

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIENCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FERNANDA REGINA DELZIOVO

**BLEND ENZIMÁTICO MELHORA O CONSUMO DE RAÇÃO, CRESCIMENTO E
SAÚDE INTESTINAL DE JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO *Oreochromis niloticus***

LAGES

2023

FERNANDA REGINA DELZIOVO**BLEND ENZIMÁTICO MELHORA O CONSUMO DE RAÇÃO, CRESCIMENTO E
SAÚDE INTESTINAL DE JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO *Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat

LAGES**2023**

FICHA CATALOGRÁFICA

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Delziovo, Fernanda Regina
BLEND ENZIMÁTICO MELHORA O CONSUMO DE
RAÇÃO, CRESCIMENTO E SAÚDE INTESTINAL DE JUVENIS
DE TILAPIA-DO-NILO *Oreochromis niloticus* / Fernanda Regina
Delziovo. -- 2023.
40 p.

Orientador: Thiago El Hadi Perez Fabregat
Coorientadora: Natalia Ha
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação , Lages, 2023.

1. Atividade enzimática. 2. Enzimas. 3. Morfometria intestinal.
I. El Hadi Perez Fabregat, Thiago. II. Ha, Natalia. III. Universidade
do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação . IV. Titulo.

FERNANDA REGINA DELZIOVO**BLEND ENZIMÁTICO MELHORA O CONSUMO DE RAÇÃO, CRESCIMENTO E
SAÚDE INTESTINAL DE JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO *Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat
Coorientadora: Dra Natalia Há

BANCA EXAMINADORA

Orientador Professor Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat
UDESC/CAV

Coorientadora Dra. Natalia Há
UDESC/CAV

Membros:

Dr. Juliano Uczay

UFSM

Dr. Tiago Goulart Petrolí
UNOESC

Dra. Kayane Pereira Besen
UDESC/CAV

Dra. Naglezi de Menezes Lovato
UFSM

Lages, 08 de fevereiro de 2023.

Dedico este trabalho a minha mãe Carmem Delziovo, ao meu pai Edemilson Delziovo, e ao meu irmão Henrique Delziovo por todo apoio e amo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meus maiores agradecimentos aos meus pais, que são os pilares da minha vida, sempre me deram amor incondicional e suporte em todas os momentos. À meu irmão, Henrique, por ser minha admiração e meu orgulho diário. A minha família, pelo carinho, união e apoio, que me mostram o que é paciencia, união, lealdade, perceverança e por serem meu porto seguro. Ao Leopoldo, que esteve comigo por 14 anos, trazendo alegria e amor todos os dias e agora descansa com dever comprido.

Sou extremamente grata as amigas que trago, Isadora e Emmily, que em especial passaram por momentos desafiadores da minha trajetoria sem soltar a minha mão. Me obrigo a citar Michel de Montaigne, quando indagado sobre sua amizade com Érienne de La Boétie: “Se me obrigassem a dizer por que o amava, sinto que a minha única resposta seria: Porque era ele, Porque era eu”. Obrigada por todos esses anos de amizade pura e sincera.

Agradeço aos meus amigos Lorenzo, Gilberto e Ingrid, que atravessaram comigo a graduação e se perpetuaram na pós graduação, por insistirem em almoços, cafés e jantares, estes momentos foram essenciais na minha tragetória. Ao Lucas, por todos os momentos de parceria, e descontrações necessárias durante este processo, apoio e carinho.

Meu muito obrigada a minhas amigas do LAPIS (laboratório de piscicultura), Nataly, Letícia, Mariana e Larissa, que não só participaram da minha tragetória na pós graduação, como da minha vida, com ajuda nas funções do laboratório, compartilhando conhecimento, até cafés da tarde. Sem vocês, a pós graduação teria sido muito mais difícil.

Aos meus colegas do LAPIS, Luiz, Natalia, Bianca, Nataly, Letícia, Mariana, Rafaela, Larissa e Diego por toda ajuda e parceria em todos os processos, de biometrias, alimentações, sifonagens e análises, sem vocês, este processo teria sido extremamente mais difícil.

Ao meu orientador, Thiago Fabregat, por toda sabedoria passada. Aprendi muito sobre nossa área, escrita e docência. Obrigada por toda paciênciam e dedicação que o senhor teve comigo. A minha coorientadora Natalia Há, por todo auxílio durante o projeto e escrita.

A todos os professores, funcionários e técnicos do CAV-UDESC, por toda dedicação, auxílio e ensinamentos passados em todo esse tempo. Ao Programa de Pós-Graduação CAV UDESC, em Ciência Animal, por possibilitar e auxiliar o crescimento academico, profissional e pessoal. Ao CNPq, pela disponibilidade da bolsa de estudo, e a empresa Quimtia, por possibilitar e auxiliar no projeto de pesquisa.

A todos, que de alguma forma contribuiram com a realização deste trabalho e me auxiliaram por esta fase, muito obrigada!

“Procure deixar o mundo um pouco melhor de que o encontrou e quando chegar a vez de morrer, poderá morrer felizes sentindo que ao menos não desperdiçou o tempo e fez todo o possível por praticar o bem”

Baden-Powell

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de dois tipos de dietas (proteína vegetal e proteína animal) e de três níveis inclusão do blend enzimático ($0, 50$ e 75 mg kg^{-1}) sobre o desempenho e saúde intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*. O delineamento foi inteiramente casualizados (DIC) em esquema fatorial (2×3) com seis tratamentos e quatro repetições. O experimento teve duração de 90 dias. Foram utilizados 240 juvenis masculinizados de tilápia-do-Nilo (peso inicial de $5,27 \pm 0,19\text{g}$) que foram distribuídos em 24 tanques redondos com volume útil de 70 L na densidade de 10 peixes por tanque. Os tanques eram conectados a um sistema de recirculação, equipados com sistema de aeração individual acopladas em um compressor radial. Cada unidade experimental teve também um aquecedor com termostato responsável por manter a temperatura de cultivo constante ($\sim 27^\circ\text{C}$). No final do experimento o desempenho foi avaliado e foram utilizados dois animais por unidade experimental para as análises de morfometria intestinal e atividade enzimática. Para os dois tipos de dieta utilizados, a suplementação com blend enzimático melhorou o crescimento e o consumo de ração de juvenis de tilápia-do-Nilo. A dieta contendo proteína animal proporcionou os melhores resultados de desempenho. A resposta do desempenho foi proporcional ao nível de suplementação com enzimas. Foi observado aumento nas células caliciformes, indicando uma melhora na saúde intestinal. A atividade enzimática dos juvenis de tilápia-do-Nilo não foi afetada pela suplementação com o blend enzimático.

Palavras-chave: atividade enzimática, enzimas, morfometria intestinal.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of two types of diets (vegetable protein and animal protein) and three levels of inclusion of the enzymatic blend (0, 50 and 75 mg kg⁻¹) on the performance and intestinal health of juveniles of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. The design was completely randomized (DIC) in a factorial scheme (2x3) with six treatments and four replications. The experiment lasted 90 days. Two hundred and forty male Nile tilapia juveniles were used (initial weight of 5.27 ±0.19g) that were distributed in 24 round tanks with a useful volume of 70 L at the density of 10 fish per tank. The tanks were connected to a recirculation system, equipped with an individual aeration system, coupled to a radial compressor. The experimental unit was also with a heater water thermostat responsible for keeping the cultivation temperature constant (~27°C). At the end of the experiment, performance was evaluated and two animals were used per experimental unit for the analyzes of intestinal morphometry and enzymatic activity. For both types of diet used, supplementation with the enzyme blend improved growth and feed intake of Nile tilapia juveniles. The diet containing animal protein provided the best performance results. The performance response was proportional to the level of enzyme supplementation. An increase in goblet cells was observed, indicating an improvement in intestinal health. The enzymatic activity of Nile tilapia juveniles was not affected by the enzymatic blend supplementation.

Keywords: enzymatic activity, enzymes, intestinal morphometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação de hidrólise proteica catalisada por protease (Lima et al., 2008).....	15
Figura 2. Hidrólise da Beta-1,3 glucana pela beta-1,3 glucanase (Fleuri e Sato, 2005).....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da suplementação com protease sobre desempenho zootécnico (modificado de Schneider & Lazzari, 2022).....	17
Tabela 2. Efeito da suplementação com carboidrases sobre desempenho zootécnico, modificada de Castillo e Gatlin III, 2015.....	19
Tabela 3. Formulação e composição das dietas.....	22
Tabela 4. Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis de qualidade de água.....	23
Tabela 5. Valores de P das variáveis de desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo.....	25
Tabela 6. Valores médios (\pm desvio padrão; n= x) das variáveis de desempenho.....	25
Tabela 7. Valores de P das variáveis de histomorfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo.....	26
Tabela 8. Valores médios (\pm desvio padrão; n= x) das variáveis de histomorfometria intestinal.....	26
Tabela 9. Valores de P das variáveis de atividade enzimática intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo.....	27
Tabela 10. Valores médios (\pm desvio padrão; n= x) das variáveis de atividade enzimática intestinal.....	27

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 ENZIMAS NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES	12
1.2 SUPLEMENTAÇÃO ENZIMÁTICA.....	13
2. Blend enzimático melhora o consumo de ração, crescimento e saúde intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	19
2.1 INTRODUÇÃO	19
2.3 RESULTADOS.....	24
2.4 DISCUSSÃO	26
2.5 CONCLUSÃO	28
3. REFERÊNCIAS.....	29

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ENZIMAS NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES

Com a expansão rápida do mercado aquícola está ocorrendo uma maior intensificação da produção de peixes e organismos aquáticos (FAO, 2022). Condições intensivas podem gerar condições de estresse, influenciando na saúde e crescimento dos animais (Herrera, et al., 2019). Com o objetivo de minimizar estes efeitos, tem-se estudado o uso de aditivos para promover maior crescimento e saúde dos peixes, entre eles as enzimas exógenas (Zheng et al., 2019), como demonstrou Liu et al (2018), onde a suplementação enzimática em dietas de carpa gibel (*arassius auratus gibelio*) proporcionou melhora no desempenho zootécnico e na eficiência alimentar. Enzimas são proteínas que possuem função catalítica (Lewis & Stone, 2022; Pacheco & Mendes 2021). A estrutura molecular enzimática é globular e composta por uma parte de estrutura proteica (apoenzima), e outra com um menor peso molecular a qual possui cofatores, sendo eles inorgânicos, grupos prostéticos ou coenzimas (Lewis & Stone, 2022; Molinaro, 2013).

As enzimas exógenas, são pronutrientes obtidas através de processos fúngicos, bacterianos e de leveduras (Zheng, 2019). Em animais terrestres, as enzimas são comumente utilizadas com objetivo de melhorar aproveitamento dos nutrientes da dieta, promovendo melhora no crescimento e saúde dos animais (Boyd et al., 2020). Já no setor aquícola, esta tecnologia precisa ser mais estudada (Boyd et al., 2020). A atuação enzimática depende de sua especificidade, habilidade de escolher exatamente o substrato com grupo molecular químico similar. O efeito das enzimas varia dependendo de qualidade e tipo de dieta (Zamini, et al., 2014; Hassan, et al., 2019) e são interdependentes e influenciadas pela temperatura, pH, substratos relacionados entre outros. A suplementação com enzimas na alimentação de peixes possui diversos benefícios, dentre eles a melhora do aproveitamento alimentar, da digestibilidade, no crescimento, na composição corporal dos peixes e do sistema imune (Monier, 2020; Zheng, et al., 2019; Hlophe-Ginindza et al., 2015).

Enzimas exógenas são enzimas suplementadas em dietas animais, afim de auxiliar e suprir a ação de enzimas endógenas. Podem ser utilizadas enzimas naturalmente produzidas pelos animais como proteases e amilase, com o objetivo de otimizar o processo digestivo, melhorar a digestibilidade, retenção de nitrogênio (Schneider & Lazzari, 2022; Lucio et al., 2021) e catalisar reações hidrolíticas para liberar glicose e carboidratos (Gomes et al., 2018). Podem ainda ser supridas enzimas que normalmente não estariam presentes no trato digestório, ou que estariam presentes em quantidades muito baixas. Exemplo disso são carboidrases como a xilanase, beta

glucanase, beta mananase e celulase, que atuam na melhora da digestibilidade da biomassa vegetal melhorando a energia da dieta (Lucio et al., 2021). Gioda et al. (2017) mostrou em seu estudo que o hábito alimentar influencia na atividade enzimática, onde a protease ácida e tripsina possuem maior atividade em peixes carnívoros e a amilase e maltase possuem maior atividade para herbívoros. Neste sentido, a abordagem com suplementações customizadas para diferentes espécies ainda precisa ser aprofundada, de forma a modular os aditivos de acordo com as demandas de cada uma delas.

A principal função da suplementação com carboidrases é romper as paredes celulares de fatores antinutricionais (FA) presentes em ingredientes vegetais com o objetivo de melhorar qualidade da dieta e imunidade do animal (Torres et al., 2003). Estes fatores são diversos e incluem PNAs que se ligam a grandes quantidades de água, aumentando a viscosidade da digesta e dificultando o contato de enzimas endógenas à nutrientes (Maas et al., 2020; Hajra et al., 2013). As carboidrases também promovem efeitos na microbiota intestinal, aumentando a disponibilidade de nutrientes digeríveis, a absorção de substâncias nutritivas necessárias para o crescimento dos peixes, além de promover um crescimento da microbiota benéfica, há também menores recursos para proliferação de patógenos intestinais (Castillo & Gatlin III, 2015; Jiang et al., 2014). O uso destas enzimas de forma isolada e em complexos enzimáticos foram revisados por Schneider & Lazzari, (2022) em dietas para peixes. De acordo com estes autores os resultados encontrados na literatura são limitados, no entanto, mostram que a suplementação para peixes é uma forma viável para melhorar a digestibilidade de carboidratos, proteínas e lipídeos.

1.2 SUPLEMENTAÇÃO ENZIMÁTICA

1.2.1 Proteases

As proteases exógenas são as enzimas mais produzidas no mercado (Razzaq et al., 2019). São obtidas por diferentes processos a partir de bactérias, fungos e leveduras (Li et al., 2015; Anwar & Saleemuddin, 1997). Um dos processos mais comuns é a obtenção através do processo de fermentação microbiana, e posteriormente isolamento e purificação (Razzaq et al., 2019). A produção de proteases por plantas e animais também é possível, mas o processo é mais longo e trabalhoso (Rao et al., 1998). O processo de obtenção por microrganismos é o mais comumente utilizado para obtenção de proteases, uma vez que os microrganismos possuem crescimento rápido e necessitam de um pequeno espaço para o seu desenvolvimento (Rao et al., 1998). A maioria das proteases comerciais obtidas por bactérias são produzidas pelo gênero *Bacillus* sp.,

devido a sua facilidade de adaptação e crescimento em meios complexos e sintéticos (Takami et al., 1990)

A utilização de proteases exógenas auxilia e compensa a atividade das enzimas digestivas, solubilizando e hidrolisando proteínas em peptídeos de baixo peso molecular, peptonas e aminoácidos (Schneider & Lazzari, 2022) como mostra a Figura 1. Estudos mostram que com inclusão de proteases é possível reduzir a proteína na dieta de peixes, como evidenciou Ragaa et al. (2017) em seu estudo, onde a redução de 2% de proteína bruta em dietas de tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*), manteve o desempenho zootécnico, com inclusão de 200 e 400mg.kg⁻¹ e protease. Assim como Saleh et al. (2021), o qual em seu estudo, a redução de 1% de proteína bruta na dieta de tilápia-do-Nilo, incluindo 500mg.kg⁻¹ de protease exógena, manteve o desempenho zootécnico dos peixes. Estas enzimas também são utilizadas na produção de hidrolisados proteicos (Kristinsson & Rasco, 2000).

Para suplementação de proteases, existem dois tipos amplamente utilizados na indústria, a protease alcalina e protease ácida (Zheng et al., 2019). A atuação enzimática proteolítica tem seu início no estomago dos peixes com a pepsina (Razzaq et al., 2019), que é predominante em pH ácido e de maior importância para peixes carnívoros (Baldisseroto, 2002). As proteases ácidas, obtidas por fungos como o *Aspergillus* sp., são estabilizadas no pH entre 3,8 e 5,6. A protease alcalina tem sua principal produção pelo gênero *Bacillus*, como exemplo a tripsina (Komklao, 2008). Possui sua maior atuação no intestino e cecos pilóricos, ativada por pH entre 9 e 11 (Razzaq et al., 2019; Singhal et al., 2012).

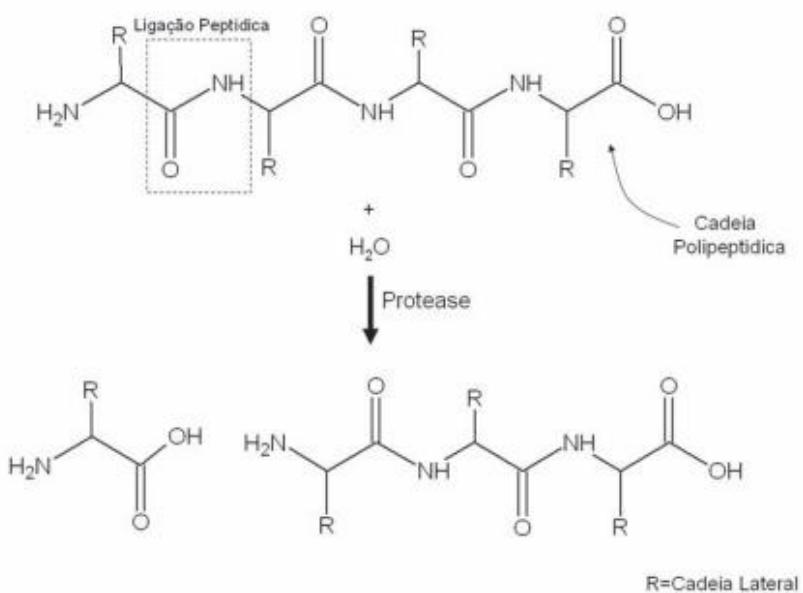


Figura 1 Representação de hidrólise proteica catalisada por protease (Lima et al., 2008)

Devido à grande variedade fisiológica nos peixes, alguns estudos mostram resultados promissores com o uso de diferentes proteases para peixes, mas nem sempre são obtidos resultados positivos (Tabela 1). Os produtos, tipos de enzimas e inclusões utilizados são bem variáveis, o que pode explicar as diferenças nos resultados. Para uma suplementação correta é importante observar as diferenças no trato gastrointestinal dos peixes, como no caso das espécies agástricas como *Cyprinideos* cujo trato digestório é neutro ou alcalino, e para as quais a suplementação com proteases ácidas não será eficiente (Zheng et al., 2019). Outro fator de interferência são os componentes da própria dieta que podem modificar na eficácia da enzima (Schneider & Lazzari, 2022). A inclusão de farinha de gérmen de alfarroba para alimentação de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) evidenciou uma redução na atividade enzimática digestiva (Couto et al., 2016). Souza et al. (2016) observou uma redução na atividade de protease alcalina, em dietas com menores níveis de proteína, fornecidas para tambaquis (*Colossoma macropomum*).

Tabela 1. Efeito da suplementação com protease sobre desempenho zootécnico (modificado de Schneider & Lazzari, 2022).

Espécie	Nível indicado (mg.kg ⁻¹)	Proteases	Resultados	Referênci a
Tilapia-do-Nilo (<i>O. niloticus</i>)	250	protease (600.000 U g ⁻¹ , Novus Company, USA)	↑GP↑TCE↑A A↑TEP ↓CI	Saleh et al. 2021
Tilapia- do-Nilo (<i>O. niloticus</i>)	500	protease (5000 U g ⁻¹ , Huvepharma, Antwerp, Belgium)	↑ GP ↓ CA ↑ TEP	Hassaan et al. (2019)
Carpa Prussiana (<i>C. auratus gibelio</i>)	400	coated neutral protease (Kemin Industries Zhuhai Co., Ltd.)	↑ TCE ↓ CA↑ TEP	Liu et al. (2016)
Truta Arco-íris (<i>O. mykiss</i>)	250	protease (Domestic poultry-250TM; JEFO Nutrition, Inc. St.-Hyacinthe, QC)	↓ CA	Drew et al. (2005)
Bagre Africano (<i>Clarias gariepinus</i>)	1100	kprotease (Kemin Industries (Zhuhai) Co. Ltd., China)	↑ GP ↑ AA ↓ CA	Kemigabo et al. (2019)

Carpa Prussiana (<i>C. auratus gibelio</i>)	150 e 175	alkaline protease (AG175™, JEFO Nutrition, Inc. Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada)	↑ GP ↓ CA ↑ TEP	Shi et al. (2016)
Tilapia (<i>O. niloticus</i> × <i>O. aureus</i>)	175	alkaline protease (JEFO Nutrition, Inc. Saint-Hyacinthe, QC, Canada)	↑ GP ↓ CA	Li et al. (2015)
Tilápia-do-Nilo (<i>O. niloticus</i>)	200 e 400	protease (Ronozyme ProAct TM, DSM Nutrition Products, SP, Poland)	↑ GP ↑ TCE ↓ CA ↑ TEP ↑ CI	Ragaa et al. (2017)
Robalo (<i>D. labrax L.</i>)	1000	protease (PROXYM ULTRA5®, Gloray Vet COMPANY)	↑ GP ↑ TCE ↓ CA ↑ TEP ↑ CI	Goda et al. (2019)

Legenda: TCE: taxa de crescimento específico; GP: Ganho de peso; CA: conversão alimentar; TEP: Taxa de eficiência proteica; AA: aproveitamento alimentar; CI – consumo individual ; Aumento (↑); Redução (↓)

1.2.2 Carboidrases

As carboidrases são definidas como enzimas que catalisam a redução de peso molecular de carboidratos poliméricos através de hidrolise das ligações glicosídicas, resultando em oligo ou polissacarídeos (Zheng et al., 2019; Adeola & Cowieson, 2011). Um dos processos de ação das carboidrases está exemplificado na Figura 2. Dentre as carboidrases, as mais utilizadas são as xilanases e beta glucanases (Adeola & Cowieson, 2011). Outras carboidrases comercialmente utilizadas são amilase, celulase e pectinase (Castilho, et al., 2015; Adeola & Cowieson, 2011). As xilanases disponíveis comercialmente são obtidas por bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Aspergillus*, *Humicola*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Paloheimo, et al. 2011). As beta glucanases estão presentes na parede celular de microrganismos como fungos e leveduras como *Agrobacterium* sp, ou ainda ser produzida por algumas bactérias, como *Sphingomonas* sp (Philippini et al. 2019).

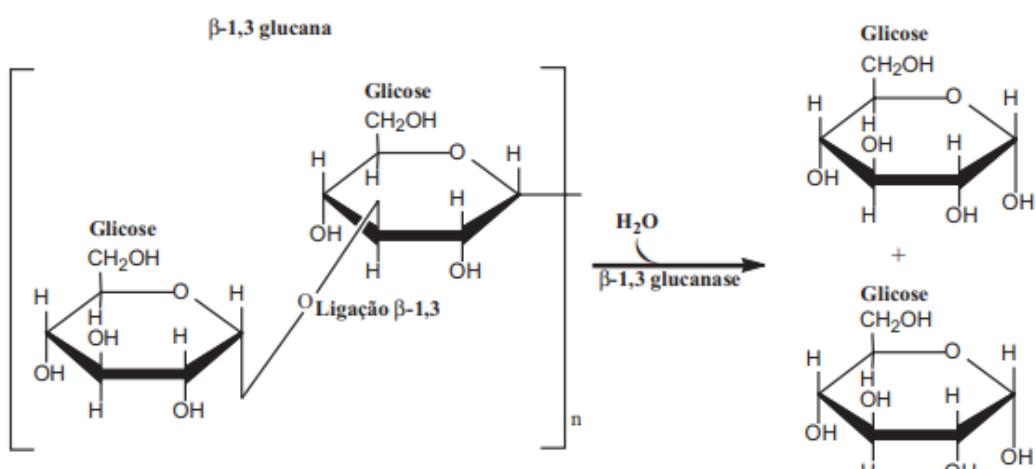


Figura 2. Hidrólise da Beta-1,3 glucana pela beta-1,3 glucanase (Fleuri e Sato, 2005)

Os ingredientes utilizados na formulação afetam o tipo de carboidrase utilizada. Devido a heterogeneidade da fração dos polissacarídeos não amilaceos (PNAs) é difícil determinar a combinação específica de enzimas para maximizar o seu aproveitamento (Meng et al., 2005). Em geral ingredientes ricos em carboidratos insolúveis, como celulose, utilizam-se as mananas e celulase. Já ingredientes com carboidratos solúveis como trigo, utilizam-se glucanases e xilanases. A ação da carboidrase também tem influência da composição da ração. Toledo et al. (2007) ao adicionar complexo enzimático em dietas para frango de corte obtiveram melhores resultados nas dietas com maior densidade nutricional quando comparada a baixa densidade (menor energia metabolizável, proteína e aminoácidos essenciais). Além disso, estudos mostram que outros tipos de enzimas incluídas no complexo enzimático também interferem na ação da carboidrases. Meng et al. (2005) em seu estudo com frango de corte verificou *in vitro* que as combinações de carboidrase foram mais efetivas na degradação de PNAs do que a utilização de carboidrases separadamente e ainda observou que a degradação dos PNAs dependeu da combinação enzimática utilizada.

As enzimas podem melhorar o aproveitamento dos carboidratos como o amido, possibilitando a inclusão de uma fonte de energia de baixo valor agregado (Gatlin et al., 2007; Krogdahl et al., 2005). Além disso, os carboidratos advindos de plantas possuem fatores antinutricionais como os PNAs (Zheng et al., 2019). Estes PNAs possuem uma parede celular a qual funciona como um escudo contra as enzimas digestivas, o que interfere na digestão e absorção, ocasionando um aumento de viscosidade da digesta, prejudicando a digestão de outros nutrientes (Gatlin III, et al., 2015). A inclusão de carboidrases nas dietas animais tem como objetivo melhorar o valor nutricional de ingredientes ricos em PNAs, para possibilitar maiores inclusões destes carboidratos na dieta (Murakami et al., 2007). Com a maior inclusão destes carboidratos, há uma redução no custo de formulação da dieta e redução de excreção destes no meio ambiente (Zheng et al., 2019).

Estudos mostram que a inclusão com carboidrases melhoram desempenho zootécnico em diversas espécies, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Efeito da suplementação com carboidrases sobre desempenho zootécnico, modificada de Castillo e Gatlin III, 2015.

Espécie	Inclusão de carboidrases ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Resultados	Referência
Salmão do Atlântico (<i>Salmo salar</i>)	tripsina, protease alcalina, protease ácida, amiloglucosidase, amilase e celulase	$\uparrow \text{AA} \uparrow \text{PF} \uparrow \text{TCE}$	Carter et al. (1994)

Robalo	Japonês <i>(Lateolabrax japonicus)</i>	fitase, glucanase, pentosanase, celulase e xilanase	↑ GP ↑AA	Ai et al. (2007)
<i>Tilapia, Oreochromis niloticus × O. aureus</i>		protease, β-glucanase e xilanase	↑ GA ↑AA	LIN et al. (2007)
Bagre Africano	<i>Clarias gariepinus</i>	xilanase, β-glucanase, β-amilase, celulase e pectinase	↑ TCE ↑AA ↑TEP	Yildirim and Turan (2010)
Tilápia-do-Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	pepsina, papaína e α-amilase	↑ GP ↑AA	Goda et al. (2012)
Carpa	Capim <i>(Ctenopharyngodon idella)</i>	Celulase	↑ GP	Zhou et al. (2013)
Carpa	Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	α -amilase	↑ GP ↑ TCE	Kumar et al. (2006)

Legenda: TCE: taxa de crescimento específico; GP: Ganho de peso; CA: conversão alimentar; AA: aproveitamento alimentar; TEP: Taxa de eficiência proteica; Aumento (↑); Redução (↓)

2. Blend enzimático melhora o consumo de ração, crescimento e saúde intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*

2.1 INRODUÇÃO

Nos últimos anos houve uma tendência de intensificação da piscicultura, como resultado do aumento da demanda pela carne de pescado (FAO, 2022). Em sistemas intensivos existe a necessidade de uma alimentação de qualidade, de forma a promover um ótimo crescimento e produzir animais mais saudáveis resistentes a desafios e infecções (Zheng, 2019). A farinha de peixe é comumente utilizada nas rações pela alta qualidade proteica e excelente perfil de aminoácidos e ácidos graxos (Jannathulla et al., 2019). Entretanto seu custo é elevado e existe demanda pela sua substituição (Liu et al., 2016; Gatlin III et al., 2007). Os farelos vegetais são alternativas, mas possuem fatores antinutricionais que podem reduzir o crescimento dos peixes (Li et al., 2019; Zhang et al., 2018; Liu et al., 2017). Neste sentido, aditivos zootécnicos estão sendo utilizados para melhorar o aproveitamento da ração e saúde dos peixes (Hassaan et al., 2020). Uma estratégia que tem proporcionado bons resultados mas ainda precisa ser melhor avaliada é o uso de enzimas exógenas.

Enzimas são consideradas catalizadores biológicos, proteínas capazes de acelerar reações químicas. As enzimas são usadas na alimentação animal como aditivos pró-nutrientes com o objetivo de melhorar a digestibilidade e valor nutricional da dieta, a performance animal, reduzir de fatores antinutricionais e manter a saúde intestinal (Lucio et al., 2021). Diferentes tipos de enzimas podem ser utilizados nas rações, como proteases, fitase e carboidrases (Zheng, et al. 2019). Após a ingestão, as enzimas são ativadas em diferentes locais. A protease alcalina, tem sua maior atividade no intestino posterior (Klahan, et al., 2009). A lipase possui sua maior atividade no intestino anterior (Klahan, et al., 2009). Já a amilase, possui sua maior atividade na porção medial do intestino (Tengjaroenkul, et al., 2000). A melhora no aproveitamento das rações reduz a disponibilidade de nutrientes que podem favorecer microrganismos patogênico e inibindo a sua proliferação (Lucio et al., 2021).

Na aquicultura a suplementação com protease tem sido uma estratégia amplamente utilizada para melhorar da eficiência nutricional e redução dos custos de produção (Dalsgaard et al., 2012; Drew et al., 2005). Recentemente, a técnica de suplementação na dieta com complexos enzimáticos tem ganhado maior atenção, visto que a dieta é formulada com múltiplos ingredientes, necessitando uma variedade enzimática (Zheng et al., 2019). Pesquisas avaliando combinados de carboidrases (xilanase, betaglucanase, beta mananase, entre outras) para melhorar o aproveitamento de ingredientes de origem vegetal na alimentação de peixe foram

desenvolvidas (Castillo e Gatlin III, 2015). Os resultados encontrados na literatura são limitados (Zheng, 2019; Yigit et al, 2018; Dalsgaard et al., 2012), mas já foi observada melhora no desempenho zootécnico (Zhou et al., 2013), demonstrando que a suplementação com blends de enzimas é uma forma viável para melhorar a digestibilidade de carboidratos, proteínas e lipídeos.

A tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* é uma espécie de grande popularidade na piscicultura devido a sua rusticidade e tolerância a criação intensiva. O uso de complexos enzimáticos já foi avaliado na alimentação de tilápias com efeitos benéficos sobre o crescimento, como melhora no ganho de peso, na taxa de crescimento específico e na sobrevivência (Adeoye et al., 2016). Diferentes combinações de enzimas ainda precisam ser avaliadas, bem como sua utilização em diferentes tipos de dietas. Além disso, os efeitos da suplementação enzimática sobre a saúde intestinal dos peixes ainda precisam ser mais estudado. Variações na composição de ingredientes (Schneider & Lazzari, 2022; Bao et al., 2013) e níveis de nutrientes (Souza et al. 2016; Toleto et al., 2007) podem afetar os resultados obtidos. O objetivo do trabalho foi avaliar a suplementação com blend enzimático em diferentes tipos de dietas, sendo uma de origem animal e outra de origem vegetal, sobre o impacto no desempenho e na saúde intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo.

2.2 METODOLOGIA

O experimento foi desenvolvido em um período de 90 dias, o Laboratório de Piscicultura da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, SC, Brasil. O estudo foi aprovado no comitê de ética no uso de animais (CEUA) da UDESC, sob o protocolo número 8318210222.

Delineamento experimental

Foi avaliado o efeito de dois tipos de dietas (proteína vegetal e proteína animal) e de três níveis inclusão do blend enzimático Precizyon X50™ (0, 50 e 75 mg kg⁻¹) sobre o desempenho e saúde intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo. O delineamento foi inteiramente casualizados (DIC) em esquema fatorial (2x3) com seis tratamento e quatro repetições. O experimento teve duração de 90 dias.

Dietas Experimentais

As dietas experimentais foram isoenergéticas (4.000 kcal/kg-1 - Hafedh, 1999) e a composição aminoacídica seguiu a recomendação de Santiago & Lovell (1988). A dieta de origem animal continha 20% de farinha de peixe de origem marinha (Agrofort). Quanto a de origem

vegetal foram formuladas exclusivamente com itens de origem vegetal (farelo de soja, milho, farelo de trigo e óleo de soja). As rações foram extrusadas e trituradas, para obtenção de partículas adequadas ao tamanho da boca dos peixes. Em seguida foi realizado o recobrimento com o blend enzimático, em veículo oleoso 2%. O blend Precizyon X50™ (Quimtia Brasil) consiste de uma combinação de alfa-amilase (120.000 u/g), xilanase (20.000 UI/g), glucanase (7.500 UI/g), mananase (250UI/g) e protease ácida (1.400 u/g).

Tabela 1. Formulação e composição das dietas

Ingredientes (%)	Ração com proteína animal	Ração com proteína vegetal
Farelo de Soja	38,5	62,1
Farinha de peixe	20	-
Milho	30,03	18,84
Farelo de trigo	8,5	8,5
Fécula de batata	-	2,7
Óleo de soja	2	3,9
Premix	0,6	0,6
Sinox Plus	0,07	0,07
DL-Metionina	0,3	0,45
L-Lisina	-	0,30
Fosfato monocálcico	-	2,2
Sal comum	-	0,34
Total (%)	100	100
Composição calculada*/ analisada** (%)		
Material seca (%)*	89,11	88,15
Proteína bruta (%)**	33,87	29,26
Energia bruta (kcal.kg ⁻¹)*	4093,34	4017,22
Extrato etéreo (%)*	6,01	6,01
Fibra bruta (%)**	3,38	4,13
Material mineral (%)*	8,07	6,14
Metionina*	0,93	0,92
Lisina*	2,05	2,14

Premix - Ácido fólico – 2.400 mg, Ácido nicotínico – 48 g, Ácido pantotênico – 24 g, Biotina – 96 mg, Vit. A – 2.400.000 UI, Vit. D3 – 400.000 UI, Vit. E – 24.000 UI, Vit. B1 – 9.600 mg, Vit. B2 – 9.600 mg, Vit. B6 – 9.600 mg, Vit. B12 – 9.600 mg, Vit K3 – 4.800 mg, Vit. C – 96 g, Ferro – 100 g, Manganês – 40 g, Zinco – 6.000 mg, Cobalto – 20 mg, Iodo – 200 mg, Selênio – 200 mg, Antioxidante – 19,6 g.

Animais e instalações

Foram utilizados 240 juvenis masculinizados de tilápia-do-Nilo com peso inicial médio de $5,27 \pm 0,19$ g gramas. Após um período de aclimatação de 7 dias os peixes foram distribuídos em 24 tanques cilíndricos com volume útil de 70 L na densidade de 10 peixes por tanque. Os tanques eram conectados a um sistema de recirculação e equipados com sistema de aeração individual acopladas em um compressor radial. Cada unidade experimental também continha um

aquecedor com termostato responsável por manter a temperatura de cultivo constante (~27°C). Os animais foram alimentados até a saciedade aparente.

Diariamente a temperatura era aferida e os restos de matéria orgânica eram retirados por sifonamento. O pH, salinidade, amônia total e o oxigênio dissolvido foram aferidos semanalmente. A água dos tanques foi ligeiramente salinizada (2 g. L⁻¹) com o objetivo de diminuir a suscetibilidade às doenças. As médias dos valores das variáveis de qualidade da água estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 4. Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis de qualidade de água

Temperatura (°C)	OD (mg/L)	pH	Amônia total (mg/ L)	Salinidade (ppm)
27,35±3,61	7,55 ± 0,86	7,74± 0,31	0,41± 0,31	2,15± 0,72

OD – Oxigênio dissolvido

Desempenho produtivo

No início dos experimentos, aos 30, 60 e 90 dias foram realizadas biometrias para monitorar o crescimento dos animais. Antes da biometria todos os peixes foram mantidos em jejum por 24 h, anestesiados com eugenol (50 mg L⁻¹) e pesados individualmente. O desempenho produtivo foi analisado com base nos seguintes parâmetros: ganho de peso (GP, g = peso médio final – peso médio inicial), taxa de crescimento específico (TCE, % dia⁻¹ = [(peso médio final – peso médio inicial) / experimental período] * 100) e conversão alimentar aparente (CA = consumo de ração / ganho de peso total). A mortalidade foi registrada para avaliar a taxa de sobrevivência (S, % = [total de animais no final / total de animais no início] * 100).

No final do experimento, após a pesagem, seis animais de cada unidade experimental foram anestesiados e depois submetidos à eutanásia por secção medular para coleta dos materiais biológicos. Foram utilizados dois animais por unidade experimental para cada uma das análises descritas abaixo.

Histomorfometria intestinal

Porções de aproximadamente 5 cm de comprimento foram coletadas do intestino proximal e cada amostra foi fixada em uma solução de formalina tamponada a 10% por 24 h, desidratada em uma série ascendente de álcoois, diafanizada em xileno, embebida em parafina e cortada em seções de 5 µm para preparação das lâminas. As amostras foram então coradas de acordo com o método de coloração PAS. As lâminas foram observadas sob microscópio óptico (OptiCam, 10×) e fotografadas usando uma câmera digital (Moticam 2300, 3 MP, resolução 3264×2448). Os

valores de altura total, largura e espessura das vilosidades foram medidos usando o software analisador de imagens TouTek TouView – x64, versões 2270/07/03. Nas mesmas vilosidades intestinais, foram realizadas as contagens do número de células caliciformes.

Atividade enzimática

Após a eutanásia, os peixes foram imediatamente colocados em gelo e dissecados para separar o intestino. Os intestinos foram retirados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados em ultra-freezer a -80°C até o momento das análises. No momento das análises, os intestinos foram cortados em pequenos pedaços e adicionados em tubos falcons de 50 ml onde foram diluídos em água destilada gelada (1:6, p/v). Os intestinos foram macerados com o auxílio de homogeneizador do tipo Turrax,, durante 5 min (5 vezes de 1 min com intervalos de 1 min em banho de gelo) para rompimento das células intestinais e liberação das enzimas digestivas. Posteriormente, os homogenatos intestinais foram centrifugados a 11000 rpm por 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram separados e utilizados para determinar a atividade das enzimas digestivas.

A atividade da amilase foi medida a $\lambda = 580$ nm usando amido solúvel dissolvido (0,3%) em solução tampão de Na₂HPO₄ (pH 7,4) como substrato (Métais e Bieth, 1968). Uma unidade de atividade da amilase (U) foi definida como mg de amido hidrolisado em 30 min a 37 °C por ml de extrato enzimático. A atividade da protease alcalina total foi determinada após 30 min de incubação a 25 °C, utilizando caseína a 0,5% (p/v) como substrato em Tris-HCl 50 mM (pH 8.0). A reação foi parada com ácido tricloroacético (20% p/v), o extrato foi centrifugado (5000 rpm, 20 min) e a absorbância do sobrenadante foi medida a $\lambda = 280$ nm à temperatura ambiente. Uma unidade de atividade da protease (U) por ml foi definida como 1 μ mol de caseína hidrolisada por min por ml de extrato enzimático (García-Carreño & Haard, 1993). A atividade da lipase foi medida a $\lambda = 410$ nm usando *p*-nitrofenil laurato (3mM) em propanol como substrato (Brabcová et al., 2013). A reação foi paralisada pela adição de acetona (Pastore et al., 2003). Uma unidade de atividade da lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a hidrolise de 1 μ mol de *p*-nitrofenil laurato em 20 min a 25 °C por ml de extrato enzimático.

Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos a testes para verificar a normalidade dos erros (Shapiro-Wilk) e a homoscedasticidade das variâncias de Bartlett empregados com uma significância de 5%. Onde a normalidade da amostra e a homogeneidade das variâncias foram encontradas, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada às variáveis de desempenho dos peixes. Considerou-

se diferença significativa quando $P<0,05$. Em caso de $P<0,10$ foi considerada tendência. Quando foi encontrada diferença estatística ($P<0,05$), aplicou-se o teste de média correspondente (Tukey ou Duncan de acordo com a variabilidade dos dados).

2.3 RESULTADOS

Desempenho produtivo

No final do experimento não houve interação ($P>0,05$) entre os fatores fonte de proteína e inclusão do blend enzimático para as variáveis de desempenho, logo os fatores foram avaliados isoladamente (Tabela 5). A maior inclusão do blend enzimático (75 mg kg^{-1}) proporcionou os melhores ($P<0,05$) resultados de peso final, ganho de peso e consumo individual (Tabela 6). Os piores ($P<0,05$) resultados de crescimento e consumo foram observados no tratamento controle sem suplementação. A sobrevivência manteve-se elevada em todos os tratamentos, não diferindo ($P>0,05$) entre eles.

Quando a fonte de proteína as dietas contendo proteína animal melhoraram ($P<0,05$) o peso final, ganho de peso, taxa de crescimento específico, consumo individual e conversão alimentar quando comparada com as dietas contendo apenas proteína vegetal (Tabela 6).

Tabela 5. Valores de P das variáveis de desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo.

	Blend enzimático (E)	Fonte de proteína (P)	Interação (E x P)
Peso final (g)	0,022*	0,0001*	0,159 ^{ns}
Ganho de peso (g)	0,023*	0,0001*	0,154 ^{ns}
TCE	0,106 ^{ns}	0,0001*	0,138 ^{ns}
Consumo indiv. (g)	0,037*	0,004*	0,131 ^{ns}
Conversão alimentar	0,806 ^{ns}	0,0001*	0,797 ^{ns}
Sobrevivência	0,781 ^{ns}	1,00 ^{ns}	0,920 ^{ns}

*: $P<0,05$; ^{ns}: não significativo (ANOVA $P>0,05$).

Tabela 6. Valores médios (\pm desvio padrão; n= x) das variáveis de desempenho.

	Blend enzimático (mg kg^{-1})			Fonte de proteína	
	0	50	75	PA	PV
PF (g)	113,60 \pm 20,09b	124,64 \pm 18,00ab	133,25 \pm 31,76a	142,72 \pm 18,33a	104,94 \pm 11,48b
GP (g)	108,40 \pm 20,07b	119,39 \pm 17,89ab	127,91 \pm 31,90a	137,47 \pm 18,32a	99,66 \pm 11,47b
TCE	1,40 \pm 0,07	1,42 \pm 0,07	1,46 \pm 0,1	1,49 \pm 0,06a	1,36 \pm 0,04b
CI (g)	113,80 \pm 9,57b	122,73 \pm 10,26ab	131,39 \pm 23,45a	131,12 \pm 18,15a	114,16 \pm 10,06b
CA (g)	1,07 \pm 0,13	1,04 \pm 0,11	1,05 \pm 0,14	0,95 \pm 0,05a	1,15 \pm 0,1b
S (%)	91,25 \pm 6,40	87,5 \pm 12,81	91,25 \pm 13,56	90 \pm 12,8	90 \pm 9,53

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P<0,05$) dentro dos fatores (fonte de proteína e nível de enzimas) pelo teste de Tukey. PF: peso final; GP: ganho de peso; TCE: taxa de crescimento específico; CI: consumo individual; CA: conversão alimentar; S: sobrevivência.

Histomorfometria intestinal

Não foi encontrada interação significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos para a histomorfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo (Tabela 7). A suplementação com maior nível de blend enzimático aumentou ($P<0,05$) a contagem de células caliciformes. Os peixes alimentados com a rações contendo proteína animal apresentaram uma tendência ($P<0,10$) a maior altura de vilosidades (Tabela 8).

Tabela 7. Valores de P das variáveis de histomorfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo.

	Fonte de proteína (P)	Blend enzimático (E)	Interação (P x E)
Altura vilosidades	0,07**	0,35 ^{ns}	0,77 ^{ns}
Espessura vilosidades	0,81 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,32 ^{ns}
Células caliciformes	0,52 ^{ns}	0,04*	0,27 ^{ns}

*: $P<0,05$; **: $P<0,10$; ^{ns}: não significativo (ANOVA $P>0,05$).

Tabela 8. Valores médios (\pm desvio padrão; n= x) das variáveis de histomorfometria intestinal

	Blend enzimático (mg kg ⁻¹)			Fonte de proteína	
	0	50	75	PA	PV
Altura vilosidades (μm)	334,48 \pm 48,82	366,28 \pm 25,11	381,46 \pm 59,75	385,79 \pm 43,55	335,83 \pm 49,58
Espessura vilosidades (μm)	43,67 \pm 2,68	47,37 \pm 3,72	47,37 \pm 3,72	44,73 \pm 4,27	43,67 \pm 2,68
Células caliciformes	24,45 \pm 6,9b	30,15 \pm 9,8ab	34,65 \pm 7,9a	28,73 \pm 6,73	30,77 \pm 7,76

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P<0,05$) dentro dos fatores (fonte de proteína e nível de enzimas) pelo teste Duncan.

Atividade enzimática

Não foi observada interação ($P>0,05$) para a atividade enzimática no intestino dos juvenis de tilápia-do-Nilo (Tabela 9). Não foi observado efeito significativo ($P>0,05$) para as atividades de amilase, protease e lipase. O tipo de fonte de proteína não afetou a atividade da amilase e lipase ($P>0,05$). Houve uma tendência ($P<0,10$) de aumento na atividade da protease (tabela 10).

Tabela 9. Valores de P das variáveis de atividade enzimática intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo.

	Fonte de proteína (P)	Blend enzimático (E)	Interação (P x %)
Amilase	0,838 ^{ns}	0,418 ^{ns}	0,991 ^{ns}
Protease	0,074**	0,189 ^{ns}	0,853 ^{ns}
Lipase	0,540 ^{ns}	0,905 ^{ns}	0,122 ^{ns}

**: $P<0,10$; ^{ns}: não significativo (ANOVA $P>0,05$).

Tabela 10. Valores médios (\pm desvio padrão; n= x) das variáveis de atividade enzimática intestinal

	Blend enzimático (mg kg ⁻¹)			Fonte de proteína	
	0	50	75	PA	PV
Amilase	0,23±0,05	0,20±0,03	0,20±0,06	0,21±0,05	0,20±0,46
Protease	2,75±0,44	2,80±0,49	2,54±0,50	2,85±0,55	2,55±0,40
Lipase	0,39±0,05	0,4±0,08	0,4±0,07	0,39±0,09	0,4±0,04

Médias não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

2.4 DISCUSSÃO

A suplementação com o blend enzimático melhorou o crescimento dos juvenis de tilápia-do-Nilo. O uso das enzimas otimizou o processo digestivo de forma a permitir que o maior consumo refletisse em maior ganho de peso sem comprometer a conversão alimentar. A resposta do desempenho foi proporcional ao nível de suplementação. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura com o uso de enzimas exógenas para a tilápia-do-Nilo, utilizando inclusões de 0, 2500 e 5000U de protease (Hassaan, et al., 2020). Nos tratamentos onde foi feita a suplementação com o blend, o maior consumo de ração que deu suporte a um maior crescimento, sem prejudicar a conversão alimentar. Este resultado não teve efeito do tipo de dieta e demonstra que o blend enzimático pode ser utilizado em para otimizar o crescimento de juvenis de tilápia-do-Nilo. Mesmo recebendo rações com diferentes fontes e níveis de proteína os resultados foram similares. A suplementação com fitase também melhorou o desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo independente da qualidade da dieta (Maas et al., 2020).

A dieta contendo proteína animal proporcionou melhores resultados de crescimento, ingestão de ração e eficiência alimentar dos juvenis de tilápia-do-Nilo em relação a dieta contendo somente proteína vegetal. Este resultado era esperado tendo em vista que proteína vegetal é menos palatável e pode prejudicar o crescimento em inclusões elevadas (Tan, et al. 2017; Sharma & Sanini, 2017; Lin & Lou 2011; Soltan et al., 2008 ; El-Sayd & Gaber, 2002). O farelo de soja possui fatores antinutricionais como inibidores de protease, hemaglutininas e fitato, que podem prejudicar não só o crescimento do animal como o consumo alimentar e saúde (Hajra et al., 2013). Além disso, a presença de polissacarídeos não-amiláceos (PNAs) no farelo de soja e farelo de trigo afeta a viscosidade das dietas. Os PNAs presentes na parede celular dos nutrientes formam uma barreira em torno dos nutrientes, o que dificulta o contato das enzimas à molécula e reduz a digestibilidade de outros nutrientes (Castillo & Gatlin III, 2015). Cabe destacar que a dieta vegetal continha níveis menores de proteína e este fator também poderia ter influenciado. Por outro lado, as exigências de aminoácidos foram supridas para evitar possíveis problemas de deficiência nutricionais (Rodrigues, et al., 2020; Furuya et al.,2005).

A suplementação com enzimas não alterou a altura e espessura das vilosidades. A suplementação com enzimas pode reduzir os efeitos negativos dos PNAs e promover efeitos benéficos na microbiota intestinal, com implicações diretas sobre a saúde intestinal (Castillo & Gatlin III, 2015). As vilosidades não foram afetadas, mas a suplementação com maior nível do blend enzimático aumentou a contagem de células caliciformes. Este é um dos primeiros trabalhos a evidenciar efeito da suplementação com blend enzimático sobre a saúde intestinal dos peixes. Hassaan et al, (2021) mostrou em seu estudo a melhora na contagem de células caliciformes e altura de vilosidades intestinais em tilápias-do-Nilo alimentadas com ração suplementada com protesase. As células caliciformes desempenham um papel crítico na proteção intestinal, além de secretar proteínas antimicrobianas, quimiocinas e citocinas que estimulam a imunidade local (Dawood, 2020).

Com o uso da dieta vegetal houve tendência de redução na altura das vilosidades intestinais da tilápia-do-Nilo em relação a dieta contendo proteína animal. O aumento da viscosidade pela presença de carboidratos solúveis pode provocar danos no epitélio intestinal (Hassan, et al., 2019; Francis, et al., 2001). Este resultado possivelmente está associado ao pior desempenho observado para a dieta vegetal. Pervin, et al., (2020) observaram redução na altura das vilosidades nos maiores níveis de inclusão vegetal nas dietas para tilápia-do-Nilo. Resultados semelhantes foram obtidos com robalo Japonês (*Lateolabrax japonicus*) onde a substituição do farinha de peixe provocou uma redução nas vilosidades e na espessura da musculatura intestinal, indicando uma possível enterite induzida pelo farelo vegetal Zhang et al., (2018).

A atividade enzimática não foi afetada pela suplementação com o blend enzimático. Estudos anteriores com a suplementação com enzimas exógenas para a tilápia-do-Nilo mostram um aumento na atividade enzimática intestinal (Hassan, et al., 2020; Lin, et al., 2007). Embora não tenha sido observada uma resposta positiva, nos tratamentos onde foi feita a suplementação com o aditivo houve também maior consumo de ração que deu suporte a um maior crescimento. Neste sentido, havia mais substrato disponível para ser digerido, o que poderia explicar o porque não houve aumento na atividade enzimática. Houve uma tendência de redução na atividade de protease dos peixes alimentados com a dieta vegetal. O farelo de soja contém fatores antinutricionais como fatores anti-tripticos que reduzem a atividade da tripsina pancreática (Stech et al., 2010). Já foi demonstrado para a tilápia-do-Nilo (Lin et al., 2011) e para o salmão do Atlântico *Salmo salar L.* (Krogdahl, et al., 2003) que o aumento da inclusão de farelo de soja nas dietas reduz a atividade de protease no trato gastrointestinal.

2.5 CONCLUSÃO

A suplementação com blend enzimático melhorou o crescimento e o consumo de ração de juvenis de tilápia-do-Nilo nos dois tipos de dieta avaliados. Também foi observado aumento nas células caliciformes no maior nível de inclusão enzimática, indicando uma melhora na saúde intestinal. A resposta do desempenho foi proporcional ao nível de suplementação com enzimas. A dieta contendo proteína animal proporcionou os melhores resultados de desempenho e saúde intestinal.

REFERÊNCIAS

Adeoye, A.A., Jaramillo-Torres, A.; Fox, S.W.; Merrifield, D.L.; Davies, S.J. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: Overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. Animal Feed Science and Technology 215, 133-143, 2016.

Ai, Q.; Mai, K.; Zhang, W.; Xu, W.; Tan, B.; Zhang, C.; Li, H. Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. A 147, 502–508, 2007.

Baldisseroto, Bernardo. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: Ed. UFSM, 212p. V.2, 2002.

Bao, Y.M.; Romero, L.F.; Cowieson, A.J. Functional patterns of exogenous enzymes in different feed ingredients, World's Poultry Science Journal, 69:4, 759-774, DOI: 10.1017/S0043933913000792, 2013.

Boyd, C.E.; D'Abramo, L.R.; Glencross, B.D.; Huyben, D.C.; Juarez, L.M.; Lockwood, G.S.; McNevin, A.A.; Tacon, A.G.J.; Teletchea, F.; Tomasso, J.R.Jr; Tucker, C.S.; Valenti, W.C. Achieving sustainable aquaculture: Historical and current perspectives and future needs and challenges. World Aquaculture Society, 51:578-633, 2020.

Brabcová, J; Prchalová, D.; Demianová, Z.; Bučánková, A.; Vogel, H.; Valterová, I.; Pichová, I.; Zarevúcka, M. Characterization of Neutral Lipase BT-1 Isolated from the Labial Gland of Bombus terrestris Males, PLoS One. 8 (2013) e80066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080066>.

Carter, C.G., Houlihan, D.F., Buchanan, B., Mitchell, A.I.,. Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed a diet containing supplementary enzymes. Aquac. Fish. Manag. V.25, p.37–46. 1994

Castillo, S.; Gatlin III, D.M. Dietary supplementation of exogenous carbohydrases enzymes in fish nutrition: a review. *Aquaculture* v.435, p. 286-292, 2015.

Couto, A.; Barraso, C.; Guerreiro, I.; Pousão-Ferreira, P.; Matos, E.; Peres, H.; Oliva-Teles, A.; Enes, P.; Carob seed germ meal in diets for meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles: Growth, digestive enzymes, intermediary metabolism, liver and gut histology. *Aquaculture* v.451, p. 396-404, 2016.

Dalsgaard, J. Verlhac, V.; Hjermitslev, N.H.; Ekmann, K.S.; Fischer, M.; Klausen, M.; Pedersen, P.B. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. V.171, p. 181-191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.10.005>, 2012.

Dawood, M.A.O. Nutritional immunity of fish intestines: important insights for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. v.13, p.642-663. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12492>, 2020.

Drew, M. D. et al. Effect of adding protease to coextruded flax:pea or canola:pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, v. 119, n. 1–2, p. 117–128, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.10.010>, 2005.

El-Saidy, D.M.S.D.; Gaber, M.M.A. Complete Replacement of Fish Meal by Soybean Meal with Dietary L-Lysine Supplementation for Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) Fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33, 297-306, DOI: 6. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2002.tb00506.x>, 2007.

El-Saidy, D. M. S. D.; Gaber, M. M. A. Complete Replacement of Fish Meal by Soybean Meal with Dietary L-Lysine Supplementation for Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) Fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 33, n. 3, p. 297–306, 2002.

FAO. The state of world Fisheries and Aquaculture. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, 2018.

Francis, G.; Makkar, H.; Becker, K. Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227, 2001.

Fleuri, L.F.; Sato, H.H. Produção, Purificação, Clonagem e Aplicação de Enzimas Líticas. Quim. Nova, Vol.28, No.5. 871-879, 2005.

Gatlin III, D.M.; Barrows, F.T.; Brown, P.; Dabrowski, K.; Gaylord, T.G.; Hardy, R.W.; Gongshe E.H.; Hu, G.; Krogdahl, A.; Nelson, R.; Overturf, K.; Rust, M.; Sealey, W.; Skonberg, D.; Souza, E.I.; Stone, D.; Wilson, R.; Wurtele E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38, 551-579, 2007.

García-Careño, F. L.; Haard N.F. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17, 97–113, 1993.

Gioda, C.R.; Pretto, A.; Freitas, C. De S.; Leitemperger, J.; Loro. V.L.; Lazzari, R.; Lissner, L.A.; Baldisserotto, B. Salbego, J. Different feeding habits influence the activity of digestive enzymes in freshwater fish. *Ciência Rural, Santa Maria*. V.47:03, e2016113, 2017.

Gomes, V.D.S.; Silva, J.H.V. da; Cavalcanti, C.R.; Almeida, J.L dos S.; Amâncio, A.L. de L.; Lucena, C.E.A. de. Avanços Do Uso De Enzimas Na Nutrição De Tilápias. Visão acadêmica, Curitiba, v.19, n.1, p. 113-129, 2018.

Goda, A.M.; Ahmed, S.R.; Nazmi, H.M.; Baromh, M.Z.; Fitzsimmons, K.; Rossi, W.Jr; Davis, S.; El-Haroun, E. Partial replacement of dietary soybean meal by high-protein distiller's dried grains (HPDDG) supplemented with protease enzyme for European seabass, *Dicentrarchus labrax* fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, v. 26, n. 3, p. 842–852, DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.13043>, 2019.

Hafedh, Y. S. A. Effects of dietary protein on growth and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research*, v. 30, n. 5, p. 385–393, 1999.

Hajra, A.; Mazumder, A.; Verma, A.; Ganguly, D.P.; Mohanty, B.P.; Sharma, A.P.; ANTINUTRITIONAL FACTORS IN PLANT ORIGIN FISH FEED INGREDIENTS: THE

PROBLEMS AND PROBABLE REMEDIES. Advances in Fish Research, v.V, p. 193-202. 2013.

Hassaan, M.S.; Mohammady, E.Y.; Soaudy, M.R.; Elashry, M.A.; Maustafa, M.M.A; Wassel, M.A.; El-Garhy, S.; El-Haroun, E.R.; Elsaied, H.E. Synergistic effects of *Bacillus pumilus* and exogenous protease on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, gut microbes, immune response and gene expression fed plant protein diet. Animal Feed Science and Technology, 275. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114892>. 2021.

Hassaan, M.S.; Mohammady, E.Y.; Adnan, A.M.; Elnabi, H.A.; Ayman, M.; Soltan, M.; El-Haroun, E. Effect of dietary protease at different levels of malic acid on growth, digestive enzymes and haemato-immunological responses of Nile tilapia, fed fish meal free diets. Aquaculture. 2020.

Hassaan, M. S. El-Sayed, A.I.M.; Soltan, M.A.; Iraqi, M.M.; Goda, A.M.; Davies, S.J.; El-Haroun, E.R.; Ramadan, H.A. Partial dietary fish meal replacement with cotton seed meal and supplementation with exogenous protease alters growth, feed performance, hematological indices and associated gene expression markers (GH, IGF-I) for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, v. 503, p. 282–292, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.009>, 2019.

Herrera, M.; Mancera, J.M.; Costa, B. The use of dietary additives in fish stress mitigation: Comparative endocrine and physiological responses. Frontiers in Endocrinology, v. 10, 447, p. 1-22, DOI: 10.3389/fendo.2019.00447, 2019.

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. 1-11, DOI: 10.1111/are.12828, 2015.

Jannathulla, R.; Rajaram, V.; Kalanjuam, R.; Ambasankar, K.; Muralidhar, M.; Dayal J.S. Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources. Aquaculture Research, 50, 3493-3506, 2019.

Jiang, T.T.; Feng, L.; Liu, Y.; Jiang, W.D.; Li, S.H.; Tang, L.; Kuang, S.Y.; Zhou, X.Q. Effects of exogenous xylanase supplementation in plant protein-enriched diets on growth performance, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Aquaculture Nutrition, 20; 632-645, DOI: 10.1111/anu.12125, 2014.

Kemigabo, C.; Jere, L.W.; Sikawa, D.; Masembe, C.; Kang'ombe, J.; Abdel-Tawwab, M. Growth response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), larvae and fingerlings fed protease-incorporated diets. Journal of Applied Ichthyology, v. 00, p. 1–8, DOI: <https://doi.org/10.1111/jai.13877>, 2019.

Klahan, R.; Areechon, N.; Yoonpundh, R.; Engkagul, A. Characterization and Activity of Digestive Enzymes in Different Sizes of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Agriculture and Natural Resources. V.43, n.1, p. 143-153. 2009.

KLOMOKLAO, Sappasith. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin Journal of Science & Technology, v. 30, n. 1, 2008.

Kristinsson, H.G.; Rasco, B. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 40, n. 1, p.43-81, 2000.

Kumar, S., Sahu, N., Pal, A., Choudhury, D., & Mukherjee, S. Non-gelatinized corn supplemented with α -amylase at sub-optimum protein level enhances the growth of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. Aquaculture Research, 37, 284–292, 2006.

Lewis T, Stone WL. Biochemistry, Proteins Enzymes. 2022 Apr 28. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; PMID: 32119368, 2022.

Li, X. Q.; Chai, X.Q.; Liu, D.Y.; Kabir, M.A.C.; Leng, X.J. Effects of temperature and feed processing on protease activity and dietary protease on growths of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and tilapia, *Oreochromis niloticus* \times *O. aureus*. Aquaculture Nutrition, v. 22, n. 6, p. 1283–1292. DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.12330>, 2015.

Li, J. Zhou, R.; Ren, Z.; Fan, Y.; Hu, S.; Zhou, C.; Deng, Z. Improvement of protein quality and degradation of allergen in soybean meal fermented by *Neurospora crassa*. LWT - Food Science and Technology, 101, 220-228, 2019.

Lima TLS, Jesus BM, Souza RRR, Okamoto KA, Lima R, Fraceto FL. Estudo da atividade proteolítica de Enzimas Presentes em frutos. Quím Nova Esc. 28: p. 47-9, 2008.

Lin, S.; Mai, K.; Tan, B. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Aquaculture Research, 38(15), 1645–1653, 2007.

Lin, S.; Luo, L. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Animal Feed Science And Technology, 168, 80-87, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.03.012>, 2011.

Liu, H.; Zhu, X.; Yang, Y.; Han, D.; Jin, J.; Xie, S. Effect of substitution of dietary fishmeal by soya bean meal on different sizes of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*): nutrient digestibility, growth performance, body composition and morphometry. Aquaculture Nutrition, 22, 142-157, 2016.

Liu W, Wu JP, Li Z, Duan ZY, and Wen H. Effects of dietary coated protease on growth performance, feed utilization, nutrient apparent digestibility, intestinal and hepatopancreas structure in juvenile Gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Aquacult Nutr. 2017;00:1–9. doi:10.1111/anu.12531, 2017.

Lucio, B.S.V.; Hernández-Domínguez, E.M.; Villa-García, M.; Díaz-Godínez, G.; Mandujano-Gonzalez, V.; Mendoza-Mendoza, B.; Álvarez-Cervantes, J. Exogenous Enzymes as Zootechnical Additives in Animal Feed: A Review. Catalysts, 11, 851. <https://doi.org/10.3390/catal11070851>, 2021.

Maas, R.M.; Verdegem, M.C.J.; Stevens, T.L.; Schrama, J.W. Effect of exogenous enzymes (phytase and xylanase) supplementation on nutrient digestibility and growth performance of Nile

tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed different quality diets. *Aquaculture*, v.529, p. 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735723>, 2020.

Métais, P.; Bieth, J. Détermination de l'a-amylase. *Ann Biol Clin* 26:133–142, 1968.

Meng. X. B. A. Slomin.ski. C. M. Nyaelioti. L. D. Campbell, and W. Gut'uter. Degradation of cell wall polysaccharides by combinations of carbohydrase enzymes and their effect on nutrient utilization and broiler chicken performance. *Poult Sci* 84:37-47, 2005.

Molinaro, Etelcia Moraes Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 3 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2013.

Monier, M.N. Efficacy of dietary exogenous enzyme supplementation on growth performance, antioxidant activity, and digestive enzymes of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. 46: 713-723, 2020.

Murakami, A. E.; Fernandes, I.M.; Sakamoto, M.I.; Souza, L.M.G.de; Furlan, A.C. Efeito da suplementação enzimática no desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 29, n. 2, p. 165-172, 2007.

Pacheco, T.F.; Mendes, T.D. Guia prático para caracterização de enzimas. Brasília, DF : Embrapa Agroenergia, 2021.

Pastore, GM.; Costa, V. dos S.R. da.; Koblitz, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp., Ciência e Tecnol. Aliment. 23 (2003) 135–140. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000200006>.

Paloheimo, M.; Piironen, J.; Vehmaanperä, J. Xylanases and Cellulases as Feed Additives. In: Bedford, M. R.; Partridge, G. G. Enzymes in farm nutrition. Londres: Cab International, p.12-53, 2011.

Park, J.S.; Kim, I.H.; Hancock, J.D.; Hines, R.H.; Cobb, C.; Cao, H.; Hong, J.W.; Kwon, O.S. Effects of amylase and cellulase supplementation in sorghum-based diets for finishing pigs. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 16, 70-79, 2003.

Philippini, R.R.; Martiniano, S.E.; Santos, J.C dos; Silva, S.S. da; Chadel, A.K. Fermentative Production of Beta-Glucan: Properties and Potential Applications. Bioprocessing for Biomolecules Production, 1ed. P. 303-320. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119434436.ch15>, 2018.

Pervin, M.A.; Jahan, H.; Akter, R.; Omri, A.; Hossain, Z. Appraisal of different levels of soybean meal in diets on growth, digestive enzyme activity, antioxidation, and gut histology of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Physiology and Biochemistry, v.46, p.1397-1407, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00798-5>, 2020.

Ragaa, N. M.; Elala, N.M.A.; Kamal, A.M.; Kamel, N.F. Effect of a serine-protease on performance parameters and protein digestibility of cultured *Oreochromis niloticus* fed diets with different protein levels. Pakistan Journal of Nutrition, v. 16, n. 3, p. 148–154, DOI: <https://doi.org/10.3923/pjn.2017.148.154>, 2017.

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.

Razzaq, A.; Shamsi, S.; Ali, A.; Ali, Q.; Sajjad, M.; Malik, A.; Ashraf, M. Microbial Proteases Applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. v.7, p. 1-20. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00110, 2019.

Rodrigues, A.T.; Mansano, C.F.M.; Klan, K.U.; Nascimento, T.M.T.; Boaratti, A.Z.; Sakomura, N.K.; Fernandes, J.B.K. Ideal profile of essential amino acids for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the finishing growth phase. Aquaculture Research, v.51, p.4724-4735. DOI: 10.1111/are.14819, 2020.

Saleh, E.S.E.; Tawfeek, S.S.; Abdel-Fadeel, A.A.A.; Abdel-Daim, A.S.A.; Andel-Razik, A.R.H.; Youssef, I.M.I. Effect of dietary protease supplementation on growth performance, water quality,

blood parameters and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 00, p. 1–10, DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.13591>, 2021.

Santiago, C.B.; Lovell, R.T. Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. *Journal of Nutrition*, v. 118, p. 1540-1546, 1988.

Schneider, T.L.S.; Lazzari, R. Nutritional implications of exogenous proteases in fish feeding. v.28, p. 70-93. DOI: <https://doi.org/10.36812/pag.202228170-93>, 2022.

Sharda Sharma, O. P., & Saini, V. P. Replacement of fishmeal with soybean meal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Diet. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5, 845–849, 2017.

Shi, Z.; Li, X.Q.; Chowdhury, M.A.K.; Chen, J.N.; Leng, X.J. Effects of protease supplementation in low fish meal pelleted and extruded diets on growth, nutrient retention and digestibility of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture*, v. 460, p. 37–44, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.049>, 2016.

Signor, A.A.; Boscolo, W.R.; Bittencourt, F.; Feiden, A.; Gonçalves, G.S.; Freitas, J.M.A.de. Desempenho de juvenis de Tilápia-do-nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 5, p.977-983, 2010.

Simbaya, J.; Slominski, B.A.; Guenter, W.; Morgan, A.; Campbell, L.D. The effects of protease and carbohydrase supplementation on the nutritive value of canola meal for poultry: in vitro and in vivo studies. *Animal Feed Science and Technology*, 61, 219-234, 1996.

Singhal, P.; Nigam, V.K.; Vidyarthi, A.S.; Studies on Production, Characterization and Applications of Microbial Alkaline Proteases. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. V.3, p.653-669. 2012.

Soltan, M.A.; Hanafy M.A.; Wafa, M.I.A. Effect of Replacing Fish Meal by a Mixture of Different Plant Protein Sources in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Diets. *Global Veterinaria*, 2 (4): 157-164, 2008.

Souza, T.De A.; Silva, A.F.E; Oliveira, E.O.; Souza, A.M.De; Figueiredo, R.A.C.R.; Campeche, D.F.B.; Melo, J.F.B. Atividade das enzimas digestivas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com dietas contendo diferentes fontes e níveis de carboidratos e concentração de proteínas. I Simpósio de Produção Animal, UFRPE-UAST. 2016.

Stech, M.R.; Carneiro, D.J.; Carvalho, M.R.B.de. Fatores antinutricionais e coeficientes de digestibilidade aparente da proteína de produtos de soja para pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Nutrição de Não-Ruminantes. V.32, n.3, p.255-262, DOI: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v32i3.5819>, 2010.

Takami, H.; Akiba, T.; Horikishi, K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. Applied Microbiology Biotechnology, Heidelberg, GE, v.34, p.157-162, 1990

Tengjaroenkul, B.; Smith, B.J.; Caceci, T.; Smith, S.A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture, v.182, p. 317-327. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00270-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00270-7), 2000.

Toledo, G.S.P. de; Costa, P.T.C.; Silva, J.H.; Ceccantini, M.; Junior, C.P. Frangos de corte alimentados com dietas de diferentes densidades nutricionais suplementadas ou não com enzimas. Ciência Rural, v.37, n.2, p. 518-523, 2007.

Torres, D.M.; Teixeira, A.S.; Rodrigues, P.B.; Bertechini, A.G.; Freitas, R.T.F. de; Santos, E.C. dos. Eficiência das Enzimas Amilase, Protease e Xilanase Sobre o Desempenho de Frangos de Corte. Ciência Agrotecnologia, v. 27, n.6, p. 1401-1408, DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542003000600027>, 2003.

Yigit, N.O.; Koca, S.B.; Didinen, B.I.; Diler, I. Effect of protease and phytase supplementation on growth performance and nutrient digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fed soybean meal-based diets. Journal of Applied Animal Research, v. 46, p. 29- 32. DOI: <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1256292>, 2018.

Yildirim, Y.B., Turan, F. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in African catfish, *Clarias gariepinus*. J. Anim. Vet. Adv. 9, 327–331, 2010.

Zamini, A.A.; Kanani, H.G.; Esmaelli, A.A.; Ramezani, S.; Zoriezahra, S.J. Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). 23:187-192, 2014.

Zhang, C.; Rahimnejad, S.; Wang, Y.R.; Lu, K.; Song, K.; Wang, L.; Mai, K. Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes. Aquaculture, 483, 173-182, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.029>, 2018.

Zheng, C.C.; Wu, J.W.; Jin, Z.H.; Ye, Z.F.; Yang, S.; Sun, Y.Q.; Fei, H. Exogenous enzymes as functional additives in finfish aquaculture. Aquaculture Nutrition, 26, 213-224, DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.12995> 2019.

Zhou, Y., Yuan, X., Liang, X., Fang, L., Li, J., Guo, X., Bai, X., He, S. Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: the effect of exogenous cellulase. Aquaculture 416–417, 1–7, 2013.



Assinaturas do documento



Código para verificação: **5J70YDW9**

Este documento foi assinado digitalmente pelos seguintes signatários nas datas indicadas:



THIAGO EL HADI PEREZ FABREGAT (CPF: 224.XXX.108-XX) em 04/04/2023 às 15:24:34

Emitido por: "SGP-e", emitido em 30/03/2018 - 12:34:16 e válido até 30/03/2118 - 12:34:16.

(Assinatura do sistema)

Para verificar a autenticidade desta cópia, acesse o link <https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo/conferencia-documento/VURFU0NfMTIwMjJfMDAwMTMyMzNfMTMyNDZfMjAyM181SjcwWURXOQ==> ou o site

<https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo> e informe o processo **UDESC 00013233/2023** e o código **5J70YDW9** ou aponte a câmera para o QR Code presente nesta página para realizar a conferência.