



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

**PROTEASE EXÓGENA EM RAÇÃO PARA
TILÁPIA-DO-NILO**

VANESSA SILVA DOS SANTOS

2015

VANESSA SILVA DOS SANTOS

**PROTEASE EXÓGENA EM RAÇÃO PARA
TILÁPIA-DO-NILO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Felipe Shindy Aiura

UNIMONTES
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Santos, Vanessa Silva dos

S237p Protease exógena em ração para tilápia-do-Nilo [manuscrito] /
Vanessa Silva dos Santos. – 2015.
33 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Universidade Estadual de Montes Claros – Janaúba,
2015.

Orientador: Prof. D. Sc. Felipe Shindy Aiura.

1. Peixe Alimentação e rações. 2. Tilápia-do-Nilo. I. Aiura,
Felipe Shindy. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III.
Título.

CDD. 639.3758

Catálogo: Biblioteca Setorial Campus de Janaúba

VANESSA SILVA DOS SANTOS

PROTEASE EXÓGENA EM RAÇÃO PARA TILÁPIA-DO-NILO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

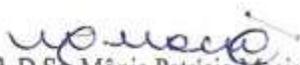
APROVADA em 30 de Junho de 2015.



Prof. D.Sc. Felipe Shindy Aiura
UNIMONTES
(Orientador)



Prof. D.Sc. Cláudio Luiz Corrêa
Arouca
UNIMONTES



Prof. D.Sc. Mônia Patricia Maciel
UNIMONTES



D.Sc. Marcelo Mattos Pedreira
UFVJM

JANAÚBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Aos

meus pais e à minha irmã, pelo apoio e amor incondicional.

DEDICO...

**“Tudo tem o seu tempo determinado e há tempo para todo propósito
debaixo do céu” (Eclesiastes 3:1)**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proporcionar força e sabedoria.

Ao professor Felipe Shindy Aiura, pela oportunidade, dedicação e valiosos ensinamentos durante os anos de orientação, minha eterna gratidão.

À Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES, pela oportunidade de realização da Pós-Graduação.

À Companhia de Desenvolvimento do Vale de São Francisco – CODEVASF/Nova Porteirinha, por disponibilizar espaço, e aos seus funcionários, pela colaboração na realização do experimento.

Aos membros da banca, professores Mônica Patrícia Maciel, Cláudio Luiz Corrêa Arouca e Marcelo Mattos Pedreira, pela dedicação e disponibilidade.

Ao João Daniel, por disponibilizar os peixes para execução do experimento.

À Patense, pela doação das farinhas de sangue e penas, utilizadas na ração experimental.

Às empresas DSM e Tortuga, pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão das bolsas.

Às colegas Daniela, Marília, Iara, Janaina, Jamille, Tâmilis, Yanca, Vitória, Gabriela e Waleska, pelo apoio e ajuda na execução do experimento.

Aos professores e funcionários do departamento de Ciências Agrárias da UNIMONTES campus - Janaúba, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus pais, José Albergues e Vitória, e à minha irmã, Ana Cláudia, por, mesmo distantes, serem presentes na minha vida. Obrigada pelo apoio e carinho.

Às amigas Anielle, Cláudia, Raquel e Isabelle pelo carinho e convivência. Os momentos com vocês são sempre especiais.

Aos familiares, pelo carinho e orações.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 A tilápia-do-Nilo.....	3
2.2 Enzimas na alimentação animal.....	4
2.3 Protease exógena.....	5
2.4 Utilização de enzimas exógenas na alimentação de peixes.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Experimento de desempenho.....	12
3.2 Experimento de digestibilidade.....	14
3.3 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Desempenho.....	18
4.2 Digestibilidade.....	23
5 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

RESUMO

SANTOS, VANESSA SILVA. **Protease exógena em ração para tilápia-do-Nilo**. 2015. 33 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.¹

Objetivou-se avaliar a suplementação da enzima protease sobre o desempenho produtivo e a digestibilidade de nutrientes da ração para tilápia-do-Nilo. Foram utilizadas 408 tilápias-do-Nilo, com peso médio inicial de $90,22 \pm 14,97$ g. Foram realizados dois experimentos, um para avaliar o desempenho produtivo e outro para a determinação dos coeficientes de digestibilidade da proteína e energia da ração. O experimento de desempenho produtivo teve duração de 60 dias. Os peixes foram distribuídos em 24 tanques-rede, na densidade de 17 peixes por unidade experimental. Foi utilizada ração à base de produtos de origem vegetal e animal, suplementadas com cinco níveis de enzima protease, compondo seis tratamentos (sem adição de protease; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 e 0,16% de protease). Ao final do período experimental foram determinados os parâmetros médios de peso final, ganho de peso, consumo de ração aparente e conversão alimentar aparente. O experimento de determinação dos coeficientes de digestibilidade teve duração de cinco dias. No 40º dia do experimento de desempenho, todos os peixes foram transferidos dos tanques-rede para 24 incubadoras, adaptadas para a coleta de fezes por gravidade. A determinação dos coeficientes foi realizada através do método indireto com 0,1% de óxido de cromo. A inclusão da enzima protease proporcionou melhoras no peso final, ganho de peso e conversão alimentar aparente dos peixes. Os níveis estimados de inclusão da protease exógena foram de 0,064 e 0,060% para proporcionarem maiores ganho de peso e conversão alimentar aparente, respectivamente. A inclusão de protease não proporcionou diferenças nos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia brutas. Concluiu-se que a inclusão de 0,06% de protease exógena na ração proporciona melhor desempenho produtivo para a tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: desempenho, digestibilidade, enzima, *Oreochromis niloticus*

¹ **Comitê de orientação:** Prof. Dr. Felipe Shindy Aiura (orientador) – Departamento de Ciências Agrárias/UNIMONTES. Profa Dra. Mônica Patrícia Maciel – DCA/UNIMONTES (coorientadora).

ABSTRACT

SANTOS, VANESSA SILVA. **Exogenous protease in diets for Nile tilapia.** 2015. 33 p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.²

This work aimed to evaluate the protease enzyme supplementation on performance and digestibility of feed nutrients for Nile tilapia. We used 408 Nile tilapia, with initial weight of 90.22 ± 14.97 g. Two trials were set, one to evaluate the performance and another to determine the digestibility of feed's protein and energy. The experiment of productive performance lasted 60 days. The fish were distributed in 24 cages, with 17 fish by experiment unit. It was used ration with plant and animal ingredients, supplemented with five levels of protease enzyme, composing six treatments (without addition of protease; 0.01; 0.02; 0.04; 0.08; 0.16% protease). At the end of the trial period we determined the average parameters of final weight, weight gain, apparent feed intake and apparent feed conversion. The experiment to determine the digestibility coefficients lasted five days. On the 40th day of the performance experiment, all of the fish were transferred from cages to 24 incubators, adapted for feces collection by gravity. The determination of the coefficients was performed using the indirect method with 0,1% chromium oxide. The inclusion of protease enzyme provided improvements in final weight, weight gain and apparent feed conversion. The optimal levels of inclusion of exogenous protease in ration were 0.064 and 0.060% for weight gain and apparent feed conversion, respectively. The inclusion of protease did not provide differences in the apparent digestibility of crude protein and energy in the rations. It was concluded that the inclusion of 0.06% exogenous protease in the ration provides better performance for the Nile tilapia.

Keywords: performance, digestibility, enzyme, *Oreochromis niloticus*

² **Guidance Committee:** Prof. Dr. Felipe Shindy Aiura (Adviser) – Department of Agricultural Sciences/UNIMONTES. Profa Dra. Mônica Patrícia Maciel – DCA/UNIMONTES (co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura tem se desenvolvido intensamente em todo o Brasil, e, em 2013, a produção de peixes oriundos das pisciculturas continentais e marinhas foi de 392.493 toneladas (IBGE, 2013).

Esse desenvolvimento se deve à evolução das técnicas de cultivo, principalmente nos sistemas intensivos, com alimentação completa, alta densidade de estocagem, monitoramento da qualidade da água e tanques planejados. Esses sistemas exigem a utilização de rações artificiais balanceadas para atender às exigências nutricionais dos peixes, sendo a proteína o nutriente mais importante e oneroso da ração.

Para aumentar a eficiência produtiva, com melhores índices de desempenho animal a baixo custo, tanto os produtores de ração quanto de peixes ficam a mercê da variedade e do custo dos ingredientes das rações (GUIMARÃES *et al.*, 2009). Assim, as rações comerciais podem não ser adequadas aos sistemas intensivos, os quais exigem rações para alto desempenho, devido à utilização de ingredientes de baixa qualidade, seja pela baixa digestibilidade e/ou pela qualidade no processamento.

Para melhorar a digestibilidade das rações com alimentos de origem vegetal, são utilizados tratamentos térmicos (extrusão) e o fracionamento dos alimentos com o intuito de reduzir o teor de fatores antinutricionais. Entretanto, a digestibilidade de muitos nutrientes permanece baixa pela ausência ou a quantidade insuficiente de produção de enzimas pelos peixes, necessárias para quebrar a estrutura da parede celular que encapsula os nutrientes, tornando-os indisponíveis (GLENCROSS *et al.*, 2012).

Assim, o uso de enzimas exógenas como aditivos alimentares para melhorar a digestibilidade dos nutrientes de alimentos de origem vegetal tem sido amplamente estudado, e tem sido utilizada em todo o mundo como uma

forma de reduzir os efeitos antinutricionais de polissacarídeos não amiláceos (PEA) e ácido fítico (ADEOLA e COWIESON, 2011).

De acordo com Shina *et al.* (2011), pesquisas sobre enzimas exógenas na alimentação de peixes poderiam concentrar-se nos efeitos das enzimas sobre a disponibilidade de aminoácidos, pois em rações para esses animais são normalmente usados alimentos ricos em proteínas. Inclusões de proteases podem promover a liberação de aminoácidos ou diminuir os inibidores de proteases em rações, podendo implicar boa resposta no crescimento desses animais (MIRELES-ARRIAGA *et al.*, 2015).

Nesse contexto, objetivou-se avaliar a suplementação da enzima protease sobre o desempenho produtivo e a digestibilidade de nutrientes da ração para tilápia-do-Nilo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A tilápia-do-Nilo

Tilápia é o nome comum de aproximadamente 70 espécies de peixes taxonomicamente classificadas, da família dos ciclídeos, nativas da África (WATANABE *et al.*, 2002). Entre as espécies de interesse comercial destacam-se as do gênero *Oreochromis*, em especial a *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo).

No Brasil, a tilápia-do-Nilo foi introduzida no nordeste em 1971, sendo então distribuída pelo país e cultivada desde a bacia do rio Amazonas até o Rio Grande do Sul (BOSCOLO *et al.*, 2001). O interesse pelo cultivo desta espécie no Sul e Sudeste do país cresceu rapidamente pela introdução da tecnologia da reversão sexual e a pesca esportiva, representada pelos pesque-pagues. Em 2013, a tilápia apresentou produção de 169.306 toneladas, representando a espécie de maior cultivo no Brasil (IBGE, 2013).

A tilápia apresenta os primeiros raios das nadadeiras dorsal, pélvica e anal transformados em espinhos defensivos. É um peixe de águas paradas, que se destaca por suas características de interesse zootécnico como: alta prolificidade, pouca susceptibilidade a doenças parasitárias, resistência a baixas concentrações de oxigênio, e grande precocidade. As fêmeas atingem a maturidade sexual precocemente, quando alcançam por volta de 250 g, e alguns problemas de superpopulação podem ocorrer em cultivos quando se criam machos e fêmeas. Deve-se, então, preconizar para a engorda cultivos exclusivos de machos, pois eles atingem o peso comercial mais cedo (RIBEIRO, 2001).

Considerada de hábito alimentar onívoro, a tilápia aceita grande variedade de alimentos, podendo ser criada em diversos sistemas de cultivo, desde a cultura semi-intensiva até os cultivos intensivos, como *raceways* e

tanques-rede, sendo o primeiro peixe oriundo da aquicultura de águas interiores a ser processado na forma de filés resfriados e congelados (MADRID, 2000). A tilápia-do-Nilo ainda se destaca pelo seu ciclo de engorda relativamente rápido (de quatro a cinco meses) em relação a outras espécies (TURRA *et al.*, 2010).

Além dos atributos para a exploração intensiva, esta espécie possui boas características organolépticas, tais como: carne saborosa, baixo teor de gordura, ausência de espinhos intramusculares, e rendimento de filé em torno de 35% em exemplares de 450 g (HILSDORF, 1995). O processo de filetagem realizado pelas indústrias proporciona ótima aceitação pelo mercado consumidor, o que a torna uma espécie de grande interesse para a piscicultura (BORGHETTI e OSTRENSKI, 1998).

2.2 Enzimas na alimentação animal

Enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações químicas no organismo, sem serem elas próprias alteradas nesse processo (CHAMPE e HARVEY, 1989). São altamente específicas para os substratos e possuem sítio ativo que as permitem atuar na ruptura de determinada ligação química sob condições favoráveis de temperatura, pH e umidade (PENZ JÚNIOR, 1998).

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

As enzimas utilizadas na ração animal devem conservar sua atividade após os processos de fabricação e digestão. A estrutura molecular das enzimas pode ser desnaturada pelo calor no processamento, álcalis, metais pesados e

outros agentes oxidantes (GRAHAM e INBORR, 1991). Os fatores que podem influenciar sua estabilidade são: o microrganismo usado na fabricação da enzima, o tipo de atividade da enzima, a composição e condição de armazenamento da ração, as condições durante o processo digestivo e a ação de enzimas endógenas (FRANCESCH, 1996).

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

De acordo com Cavalheiro *et al.* (2014), as principais enzimas exógenas estudadas são as fitases, amilases, lipases e proteases. Quando essas enzimas agem sobre os fitatos, amidos, lipídeos e proteínas presentes nos ingredientes da ração liberam o fósforo, sacarídeos, ácidos graxos, aminoácidos e peptídeos, proporcionando melhor absorção (FURNE *et al.*, 2005).

As enzimas exógenas permitem aumentar a digestibilidade dos nutrientes, melhorando o desempenho produtivo de peixes e reduzindo a excreção de nutrientes (SIGNOR *et al.*, 2010).

2.3 Protease exógena

O uso de protease como aditivo na alimentação animal teve início entre os anos de 1950 e 1960 e, atualmente, ainda não foi explorado de forma extensiva como a fitase (PASQUALI, 2014). Além disso, na maioria dos estudos com enzimas, a protease é avaliada em complexos enzimáticos, dificultando a avaliação precisa e confiável dos efeitos causados pelo uso desta enzima em rações para animais.

Estas enzimas constituem uma família dividida em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases, conforme a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. Exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupo amino ou carboxi terminal do substrato (classificadas como amino e carboxypeptidases, respectivamente), enquanto as endopeptidases clivam as ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. As endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em: serina proteases, cisteína proteases, aspártico-proteases ou aspártico-endopeptidases e metaloproteases ou metaloendopeptidases (RAO *et al.*, 1998).

As proteases produzidas por *Bacillus licheniformis* são classificadas como serina proteases, enzimas que atuam sobre as ligações peptídicas das proteínas e possuem resíduo do aminoácido serina em seu sítio ativo. As serina proteases são altamente eficientes na hidrólise de peptídeos e abrangem outras classes de enzimas específicas extremamente diversificadas como tripsina, quimotripsina e subtilisina, por exemplo (HEDSTROM, 2002).

Proteases são enzimas digestivas que degradam proteínas e podem ser utilizadas de forma exógena na nutrição animal, permitindo a degradação de fatores antinutricionais inibidores de enzimas. De forma natural, os animais produzem algumas proteases endógenas, como pepsina, tripsina, quimotripsina e carboxipeptidases (GLITSO *et al.*, 2012).

Parte da proteína proveniente da ração não é aproveitada e acaba sendo excretada devido a diversos fatores, entre eles: taxa de passagem da digesta, idade do animal, composição da ração e qualidade dos ingredientes, grau de moagem da ração, entre outros. Dessa forma, o uso de proteases na nutrição animal pode ser viável com o objetivo de melhorar a utilização da proteína das rações (PASQUALI, 2014). Para Wyatt e Bedford (1998), as proteases agem

neutralizando os efeitos dos fatores antinutricionais do farelo de soja e aumentam a digestibilidade da proteína.

O uso de protease proveniente de *Bacillus licheniformis* complementa a ação de enzimas digestivas endógenas dos animais, como pepsina e proteases produzidas pelo pâncreas, aumentando a solubilização de proteínas de diversos ingredientes que compõem as rações (SMITH, 2011).

As proteínas de reserva dos vegetais são produzidas e armazenadas no grão como fonte de nitrogênio durante a germinação e, normalmente, estão associadas a 17 grânulos de amido. Dessa forma, as proteases podem hidrolisar as proteínas de reserva, liberando moléculas de amido que podem então ser digeridas pelos animais (BARLETTA, 2010). Assim, o uso de protease exógena pode melhorar também o aproveitamento da energia proveniente da dieta (FRUNJI *et al.*, 2011).

2.4 Utilização de enzimas exógenas na alimentação de peixes

Lin *et al.* (2007), avaliando os efeitos da suplementação do complexo (protease, β -glucanase e xilanase) nos níveis de 0,1 e 0,15% em híbridos de tilápia (*O. niloticus* x *O. aureus*) alimentados com rações à base de alimentos de origem vegetal, observaram que a taxa de crescimento, taxa de eficiência alimentar aparente e retenção de proteína apresentaram melhoras com a inclusão de 0,15% do complexo.

Oliveira *et al.* (2007), em estudo com tilápia-do-Nilo, constataram que a inclusão do complexo enzimático composto por celulase, protease e amilase nos níveis de 0,025 até 0,1%, em rações formuladas com ingredientes de origem vegetal, apresentou o melhor coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína e energia bruta, quando utilizados os níveis de inclusão de 0,049; 0,052 e 0,049% respectivamente.

Também em pesquisa com a tilápia-do-Nilo, Guimarães *et al.* (2009), avaliando a inclusão de 0,01 a 0,04% do complexo enzimático (lipase, protease e carboidrase), verificaram que a digestibilidade da proteína bruta e do extrato etéreo aumentou de acordo com o incremento do nível de complexo enzimático na ração.

Goda *et al.* (2012) concluíram que o uso de 1% de levedura em associação com o complexo enzimático pepsina, papaína e α -amilase (0,16; 0,32, 0,04%) respectivamente, proporcionou melhores valores de ganho de peso, crescimento específico, conversão alimentar e eficiência proteica para tilápia-do-Nilo.

Pedrosa (2012), utilizando complexo enzimático constituído de amilase, protease e celulase nas concentrações 0,033; 0,066 e 0,099% em rações para tilápia-do-Nilo, relatou que os coeficientes de digestibilidade aparente de matéria seca, proteína bruta e energia bruta da ração contendo 0,033% de inclusão do complexo enzimático mostraram-se superiores com relação aos outros níveis de inclusão testados.

Com a mesma espécie, Moura *et al.* (2012), analisando o efeito do complexo enzimático (protease, α -amilase, celulase, xilanase, α -galactosidase, pectinase, fitase, endoglucanase e sacarase) nos níveis de 0,005 a 0,025%, observaram aumento linear para ganho de peso e peso final.

Signor *et al.* (2010), ao avaliarem o complexo enzimático (amilase, protease, celulase, lipase, pectinase, xilanase, β -glucanase e fitase) contendo 0,033; 0,066 e 0,099% na ração, para tilapia-do-Nilo, constataram que o complexo não afetou o ganho de peso, taxa de sobrevivência e taxa de crescimento específico, alterando apenas o consumo de ração e conversão alimentar, cujos valores foram melhores nos peixes alimentados com a ração com 0,066% de inclusão.

Avaliando a inclusão do complexo enzimático (pectinase, protease, fitase, β -glucanase, xilanase, celulase e amilase) em rações para tilápia-do-Nilo, Pereira (2014) concluiu que as rações com menores níveis nutricionais e suplementadas com 0,085% do complexo enzimático proporcionam o mesmo ganho de peso diário e taxa de crescimento específico de uma ração formulada de acordo com as exigências do animal. Esse estudo demonstrou que é possível reduzir o custo de produção das rações e diminuir a excreção de nutrientes no ambiente em que esses peixes estão confinados.

Silva *et al.* (2007), ao utilizar um complexo enzimático exógeno composto de amilase, protease, lipase e celulase com três níveis de inclusão (0,05; 0,10 e 0,15%), em rações de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*), observaram que os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta, extrato etéreo, carboidratos e energia bruta foram melhores com o nível de inclusão de 0,05%.

Singh *et al.* (2011) relataram que a suplementação de 2% de papaína resultou em melhor taxa de crescimento, conversão alimentar, digestibilidade da proteína e eficiência proteica para carpa comum (*Cyprinus carpio*) em estudo com inclusão de 1, 2 e 3% da enzima nas rações.

Em estudos com o tucunaré-paca (*Cichla sp.*), Soares *et al.* (2008) incluíram 0,05; 0,10 e 0,15% de protease à ração e constataram que o melhor nível de inclusão da enzima foi de 0,10% para ganho de peso, conversão alimentar aparente e taxa de crescimento específico.

Farhangi e Carter (2007), avaliando o efeito de enzimas α -galactosidase (0,3%); protease (0,03%); hemicelulose (0,18%) e a combinação das três enzimas (0,51%) para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em rações à base de tremoço, verificaram que a associação das enzimas proporcionou melhoras na taxa de eficiência proteica e nos coeficientes de digestibilidade da matéria seca,

proteína e energia brutas. Já a suplementação das enzimas isoladas não causou nenhum efeito sobre o desempenho dos peixes.

Dalsgaard *et al.* (2012), também com truta arco-íris (*O. mykiss*), avaliaram a substituição parcial da farinha de peixe por soja 34,4% e a suplementação da enzima protease (0,0228%) separadamente ou em associação com as enzimas β -glucanase (0,0067%) e xilanase (0,0208%) e reportaram que a inclusão da protease gerou aumento no coeficiente de digestibilidade da proteína bruta da ração. Entretanto, os autores não observaram ganhos sobre a digestibilidade da proteína da ração com o uso das enzimas em associação.

É importante ressaltar que as espécies de hábito alimentar carnívoro possuem maior dificuldade em digerir alimentos de origem vegetal comparando-as com espécies de hábito alimentar onívoro.

Ao avaliarem o efeito da adição da amilase, lipase e protease nos níveis 0,05; 0,1 e 0,2%, Nunes *et al.* (2006) encontraram melhorias no desempenho zootécnico de tambaqui (*C. macropomum*) com adição de amilase (0,05%) e lipase (0,20%). Com a adição da enzima protease, os autores não verificaram efeito sobre o desempenho dos peixes.

Coraspe-Amaral *et al.* (2012), analisando o uso de protease exógena (0,02% e 0,2%) em rações para piabanha-do-Pardo (*Brycon* sp.), não encontraram melhorias no peso final, comprimento total, biomassa, sobrevivência e taxa de crescimento específico dos peixes.

Signor *et al.* (2013), utilizando o complexo enzimático (amilase, protease, celulase, lipase, β -glucanase e fitase) em kinguios (*Carassius auratus*), nas proporções 0,033; 0,066 e 0,099%, não observaram influência do complexo sobre o desempenho zootécnico.

A suplementação de enzimas exógenas em rações para peixes tem apresentado resultados positivos na digestibilidade dos nutrientes e no desempenho animal, melhorando, assim, o aproveitamento das rações e,

consequentemente, a produtividade dos peixes, auxiliando também na diminuição da poluição ambiental devido à menor excreção de nutrientes na água. Todavia, novas pesquisas são necessárias para determinação da correta dosagem e do comportamento da enzima, dependendo do tipo de alimento e hábito alimentar da espécie cultivada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento de desempenho

O experimento foi desenvolvido no Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura do Gortuba – CODEVASF, localizado no município de Nova Porteirinha–MG, e teve duração de 60 dias. Durante o período experimental, não se verificou mortalidade dos peixes.

Foram utilizadas 408 tilápias-do-Nilo, revertidas sexualmente, com peso médio inicial de $90,22 \pm 14,97$ g. Os peixes foram distribuídos em 24 tanques-rede (0,8 x 0,8 x 1,20 m), os quais foram instalados em um viveiro retangular de 200 m², na densidade de 17 peixes por unidade experimental.

A ração experimental foi composta à base de produtos de origem vegetal e animal, conforme as exigências nutricionais da tilápia, de acordo com Furuya *et al.* (2010), as quais foram suplementadas com enzima protease, compondo os seguintes tratamentos (Tabela 1):

T1 – testemunha (sem adição de protease);

T2 – 0,01% de protease;

T3 – 0,02% de protease;

T4 – 0,04% de protease;

T5 – 0,08% de protease;

T6 – 0,16% de protease.

A alimentação foi realizada quatro vezes ao dia (08 h, 11 h, 13h 30 min e 16h30 min) até a saciedade aparente. Sete dias antes do fornecimento da ração com a enzima protease, os peixes passaram por período de adaptação à ração peletizada e aos tanques-rede.

TABELA 1. Composição da ração experimental

Ingredientes	Níveis de protease (%)					
	0,00	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16
Milho	30,00	29,99	29,98	29,93	29,92	29,84
Farelo de algodão	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Farelo de arroz	7,34	7,34	7,34	7,34	7,34	7,34
Farelo de soja	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
Farelo de trigo	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Farinha de penas	7,16	7,16	7,16	7,16	7,16	7,16
Farinha de sangue	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Enzima protease	0,00	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16
Calcário	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Fosfato bicálcico	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Suplemento vit. e min. ¹	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Valores nutricionais calculados (%)						
Proteína bruta	32,56	32,56	32,55	32,55	32,55	32,54
Fibra bruta	5,23	5,23	5,23	5,23	5,23	5,23
Extrato etéreo	2,96	2,96	2,96	2,96	2,96	2,96
Cálcio	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68
Fósforo total	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09	1,09

¹ Níveis de garantia por kg de produto: vit. A - 1.200.000,00 ui; vit. D3 = 270.000,00 ui; vit. E - 12.000,00 mg; vit. K3 - 2.403,70 mg; vit. B1 - 2.000,08 mg; vit. B2 - 4.800,00 mg; vit. B6 - 3.999,96 mg; vit. B12 - 4.800,00 mg; ác. Nicotínico - 24.000,00 mg; pant. de cálcio - 12.006,00 mg; biotina - 48,00 mg; ác. fólico - 72,00 mg; colina - 62,00 mg; vit. C = 48.000,00 mg; ferro - 10.002,00 mg; manganês - 4.602,00 mg; zinco - 6.401,50 mg; cobre - 800,65 mg; selênio - 24,08 mg; iodo - 20,74 mg.

Para a fabricação da ração experimental, os ingredientes foram moídos na granulometria de 0,5 mm e a enzima protease foi adicionada de acordo com os tratamentos. Posteriormente, as rações foram homogeneizadas, sendo adicionada água destilada a 40 °C para peletização feita com auxílio de moedor elétrico e, em seguida, os peletes foram secos em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 24 horas. Após esses procedimentos, os grânulos foram fracionados, selecionando-se partículas conforme tamanho da boca e o desenvolvimento dos peixes. A fabricação da ração experimental foi a cada 10 dias.

A temperatura e o teor de oxigênio dissolvido na água do viveiro foram monitorados diariamente às 07 h e às 16 h 30 min e, semanalmente, o pH, utilizando-se uma sonda Multiparâmetros HORIBA modelo W-22XD. Durante o período experimental, os parâmetros apresentaram valores médios de temperatura, oxigênio e pH de $27,5 \pm 3,12$ °C; $7,6 \pm 0,67$ mg/L e $7,1 \pm 0,30$ respectivamente.

Os peixes foram pesados no início e ao final da fase experimental para avaliação do desempenho produtivo de acordo com os parâmetros médios: peso final (biomassa / n° total de peixes); ganho de peso (peso final médio – peso inicial); consumo de ração aparente (ração fornecida) e conversão alimentar aparente (peso de alimento fornecido / ganho de peso).

3.2 Experimento de digestibilidade

O experimento foi realizado no Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura do Gortuba – CODEVASF, localizado no município de Nova Porteirinha–MG. O período experimental teve duração de cinco dias, sendo antes realizado um período de três dias de adaptação dos peixes às incubadoras e de fornecimento da ração com indicador.

No 40º dia do experimento de desempenho, todos os peixes foram transferidos dos tanques-rede para 24 incubadoras de fibra de vidro de 200 litros, adaptadas para a coleta de fezes por gravidade (sistema de Guelph modificado) com entrada e saída de água por cima das incubadoras, sendo a mesma fonte de água de abastecimento do viveiro com os tanques-rede. As incubadoras foram cobertas com sombrite para evitar a fuga dos peixes.

Para a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia brutas das rações, foi utilizado o método indireto, que consiste na coleta parcial das fezes com utilização de marcador inerte (óxido de cromo), conforme o NRC (1993), a 0,1%, corrigindo-se a quantidade do milho nas rações.

A alimentação foi realizada até a saciedade quatro vezes ao dia (08 h, 11 h, 13 h 30min e 16 h). No final da tarde, às 16 h 30 min, as incubadoras eram limpas para preparação da coleta de fezes na manhã do dia seguinte, às 7 h, sendo então iniciado um novo dia de alimentação.

O monitoramento da temperatura, teor de oxigênio dissolvido e pH na água das incubadoras foi realizado conforme procedimento descrito no experimento de desempenho, sendo que os valores médios observados para esses parâmetros encontram-se dentro da faixa apresentada anteriormente.

As fezes coletadas foram desidratadas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 48 horas, maceradas com o uso de gral e pistilo, identificadas e armazenadas em *freezer* para análises posteriores.

Ao final da coleta de fezes, os peixes foram transferidos novamente para os tanques-rede, para continuidade do experimento de desempenho.

Foram realizadas análises de proteína bruta da ração e das fezes conforme Detman *et al.* (2012), no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Ciências Agrárias da UNIMONTES. As análises de óxido de

cromo e energia bruta das rações e das fezes foram realizadas em laboratório particular especializado.

Os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia das rações foram calculados com base na fórmula apresentada a seguir:

$$CDa_{(n)} = 100 - \left[100 \left(\frac{\% \text{ indicador}_r}{\% \text{ indicador}_f} \right) \times \left(\frac{\% N_f}{\% N_r} \right) \right]$$

Onde:

$CDa_{(n)}$ = coeficiente de digestibilidade aparente;

$\% \text{ indicador}_r$ = % de indicador na ração;

$\% \text{ indicador}_f$ = % de indicador nas fezes;

N_r = nutriente na ração;

N_f = nutriente nas fezes.

3.3 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos (testemunha + cinco níveis da enzima protease) e quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos em relação à testemunha foram comparadas pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade, usando-se o programa estatístico SAS (SAS, 2000). Comprovando-se diferença significativa, foi aplicado o estudo de regressão para os níveis da enzima protease (5% de probabilidade), usando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

O modelo estatístico adotado para análise dos dados foi:

$$Y = m + t_i + e_{ij}$$

Onde:

Y_{ij} = valor observado no tratamento i na repetição j ;

m = constante associada às observações;

t_i = efeito do tratamento i , com $i = 1, 2, 3, 4, 5$;

e_{ij} = erro experimental, associado aos valores observados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desempenho

Os valores médios para as variáveis de desempenho, peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração aparente (CRA) e conversão alimentar aparente (CAA) da tilápia-do-Nilo alimentadas com ração contendo enzima protease estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Valores médios, valor de P e coeficientes de variação (CV) para peso final (PF), ganho de peso (GP), consumo de ração aparente (CRA) e conversão alimentar aparente (CAA) para tilápia-do-Nilo alimentada com ração contendo enzima protease

Tratamento	Variáveis			
	PF (g)	GP (g)	CRA (g)	CAA
Testemunha (sem protease)	208,72	129,32	303,07	2,35
0,01% protease	241,05*	145,15	334,77	2,32
0,02% protease	263,33*	172,73*	313,27	1,82*
0,04% protease	261,15*	171,72*	302,26	1,76*
0,08% protease	256,21*	166,51*	313,73	1,89*
0,16% protease	266,72*	170,42*	318,36	1,88*
Valor P	0,0008	0,0001	0,1882	0,0001
CV %	6,61	7,32	5,83	6,50

Médias seguidas de asterisco diferem do tratamento testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$).

A análise de variância mostrou-se significativa para os parâmetros PF, GP e CAA. As rações contendo a enzima protease proporcionaram valores superiores à testemunha para PF. Para GP e CAA, os tratamentos apresentaram

melhores valores comparados à testemunha a partir de 0,02% de inclusão da enzima.

Assim, essas variáveis contendo a enzima protease foram submetidas ao estudo de regressão. Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios, valor de P e coeficiente de variação (CV) para PF, GP e CAA para tilápia-do-Nilo alimentada com ração contendo a enzima protease.

TABELA 3. Valores médios, valor de P e coeficiente de variação (CV) para peso final (PF), ganho de peso (GP) e conversão alimentar aparente (CAA) para tilápia-do-Nilo alimentada com ração contendo enzima protease

Tratamento	Variáveis		
	PF (g)	GP (g)	CAA
0,01% protease	241,05	145,15	2,32
0,02% protease	263,33	172,73	1,82
0,04% protease	261,15	171,72	1,76
0,08% protease	256,21	166,51	1,89
0,16% protease	266,72	170,42	1,88
Valor P	0,2276	0,0090	0,0002
CV (%)	6,18	6,21	6,78

Pode-se observar que o PF não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos contendo a enzima protease, demonstrando que os animais que receberam os diferentes níveis de protease exógena alcançaram peso similar ao final do experimento, com média de 249,53 g. Para as variáveis GP e CAA, observou-se comportamento quadrático em resposta às diferentes concentrações de enzima na ração.

O melhor valor estimado que proporcionou o máximo ganho de peso foi de 0,064% de adição de protease na ração (Figura 1).

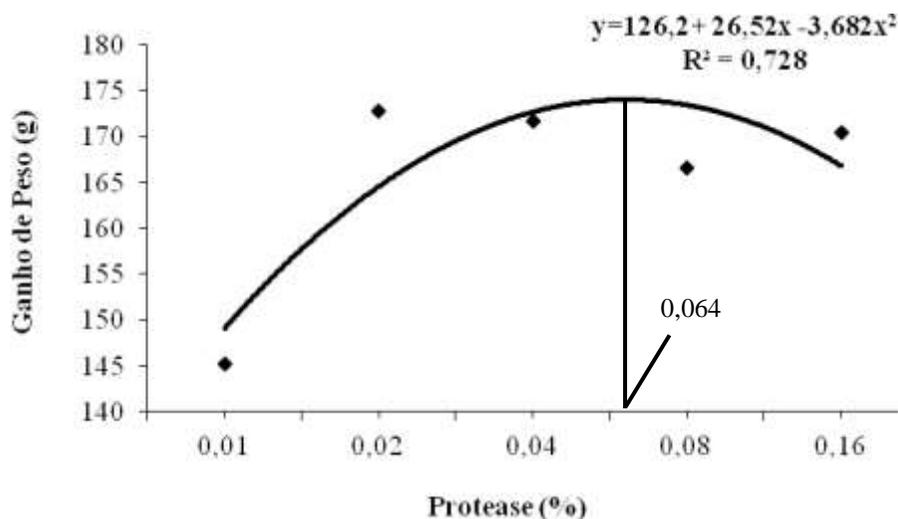


FIGURA 1. Valores médios de ganho de peso para tilápia-do-Nilo alimentada com ração contendo enzima protease

Lin *et al.* (2007), avaliando o desempenho de híbridos de tilápia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) alimentados com uma combinação de enzimas exógenas (protease, β -glucanase e xilanase) nos níveis de 0,1 e 0,15%, verificaram melhoras no GP dos peixes com o aumento da inclusão das enzimas. Observaram ainda que a atividade da protease e de amilase no intestino dos híbridos foi maior com a suplementação de enzimas exógenas, sugerindo uma maior secreção enzimática endógena nos peixes.

Em estudo com a tilápia-do-Nilo, Goda *et al.* (2012) constataram aumento no GP com a suplementação do complexo enzimático pepsina, papaína e α -amilase (0,64; 1,28; 0,16%) respectivamente. Também com a tilápia-do-Nilo, Moura *et al.* (2012), testando a inclusão de complexo enzimático contendo a enzima protease nos níveis de 0,005 a 0,025% observaram aumento nos valores de GP de acordo com o aumento de inclusão do complexo.

Com a carpa comum (*Cyprinus carpio*), o estudo da inclusão de papaína nas rações resultou em melhor taxa de crescimento com a suplementação de 2% da enzima (SINGH *et al.*, 2011).

Soares *et al.* (2008), ao analisarem o efeito da enzima protease exógena em rações para o tucunaré paca (*Cichla sp.*), constataram melhores valores de GP ao nível de 0,10%.

Entretanto, estes resultados diferem do encontrado por Farhangi e Carter (2007) que, ao estudarem o efeito da suplementação das enzimas α -galactosidase (0,3%); protease (0,03%); hemicelulose (0,18%) e a combinação das três enzimas (0,51%), em rações à base de tremçoço no desempenho de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), observaram que as enzimas adicionadas não causaram melhora no GP dos peixes. Os autores relacionam os resultados ao elevado teor de polissacarídeos não amiláceos presentes na ração. De acordo com Kolkovski (2001), o efeito das enzimas digestivas exógenas depende da espécie, do tipo de enzima utilizada, bem como do hábito alimentar do peixe.

O nível estimado de inclusão da enzima protease que proporcionou o melhor valor de CAA foi de 0,060% (Figura 2). O resultado sugere que o uso da enzima protease disponibiliza maior quantidade de nutrientes, levando os peixes ao melhor ganho de peso.

Este resultado está próximo ao encontrado por Signor *et al.* (2010), que analisaram a suplementação de complexo enzimático contendo a enzima protease nos níveis 0,033; 0,066 e 0,099% para a tilápia-do-Nilo e encontraram o melhor valor de CAA com a suplementação de 0,066% do complexo enzimático.

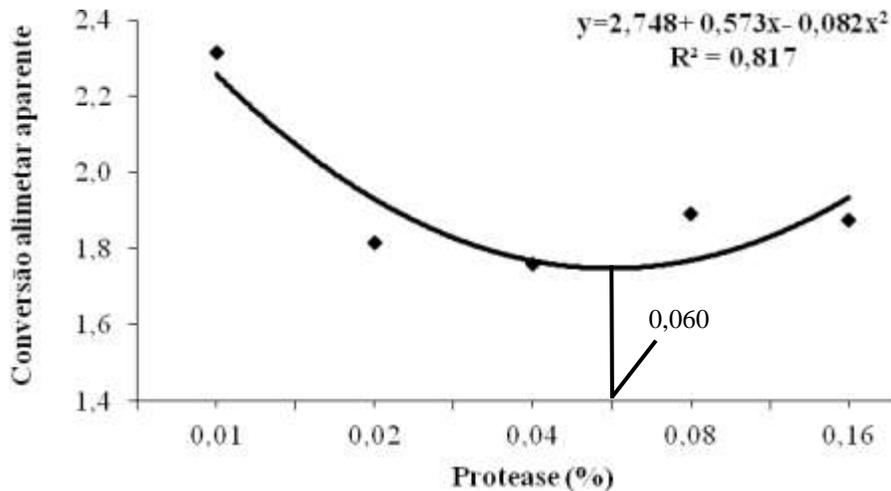


FIGURA 2. Valores médios de conversão alimentar aparente para tilápia-do-Nilo alimentada com ração contendo enzima protease

Singh *et al.* (2011), testando a inclusão de 1, 2 e 3% de papaína em rações para carpa comum (*C. carpio*), observaram que a suplementação de 2% de papaína resultou em melhor taxa de CAA. Os autores inferiram que a inclusão da enzima protease na ração promove um aumento no metabolismo, implicando melhora no desempenho produtivo.

Soares *et al.* (2008) verificaram melhor valor de CAA ao nível de 0,10% de inclusão de protease nas rações para o tucunaré paca (*Cichla sp.*).

A adição de protease exógena na ração promoveu ganhos no desempenho produtivo para a tilápia-do-Nilo. Desse modo, é possível o uso de ingredientes proteicos de menor aproveitamento pelo animal, como a farinha de penas e a farinha de sangue utilizada na composição da ração, sem prejudicar o desempenho dos animais.

4.2 Digestibilidade

Não foram observadas diferenças significativas do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da proteína bruta (PB) e energia bruta (EB) com a inclusão de enzima protease à ração (Tabela 4). O CDA da PB da ração variou de 87,97 a 89,54% e da EB de 76,92 a 78,37%.

TABELA 4. Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína bruta (PB) e energia bruta (EB) da ração contendo enzima protease para tilápia-do-Nilo

Tratamento	CDA (%)	
	PB	EB
Testemunha (sem protease)	87,97	76,92
0,01% protease	88,40	77,19
0,02% protease	88,43	77,36
0,04% protease	89,08	77,93
0,08% protease	89,28	78,33
0,16% protease	89,54	78,37
Valor P	0,2354	0,7408
CV %	0,94	1,86

Estes resultados assemelham-se aos encontrados por Pereira (2014), que ao avaliar a inclusão de 0,025 a 0,085% do complexo enzimático contendo a enzima protease na ração de tilápias-do-Nilo, não notou diferenças significativas na digestibilidade da PB e EB.

Entretanto, na literatura, são encontradas respostas positivas na utilização de enzimas exógenas em rações para peixes. Em estudo com a tilápia-do-Nilo, Oliveira *et al.* (2007) concluíram que a inclusão de um complexo

enzimático contendo a enzima protease nos níveis de 0,025 a 0,1% em rações formuladas com ingredientes de origem vegetal proporcionou maiores CDA da PB e EB quando utilizaram 0,052 e 0,049%, respectivamente, do complexo enzimático à ração.

Guimarães *et al.* (2009), analisando a inclusão de complexo enzimático (0,01 a 0,04%), contendo a enzima protease, verificaram que os CDA da PB e EB foram crescentes com a adição do complexo enzimático na ração para tilápia-do-Nilo.

Silva *et al.* (2007), ao avaliarem o CDA da PB, EB, extrato etéreo (EE) e carboidratos (CHO) da ração suplementada com complexo enzimático contendo a enzima protease para o tambaqui (*Colossoma macropomum*), constataram que o nível de inclusão do complexo enzimático que melhor contribuiu para o aumento da digestibilidade foi o de 0,05%.

Farhangi e Carter (2007), ao estudarem o efeito da suplementação enzimática de hemicelulase, protease e α -galactosidase em rações à base de tremoço para truta arco-íris (*O. mykiss*), observaram que a associação das enzimas gerou aumento dos CDA da PB e EB.

Em estudo com truta arco-íris (*O. mykiss*) realizado por Dalsgaard *et al.* (2012), a substituição parcial da farinha de peixe por soja 34,4% e a suplementação das enzimas β -glucanase (0,0067%) e protease (0,0228%) separadamente resultaram em aumento dos CDA da PB e lipídios das rações.

Apesar de ser possível a inclusão nas rações de apenas uma enzima, como aditivo comercial, é comum o uso de várias enzimas, constituindo complexos enzimáticos, que são interessantes, uma vez que as rações são compostas por vários tipos de ingredientes (CAMPESTRINI *et al.*, 2005).

Segundo Stech *et al.* (2009), os resultados dos trabalhos com uso de enzimas exógenas em rações para peixes mostram que as respostas dependem da

espécie utilizada, da dieta, da origem, concentração e estabilidade da enzima e seu uso concomitante ou não com outras enzimas.

5 CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizado este experimento, concluiu-se que a inclusão de 0,06% de protease exógena na ração proporciona melhor desempenho produtivo para a tilápia-do-Nilo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOLA, O.; COWIESON, A.J. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. **Journal of Animal Science**, [s.l.], v. 89, p. 3189-3218, 2011.

BARLETTA, A. Introduction: current market and expected developments. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G.G. (Eds.) **Enzymes in farm animal nutrition**. 2 ed. London: Wallingford: CAB International, 2010. cap.1. p.1-11.

BORGHETTI, J. R.; OSTRENSKY, A. Estratégias e ações governamentais para incentivar o crescimento da atividade aquícola no Brasil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE AQUICULTURA, 1, 1998, Recife, PE. **Anais...** Recife: SIMBRAQ, 1998. p. 437-447,

BOSCOLO, W. R. *et al.* Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa-MG, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, [s.l.], v. 2, n. 6, p. 254-267, 2005.

CAVALHEIRO, A. C. M. *et al.* Microingredientes utilizados em alimentação de peixes em cativeiro—Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 109, p. 11-20, 2014.

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

DALSGAARD, J. *et al.* Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high

inclusion of plant-based protein. **Animal Feed Science and Technology**, [s.l.], v. 171, p. 181-191, 2012.

DETMAN, E.; SOUZA, M. A. *et al.* **Métodos para análises de alimentos - INCT** – Viçosa: Editora UFV, 2012. p. 214.

FARHANGI, M.; C. G. C. Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, Amsterdam, v. 38, p. 1274-1282, 2007.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

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

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

FRU-NJI, F. *et al.* A feed serine protease improves broiler performance and increases protein and energy digestibility. **Journal of Poultry Science**, [s.l.], v. 48, p. 239-246, 2011.

FURNE, M. *et al.* Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 250, 391-398, 2005.

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

GLENCROSS, B.; RUTHERFORD, N.; BOURNE, N. The influence of various starch and nonstarch polysaccharides on the digestibility of diets to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 356–357, p. 141–146, 2012.

GLITSO, V. *et al.* Development of a Feed Protease. **Industrial Biotechnology**, New York, v. 8, p. 172-175, 2012.

GODA, A. *et al.* Effect of using Baker's yeast and exogenous digestive enzymes as growth promoters on growth, feed utilization and hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Tehran, v. 2, p. 15-28, 2012.

GRAHAM, H.; INBORR, J. Enzymes in monogastric feeding. **Agro Industry Hi-tech.**, Milano, v. 2, n. 1, p. 45-48, 1991.

GUIMARÃES, I.G. *et al.* Digestibilidade aparente de rações contendo complexo enzimático para tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa-MG, v. 61, n. 6, p.1397-1402, 2009.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, Washington, v. 102, p. 4501-4524, 2002.

HENN, J. D. **Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves**. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, 2002. 16. p. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/aditiv_enzimas.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2015.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 73-84, 1995.

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Produção da Pecuária Municipal – 2013**. Disponível em:

<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/tabelas_pdf/tab02.pdf.> Acesso em: 20 mai. 2015.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 200, p. 181-201, 2001.

LIN, S., MAI, K., TAN, B. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Aquaculture Research**, Amsterdam, v.38, p. 1645-1653, 2007.

MADRID, R. M. Avança Brasil: Programa de Desenvolvimento da Aquicultura. *In*: SEMINÁRIO E WORKSHOP “TECNOLOGIA PARA APROVEITAMENTO INTEGRAL DO PESCADO”, 2000, Campinas. **Resumos...** Campinas: ITAL, 2000. p.1-4

MIRELES-ARRIAGA, A. I. *et al.* Use of exogenous enzyme in animal Feed. **Life Science Journal**, Ohio, v. 12, n. 2, 2015.

MOURA, G. S. *et al.* Effects of enzyme complex SSF (solid state fermentation) in pellet diets for Nile tilapia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa-MG, v.41, n.10, p.2139-2143, 2012.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of fish: nutrient requirements of domestic animals**. Washington, D.C.: National Academy Press, 1993. p. 114

NUNES, E. S. S. *et al.* Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 139-143, 2006.

OLIVEIRA, G. R. *et al.* Digestibilidade de nutrientes em rações com complexo multienzimático para a tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa-MG, v. 36, n. 6, p.1945-1952, 2007.

PASQUALI, G. A. M. **Níveis de inclusão de sorgo e adição de enzimas exógenas em dietas para frangos de corte.** 2014. 67p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014.

PEDROSA, R. U. **Digestibilidade do farelo de urucum com adição de complexo enzimático para Tilápia do Nilo.** 2012. 45 p. Monografia (Graduação) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2012.

PENZ JÚNIOR, A. M. Enzimas em rações para aves e suínos. *In:* SIMPÓSIO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO DE RUMINANTES E NÃO RUMINANTES, 1998, Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p.165-178

PEREIRA, B. H. S. **Uso de complexo enzimático em dietas para tilápia do Nilo: digestibilidade, atividade enzimática, desempenho produtivo e parâmetros fisiológicos.** 2014. 66 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

RAO, M. B.; *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington,. v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RIBEIRO, R. P. Espécies exóticas. *In:* MOREIRA, H.L.M. *et al.* **Fundamentos da moderna aquicultura.** Canoas: ULBRA, 2001. p.91-121.

SAS - STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **User's guide.** Version 8. 2.ed. Cary: 2000. (CD-ROM)

SHINA, A. *et al.* Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition: A review. **Food Chemistry**, Reading, v. 127, p. 1409–1426, 2011.

SIGNOR, A. A. *et al.* Desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa-MG, v. 39, n. 5, p. 977-983, 2010.

SIGNOR, A. A. *et al.* Complexo enzimático na dieta de alevinos de kinguio (*Carassius auratus*). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1381-1388, 2013.

SILVA, J. A. M. *et al.* Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 37, n. 1, p. 157-164, 2007.

SINGH, P. *et al.* Exogenous supplementation of papain as growth promoter in diet of fingerlings of *Cyprinus carpio*, **International Aquatic Research**, Cham, v. 3, p.1-9, 2011.

SMITH, A. Using proteases in broiler diets - careful selection is key. **International Poultry Production**, St. Louis, v.19, p.15-17, 2011.

SOARES, E. C. *et al.* Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca (*Cichla sp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa-MG, v. 37, n.6, p.971-976, 2008.

STECH, M. R.; CARNEIRO, D.; PIZAURO, J. J. M. Fatores que afetam a produção de enzimas digestivas em peixes e o uso de enzimas exógenas como ferramentas em nutrição de peixes. **Ensaio e Ciência Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Valinhos, n.2, p.79-93, 2009.

TURRA, E. M. *et al.* Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p. 29-36. 2010.

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

WATANABE, W.O.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K. *et al.* Tilapia production systems in the Américas: technological advances, trend, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, New York, v. 10, p. 465-498, 2002.

WYATT, C. L.; BEDFORD, M. R. Uso de enzimas nutricionais para maximizar a utilização de nutrientes pelo frango de corte em dietas à base de milho: recentes progressos no desenvolvimento e aplicação prática. In: SEMINÁRIO TECNICO FINNFEEDS, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FINNFEEDS, 1998. p. 2-12