidade microbiana do intestino e na atividade de enzimas digestivas em juvenis de tilápia. O autor obteve efeito para a atividade da lipase, onde a menor atividade foi estimulada no nível de inclusão de 2,50 g/kg do aditivo, sendo que as demais enzimas digestivas não houve diferença.

Ramos *et al.* (2020) que avaliaram os efeitos da suplementação de glutamina (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) sobre as variáveis de crescimento, composição corporal, morfologia intestinal e aspectos enzimáticos de juvenis de pirarucu, encontraram influência do ingrediente teste na atividade das enzimas digestivas. Os autores observaram que 1,02% de glutamina influenciou na atividade das proteases alcalinas, lipase, amilase e aspartato aminotransferase.

Com base no que foi descrito, sugere-se novos estudos avaliando a inclusão do blends de proteases ácida e alcalina na atividade das enzimas digestivas no intestino de tilápias na fase final de desenvolvimento.

Em relação a atividade da tripsina e a quimotripsina, estas enzimas digestivas apresentaram maiores atividades em dietas com inclusão de 100 (T3) e 400 (T5) g/t de protease respectivamente.

Segundo Solovyo *et al.* (2023) a tripsina e a quimotripsina são as principais proteases digestivas alcalinas responsáveis pela quebra de proteínas no intestino dos peixes. Ambas são sintetizadas no pâncreas exócrino e acumuladas em formas não ativas de zimogênio (tripsinogênio, quimotripsinogênio) e bicarbonato, que neutraliza o pH ácido do quimo

proveniente do estômago (Buddington e Kuz'mina, 2000; Baldisseroto, 2009; Genten *et al.*, 2009; Wilson e Castro, 2011).

Durante a digestão, as proteínas são secretadas no lúmen intestinal através dos ductos pancreáticos onde a enterocinase clivam pequenos peptídeos de tripsinogênio e quimiotripsinogênio convertendo-os na forma ativa (tripsina e quimotripsina) (Solovyo *et al.*, 2023), sendo então absorvidos por transporte ativo pelos cecos pilóricos do intestino e destinados para a formação dos tecidos.

Desta forma, essas enzimas digestivas são de extrema importância para os peixes, sendo assim, sugere-se que, as concentrações de blends de proteases inclusos nas dietas estimularam o aumento da atividade da tripsina e quimotripsina, melhorando a quebra e absorção das proteínas dos alimentos, destinados principalmente para a formação dos tecidos. Isso justifica o aumento de fibras musculares menores, sua tendência de crescimento, e os bons valores de conversão alimentar e taxa de eficiência proteica.

Para a digestão dos carboidratos, a sacarase, amilase e maltase apresentaram maior atividade enzimática nos tratamentos com inclusão de 400, 200 e 400 g/t de protease respectivamente.

Segundo Wang *et al.* (2016) os carboidratos são as principais fontes de energia menos dispendiosa na dieta dos animais. A energia produzida na forma de ATP é destinada para os processos químicos, como: biossíntese, mecânicos (contração muscular), elétricos (condução de estímulos nervosos), osmóticos (transporte ativo através da membrana) ou luminosos (bioluminescência) (Marzzoco *et al.*, 1999).

Desta forma, sugere-se que, os blend de proteases estimularam o aumento da atividade da sacarase, amilase e maltase, para a produção de energia na forma de ATP.

Em relação a lipase, esta enzima digestiva apresentou maior atividade no tratamento (T4) com inclusão de 200 g/t de protease. Segundo Moura *et al.* (2012) as lipases atuam na degradação de lipídios provenientes da alimentação, através da liberação de ácidos graxos e glicerol no lúmen do intestino, os quais desempenham importantes funções energéticas, estruturais e hormonais.

Com isso sugere-se que, blend de protease ácida e alcalina estimularam a maior atividade da lipase, que atuou na quebra e degradação dos lipídios provenientes da alimentação.

Na tabela 9 estão descritos os valores referentes às atividades das enzimas do metabolismo de aminoácidos no fígado dos peixes alimentados com diferentes concentrações de blends de proteases ácidas e alcalinas, durante 71 dias experimentais.

Tabela 8. Atividade das enzimas do metabolismo de aminoácidos no fígado (média \pm desvio padrão) de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes concentrações de blend de proteases ácidas e alcalinas, após 71 dias de cultivo.

Parâmetros	Tratamento					Valor de p^3	CV (%) ⁴
	T1	T2	T3	T4	T5		
¹ TGP	1,11 \pm 0,17a	1,15 \pm 0,35a	0,98 \pm 0,24a	0,66 \pm 0,10a	1,34 \pm 0,24a	0,3406	42,95
² TGO	5,14 \pm 0,26a	4,45 \pm 1,11a	4,56 \pm 1,20a	3,82 \pm 0,33a	4,63 \pm 0,59a	0,7858	31,76

¹TGP expressa em U/mL/mg de proteína; ²TGO expressa em U/mL/mg de proteína. Valores médios na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey e Duncan a 5% de probabilidade (n=4). ³Valor de p determinado por Análise de Variância (ANOVA); ⁴Coefficiente de variação (CV).

A inclusão de diferentes concentrações de blend de protease ácida e alcalina na alimentação de tilápias durante 71 dias experimentais, não tiveram efeito ($p > 0,05$) na atividade das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP).

Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo foram obtidos por Bartoszik (2016) que avaliou o desempenho zootécnico e perfil metabólico e enzimático de girinos submetidos a diferentes rações (coelho, peixe, coelho com suplementação externa de espinafre em proporção de 50% e ração de peixe com suplementação externa de espinafre na proporção de 50%). O autor não observou variações entre os tratamentos em relação a atividade de TGO, TGP, catalase, níveis de LPO, concentração de glicogênio e nas enzimas digestivas (maltase, lactase e sacarase).

Observa-se que, TGP e a TGO apresentaram maior atividade nos tratamentos (T5 e T1) com inclusão de 400 g/t e a dieta com condições suplementares de aminoácidos mais elevados, respectivamente.

Segundo Souza (2018) as aminotransferases TGO e TGP são enzimas produzidas no fígado e em outros tecidos que participam da síntese e degradação de aminoácidos, onde por meio de vias de transaminação, são capazes de transferir o grupo amino de um aminoácido que sofre a desaminação para um cetoácido que consiste em um aceptor do grupo amino para formação de um novo aminoácido.

Desta forma, sugerir-se que, a TGO não teve influência do blend de prótese, ao contrário do TGP que na maior concentração do ingrediente teste apresentou maior atividade.

O aumento desta TGP está relacionado ao papel do fígado na produção de enzimas destinadas a quebra de aminoácido.

Com base no exposto até o momento, podemos concluir que, o blend de protease ácida e alcalina é um excelente ingrediente funcional pois em concentrações de 200 a 400 g/t,

proporciona bons resultados de desempenho produtivo, principalmente nos parâmetros de conversão alimentar e taxa de eficiência proteica. Também, os blends de proteases nestas concentrações, estimulam a maior atividade das enzimas digestivas no intestino (tripsina, quimiotripsina, sacarase, amilase, maltase e lipase) e as enzimas do metabolismo de aminoácidos do fígado (TGP).

Porem, sugere-se estudos mais detalhados sobre a inclusão de diferentes concentrações de blends de proteases ácidas e alcalinas na alimentação de tilápias. Também faz necessário, estudos avaliando a viabilidade e o custo de produção do blend de protease.

5. CONCLUSÃO

Recomenda-se a inclusão de 200 a 400 g/t de blend de protease ácida e alcalina em dietas para tilápia na fase final de desenvolvimento.

Sugere-se novos estudos sobre a inclusão de diferentes concentrações de blends de proteases ácidas e alcalinas na alimentação de tilápias e estudos avaliando a viabilidade deste produto e seu custo de produção.

6. AGRADECIMENTO

Agradecimento CAPES – Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo e a Tectron® pelo financiamento da pesquisa.

7. REFERÊNCIAS

ALAMI-DURANTE, H; WRUTNIAK-CABELLO, C; KAUSHIK, S. J; MÉDALE, F. Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. **Science Direct**, v. 156, n°4, p.561-568. 2010.

ALVES, K. C. S; ALMEIDA, M. E. M; GLORIA, J. C; SANTOS, F. A; PEREIRA, K. D; CASTRO, D. P; MARIÚBA, L. A. M. *Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia**, v.7, n.2, 9p. 2018.

ARANA, L. A. V. Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões. **Editora da UFSC**. Florianópolis, 2 ed. 161p. 2004.

BRODY, T. Nutritional Biochemistry. **USA: Academic Press**, 657p. 1994.

BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada á piscicultura. **Editora da Universidade Federal de Santa Maria**, 2ed. 2009.

BARTOSZIK, H. **Desempenho zootécnico e metabólico de girinos de rã-touro submetidos a diferentes dietas**. 60p. (Monografia) Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia de Aquicultura, Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras, 2016.

BERG, J. M; STRYER, L; TYMOCZKO, J. L. Bioquímica. **Guanabara Koogan**, 5 ed. Rio de Janeiro, 1104p. 2004.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, v. 72, n° 7, p. 248-254, 1976.

BRITO, J. M; PONTES, T. C; TSUJII, K. M; ARAUJO, F. E; RICHTER, B. L. Automatio in tilapicultura: literature review. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.14, n.3, p.4-10, 2017.

BUDDINGTON, R. K; KUZ'MINA, V. Digestiv System. **The Laboratory Fish: Handbook of Experimental Animals**. **Academic Press, Baltimore**, p.173-179, 2000.

CABALLERO, M. J; LOPEZ-CABALERO, G; SOCORRO, J; ROO, F. J; IZQUIERDO, M. S; FERNANDEZ, A. J. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of githead seabream. **Aquaculture**, p.277-290, 1999.

CLEMENT, S; LOVELL, R. T. Comparison of processing yield and nutrient composition of culture Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v.119, p.299-310, 1994.

COSTA, F. G. P; CLEMENTINO, R. H; JÁCOME, I. M. T. D; NASCIMENTO, G. A. J; PEREIRA, W. E. Utilização de um complexo multienzimático em dietas de frango de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.2, p.63-71, 2004.

CRUZ, F. G. **Complexo enzimático em dietas extrusadas para tilápia do Nilo**. 60p. (Tese), Doutorado em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/Minas Gerais, 2017.

CARVALHO, B. R. **Avaliação de um complexo enzimático em rações para frango de corte com diferentes idades**. 86p. (Dissertação), Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2013.

DELZIOVO, F. R. **Blend enzimática melhora o consumo de ração, crescimento e saúde intestinal de juvenis de tilápia do Nilo**. 41p. (Dissertação) Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages. 41p. 2023.

DOURADO, L. R. B; BARBOSA, N. A. A; SAKOMURA, N. K. Enzimas na nutrição de não ruminantes. **Funep**, p.466-484, 2014.

DIAS, P. S; NOVODWORSKI, J; MATOS, E. J. A; MOCOCHINSKI, R; MEURER, F.

Rendimento de carcaça e filé de adultos de *Oreochromis niloticus* em sistema de recirculação fechada. 3p. 2022.

EMBRAPA PESCA E AQUICULTURA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Aspectos técnicos e econômicos da produção de tilápia em tanques-rede no Lago de Palmastão, Parque Aquícola Brejinho II. **Embrapa**, 1 Ed., 46p. 2022.

EL-SAYED, A. M. Tilapia culture. **CABI Publishing Series**, Egypt, 2006.

ESPÓSITO, T. S. **Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do Tambaqui e da Carpa como aditivo de detergentes em pó**. 98p. (Dissertação), Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

FIGUEIREDO, R. A. C. R; SOUZA, R. C; BEZERRA, K. S; CAMPECHE, D. F. B; CAMPOS, R. M. L; SOUZA, A. M; MELO, J. F. B. Relação proteína:carboidrato no desempenho e metabolismo de juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1567-1576, 2014.

FURUYA, W. M. Tabelas brasileiras para nutrição de tilápias. **Toledo: GFM**, 100p. 2010.

GENTEN, F; TERWINGHE, E; DANGUY, A. Digestive system. **Athas of fish histology, Science Publishers, Enfield**, p.75-91, 2009.

GOMES, V. D. S; SILVA, J. H. V; FILHO, J. J; AMÂNCIO, A. L. L; GIVISIEZ, P. E. N; COSTA, F. G. P. Blends de enzimas digestivas sobre crescimento e composição corporal de juvenis de tilápias do Nilo. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 20, n. 2, p. 59-64, 2018.

HENN, J. D. **Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves**. Seminário apresentado Hlophe-Ginindza, S.N.; Moyo, N.A.G.; Ngambi, J.W.; Ncube, I. The effect of exogenous enzyme supplementation on growth performance and digestive enzyme activities in *Oreochromis mossambicus* fed kikuyu-based diets. **Aquaculture Research**. 11p. 2002.

HONORATO C. A; ASSANO M; CRUZ C; CARNEIRO D. J; MACHADO M. R. F. Histologia do intestino de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo diferentes fontes de proteína. **Nucleus Animalium**. v. 1, n. 5, p. 85-92. 2013.

HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. **Can. J. Biochem Physiol**, v. 37, n. 12, p. 1393-1399, 1959.

KUBITZA, F. Tilápias: tecnologia e planejamento na produção comercial. **Jundiaí SP edição do autor**, 19p. 2000.

KOCH, J. F. A; PEZZATO, L. E; BARROS, M. M; TEIXEIRA, C. P; JUNIOR, A. C. F; PADOVANI, C. R. Levedura como pronutriente em dietas para matrizes e alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.11, p.2281-2289, 2011.

LUCZINSKI, T. G. **Proteína hidrolisada de frango em dietas para juvenis de tilápia do Nilo**. 28p. (Dissertação) Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2019.

MACEDO-VIEGAS, E. M; SOUZA, M. L. R; KRONKA, S. N. Estudo da carcaça de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em quatro categorias de peso. **Rev. Unimar**, v.19, p.863-870, 1997.

MARTINS, M. G; MOURA, G. S; FERREIRA, T. A; FERREIRA, A. L; SANTOS, T. G; PEDREIRA, M. M. Inclusão de complexo enzimático SSF em rações para juvenis de tambacu. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n.1, p.19-24, 2016.

MARZZOCO, A; TORRES, B. B. Bioquímica Básica. **Guanabara Koogan**, 2 ed. 355p. 1999.

MCANDREW, B. J. Evolution, phylogenetic relationship and biogeography. **Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Chapter one**, 32p. 2000.

MOURA, G. S; LANNA, E. A. T; FILER, K; FALKOSKI, D. L; DONZELE, J. L; OLIVEIRA, M. G. A; REZENDE, S. T. Effects of enzyme complex SSF (solid state fermentation) in pellet diets for Nile tilápia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.10, p.2139-2143, 2012.

MOURA, G. S; OLIVEIRA, M. G. A; LANNA, E. A. T. Desempenho e atividade de lipase em tilápias do Nilo. **Arquivos de Zootecnia**, v. 61, 8p. 2012.

NELSON, D. L; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Porto Alegre: Artmed**, 2014.

NRC - National Research Council. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington D. C.: The National Academies Press. 376 p. 2011.

NUNES, E. S. S; CAVERO, B. A. S; PEREIRA-FILHO, M; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.139-140, 2006.

OFFICER, D. I. Feed enzymes. *In*: D'Mello, J.P.F. (Ed.). **Farm animal metabolism and nutrition**. The Scottish Agricultural College, Edinburgh, UK. p. 405-426, 2000.

OLIVEIRA, G. R; LOGATO, P. V. R; FREITAS, R. T. F; RODRIGUES, P. B; ELIAS TADEU FIALHO, E. T; DIODATTI, F. C. Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1945-1952, 2007.

OKAMURA, D; ARAÚJO, F. G; ROSA, P. V; FREITAS, R. T. F; MURGAS, L. D. S; CESAR, M. P. Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n°5, 6p. 2010.

OSTRENSKY, A., BORGUETTI, J. R., SOTO, D. Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer. **Research Gate**, Brasília, 276p. 2008.

PEIXE BR – Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário 2023 Peixe BR da piscicultura: a força do peixe brasileiro. **PEIXE BR**, São Paulo/SP, 65p. 2023.

PESSINI, J. E. **Uso do aditivo alimentar VILIGEN em dietas para juvenis de tilápia do Nilo**. 105p. (Tese) Doutorado em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

PILLAY, T. V. R. Aquaculture Principles and Practices. **Oxford: Blackwell Publishing**, 640p. 1990.

PONTES, A. S. G. C. **Influência das propriedades fluidodinâmicas na matriz do biodiesel metílico e suas misturas dieséis: Biodiesel de óleo de peixe**. 98p. (Dissertação), Mestrado em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

POPMA, T; MASSER, M. Tilapia: Life history and biology. **Southern Regional Aquaculture Center**, 4p. 1999.

RAMOS, A. P. S; LUZ, J. R; MELO, J. F. B; BRAGA, L. G. T. Uso de glutamina na alimentação de juvenis de pirarucu. **Arq. Bras. Med. Veterinário Zootecnia**, v.72, n.5, p.1789-1796, 2020.

ROCHA, C. P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado solido. 161p. (Dissertação), Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

RANDALL, D; BURGGREN, W; FRENCH, K. Fisiologia animal. **Guanabara Koogan**, 4ed. 729p. 2000.

RAO, M. B; TANKSALE, A. M; GHATGE, M. S; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

SANTOS, V. G. do N; MACEDO, H. R; MELO, I. W. de A; ROCHA, J. D. M; ESTEVES, Y. A; FEIDEN, A. Rendimento de carcaça, composição química e resistência do couro de tilápia criadas em tanques e tanques-rede. **Research, Society and Development**, v.11, n.7, 2022.

SEIXAS-FILHO, J. T. Revisão sobre as enzimas digestivas nos peixes teleostei e seus métodos de determinação. **Augustus**, v. 08, 2003.

SIGNOR, A. A; BOSCOLO, W. R; BITTENCOURT, F; FEIDEN, A; 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. 39, n. 5, 7p. 2010.

SILVA, J. T; MENDES, H. R. C; FONSECA, J. D. R; OLIVEIRA, M. M; AIURA, F. S; SOUZA, I. G; PEREIRA, P. A; SIMAS, D. A. Avaliação do desempenho da tambatinga alimentada com rações contendo a enzima protease. **Zootec**, Santos, SP. 2017.

SOARES, E. C; PEREIRA-FILHO, M; ROUBACH, R; SILVA, R. C. S. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.6, p.971-976, 2008.

SOLOVYOV, M; KASHINSKAYA, E; GISBERT, E. Uma meta-análise para avaliar as contribuições da tripsina e da quimiotripsina como as duas principais endoproteases na hidrólise de proteínas no intestino dos peixes. **Elsevier**, 9p. 2023.

SOUSA, A. A. **Aspergillus niger e colina vegetal em dietas para tilápia no Nilo em sistemas fechados de produção**. 80p. (Dissertação), Mestrado em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó/SC, 2018.

SOUZA, M. L. R; MACEDO-VIEGAS, E. M. Comparação de quatro métodos de filetagem utilizado para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o rendimento do processamento. **Infopesca Internacional, Uruguay**, p.26-31, 2001.

TAKASHIMA, F; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology normal and pathological features**. 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag, 1995.

TORRES, V. C; ALI, I. G. P. Metabolismo de proteínas. **Revista de Actualización Clínica**, v.41, 5p. 2014.

WANG, T; CHENG, Y; CHEN, X; LIU, Z; LONG, X. Efeitos de pequenos peptídeos, probióticos, prebióticos e simbiótico no desempenho do crescimento, enzimas digestivas e estresse oxidativo em machos laranja garoupa, juvenis criados em água do mar artificial. **Jornal Chinês de Oceanologia e Limnologia**, v.35, p. 89-97, 2016.

WILSON, J. M; CASTRO, L. F. C. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. **The multifunctional gut of fish. Fish Physiology, Academic press**, p.2-55, 2011.

YANG, Y. H; WANG, Y. Y; LU, Y; LI, Q. Z. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus excretion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, vol. 19, p. 405-419, 2011.