

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ASSOCIAÇÃO DE XILANASE E β -GLUCANASE SOBRE A
DIGESTIBILIDADE, DESEMPENHO PRODUTIVO,
HISTOLOGIA INTESTINAL E MICROBIOMA
DE TILÁPIAS DO NILO

Autor: Johnny Martins de Brito
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Alice Eiko Murakami

MARINGÁ
Estado do Paraná
Abril – 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ASSOCIAÇÃO DE XILANASE E β -GLUCANASE SOBRE A
DIGESTIBILIDADE, DESEMPENHO PRODUTIVO,
HISTOLOGIA INTESTINAL E MICROBIOMA
DE TILÁPIAS DO NILO

Autor: Johnny Martins de Brito
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Alice Eiko Murakami

“Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal”.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Abril– 2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Brito, Johnny Martins de

B862a

Associação de Xilanase e β -glucanase sobre a digestibilidade, desempenho produtivo, histologia intestinal e microbioma de tilápias do Nilo/ Johnny Martins de Brito. -- Maringá, 2019.

132 f. : il., color., figs. , tabs.

**Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya.
Coorientadora: Prof.a. Dr.a. Alice Eiko Murakami.**

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Produção Animal, 2019.

1. Carboidrases. 2. Oreochromis niloticus. 3. Polissacarídeos não amiláceos. 4. Trigo. I. Furuya, Wilson Massamitu, orient. II. Murakami, Alice Eiko, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Área de Concentração Produção Animal. IV. Título.

**CDD 22. ED.639.31
Jane Lessa Monção CRB9 1173**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ASSOCIAÇÃO DE XILANASE E B-GLUCANASE SOBRE
DIGESTIBILIDADE, DESEMPENHO PRODUTIVO,
HISTOLOGIA INTESTINAL E MICROBIOMA DE
TILÁPIAS DO NILO

Autor: Johnny Martins de Brito
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADO em 12 de abril de 2019.

Prof. Dr. Aires Oliva Teles

Prof. Dr. Cheila Roberta Lehen

Prof. Dr. Raquel Abdallah da
Rocha Oliveira

Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate

Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Orientador

"Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo. Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo. Não viva de fotografias amareladas. Continue, quando todos esperam que desistas. Não deixe que enferruje o ferro que existe em você. Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você. Quando não conseguir correr através dos anos, trote. Quando não conseguir trotar, caminhe. Quando não conseguir caminhar, use uma bengala. Mas nunca se detenha."

Madre Teresa De Calcutá

Aos meus pais Raimunda de Araújo Martins e Antônio Crispiano de Sousa Brito, por todo o amor, carinho, confiança e incentivo que foram fundamentais para que essa importante etapa da minha vida fosse concluída com sucesso. A vocês meu muito obrigado por estarem sempre comigo incentivando, ensinando, confiando e acima de tudo amando. A vocês pertence o meu amor, carinho, admiração e respeito incondicional. Serei eternamente grato por tudo que já fizeram, fazem e sei que ainda irão fazer pelo meu sucesso. Amo muito vocês meus pais queridos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter concedido saúde, força e sabedoria para a realização desse sonho;

Aos meus queridos pais Antônio Crispiano de Sousa Brito e Raimunda de Araújo Martins e irmãos Cristiano Martins de Brito, Silvia Renata Martins de Brito e Jarley Martins de Brito, por todo amor, carinho, incentivos, apoio e conselhos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya, pela orientação, pela motivação profissional e pessoal, confiança, incentivos e amizade;

À Coorientadora Prof.^a Dr.^a Alice Eiko Murakami, pela disponibilidade e colaborações;

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, pela oportunidade de realização desse sonho;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, por todos os ensinamentos repassados e pelas contribuições profissionais e pessoais compartilhadas;

Às professoras Dr.^a Valéria Rossetto Barriviera Furuya, Dr.^a Mariana Michelato Kawakami e Dr.^a Fernanda Losi Alves de Almeida e aos técnicos de laboratórios do departamento de zootecnia da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG Valquiria Nanuncio Choclel e Antônio do Espírito Santo Prado, pela disponibilidade, pelo apoio e por toda ajuda na realização das análises laboratoriais;

Ao grupo de pesquisa *Fish Nutrition*, formado por Tânia Cristina Pontes, Allan Vinnicius Urbich, Paola Aparecida Paulovski, Alycia Renata Rudnik, João Antônio Galiotto Miranda, Maytê Vedam Dimbarre, Ana Flavia, Fernanda Eleutério Miara Almeida e Thaís Pereira da Cruz, pela amizade e pela grandiosa e valiosa ajuda na condução dos experimentos e realização das análises laboratoriais;

Ao grupo de pesquisa *AquaNutri* (UNESP, Botucatu, SP, Brasil) em especial ao Dr. Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho, pela moagem, extrusão e secagem das dietas experimentais;

À BASF S.A., pela parceria, pelo o fornecimento das enzimas utilizados na execução do experimento e pelo auxílio na realização das análises laboratoriais, agradecimento especial ao Sr. Bruno Wernick, consultor de serviços técnico da BASF S.A. *Nutrição animal* Maringá, Paraná;

À CAPES, pela concessão de bolsa de doutorado;

A todos meus amigos e colegas do PPZ/UEM, pelo conhecimento compartilhado, pela parceria e pela amizade conquistada, em especial a Tânia Cristina Pontes, Marcio Gregório Rojas dos santos, Jailton da Silva Bezerra Júnior e Fabiana Cristina Belchior de Souza;

A todos os amigos (a) que conquistei durante essa etapa de suma importância na minha vida em especial a Fabricio Eugênio de Araújo, Karla Miky Tsujii, Bianca Richter, Amanda Lima, Marcel Jobbins, Dayane Cheritt Batista, Jonathan Ribeiro, Charlise Primieri, Leticia Souza, Ingrid Caroline, Juliane Andressa, Fernanda Lima, Alison Macedo, Jessica Nakamura, Amanda Moraes e Bruna de Souza Andrade, muito obrigado pela parceria e por todos os momentos de alegrias vividos;

A todos os colegas e amigos da Universidade Estadual de Ponta Grossa-UEPG;

A todos meus familiares que de forma direta ou indireta contribuíram para que meus objetivos fossem alcançados.

BIOGRAFIA

JOHNNY MARTINS DE BRITO, filho de Antônio Crispiano de Sousa Brito e Raimunda de Araújo Martins, nasceu em Imperatriz, no estado do Maranhão, em 1991.

Em março de 2009 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Estadual do Piauí - UESPI, obtendo o título de ZOOTECNISTA em agosto de 2013.

No mês de março de 2014 ingressou no programa de Pós-graduação em Zootecnia na Universidade Federal do Piauí, em nível de Mestrado, área de produção e nutrição de animais Não Ruminantes, realizando estudos com ênfase em peixes de água doce, sendo titulado como MESTRE EM ZOOTECNIA em fevereiro de 2016.

Iniciou os estudos em nível de doutorado no mês de março de 2016, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Produção Animal, tendo como especialidade a área de aquicultura, na Universidade Estadual de Maringá - UEM, na cidade de Maringá, PR, em 12 de fevereiro de 2019, obteve a qualificação, e na data de 12/04/2019, submeteu-se à banca examinadora para defesa da tese de doutorado e obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xviii
I - INTRODUÇÃO GERAL	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1.1. Panorama da piscicultura brasileira	2
1.2. Tilápia do Nilo	3
1.3. Polissacarídeos não amiláceos	4
1.4. Arabinoxilanos e β -glucanos	7
1.5. Enzimas exógenas nas dietas para peixes	8
1.6. Carboidrases em dietas para peixes	12
1.7. Histologia intestinal	15
1.8. Microbioma na nutrição de peixes	16
1.9. Referências	22
2. Objetivo geral	33
2.1. Objetivos Específicos	33
 II - Coeficientes de digestibilidade aparente da energia, proteína, aminoácidos e minerais em dietas contendo baixo e alto teor de arabinoxilanos e β-glucano utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores para juvenis de tilápias do Nilo	 35
Resumo	35
Abstract	37
1. Introdução	38
2. Material e Métodos	39
2.1. <i>Local de realização do experimento</i>	39
2.2. <i>Dietas experimentais</i>	40

2.3. <i>Peixes e condições experimentais</i>	43
2.4. <i>Análises laboratoriais e cálculos de digestibilidade</i>	44
2.5. <i>Delineamento experimental e análise estatísticos</i>	45
3. Resultados	46
3.1. <i>Digestibilidade da energia e dos nutrientes</i>	46
3.2. <i>Digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais</i>	48
4. Discussão	51
4.1. <i>Digestibilidade da energia e dos nutrientes</i>	51
4.2. <i>Digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais</i>	53
5. Conclusões	54
Agradecimentos	54
Referências	55
III - Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de dietas contendo baixo e alto teor de arabinosilanos e β-glucano com adição de xilanase e β-glucanase para juvenis de tilápias do Nilo	58
Resumo	58
Abstract	59
1. Introdução	60
2. Material e métodos	61
2.1. <i>Dietas experimentais</i>	61
2.2. <i>Peixes e condições experimentais</i>	64
2.3. <i>Viscosidade das dietas experimentais</i>	66
2.4. <i>Análises laboratoriais e cálculos de digestibilidade</i>	66
2.5. <i>Análise estatística</i>	67
3. Resultados	67
3.1. <i>Digestibilidade da energia e dos nutrientes</i>	67
3.2. <i>Digestibilidade dos aminoácidos</i>	70
4. Discussão	73
4.1. <i>Digestibilidade da energia e dos nutrientes</i>	73
4.1. <i>Digestibilidade dos aminoácidos</i>	75
5. Conclusões	76
Agradecimentos	76
Referências	76
IV - Desempenho produtivo, parâmetros bioquímicos, histologia intestinal, e microbioma de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas com adição de xilanase e β-glucanase	81

Resumo	81
Abstract.....	82
1. Introdução.....	83
2. Material e métodos	84
2.1. <i>Dieta experimentais</i>	84
2.2. <i>Peixes e condições experimentais</i>	86
2.3. <i>Ensaio de desempenho</i>	87
2.4. <i>Análises bromatológicas</i>	88
2.5. <i>Análises hematológicas</i>	88
2.6. <i>Comprimento absoluto e relativo do intestino</i>	88
2.7. <i>Análise histológica</i>	89
2.8. <i>Microbioma intestinal</i>	89
2.9. <i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	91
3. Resultado	91
3.2. <i>Desempenho produtivo aos 90 dias</i>	91
3.3. <i>Índice hepatossomático, gordura visceral e comprimento do intestino</i>	92
3.4. <i>Composição corporal</i>	92
3.5. <i>Parâmetros bioquímicos do sangue</i>	93
3.6. <i>Histologia intestinal</i>	94
3.7. <i>Microbioma intestinal</i>	95
4. Discussão.....	99
4.1. <i>Desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo</i>	99
4.2. <i>Composição corporal</i>	100
4.3. <i>Parâmetros bioquímicos do sangue</i>	100
4.4. <i>Histologia intestinal</i>	101
4.5. <i>Microbioma intestinal</i>	101
5. Conclusões.....	103
Agradecimentos.....	103
Referências	103
V - CONSIDERAÇÕES FINAIS	109

LISTA DE TABELAS

I - Revisão bibliográfica.....	2
Tabela 1. Valores médios de polissacarídeos não amiláceos (PNA) (g/kg de matéria seca) de alguns ingredientes utilizados na alimentação de peixes.	6
Tabela 2. Principais enzimas utilizadas em dietas de animais não ruminantes.	11
Tabela 3. Resultados de trabalhos utilizando enzimas exógenas nas dietas para peixes.	13
Tabela 4. Efeitos da dieta sobre a microbiota intestinal de diferentes espécies de peixes.	18
II - Coeficientes de digestibilidade aparente da energia, proteína, aminoácidos e minerais em dietas contendo baixo e alto teor de arabinosilanos e β-glucano utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores para juvenis de tilápias do Nilo.....	35
Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/kg).....	41
Tabela 2. Composição analisada das dietas experimentais (g/kg).....	42
Tabela 3. Composição analisada de aminoácidos essenciais e não essenciais das dietas com diferentes perfis de arabinosilanos e β -glucanos (g/kg, base na matéria seca)	43
Tabela 4. Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, energia bruta, proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo, cálcio e fósforo, por juvenis tilápia do Nilo, alimentadas com dietas formuladas com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores	47
Tabela 5. Desdobramento da interação dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca, energia bruta, fibra bruta, cálcio e fósforo, por juvenis tilápia do Nilo, alimentadas com dietas formuladas com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores.....	48
Tabela 6. Coeficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos essenciais e não essenciais, por juvenis tilápia do Nilo, alimentadas com dietas formuladas com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores	50

Tabela 7. Desdobramento da interação para os coeficientes de digestibilidade dos aminoácidos leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, valina, alanina e tirosina, por juvenis tilápia do Nilo, alimentadas com dietas com baixo ou alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores51

III - Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de dietas contendo baixo e alto teor de arabinoxilanos e β -glucano com adição de xilanase e β -glucanase para juvenis de tilápias do Nilo.....58

Tabela 1. Composição das dietas experimentais..... 62

Tabela 2. Composição analisada das dietas experimentais63

Tabela 3. Composição analisada de aminoácidos essenciais e não essenciais das dietas contendo diferentes fontes de energia, com ou sem adição de xilanase e glucanase (g/kg, base na matéria seca) 64

Tabela 4. Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, matéria seca, energia bruta, cálcio e fósforo, por juvenis de tilápias do Nilo alimentadas, com dietas contendo baixo ou alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos com ou sem adição de xilanase e glucanase..... 68

Tabela 5. Desdobramento da interação para os coeficientes de digestibilidade da matéria seca, cálcio e fosforo, por juvenis tilápias do Nilo alimentadas, com dietas contendo baixo ou alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos com ou sem adição de xilanase e glucanase.....69

Tabela 6. Coeficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos essenciais e não essenciais, por juvenis tilápias do Nilo alimentadas, com dietas contendo baixo ou alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos com ou sem adição de xilanase e glucanase 72

IV - Desempenho produtivo, parâmetros bioquímicos, histologia intestinal, e microbioma de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas com adição de xilanase e β glucanase.....81

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.. 85

Tabela 2. Composição analisada das dietas experimentais.....86

Tabela 3. Resumo das sequências usadas na classificação taxonômica.....90

Tabela 4. Desempenho produtivo de juvenis de tilápias alimentadas com dietas sem ou com adição de xilanase e β -glucanase aos 90 dias de experimento..... 92

Tabela 5. Composição corporal (g/kg) com base na matéria seca de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem ou com adição de xilanase e β -glucanase aos 90 dias de experimento.....	93
Tabela 6. Parâmetros bioquímicos de juvenis de tilápias alimentadas com dietas sem ou com adição de xilanase e β -glucanase após 90 dias de experimento.....	93
Tabela 7. Histologia intestinal da porção média de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas sem ou com adição de xilanase e β -glucanase	94
Tabela 8. Gêneros bacterianos que foram significativamente diferentes em relação à abundância entre os juvenis de tilápias alimentadas com dietas sem e com adição de xilanase e β -glucanase pelo teste de Welch ($P < 0,05$).....	96

LISTA DE FIGURAS

I - Revisão bibliográfica.....	2
Figura 1. Estrutura química do arabinoxilanos,.....	7
Figura 2. Estrutura primária de ligação β -D-glucano	8
Figura 3. Densidade de microvilosidades (UA) dos intestinos de tilápias do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com fitase, protease e carboidrases.....	16
Figura 4. Valores médios de bactérias amilolíticas [log CFU g ⁻¹] da porção distal do intestinal da tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i> e jundiá, <i>Rhamdia quelen</i> após 15 dias de alimentação com diferentes fontes de carboidratos..	20
III - Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de dietas contendo baixo e alto teor de arabinoxilanos e β-glucano com adição de xilanase e β-glucanase para juvenis de tilápias do Nilo.....	59
Figura 1. Energia digestível de dieta contendo baixo e alto teor de arabinoxilanos e β -glucano; B - Efeito da adição de xilanase e β -glucanase (0 ou 0,2 g/kg) na dieta a base de milho e trigo.....	69
IV - Desempenho produtivo, parâmetros bioquímicos, histologia intestinal, e microbioma de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas com adição de xilanase e β glucanase.....	81
Figura 1. Parede do intestino médio de juvenis de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentadas com dietas sem (A) e com (B) adição de xilanase e β -glucanase.....	94

Figura 2. Composição taxonômica das amostras de microbiota e juvenis de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) alimentadas com dietas sem e com adição de xilanase e β -glucanase.....	95
Figura 3. Análise de componentes principais dos gêneros de comunidades bacterianas em tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com adição de xilanase e β -glucanase.....	97
Figura 4. Diagrama de Veen que representa o “core microbiota” e número de OTUs únicos de tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com adição de xilanase e β -glucanase.....	98

RESUMO

Foram realizados três experimentos para avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e inclusão de xilanase e β -glucanase (XB) em dietas com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos (AB) para juvenis de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*. O primeiro experimento foi realizado para determinar os CDA da energia e nutrientes em peixes alimentados com dietas com baixo ou alto teor de AB, usando óxido de cromo ou celulose como indicador de digestibilidade. Os peixes ($n = 96$; peso corporal $50,0 \pm 1,2$ g) foram distribuídos em esquema fatorial 2×2 , sendo dois teor de AB (baixo ou alto) e dois indicadores de digestibilidade (óxido de cromo ou celulose). Os peixes foram alojados em oito aquários de digestibilidade e as fezes foram coletadas pelo método modificado de Guelph, durante 21 dias. Houve interação entre teor de AB e indicador sobre os CDA da matéria seca ($P = 0,002$), energia bruta ($P = 0,006$), fibra bruta ($P = 0,002$), cálcio ($P = 0,031$) e fósforo ($P = 0,044$), observando melhores resultados em peixes que foram alimentados com dieta contendo baixo teor de AB utilizando o óxido de cromo como indicador de digestibilidade. Observou-se interação entre o teor de AB e indicador nos CDA da leucina ($P = 0,001$), isoleucina ($P = 0,009$), fenilalanina ($P = 0,006$), treonina ($P = 0,031$), valina ($P = 0,011$), alanina ($P = 0,017$) e tirosina ($P = 0,038$) e os melhores CDA foram obtidos nos peixes alimentados com a dieta contendo baixo teor de AB. Conclui-se que a celulose não é recomendada como indicador para determinar os coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes, independente do teor de arabinosilanos e β -glucanos em dietas para tilápias do Nilo. O segundo estudo foi realizado com o objetivo de determinar os CDA da energia, proteína bruta, aminoácidos, lipídios totais e minerais considerando o teor de AB da dieta e a adição de XB para juvenis de tilápias do Nilo. Foram utilizados 96 juvenis de tilápias do Nilo ($n = 96$; peso corporal $60,0 \pm 1,4$ g), distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso em esquema

fatorial 2 x 2, sendo dois teor de AB (baixo ou alto), sem ou com adição de XB (0,2 g/kg). As fezes foram coletadas pelo método modificado de Guelph, durante 21 dias. Houve interação entre o teor de AB e a adição de XB sobre os CDA da matéria seca ($P = 0,007$), cálcio ($P = 0,033$) e fósforo ($P = 0,048$), com os melhores resultados em peixes alimentados com a dieta contendo baixo teor de AB. Houve efeito ($P < 0,05$) da adição de XB sobre os CDA da energia e dos nutrientes e os maiores CDA da matéria seca, energia bruta, proteína bruta, fibra bruta e cálcio foram observados nos peixes alimentados com a dieta contendo alto teor de AB e com adição de XB. Não foi observada interação sobre os CDA dos aminoácidos essenciais e não essenciais. A adição de XB influenciou os CDA da isoleucina ($P = 0,033$), fenilalanina ($P = 0,030$), treonina ($P = 0,033$) e valina ($P = 0,025$) e os maiores CDA foram observados em peixes alimentados com a dieta contendo alto teor de AB e com adição de XB. A adição de xilanase e β -glucanase melhora os coeficientes de digestibilidade aparente da energia e dos nutrientes de dietas formuladas com alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos. O terceiro estudo objetivou avaliar desempenho produtivo, histologia intestinal, parâmetros bioquímicos e microbioma de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem e com adição de XB após 90 dias de experimento. Foram utilizados cento e trinta e seis juvenis de tilápias do Nilo ($12 \pm 1,4$ g), distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso sendo dois níveis de inclusão de XB (sem ou com 0,2 g/kg), com quatro repetições por tratamento e 17 peixes por unidade experimental. Para o desempenho produtivo aos 90 dias, houve efeito no peso final ($P = 0,011$), ganho de peso ($P = 0,010$), ganho de peso diário ($P = 0,010$), consumo de ração ($P = 0,029$), conversão alimentar ($P = 0,002$), taxa de eficiência proteica ($P = 0,001$), índice hepatossomático ($P = 0,024$), taxa de gordura visceral ($P = 0,004$), comprimento absoluto do intestino (0,011) e comprimento relativo do intestino ($P = 0,003$) os melhores resultados foram obtidos em peixes alimentados com dieta com adição de XB. Observou-se efeito da adição de XB ($P < 0,05$) na altura, largura das vilosidades e maior espessura do epitélio das vilosidades quando comparados com os peixes que receberam a dieta sem adição de XB. Na análise da microbiota intestinal foram identificados 243 táxons e os mais abundantes foram os gêneros *Barnesiella*, seguido por *Bacteroides*, *Alistipes* e *Faecalibacterium*, respectivamente. Foram identificados 25 gêneros com abundância diferente ($P < 0,05$) entre peixes alimentados com a dieta com e sem adição de XB. A comparação detalhada mostrou aumento significativo dos gêneros *Barnesiella*, *Bacteroides*, *Ruminococcus torques*, *Peptoclostridium*, *Anaerofilum*, *Butyricoccus* e *Parasutterella* nos peixes alimentados com dieta com adição de XB,

comparado aos peixes alimentados com dieta sem adição de XB. Concluiu-se que a adição de xilanase e β -glucanase melhora o desempenho produtivo e a morfometria intestinal, além de modular a microbiota intestinal de juvenis de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: carboidrases, *Oreochromis niloticus*, polissacarídeos não amiláceos, trigo.

ABSTRACT

Three experiments were carried out to determine the apparent digestibility coefficients (ADC) and inclusion of xylanase and β -glucanase (XB) in diets with low or high content of arabinoxylans and β -glucans for Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus*. The first experiment was carried out to determine the energy and nutrient content of fish fed diets with low or high AB content using chromium oxide or cellulose as a digestibility marker. Fish ($n = 96$; body weight 50.0 ± 1.2 g) were distributed in a 2 x 2 factorial scheme, being two AB content (low or high) and two digestibility markers (chromium oxide or cellulose). The fish were housed in eight digestibility aquaria and the feces were collected by the modified Guelph method for 21 days. There was interaction between AB contents and indicator on dry matter ($P = 0,002$), crude energy ($P = 0,006$), crude fiber ($P = 0,001$), calcium ($P = 0,031$) and phosphorus ($P = 0,044$) levels, observing better results in fish fed diet with low AB content and chrome oxide diets as digestibility marker. There was interaction between AB content and marker in the CDA of leucine ($P = 0,001$), isoleucine ($P = 0,009$) phenylalanine ($P = 0,006$), threonine ($P = 0,031$), valine ($P = 0,011$), alanine ($P = 0,017$) and tyrosine ($P = 0,038$), the best CDA of these amino acids were obtained in fish fed with diets based with low arabinoxylans and β -glucans contents. It was concluded that cellulose is not recommended as a marker to determine the apparent energy and nutrients digestibility coefficients, regardless of the arabinoxylans and β -glucans content in Nile tilapia diets. The second study was carried out to determine the ADC of energy, crude protein, amino acid, total lipids and minerals considering the diet AB content with XB addition for Nile tilapia juveniles. Nile tilapia juveniles ($n = 96$; body weight 60.0 ± 1.4 g) were distributed in a completely randomized design in a 2 x 2 factorial scheme, being two AB contents (Low or high), with or without XB addition (0.2 g/kg). Feces were collected by the modified Guelph method for 21 days. There was interaction between AB content and the XB addition on dry matter ($P = 0.007$), calcium

($P = 0.033$) and phosphorus ($P = 0.048$), with the best results in fish fed with diet containing low AB content. There was effect ($P < 0.05$) of the XB addition on energy and nutrients ADC and the highest ADC of dry matter, crude energy, crude protein, crude fiber and calcium were observed in fish fed with diet containing high AB with XB. No interaction was observed on the ADC of essential and non-essential amino acids. The XB addition influenced the CDA of isoleucine ($P = 0.033$), phenylalanine ($P = 0.030$), threonine ($P = 0.033$) and valine ($P = 0.025$), and higher ADC were observed in fish fed diet supplemented with XB. The xylanase and β -glucanase addition improves the apparent energy and nutrients digestibility coefficients of diets formulated with high arabinoxylans and β -glucans content. The third study aimed to evaluate growth performance, intestinal histology, biochemical parameters and microbiome of Nile tilapia fed with diets without and with XB addition after 90 days of experiment. One hundred and thirty six Nile tilapia juveniles (12 ± 1.4 g) were used, distributed in a completely randomized design with two XB inclusion levels (without or with 0.2 g / kg), with four replications per treatment and 17 fish per experimental unit. It was evaluate the productive performance, intestinal histology, blood biochemical parameters and the microbiome. For growth performance at 90 days there was effect on the final weight ($P = 0.011$), weight gain ($P = 0.010$), daily gain ($P = 0.010$), feed intake ($P = 0.001$), food efficiency ($P = 0.001$), protein efficiency ($P = 0.001$), hepatosomatic index ($P = 0.024$), visceral fat ratio ($P = 0.004$) and absolute bowel length relative to the intestine ($P = 0.003$) the best results were obtained in fish fed diet supplemented with XB. The XB addition resulted in higher ($P < 0.05$) villus height, villi width and villus epithelial thickness compared to fish fed diet without XB addition. In the intestinal microbiota analysis were identified 243 taxa and the most abundant were the genera *Barnesiella*, followed by *Bacteroides*, *Alistipes* and *Faecalibacterium*, respectively. 25 genera with different abundance ($P < 0.05$) were identified among fish fed with diet with and without XB addition. The detailed comparison showed a significant increase of the genera *Barnesiella*, *Bacteroides*, *Ruminococcus torques*, *Peptoclostridium*, *Anaerofilum*, *Butyricicoccus* and *Parasutterella* in the fish fed with diet with XB addition, compared to fish fed diet without XB addition. It was concluded that the xylanase and β -glucanase addition improves the productive performance and intestinal morphometry, besides modulating the intestinal microbiota of Nile tilapia juveniles.

Key words: Carbohydrases, *Oreochromis niloticus*, non-starch polysaccharides, wheat.

I - INTRODUÇÃO GERAL

A redução na disponibilidade de pescado originado da pesca extrativista resultou no crescimento acelerado da aquicultura nos últimos 30 anos. Aproximadamente metade dos peixes para consumo humano é originado da aquicultura, sendo globalmente uma importante fonte de alimento e geração de renda (FAO, 2016). No Brasil e em muitos países tropicais, a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* é uma das espécies mais utilizadas na piscicultura brasileira, com a sua criação se expandindo, principalmente, em tanques escavados e tanques-rede (IBGE, 2016).

O milho, o trigo, a soja e os coprodutos são os principais alimentos de origem vegetal utilizados em dietas para tilápias do Nilo objetivando elaborar dietas mais econômicas e sustentáveis (Vidal et al., 2017, 2015). Esses alimentos possuem polissacarídeos não amiláceos (PNA) como a celulose, hemicelulose, arabinosilanos, β -glucanos, pectinas e ligninas que não são digeridos no trato digestório dos peixes, por causa da ausência ou produção insuficiente de enzimas endógenas específicas. Os PNA atuam negativamente na digestibilidade, desempenho produtivo e saúde dos peixes (Castillo e Gatlin III, 2015).

Os alimentos de origem vegetal possuem elevadas proporções de arabinosilanos e β -glucanos (AB), que exercem efeitos negativos sobre a digestibilidade e absorção da energia e nutrientes da dieta (Jiang et al., 2014; Kim et al., 2005; Nitrayová et al., 2009; Ogunkoya et al., 2006; Tahir et al., 2008; Vidal et al., 2015, 2004). O alto teor de AB presentes nesses alimentos limita a utilização em dietas para peixes (Kim et al., 2005; Sinha et al., 2011).

Os PNA estão presentes como parte da parede celular dos vegetais protegendo os substratos do contato com as enzimas digestivas ou como parte do conteúdo celular, e sua presença pode interferir na digestão e absorção em virtude de sua natureza química

(Nitrayová et al., 2009). Em peixes, a presença de enzimas digestivas que hidrolisam especificamente as ligações β -glicosídicas de PNA é baixa ou inexistente. Os PNA impedem a atuação das enzimas endógenas sobre os carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais (Krogdahl et al., 2010).

As enzimas exógenas são utilizadas para reduzir ou eliminar os fatores antinutricionais e aumentar o valor nutricional dos alimentos por meio da transformação de componentes complexos em compostos absorvíveis, melhorando a utilização de nutrientes e diminuindo a excreção dos nutrientes pelos peixes no ambiente (Ludke et al., 2002). Nos últimos anos, as carboidrases têm sido utilizadas em dietas para aves e suínos (Masey O'Neill et al., 2014) e para várias espécies de peixes (Adeoye et al., 2016; Jiang et al., 2014; Ogunkoya et al., 2006), inclusive tilápias do Nilo (Adeoye et al., 2016; Tachibana et al., 2010). As carboidrases são utilizadas em dietas para peixes formuladas com base em ingredientes de origem vegetal para aumentar a digestão e absorção da energia e nutrientes e reduzir a quantidade de compostos excretados pelos peixes ao meio ambiente (Castillo e Gatlin III, 2015).

Atualmente, há disponibilidade no mercado de xilanase e β -glucanase líquida produzida por fermentação a partir do fungo *Aspergillus spp.* mais resistente ao pH do trato gastrintestinal dos animais e temperatura do processamento das dietas. No entanto, existem poucos estudos que relatam a relação entre a adição de carboidrases com a modulação do microbioma e os resultados de digestibilidade e desempenho produtivo em tilápias. Assim, são necessárias pesquisas para avaliar os efeitos da adição de xilanases e β -glucanases para viabilizar sua aplicação em dietas comerciais para tilápias do Nilo. Além disso, é importante considerar a fonte energética, em função das variações nos níveis e proporções de PNA, que influenciam as respostas de digestibilidade e conseqüentemente a microbiota, histologia intestinal e o desempenho produtivo dos peixes.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Panorama da piscicultura brasileira

A demanda de pescado tem crescido nos últimos anos. Além do crescimento populacional, os consumidores têm exigido produtos mais saudáveis e seguros (Brabo et al., 2016). Tecnologias avançadas como as enzimas exógenas em dietas para peixes podem contribuir para aumentar a produção de peixes, pela melhora na digestibilidade e

aumento no aproveitamento dos nutrientes e energia dos alimentos (Castillo e Gatlin III, 2015).

O pescado é a fonte de proteína de origem animal mais produzida. A criação de peixes no Brasil poderá alcançar 960 mil toneladas em 2022, o dobro em relação as 479 mil toneladas produzidas em 2010. Em relação a 2017, a piscicultura brasileira cresceu 4,5% em 2018, com a produção de 722.560 toneladas. O consumo de carne de peixes pelos brasileiros é de 9,5 kg por habitante/ano, esse consumo é inferior à quantidade mínima recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que é de 12 kg de peixe por habitante/ano e está muito abaixo da média mundial de 20,0 kg habitante/ano (PEIXE BR, 2019).

A alimentação dos peixes em sistemas intensivos pode chegar a 80% do custo total de produção, principalmente pelo elevado custo dos alimentos de origem animal para atender as exigências nutricionais e para produzir dietas com elevada aceitabilidade pelos peixes. A participação da farinha e óleo de peixes na produção de peixes mais do que duplicou na última década, variando entre 68% e 88% respectivamente (FAO, 2016).

A farinha de peixe já foi o principal ingrediente proteico de origem animal utilizado nas dietas para os peixes, uma vez que é rica em aminoácidos, vitaminas e minerais. É um dos ingredientes mais onerosos em dietas para animais aquáticos. A elevada demanda, não somente pela indústria de alimentos para organismos aquáticos, mas também pela forte pressão da pesca sobre as espécies “forrageiras”, tem ocasionado depleção dos estoques (Naylor et al., 2000). Assim, são necessárias pesquisas com alimentos de origem vegetal para substituir a farinha de peixes ou outros alimentos de origem animal.

1.2. Tilápia do Nilo

Tilápia é um nome genérico utilizado para referenciar um grupo de ciclídeos originados do continente Africano. Deste grupo, três gêneros se destacam para aquicultura: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia* (Popma e Masser, 1999). Existem registros da criação dessa espécie em mais de 135 países, abrangendo todos os continentes, sendo criada em sistemas extensivos e intensivos com diferentes níveis tecnológicos (FAO, 2016).

A tilápia do Nilo é uma espécie que possui rápido crescimento, alimenta-se de itens básicos da cadeia trófica, apresenta boa conversão alimentar e possui carne com boas características organolépticas. É considerada uma espécie indicada para

processamento industrial para obtenção de filés sem espinhas e de grande versatilidade industrial e culinária (Furuya, 2010).

Dentre as espécies de peixes criadas no Brasil, a tilápia do Nilo destacou-se com produção de 400.280 toneladas produzidas em 2018, representando 55,4% da produção nacional, colocando o Brasil como o quarto produtor mundial, ficando atrás apenas da China, Indonésia e do Egito (PEIXE BR, 2019). A criação de tilápias no Brasil está concentrada principalmente em cinco estados, sendo o Paraná o maior produtor de tilápias no Brasil, tendo produzido, em 2018, 123.000 toneladas. São Paulo é segundo maior produtor com 69.500 toneladas, seguido de Santa Catarina, com 33.800 toneladas, Minas Gerais, com 31.500 toneladas e Bahia, com 24.600 toneladas produzidas em 2018. Juntos, esses cinco estados representam 70,5% da produção nacional de tilápias (PEIXE BR, 2019).

Com a elevada disponibilidade de alimentos de origem vegetal no Brasil, resultando em menor custo pela elevada oferta, o milho, a soja, o trigo e coprodutos têm sido amplamente empregados na elaboração de dietas para tilápias. No entanto, possuem diversos PNA que pioram a digestão e/ou absorção de nutrientes. Assim, a utilização de carboidrases é uma alternativa para melhorar o valor nutritivo das dietas, resultando em aumento no desempenho de forma ambientalmente desejável com a redução na excreção de nutrientes pelos peixes.

1.3. Polissacarídeos não amiláceos (PNA)

Os carboidratos vegetais são classificados geralmente em duas categorias: polissacarídeos de reserva como amido, e polissacarídeos estruturais, como polissacarídeos não amiláceos. O amido constitui a principal reserva de energia dos vegetais, sendo armazenado no citoplasma celular na forma de grânulos densos, semi-cristalinos e insolúveis em água. É composto por duas macromoléculas: a amilose e a amilopectina que são, respectivamente, polímeros lineares e ramificados de glicose com ligações α -glicosídicas (Voet e Voet, 2006).

Os PNA são constituídos por polímeros de monossacarídeos ou açúcares simples unidos por uma ligação específica chamada ligação glicosídica, que é formada entre o grupo hemiacetal de um açúcar e o grupo hidroxila do outro. São classificados segundo considerações estruturais e propriedades físico-químicas, como o tamanho molecular, a presença de cadeia linear ou ramificada e estão relacionados com a solubilidade em meio

aquoso (Smits e Annison, 1996). Essas características dos PNA influenciam a viscosidade e microbiota intestinal (Choct et al., 2015).

Os PNA compreendem várias classes de polissacarídeos, como a celulose, hemicelulose, pectina, quitina, entre outros. Os efeitos dos PNA na nutrição estão relacionados com a redução da digestibilidade dos nutrientes, alteração na velocidade de passagem dos alimentos pelo trato gastrintestinal, diminuição dos níveis séricos de glicose e colesterol e redução do desempenho dos animais (Bedford, 1995). É importante o conhecimento da quantidade de PNA dos alimentos pelas ações negativas sobre a digestibilidade, absorção de nutrientes e conseqüentemente o desempenho dos animais (Dourado et al., 2014).

Os ingredientes de origem vegetal mais utilizados em dietas para animais monogástricos são ricos em amido, mas contêm nutrientes não digeríveis presentes na parede celular, como os PNA, os oligossacarídeos e outros não carboidratos (glicoproteínas, ésteres fenólicos, lignina). Os PNA dificultam a ação das enzimas hidrolíticas no trato digestório dos animais (Oliveira et al., 2007) e possuem elevada capacidade de retenção de água, podendo afetar a viscosidade da digesta em peixes. A alta viscosidade retarda o esvaziamento gástrico e o tempo de trânsito alimentar, diminui a ação das enzimas intestinais com as macromoléculas alimentares, resultando em menor disponibilidade de nutrientes. Os PNA também alteram a microbiota intestinal, o que pode ser benéfico ou prejudicial para os peixes (Sinha et al., 2011). Diversos cereais e leguminosas, utilizados em dietas para peixes, possuem elevados teores de PNA (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios de polissacarídeos não amiláceos (PNA) (g/kg de matéria seca) de alguns ingredientes utilizados em dietas para peixes.

Ingredientes	Celulose	Lignina	PNA solúvel	PNA insolúvel
Milho	22	11	9	66
Farelo de soja	62	16	63	92
Trigo	20	19	25	74
Farelo de trigo	72	75	29	273
Centeio	16	21	42	94
Cevada com casca	43	35	56	88
Cevada sem casca	10	9	50	64
Glúten de milho	75	---	34	242
Aveia com casca	82	66	40	110
Aveia sem casca	14	32	54	49
Ervilhas	53	12	52	76
Farinha de colza	52	134	55	123
Lupin	131	---	134	139

Adaptado de Sinha et al. (2011).

1.4. Arabinoxilanos e β -glucanos

As estruturas de arabinoxilanos de cereais são compostas predominantemente de duas pentoses, arabinose e xilose (Izydorczyk e Biliaderi, 1995). Sua estrutura molecular consiste em um esqueleto linear de unidades de xilose (β -1-4) cujos os constituintes estão ligados através de átomos O-2 e O-3 dos resíduos de xilosil (Perlin, 1951) (Figura 1). Os arabinoxilanos formam soluções aquosas com elevado nível de viscosidade (Sinha et al., 2011).

Os arabinoxilanos, que são constituídos de arabinoses e xiloses são os principais PNA presentes no milho. O teor de PNA totais do milho varia de 8,10% a 9,32% e a quantidade de arabinoxilanos é de 5,35% (Malathi e Devegowda, 2001; Tavernari et al., 2008). Na soja, os principais PNA encontrados são celulose (5,15%), pectinas (6,16%) e arabinoxilanos (4,21%) (Malathi e Devegowda, 2001). O trigo apresenta elevada quantidade de PNA que compreende de 8,3 e 9,8% (Henry, 1987). Os principais PNA do farelo de trigo são arabinoxilanos (36,5%) e celulose (11%), que causam impactos negativos na digestão dos nutrientes (Maes et al., 2004).

Os PNA presentes no farelo de trigo e no milho interferem negativamente na disponibilidade de aminoácidos (Silva et al., 2000). A interferência na biodisponibilidade dos aminoácidos é causada pela alta viscosidade provocada pelos arabinoxilanos que interferem na digestão e absorção, aumento da secreção de proteínas endógenas, derivadas do intestino, e pela perda de células intestinais (Bedford e Apajalahti, 2001). Dietas à base de trigo possuem alto teor de arabinoxilanos e prejudicam a digestibilidade da energia e dos nutrientes de peixes alimentados com essas dietas (Englyst, 1989).

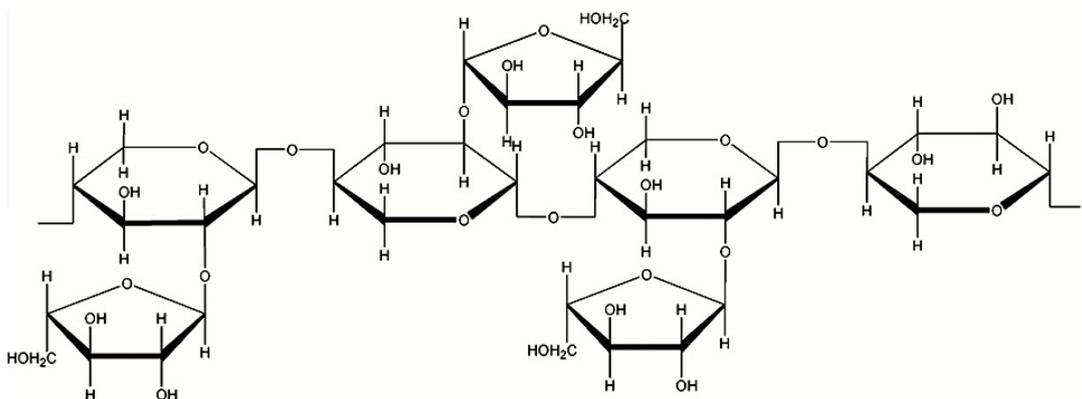


Figura 1. Estrutura química do arabinoxilanos. Adaptado de: Sinha et al. (2011).

Os β -glucanos, presentes nos cereais, estão localizados na parede celular subaleurônica e endospermica, que se associam com microfibrilas de celulose durante o crescimento celular (Ebringerová, 2006). Quando as dietas são formuladas com base em cereais, as características estruturais dos β -glucanos exercem efeitos sobre as respostas fisiológicas dos animais. Essas características incluem proporções de ligações que unem unidades de glicose, presença e quantidade de fragmentos longos e tamanho molecular semelhantes à celulose (Izydorczyk e Biliaderis, 2000). Em geral, os β -glucanos consistem em uma cadeia linear de unidades de glicose unidas por ligações (β -1-3) e (β -1-4), as quais rompem a linearidade da molécula impedindo a formação de fibrilas (Bengtsson et al., 1990) (Figura 2).

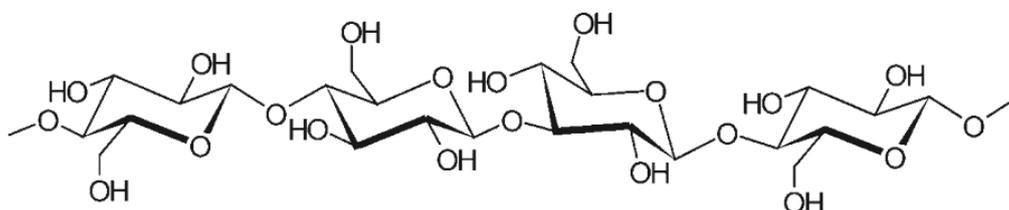


Figura 2. Estrutura primária de ligação β -D-glucano. Adaptado de: Ebringerová (2006).

1.5. Enzimas exógenas nas dietas para peixes

Os carboidratos são a classe mais abundante de nutrientes que produzem energia, sendo economicamente desejável em dietas para peixes. No entanto, a capacidade dos peixes para usar energia dos carboidratos difere de acordo com o hábito alimentar e características anatômicas e fisiológicas (Kamalam et al., 2017). Os carboidratos são boas fontes de energia, mas não são essenciais e os peixes podem sintetizar eficientemente a glicose a partir de precursores não carboidratos como o lactato, piruvato e aminoácidos (NRC, 2011).

As dietas para peixes onívoros, como as tilápias, são formuladas com níveis elevados de ingredientes de origem vegetal, necessitando de estratégias para maximizar a digestão e absorção de nutrientes, como a utilização de enzimas exógenas. As enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que atuam como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações químicas no organismo. São altamente específicas para os substratos atuam em meio favorável de temperatura, pH e umidade (Champe e Harvey, 1989).

As carboidrases incluem todas as enzimas que catalisam e promovem a redução do peso molecular dos polímeros de carboidratos. As principais carboidrases são as xilanases e glucanases, as quais representam mais de 80% das carboidrases comercializadas globalmente, mas, destacam-se também a α -amilase, β -mananase, galactosidase e pectinase (Castillo e Gatlin III, 2015). As carboidrases hidrolisam os polímeros de carboidratos para gerar oligossacarídeos ou polissacarídeos de peso molecular menor (Adeola e Cowieson, 2011). A adição de carboidrases aumenta a digestibilidade de nutrientes que produzem energia, como o amido, uma vez que os PNA reduzem a capacidade de digestão de nutrientes reduzindo a acessibilidade das enzimas aos substratos (Adeola e Bedford, 2004).

Fatores como composição e processamento da dieta, forma de adição das enzimas, idade e espécie afetam a atuação das enzimas em animais monogástricos (Dourado et al., 2014). As tentativas de melhorar a digestibilidade da energia e nutrientes dos vegetais incluem o uso de tratamentos hidrotermais como a extrusão, bem como fermentação, para reduzir o conteúdo de fatores antinutricionais e aumentar a concentração de proteína (Castillo e Gatlin III, 2015).

Ainda que a extrusão melhore a digestibilidade da proteína e energia de muitas plantas, a digestibilidade de muitos ingredientes permanece baixa pela falta ou ausência de enzimas necessárias para rompimento da complexa estrutura da parede celular que encapsula os nutrientes. Assim, as enzimas exógenas estão sendo utilizadas para maximizar a disponibilidade dos nutrientes e energia presentes nos grãos de cereais e leguminosas, considerando também as particularidades da espécie e os fatores físicos e químicos aplicados durante o processamento dos alimentos (Glencross et al., 2012).

As enzimas exógenas são utilizadas para incluir no trato digestório dos animais enzimas que os animais não conseguem sintetizar (Brito et al., 2006). As β -glucanases, xilanases, pentosanas e α -galactosidases influenciam na ingestão e digestão e absorção da energia e nutrientes (Castillo e Gatlin III, 2015).

As enzimas devem ser resistentes à inativação por calor, baixo pH e enzimas proteolíticas, possuir segurança toxicológica e baixo custo de produção. Além disso, não devem interagir com a matriz do alimento (Bedford, 1995). As enzimas exógenas são usadas na elaboração de dietas pela adição direta durante a mistura dos ingredientes, por incorporação pela indústria em pré-misturas ou por pulverização após a extrusão e secagem das dietas (Dourado et al., 2014). A enzima líquida para adição “*on-top*”, via pulverização, em água constitui grande vantagem em dietas extrusadas para organismos

aquáticos, considerando a garantia da concentração residual das enzimas após o processamento (Castillo e Gatlin III, 2015).

As enzimas exógenas adicionadas às dietas visam remover ou hidrolisar fatores antinutricionais como os PNA, presentes em ingredientes como a cevada, o trigo, a aveia e o triticale (Pucci et al., 2003). As enzimas comerciais são elaboradas para alimentos com baixa quantidade de PNA como o milho, o sorgo e a soja e alimentos com elevados teores de PNA como trigo, arroz, cevada e aveia.

O uso de enzimas inadequadas ou em concentrações excessivas pode causar perda de material endógeno, por causa da interação direta com o trato gastrintestinal, resultando na diminuição da capacidade de absorção de nutrientes no trato digestório dos peixes, pela lesão dos enterócitos, vilosidades e ou outras estruturas relacionadas à absorção de nutrientes (Cowieson et al., 2006). A capacidade dos peixes de utilizar os nutrientes ingeridos depende da presença de enzimas em locais apropriados da parede e ao longo do lúmen do trato digestório (Tengjaroenkul et al., 2000).

As xilanases são glicosidases responsáveis, principalmente, pela hidrólise das ligações β -1,4 presentes no xilano vegetal, que são componentes da hemicelulose. A hemicelulose é formada por vários polímeros, principalmente de xilano. Esses polímeros são formados por resíduos de açúcares e a sua degradação completa necessita da ação de um complexo de enzimas microbianas específicas para atuar em diferentes ligações, sendo a xilanase a enzima principal na despolimerização do xilano (Coughlan e Hazlewood, 1993). A produção comercial das xilanases se concentra principalmente nos fungos *Trichoderma sp.* e *Aspergillus spp.* (Kulkarni e Abhay Shendye, 1999).

As glucanases atuam hidrolisando principalmente os β -glucanos em polímeros menores, diminuindo a viscosidade da digesta, permitindo a ação das enzimas endógenas e a fermentação dos carboidratos pela microbiota, aumentando a digestibilidade dos nutrientes (Choct, 1997; Cosson et al., 1999). Comercialmente, as glucanases são obtidas a partir de microrganismos geneticamente modificados, incluindo *Aspergillus spp.*, *Bacillus sp.* e *Trichoderma sp.* (Yin et al., 2000). O uso de β -glucanase aumenta a digestibilidade das proteínas, lipídeos e amido ligados na parede celular das células (Chesson, 1993). As principais enzimas exógenas utilizadas em dietas de animais não ruminantes são descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Principais enzimas utilizadas em dietas de animais não ruminantes.

Enzima	Modo de ação	Dieta e/ou alimentos	Benefícios esperados
β -glucanase	Degradação de β glucanos a oligossacarídeos	Dietas à base de aveia, cevada, trigo e arroz	Redução da viscosidade intestinal e melhora a utilização dos nutrientes
Xilanases	Degrada arabinosilanos a produtos de menor peso molecular e açúcares	Dietas à base de aveia, soja, trigo, milho, cevada e arroz	Melhora a utilização dos nutrientes e reduz a excreção de água
Amilases	Degrada o amido à dextrina e açúcares	Dietas ricas em amido	Maximiza a disponibilidade da glicose
Celulases	Degrada celulose a produtos de menor peso molecular e açúcares	Dietas ricas em fibras, farelo de trigo e cevada	Eleva a disponibilidade de energia, devido ao aproveitamento do conteúdo
Galactosidases	Degrada oligossacarídeos e fatores antinutricionais	Oleaginosas e leguminosas	Melhora a disponibilidade de energia e diminui a viscosidade
Fitase	Degrada as ligações do fitato com íons divalentes (fosforo e a molécula de inositol)	Cereais e oleaginosas	Minimiza a inclusão de fósforo inorgânico na dieta
Proteases	Degrada proteínas à peptídeos e aminoácidos	Dietas com oleaginosas	Eleva a disponibilidade de aminoácidos e reduz a excreção de nitrogênio
Lipases	Degrada lipídeos à ácidos graxos e monoacilglicerol	Dietas ricas em óleos vegetal e animal	Melhora a digestibilidade de gorduras

Adaptado de Thorpe e Beal (2001).

1.6. Carboidrases em dietas para peixes

A determinação da digestibilidade da energia e nutrientes de um alimento é importante para avaliar o potencial de inclusão em dietas para peixes (Pezzato et al., 2002). A utilização de enzimas exógenas também influencia a digestão e absorção da energia e nutrientes (Adeoye et al., 2016; Castillo e Gatlin III, 2015; Maas et al., 2018; Zhou et al., 2013) e, conseqüentemente, o desempenho produtivo dos peixes (Dimitroglou et al., 2010; Jiang et al., 2014; Maas et al., 2018; Owusu-Asiedu et al., 2010; Tachibana et al., 2010).

A inclusão de carboidrases em dietas de peixes aumenta a retenção de proteínas e lipídios, além de minimizar a excreção de resíduos nitrogenados para o meio ambiente (Kim et al., 2005; Nitrayová et al., 2009; Tachibana et al., 2010). As carboidrases aumentam os coeficientes de digestibilidade aparente de matéria seca, proteína bruta e lipídeos de dietas à base de ingredientes de origem vegetal (Ogunkoya et al., 2006). Além disso, as carboidrases auxiliam na utilização da proteína, aumentando o acesso das proteases digestivas (Tahir et al., 2008). As endo-glucanases reduzem o efeito antinutricional dos glucanos, diminuindo a viscosidade da dieta e aumentando a disponibilidade de polissacarídeos e açúcares (Bedford e Apajalahti, 2001).

Para maximizar a lucratividade da produção, é muito importante que os valores de energia dos alimentos sejam estimados com precisão para formulação de dietas de custo mínimo e atendendo à exigência energética dos animais (Tavernari et al., 2014). O aproveitamento dos nutrientes dos ingredientes de origem vegetal pelos peixes é variável conforme o hábito alimentar das espécies, fase de vida, forma de processamento, níveis de inclusão, utilização de enzimas exógenas e quantidade de fatores antinutricionais presentes nesses alimentos (Pezzato et al., 2017).

A adição de xilanase em dietas para tilápias do Nilo, melhora a disponibilidade da energia e dos nutrientes da dieta e aumenta o crescimento (Maas et al., 2018). A combinação de xilanase e amilase também aumenta consumo, melhora a conversão alimentar e desempenho produtivo de juvenis de tilápias do Nilo (Khalafalla, 2016).

A utilização de enzimas exógenas que atuam sobre os PNA é uma alternativa para aumentar a digestibilidade da energia e dos nutrientes, desempenho produtivo dos peixes e elevar a rentabilidade da criação de forma ambientalmente sustentável. Na Tabela 3, encontram-se os resultados de pesquisas com enzimas exógenas em dietas à base de ingredientes de origem vegetal para peixes.

Tabela 3. Resultados de trabalhos utilizando enzimas exógenas nas dietas para peixes.

Espécie	Fase de vida	Alimento	Enzima	Resultado	Referência
Tilápias do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	Juvenil	Milho, trigo, soja, DDGs de trigo,	Fitase e xilanase	Melhora a disponibilidade da energia e dos nutrientes da dieta, melhorando o desempenho de crescimento dos peixes.	(Maas et al., 2018)
Tilápias do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	Juvenil	Soja, milho e glúten de trigo	Fitase	Melhora retenção de fósforo na carcaça.	Cerozi e Fitzsimmons, 2017)
Tilápias do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	Juvenil	Soja, milho e glúten de milho	Fitase e protease	Aumenta a disponibilidade da energia e nutrientes de dieta à base de proteína vegetal para tilápias do Nilo.	(Novelli et al., 2017)
Tilápias do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	Juvenil	Farinha de peixe, farelo de soja, farelo de arroz e trigo	Fitase, xilanase, protease, β -glucanase, celulase e amilase	Melhora a disponibilidade da energia e nutrientes de dietas enriquecida com proteína vegetal.	(Eleraky et al., 2016)
Tilápias do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	Alevino	Farelo de soja, milho e farelo de arroz	Xilanase e amilase	Melhora o desempenho produtivo e consumo de ração de juvenis de tilápias do Nilo.	(Khalafalla, 2016)
Tilápias do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	Juvenil	Soja e amido de milho	Fitase, protease e carboidrase	Melhora o desempenho produtivo e modula a microbiota intestinal dos peixes.	(Adeoye et al., 2016)
Carpa, <i>Cyprinus carpio</i> var. Jia	Juvenil	Farinha de peixe, trigo e farinha de soja	Xilanase	A adição de xilanase na dieta melhora o desempenho de crescimento e atividades das enzimáticas intestinais.	(Jiang et al., 2014)

Continuação

Esturjão-branco, <i>Huso Huso</i>	Alevino	Milho e soja	Fitase, lipase, xilanase, protease, β -glucanase, α -amilase, pentosanase, hemicelulase, celulase e pectinase	Maior ganho de peso e taxa de crescimento específico e melhorou significativamente o índice de conversão alimentar.	(Ghomi et al., 2012)
Truta-arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Juvenil	Soja, girassol e colza	Xilanase β -glucanase e protease	Efeito moderado nos tratamentos de girassol e colza, enquanto que a β -glucanase e a protease melhoraram a digestibilidade aparente de todos os nutrientes da dieta com soja.	(Dalsgaard et al., 2012)
Tilápias do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	Juvenil	Triticale, amido de milho, albumina e gelatina	Xilanase e β -glucanase	Aumentam a disponibilidade de energia e nutrientes melhorando a conversão alimentar e maximizando o desempenho produtivo dos peixes.	(Tachibana et al., 2010)
Tilápias do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	Juvenil	Milho, farelo de soja	Celulase, protease e amilase	Melhora a digestibilidade aparente de matéria seca, proteína bruta, energia bruta, amido, cálcio e fósforo.	(Oliveira et al., 2007)
Truta-arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Juvenil	Farelo de soja	Xilanase, amilase, celulase, protease e β -glucanase	Efeito positivo sobre os coeficientes de digestibilidade aparente de MS, PB, lipídeo, fósforo e energia.	(Ogunkoya et al., 2006)
Rohu, <i>Labeo rohita</i>	Juvenil	Milho gelatinizado e não gelatinizado	Amilase, b-glucanases e b-xilanases	Aumenta a digestibilidade energética e a disponibilidade de glicose, galactose e xilose.	(Kumar et al., 2006)

1.7. Histologia intestinal

A avaliação de ingredientes alternativos na alimentação animal depende, primeiramente, das respostas de desempenho produtivo dos animais (Bengtson, 1993). Os efeitos sobre o desempenho produtivo dos peixes estão relacionados às diferenças interespecíficas, das características do trato digestório e com a capacidade dos peixes de digerir e assimilar os nutrientes (Honorato e Cruz, 2011). Essas características são de grande importância para o desenvolvimento dos peixes e dependem da estrutura do epitélio e das vilosidades intestinais, do perfil enzimático de seu canal alimentar e de sua capacidade adaptativa (Kuperman e Kuz'Mina, 1994).

A mucosa intestinal de peixes teleósteos possui inúmeras projeções denominadas vilosidades, sem criptas na base e que possuem células indiferenciadas, que sofrem sucessivas mitoses para formação das células epiteliais das micro vilosidades (Jobling, 1995). As regiões das pregas, vilosidades e micro vilosidades aumentam consideravelmente a superfície de revestimento intestinal e estão envolvidas nos processos absorptivos devido ao aumento da área efetiva para absorção de nutrientes (Takashima e Hibiya, 1995). O estudo da morfologia intestinal é de grande relevância, pois está relacionado com as diferentes adaptações do trato digestório em função da dieta ofertada (Domeneghini et al., 2005; Liquori et al., 2007).

Estudos que avaliam a mucosa intestinal dos peixes são de grande valia para fornecer informações para área de nutrição, de forma a possibilitar o atendimento das exigências nutricionais para adequando desempenho produtivo e saúde dos peixes (Silva et al., 2010). A parede do intestino delgado dos peixes geralmente é constituída por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Genten et al., 2011).

A avaliação das vilosidades do intestino de tilápias é importante para explicar os resultados de digestibilidade e desempenho produtivo em peixes alimentados com dietas suplementadas com carboidrases. No entanto, ainda não existem pesquisas que relatem a histologia intestinal de tilápias alimentadas com dietas contendo alimentos comumente utilizados na formulação de rações comerciais para tilápias no Brasil com diferentes níveis e proporções de arabinosídeos e β -glucanos suplementadas com xilanase e β -glucanase.

Verifica-se aumento da densidade das micro vilosidades intestinal de tilápias do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com carboidrases (Figura 4). Esses resultados

estão relacionados com a utilização dos nutrientes resultando em maior desempenho dos peixes (Adeoye et al., 2016).

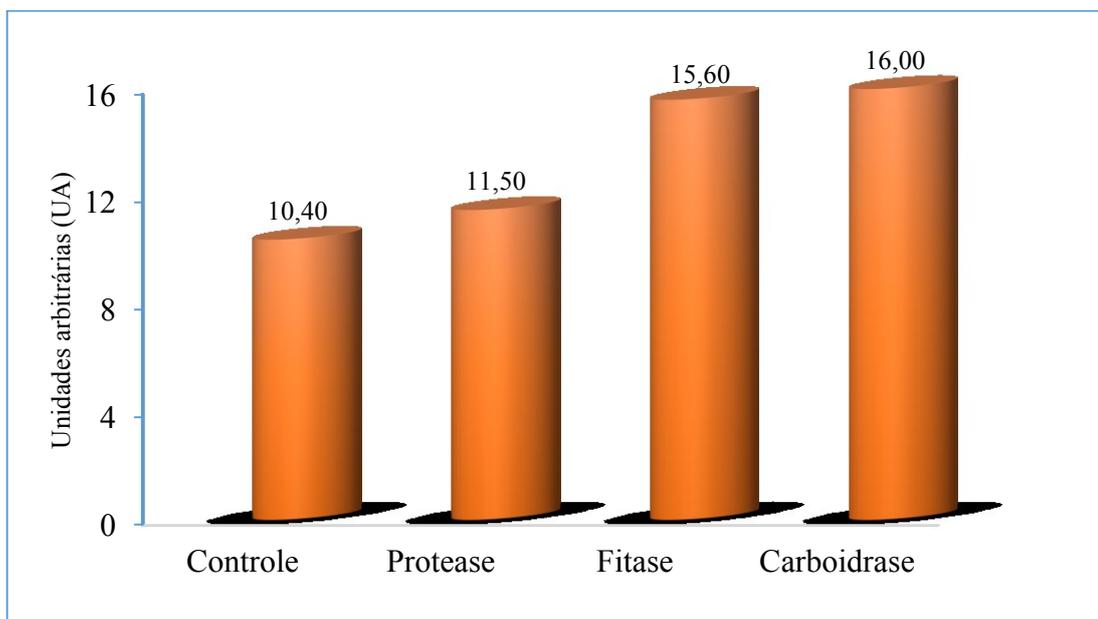


Figura 3. Densidade de microvilosidades (UA) dos intestinos de tilápias do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com fitase, protease e carboidrases: Adaptado de Adeoye et al. (2016).

1.8. Microbioma na nutrição de peixes

A avaliação dos valores nutricionais dos alimentos alternativos é relevante uma vez que a indústria busca alternativas para substituir de forma parcial ou total os alimentos tradicionais como a farinha de peixe (Hardy, 2010). Há grande interesse em caracterizar a microbiota de espécies de peixes, uma vez que a composição da dieta influencia a microbiota (Bruce et al., 2018).

A microbiota intestinal contribui para a digestão e pode afetar a nutrição, o crescimento, a reprodução e a saúde dos peixes (Mahdi et al., 2015). Os avanços recentes na tecnologias de sequenciamento de DNA e análise de bioinformática permitem a realização de estudos detalhados das comunidades microbianas associadas aos vários habitats, incluindo a microbiota intestinal de peixes (Mahdi et al., 2015).

As tecnologias de sequenciamento permitem monitorar e quantificar o microbioma de um grupo de peixes ao longo do tempo em uma região específica ou globalmente em diferentes locais. Entretanto, os métodos que dependem da análise DNA genômico podem não ser suficientes para caracterizar o efeito da dieta sobre a atividade de bactérias no intestino (Gatesoupe et al., 2018). Outras técnicas estão sendo utilizadas

para estudar à microbioma dos peixes como a transcrição reversa de amostras de RNA antes de analisar o produto de PCR por eletroforese em gel (Navarrete et al., 2012), a pirosequenciação de produtos de RT-PCR (Gatesoupe et al., 2016), ressonância magnética nuclear (NMR) para analisar as alterações metabólicas decorrentes da composição da dieta em várias espécies de peixes (Mannina et al., 2008). Essas abordagens foram implementadas para correlacionar os metabólitos fecais com a microbiota intestinal em peixes (Asakura et al., 2014).

A população microbiana de um peixe difere dependendo dos seus hábitos alimentares e essas populações também podem ser influenciadas por ingredientes dietéticos (Pedrotti et al., 2015). Os carboidratos fermentáveis são os componentes da dieta mais efetivos para favorecer a proliferação de espécies bacterianas benéficas (Bauer et al., 2006). Outros fatores que alteram a microbiota intestinal dos peixes são os relacionados com a genética (Navarrete et al., 2012); estresse (Olsen et al., 2002) e fatores ambientais, como a temperatura (Lea et al., 1997).

A microbiota intestinal exerce funções importantes na modulação do sistema imunológico, na proliferação do epitélio intestinal e na regulação do consumo. A compreensão dos fatores que influenciam a formação dessas comunidades microbianas é importante para melhor compreensão dos efeitos nutricionais, mas ainda requer investigação básica para melhores entendimentos da relação entre a dieta e os efeitos sobre a microbiota (Li et al., 2015). A microbiota do trato gastrointestinal dos peixes influencia a fisiologia e metabolismo dos nutrientes (Bauer et al., 2006).

Compreender os fatores que influenciam a formação da comunidade microbiana no trato digestório do hospedeiro é importante para modular a população microbiana do intestino e para entender as respostas de desempenho produtivo dos peixes (Wu et al., 2012). A melhor compreensão de como a microbiota intestinal interage com a saúde dos peixes também é uma ferramenta para desenvolvimento sustentável da aquicultura (Gatesoupe et al., 2016). Na Tabela 4, encontram-se informações dos efeitos da dieta sobre a microbiota intestinal de diferentes espécies de peixes.

Tabela 4. Efeitos da dieta sobre a microbiota intestinal de diferentes espécies de peixes.

Espécies	Amostra	Dieta	Principais resultados	Referência
Truta arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Massa visceral	Dietas com diferentes níveis de ingredientes à base de farinha de peixe e vegetais (44% de proteína bruta).	A atividade relativa de algumas bactérias foi particularmente influenciada pela dieta, e as mudanças mais importantes dizem respeito a algumas <i>Proteobactérias</i> e <i>Firmicutes</i> . A dieta influenciou a quantidade de bactéria <i>Cetobacterium sp.</i>	(Gatesoupe et al., 2018)
Truta arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Amostras fecais do intestino	Inclusão de ingredientes processados à base de farelo de soja (44% de proteína bruta).	A incorporação de proteínas processadas à base de soja altera a posição da comunidade microbiana dentro do intestino distal e modula as concentrações de lisozima dentro dos tecidos intestinais distais.	(Bruce et al., 2018)
Salmão do Atlântico, <i>Salmo salar</i>	Digesta e mucosa intestinal	Substituição da farinha de peixes por alimentos alternativos (farinha de aves, farelo de soja e glúten de trigo, concentrado de proteína de soja e farinha de aves farinha de guar e glúten de trigo).	A riqueza microbiana foi maior na digesta do que na mucosa. As comunidades bacterianas associadas à digesta foram mais afetadas pela dieta do que a microbiota associada à mucosa. As dietas à base de leguminosas apresentaram alta abundância relativa de bactérias do ácido lático, além disso, o estudo identificou grupos bacterianos associados com disfunção intestinal induzida por dieta que podem ser utilizados como marcadores microbianos do estado de saúde intestinal em peixes.	(Gajardo et al., 2017)
Robalo, <i>Dicentrarchus labrax</i>	Mucosa intestinal	Dieta à base de farinha e coprodutos de peixes (diferentes níveis 42-53% de proteína bruta)	No robalo, as características microbiológicas do intestino e as características fisiológicas dos indivíduos estão ligadas entre si, interferindo no perfil nutricional, e resultando em alta variabilidade entre a microbiota individual.	(Gatesoupe et al., 2016)
Carpa capim, <i>Ctenopharyngodon idellus</i> , Carpa cruciana, <i>Carassius</i>	Conteúdo intestinal	Ração comercial (30% de proteína bruta).	As comunidades microbianas das três espécies de carpas foram dominadas por <i>Fusobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Proteobacteria</i> e <i>Bacteroidetes</i> , mas a	(Li et al., 2015)

Continuação

cuvieri e Carpa cabeçuda,
Hypophthalmichthys nobilis

Jundiá, *Rhamdia quelen*, e
tilápia do Nilo, *Oreochromis*
niloticus

Porções da região
proximal, mediana e
distal do intestino

Diferentes tipos de fontes de
carboidratos (42% de proteína
bruta).

abundância de cada filo foi significativamente
diferente entre as espécies.

Uma *Cetobacterium* spp. foi detectado em jundiás
alimentados com dietas contendo arroz quebrado e
bagaço de mandioca e em tilápia alimentada com
dextrina, arroz quebrado e milho moído. A presença
dessas espécies bacterianas também foi influenciada
pelas fontes de carboidratos na dieta.

(Pedrotti et al.,
2015)

Carpa capim,
Ctenopharyngodon idellus

Digesta e mucosa
intestinal

Ração comercial (32 % de
proteína bruta).

Os resultados mostram que a microbiota intestinal de
peixes abriga muitas bactérias que degradam a
celulose, incluindo sequências relacionadas a
Anoxybacillus, *Leuconostoc*, *Clostridium*,
Actinomyces e *Citrobacter*. As unidades
taxonômicas operacionais bacterianas (UTOs) mais
abundantes no conteúdo intestinal de Carpa capim
são aquelas relacionadas à digestão de alimentos. A
alimentação também exerce influência significativa
na composição da microbiota intestinal.

(Wu et al., 2012)

Tilápia híbrida vermelha,
Oreochromis mossambicus ×
Oreochromis macrochir

Porções das regiões
do estômago,
intestino anterior e
intestino posterior

Dieta comercial (44% de
proteína bruta)

O número médio de bactérias no estômago foi menor
do que no intestino anterior e posterior, que não
foram significativamente diferentes. A abundância
relativa de *Vibrio* spp. foi negativamente
correlacionado com o de *Flavobacterium*, que pode
ter refletido a competição entre espécies patogênicas
e não-patogênicas.

(Lea, M et al.,
1997)

Na microbiota intestinal dos peixes existem vários tipos de bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias obrigatórias, que contribuem para o desenvolvimento do hospedeiro, metabolismo, imunidade e resistência as doenças, essas comunidades microbianas fornecem uma fonte potencial de diversas enzimas exógenas e podem produzir enzimas digestivas extracelulares (Bairagi et al., 2002; Nayak, 2010; Rawls et al., 2004; Saha et al., 2006). Os peixes possuem uma microbiota intestinal distinta em comparação com o ambiente externo e as bactérias no intestino são geralmente aquelas provenientes do ambiente ou da dieta (Ringo et al., 2006).

Na Figura 4, mostram-se os valores médios de bactérias amilolíticas da porção distal do intestino da tilápia (*Oreochromis niloticus*) e jundiá (*Rhamdia quelen*) após 15 dias de alimentação com diferentes fontes de carboidratos (Pedrotti et al., 2015).

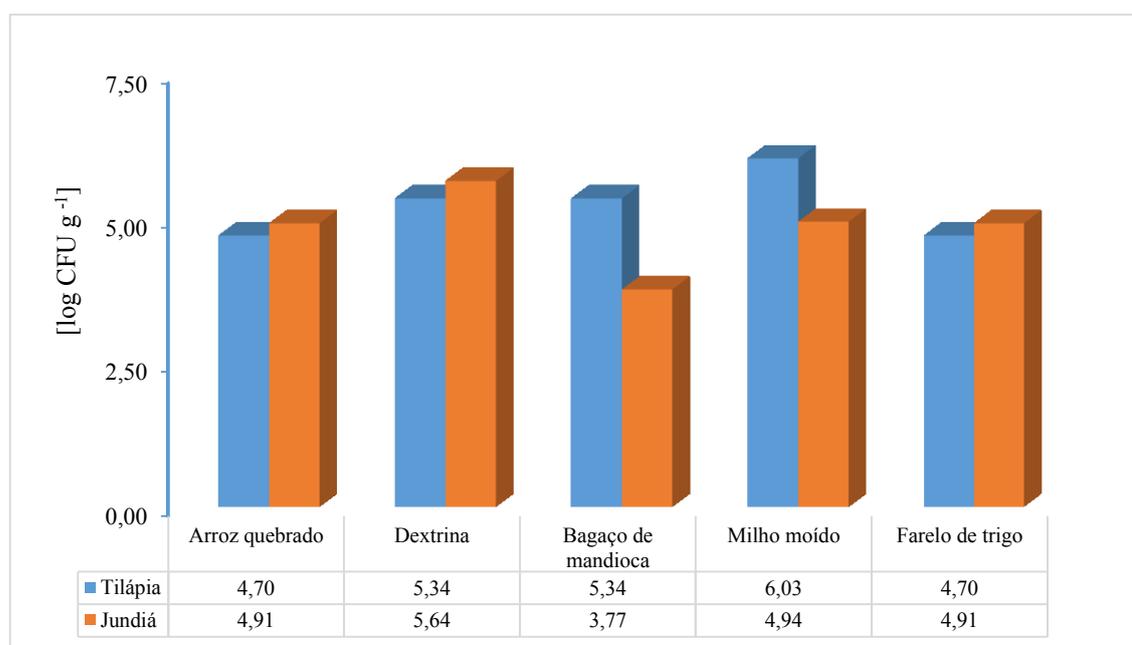


Figura 4. Valores médios de bactérias amilolíticas [log CFU g⁻¹] da porção distal do intestino da tilápia, *Oreochromis niloticus* e jundiá, *Rhamdia quelen* após 15 dias de alimentação com diferentes fontes de carboidratos. Adaptado de: Pedrotti et al. (2015).

A microbiota intestinal também abriga patógenos bacterianos oportunistas (Roeselers et al., 2011). A microbiota intestinal pode influenciar a imunidade, o desenvolvimento e as funções do trato gastrintestinal, podendo sofrer influência do ambiente, do tempo que a digesta fica dentro do sistema digestório e metabolismos associados com as fases de vida dos peixes (Vatsos, 2017). Além disso, o desenvolvimento do sistema imunológico, a produção de anticorpos e a resistência ao

estresse dos peixes podem ser impactados pela microbiota, embora mecanismos específicos ainda exijam caracterização e permanecem desconhecidos (Kelly e Salinas, 2017).

Ainda existem poucas informações sobre as associações entre a alimentação de origem vegetal e as comunidades microbianas no trato digestivo de animais aquáticos (Bruce et al., 2018; Gajardo et al., 2017; Wu et al., 2012). Assim, fica evidenciado a importância de estudos da microbiota intestinal de tilápias do Nilo alimentadas com alimentos contendo altos teores de PNA e suplementadas com carboidratos, visando nortear os estudos de nutrição com intuito de melhorar o valor nutritivo e atender as exigências nutricionais dos peixes com maior retorno econômico e foco em dietas mais sustentáveis ambientalmente.

1.9. Referências

- Adeola, O., Bedford, M.R., 2004. Exogenous dietary xylanase ameliorates viscosity-induced anti-nutritional effects in wheat-based diets for White Pekin ducks (*Anas platyrinchos domesticus*). *British Journal of Nutrition* 92, 87. <https://doi.org/10.1079/BJN20041180>
- Adeola, O., Cowieson, A.J., 2011. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *Journal of Animal Science* 89, 3189–3218. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3715>
- Adeoye, A.A., Jaramillo-Torres, A., Fox, S.W., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2016. 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. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.002>
- Associação Brasileira da piscicultura - PEIXE BR., 2019.
- Asakura, T., Kenji, S., Seiji Y., Yasuhiro, D., Jun, K., 2014. Noninvasive analysis of metabolic changes following nutrient input into diverse fish species, as investigated by metabolic and microbial profiling approaches.
- Bairagi, A., Ghosh, K.S., Kumar, S., Ray, A.K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish. *Aquaculture International* 10: 10, 109–121.
- Bauer, E., Williams, B.A., Smidt, H., Mosenthin, R., Verstegen, M.W.A., 2006. Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. *Nutrition Research Reviews* 19, 63. <https://doi.org/10.1079/NRR2006123>
- Bedford, 1995. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology* 53, 145–155. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)02018-U](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)02018-U)
- Bedford, M.R., Apajalahti, J., 2001. Implications of Diet and Enzyme Supplementation on the Microflora of the Intestinal Tract. In *advances in nutritional technology Proceedings of the 1st. World Feed conference* 197–206.
- Bedford, M.R., Cowieson, A.J., 2012. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Animal Feed Science and Technology* 173, 76–85.
- Bengtson, D.A., 1993. A Comprehensive Program for the Evaluation of Artificial Diets. *Journal of the World Aquaculture Society* 24, 285–293.
- Bengtsson, S., Aman, P., Graham, H., Newman, C.W., Newmanb, R.K., 1990. Chemical

- Studies on Mixed-Linked P-Glucans in Hull- Less Barley Cultivars Giving Different Hypocholesterolaemic Responses in Chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 435–445.
- Brabo, M.F., Pereira, L.F.S., Santana, J.V.M., Campelo, D.A. V., Veras, G.C., 2016. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura Current scenario of fish production in the world, Brazil and Pará State: emphasis on. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources* 4, 50–58. <https://doi.org/10.2312/ActaFish.2016.4.2.50-58>
- Brito, C.O., Fernando, L., Albino, T., Rostagno, H.S., Gomes, C., Cristine, D., Carvalho, O., Corassa, A., 2006. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada : valores energéticos e digestibilidade de nutrientes em pintos de corte 1 Effects of feeding multienzymatic complex addition and different extruded soyb. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35, 1047–1055.
- Bruce, T.J., Neiger, R.D., Brown, M.L., 2018. Gut histology, immunology and the intestinal microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed process variants of soybean meal. *Aquaculture Research* 49, 492–504. <https://doi.org/10.1111/are.13480>
- Castillo, S., Gatlin, D.M., 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture* 435, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.011>
- Cerozi, B.S., Fitzsimmons, K. Effect of dietary phytase on phosphorus use efficiency and dynamics in aquaponics. 2017. *Aquaculture International* 25, 3, 1227-1238.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., 1989. Enzimas. In: *Bioquímica Ilustrada*, 2 ed. São Paulo, Artes médicas.
- Chesson, A., 1993. Feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology* 45, 65–79. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(93\)90072-R](https://doi.org/10.1016/0377-8401(93)90072-R)
- Choct, M., 1997. Feed non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. *Feed milling international* 13–26.
- Choct, M., Hughes, R.J., Wang, J., Bedford, M.R., Morgan, A.J., Annison, G., 2015. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *British Poultry Science* 37, 609–621. <https://doi.org/10.1080/00071669608417891>
- Conte, A.J., Teixeira, A.S., Fialho, E.T., Schoulten, N.A., Bertechini, A.G., 2003. Efeito da fitase e xilanase sobre o desempenho e as características ósseas de frangos de

- corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32, 1147–1156. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000500015>
- Cosson, T., Vendrell, A. m. p., Teresa, B. g., Reñé, D., Taillade, P., Brufau, J., 1999. Enzymatic assays for xylanase and β -glucanase feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology* 77, 345–353.
- Coughlan, M.P., Hazlewood, G., 1993. Beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 17, 259–289.
- Cowieson, A.J., Acamovic, T., Bedford, M.R., 2006. Phytic Acid and Phytase: Implications for Protein Utilization by Poultry. *Poultry Science* 85, 878–885. <https://doi.org/10.1093/ps/85.5.878>
- Dalsgaard, J., Verlhac, V., Hjermitsev, N.H., Ekmann, K.S., Fischer, M., 2012. 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* 171, 181–191.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300, 182–188.
- Domeneghini, C., Arrighi, S., Radaelli, G., Bosi, G., Veggetti, A., 2005. Histochemical analysis of glycoconjugate secretion in the alimentary canal of *Anguilla anguilla* L. *Acta Histochemica* 106, 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2004.07.007>
- Dourado, L.R.B., Barbosa, N.A.A., Sakomura, N.K., 2014. Nutrição de não ruminantes: Nilva Kazue saomura, José Humberto Vilar da Silva, Fernando Guilherme Perazzo Costa, João Batista Kochenborger Fernandes, Luciano Hauschild. Jaboticabal: Funep., in: *Enzimas Na Nutrição de Monogástricos*. pp. 265–484.
- Ebringerová, A., 2006. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. *Macromolecular Symposia* 232, 1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>
- Eleraky, W., Ibrahim, D., Mahmoud, R. Effects of rare earth elements and exogenous multienzyme supplementation to plant protein enriched diet on growth performance, digestibility and economic efficiency of Nile tilapia, *Oreochromis Niloticus*. 2016. *Japanese Journal of Veterinary Research* 64, 73-78.
- Englyst, H., 1989. Classification and measurement of plant polysaccharides. *Animal Feed Science and Technology* 23, 27–42. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(89\)90087-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(89)90087-4)

- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO., 2016. The state of world fisheries and aquaculture, Roma. 209.
- Furuya, W.M., 2010. Tabelas brasileiras para nutrição de tilápia. 21 ed. Toledo: GFM, 2010. 100 p.
- Gajardo, K., Jaramillo-Torres, A., Kortner, T.M., Merrifield, D.L., Tinsley, J., Bakke, A.M., Krogdahl, Å., 2017. Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Applied and Environmental Microbiology 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.02615-16>
- Gatesoupe, F.J., Fauconneau, B., Deborde, C., Madji Hounoum, B., Jacob, D., Moing, A., Corraze, G., Médale, F., 2018. Intestinal microbiota in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed diets with different levels of fish-based and plant ingredients: A correlative approach with some plasma metabolites. Aquaculture Nutrition 24, 1563–1576. <https://doi.org/10.1111/anu.12793>
- Gatesoupe, F.J., Huelvan, C., Le Bayon, N., Le Delliou, H., Madec, L., Mouchel, O., Quazuguel, P., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.L., 2016. The highly variable microbiota associated to intestinal mucosa correlates with growth and hypoxia resistance of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, submitted to different nutritional histories. BMC Microbiology 16, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0885-2>
- Genten, F., Terwinghe, E., Dangu, A., 2011. Histologie illustrée du poisson.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A., 2009. Atlas of fish histology. Editora Enfield: Science Publ. 215 p.
- Ghomi, M.R., Shahriari, R., Langroudi, H.F., Nikoo, M., 2012. composition , and fatty acid profiles of cultured great. Aquaculture International 20, 249–254. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9453-9>
- Glencross, B., Rutherford, N., Bourne, N., 2012. The influence of various starch and non-starch polysaccharides on the digestibility of diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 356–357, 141–146.
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. Aquaculture Research 41, 770–776.
- Henry, R.J., 1987. Pentosan and (1 → 3),(1 → 4)-β-Glucan concentrations in endosperm and wholegrain of wheat, barley, oats and rye. Journal of Cereal Science 6, 253–258. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(87\)80062-0](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(87)80062-0)
- Honorato, C., Cruz, C. da, 2011. Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia

- do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo silagem de peixe. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 48, 281–288.
- Huisman, M.M.H., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 1998. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterisation. *Carbohydrate Polymers* 37, 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00111-2)
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE., 2016. Produção de tilápia aumenta 9,7% no Brasil.
- Izydorczyk, M.S., Biliaderi, C.G., 1995. Cereal arabinoxylans : advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 28, 33–48.
- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., 2000. Structural and Functional Aspects of Cereal Arabinoxylans and 13-Glucans. *Novel macromolecules in food systems* 361–384.
- Jiang, T.T., Feng, L., Liu, Y., Jiang, W.D., Jiang, J., Li, S.H., Tang, L., Kuang, S.Y., Jobling, M., 1995. *Environmental biology of fishes*. Fish and Fisheries Series 16. London: Chapman and Hall. 455p.
- Kamalam, B.S., Medale, F., Panserat, S., 2017. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture* 467, 3–27.
- Kelly, C., Salinas, I., 2017. Under pressure: Interactions between commensal microbiota and the teleost immune system. *Frontiers in Immunology* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00559>
- Khalafalla, M.M., 2016. The influence of nutrasexylam[®] enzyme on growth , carcass composition and plasma indices of nile tilapia fingerlings the influence of nutrasexylam © enzyme on growth , carcass composition and plasma indices of nile tilapia fingerlings. *Journal of Fisheries and Aquaculture* 4, 143–147.
- Kim, J.C., Simmins, P.H., Mullan, B.P., Pluske, J.R., 2005. The effect of wheat phosphorus content and supplemental enzymes on digestibility and growth performance of weaner pigs 118, 139–152.
- Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A.M., 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: An update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research* 41, 333–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>
- Kulkarni, N., Abhay Shendye, M.R., 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 411–456.
- Kumar, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Choudhury, D., Mukherjee, S.C., 2006. Studies on

- digestibility and digestive enzyme activities in *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles: Effect of microbial amylase supplementation in non-gelatinized or gelatinized corn-based diet at two protein levels. *Fish Physiology and Biochemistry* 32, 209–220. <https://doi.org/10.1007/s10695-006-9002-z>
- Kuperman, I., Kuz'Mina, V., 1994. The structure of the intestinal epithelium in fish with different types of feeding. *Journal Fish Biological* 44, 181–193.
- Lea, M, B.R., Walsh, W.A., Brock, J.A., Fujioka, R.S., 1997. Cold stress-induced changes in the aerobic heterotrophic gastrointestinal tract bacterial flora of red hybrid tilapia. *Journal of Fish Biology* 50, 770–780. <https://doi.org/10.1006/jfbi.1996.0339>
- Li, J.S., Li, J.L., Wu, T.T., 2009. Effects of non-starch polysaccharides enzyme, phytase and citric acid on activities of endogenous digestive enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *Aquaculture Nutrition* 15, 415–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00606.x>
- Li, T., Long, M., Gatesoupe, F.J., Zhang, Q., Li, A., Gong, X., 2015. Comparative Analysis of the Intestinal Bacterial Communities in Different Species of Carp by Pyrosequencing. *Microbial Ecology* 69, 25–36. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0480-8>
- Liquori, G.E., Mastrodonato, M., Zizza, S., Ferri, D., 2007. Glycoconjugate histochemistry of the digestive tract of *Triturus carnifex* (*Amphibia*, *Caudata*). *Journal of Molecular Histology* 38, 191–199. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9087-4>
- Ludke, M.D.C.M.M., López, J., Ludke, J.V., 2002. Fitase Em Dietas Para Suínos Em Crescimento: (I) Impacto Ambiental. *Ciência Rural* 32, 97–102. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000100017>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Dersjant-Li, Y., Schrama, J.W., 2018. The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture* 487, 7–14.
- Maes, C., Vangeneugden, B., Delcour, J.A., 2004. Relative activity of two endoxylanases towards water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *Journal of Cereal Science* 39, 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.08.001>
- Mahdi, G., Wolfgang, K., Konrad, D., 2015. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture* 448, 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- Malathi, V., Devegowda, G., 2001. In vitro evaluation of nonstarch polysaccharide

- digestibility of feed ingredients by enzymes. *Poultry Science* 80, 302–305. <https://doi.org/10.1093/ps/80.3.302>
- Mannina, L., Sobolev, A.P., Capitani, D., Iaffaldano, N., Rosato, M.P., Ragni, P., Reale, A., Sorrentino, E., D’Amico, I., Coppola, R., 2008. NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: Implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta* 77, 433–444.
- Masey O’Neill, H., Smith, J.A., Bedford, M.R., 2014. Multicarbohydrase Enzymes for Non-ruminants 27, 290–301.
- National Research Council-NRC., 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academy Press, Washington, DC, USA. 2011.
- Navarrete, P., Magne, F., Araneda, C., Fuentes, P., Barros, L., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J., 2012. PCR-TTGE Analysis of 16S rRNA from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Gut Microbiota Reveals Host-Specific Communities of Active Bacteria. *PLoS One* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031335>
- Nayak, S.K., 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research* 41, 1553–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Naylor, R.L., Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024. <https://doi.org/10.1038/35016500>
- Nitrayová, S., Heger, J., Patráš, P., Kluge, H., Broz, J., 2009. Effect of xylanase on apparent ileal and total tract digestibility of nutrients and energy of rye in young pigs. *Archives of Animal Nutrition* 63, 281–291.
- Novelli, P.K., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Araujo, E.P., Mattos, B.R., Fleuri, L.F., 2017. Enzymes produced by agro-industrial co-products enhance digestible values for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A significant animal feeding alternative. *Aquaculture* 481, p. 1-7.
- Ogunkoya, A.E., Page, G.I., Adewolu, M.A., Bureau, D.P., 2006. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 254, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.032>
- Oliveira, G.R., Logato, P.V.R., De Freitas, R.T.F., Rodrigues, P.B., Fialho, E.T., Diodatti, F.C., 2007. Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36, 1945–1952.
- Olsen, R.E., Sundell, K., Hansen, T., Hemre, G.I., Myklebust, R., Mayhew, T.M., Ringø,

- E., 2002. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 211–221. <https://doi.org/10.1023/A:1026217719534>
- Owusu-Asiedu, A., Simmins, P.H., Brufau, J., Lizardo, R., Péron, A., 2010. Effect of xylanase and β -glucanase on growth performance and nutrient digestibility in piglets fed wheat-barley-based diets. *Livestock Science* 134, 76–78. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.06.102>
- Pezzato, L.E., da Silva, R.L., de Araújo, E.P., Rocha, M.K.H.R., Damasceno, F.M., de Freitas, J.M.A., Sartori, M.M.P., de Lima Meirelles, P.R., Barros, M.M., 2017. Diet components as internal indicators in the determination of the apparent digestibility coefficients for Nile tilapia. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 52, 393–400. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017000600003>
- Pedrotti, F.S., Davies, S., Merrifield, D.L., Marques, M.R.F., Fraga, A.P.M., Mouriño, J.L.P., Fracalossi, D.M., 2015. The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research* 46, 472–481. <https://doi.org/10.1111/are.12195>
- Perlin, A.S., 1951. Isolation and composition of the soluble pentosans of wheat flours. *Cereal Chemistry* 28, 370–391.
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C. De, Gabriel, L., Pinto, Q., Furuya, W.M., Barros, M.M., Magalhães, G.J., Arruda, E., Lanna, T., 2002. Avaliação de dois métodos de determinação do coeficiente de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Scientiarum* 965–971.
- Popma, T., Masser, M., 1999. Tilapia Life History and Biology. South Regional Aquaculture Center 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00329.x>
- Pucci, L.E.A., Rodrigues, P.B., Tadeu, R., Freitas, F. De, Bertechini, A.G., Carvalho, E.M., 2003. Níveis de óleo e adição de complexo enzimático na ração de frangos de corte 1 oil levels and enzymatic complex addition in broiler diets. *Revista Brasileira de Zootecnia* 909–917.
- Rawls, J.F., Samuel, S.B., Gordon, I.J., 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *PNAS* 101, 4596–4601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400706101>
- Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S., Krogdahl, Å., 2006. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The

- effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 261, 829–841. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.030>
- Roeselers, G., Mittge, E.K., Stephens, W.Z., Parichy, D.M., Cavanaugh, C.M., Guillemin, K., Rawls, J.F., 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME Journal* 5, 1595–1608. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.38>
- Saha, S., Roy, R.N., Sen, S.K., Ray, A.K., 2006. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* 380–388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01442.x>
- Silva, L.C.R., Furuya, W.M., Natali, M.R.M., Schamber, C.R., Dos Santos, L.D., Vidal, L.V.O., 2010. Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39, 1175–1179. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000600002>
- Silva, V. José H., Mukami, F., Teixeira, F.L.A., 2000. Uso de Rações à Base de Aminoácidos Digestíveis para Poedeiras. *Revista Brasileira de Zootecnia* 29, 1446–1451.
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chemistry* 127, 1409–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.042>
- Smith, L.S., 1989. Digestive functions in teleost fishes. In *Fish nutrition*, 2nd edn, (Halver, J. E., eds), pp. . San Diego, CA: Academic press 2, 331–421.
- Smits, C.H.M., Annison, G., 1996. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition -towards a physiologically valid approach to their determination. *World Poult. Sci.* 52, 203–221. <https://doi.org/10.1079/WPS19960016>
- Steenfeldt, S., Knudsen, K.E., Borsting, C., Eggum, B., 1995. the Nutritive-Value of Decorticated Mill Fractions of Wheat .2. Evaluation With Raw and Enzyme-Treated Fractions Using Adult Cockerels. *Animal Feed Science and Technology* 54, 249–265.
- Tachibana, L., Gonçalves, G.S., Guimarães, I.G., Pezzato, L.E., 2010. Digestibilidade aparente do triticale para a tilápia-do-Nilo. *Boletim do Instituto de Pesca* 36, 39–44.
- Tahir, M., Saleh, F., Ohtsuka, A., Hayashi, K., 2008. An effective combination of carbohydrases that enables reduction of dietary protein in broilers: Importance of hemicellulase. *Poultry Science* 87, 713–718. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00340>

- Takashima, F., Hibiya, T., 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological features. 2. ed. Tokio: Kondansha Ltda, 195 p.
- Tavernari, F. de C., Bernal, L.E.P., Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Vieira, R.A., 2014. Relação metionina + cistina/lisina digestível para frangos de corte cobb. Revista Ceres 61, 193–201. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000200006>
- Tavernari, F. de C., Carvalho, T.A., Assis, A. paula, Lima, H.J., 2008. Revista Eletrônica Nutritime 673. Revista Eletrônica Nutritime 5, 673–689.
- Tengjaroenkul, B., Smith, B.J., Caceci, T., Smith, S.A., 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture 182, 317–327. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00270-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00270-7)
- Thorpe, P., Beal, J., 2001. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. In: Bedford,, MR; Partridge, GG (Eds.), in: Enzymes In Farms Animal Nutrition. pp. 125–143.
- Vatsos, I.N., 2017. Standardizing the microbiota of fish used in research. Laboratory Animals 51, 353–364. <https://doi.org/10.1177/0023677216678825>
- Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Michelato, M., Tadeu, E.N., Pezzato, L.E., Furuya, W.M., 2015. Apparent Protein and Energy Digestibility and Amino Acid Availability of Corn and Co-products in Extruded Diets for Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of the World Aquaculture Society 46, 183–190. <https://doi.org/10.1111/jwas.12184>
- Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Moura, L.B., Graciano, T.G., Martins, E.N., Furuya, W.M., 2017. Apparent digestibility of soybean coproducts in extruded diets for Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Nutrition 23, 228–235. <https://doi.org/10.1111/anu.12383>
- Vidal, M.V., Donzele, J.L., De Andrade, D.R., Dos Santos, L.C., 2004. Determinação da digestibilidade da matéria Seca e da proteína bruta do fubá de milho e do farelo de soja para tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizando-se técnicas com uso de indicadores internos e externos. Revista Brasileira de Zootecnia 33, 2193–2200. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000900003>
- Voet, D., Voet, J.G., 2006. Bioquímica, in: Médica Panamericana. p. 1776.
- Wu, S., Wang, G., Angert, E.R., Wang, W., Li, W., Zou, H., 2012. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. PLoS ONE 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030440>

- Yin, Y.L., McEvoy, J.D.G., Schulze, H., Hennig, U., Souffrant, W.B., McCracken, K.J., 2000. Apparent digestibility (ileal and overall) of nutrients and endogenous nitrogen losses in growing pigs fed wheat (var. Soissons) or its by-products without or with xylanase supplementation. *Livestock Production Science* 62, 119–132. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(99\)00129-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(99)00129-3)
- Zhou, Y., Yuan, X., Liang, X.F., Fang, L., Li, J., Guo, X., Bai, X., He, S., 2013. Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: The effect of exogenous cellulase. *Aquaculture* 416–417, 1–7.
- Zijlstra, R.T., Owusu-Asiedu, A., Simmins, P.H., 2010. Future of NSP-degrading enzymes to improve nutrient utilization of co-products and gut health in pigs.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação de xilanase e β -glucanase sobre a digestibilidade, desempenho produtivo, histologia intestinal e microbioma de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas com baixo e alto teor de arabinosilanos e β -glucanos.

2.1. Objetivos Específicos

- Determinar se a celulose é um indicador apropriado para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes em juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas formuladas com baixo e alto teor de arabinosilanos e β -glucano;
- Avaliar se a adição de xilanase e β -glucanase influenciam os coeficientes de digestibilidade aparente de energia e nutrientes, incluindo aminoácidos e minerais, em dietas com baixo e alto teor de arabinosilanos e β -glucano;
- Determinar o desempenho produtivo, parâmetros bioquímicos do sangue e histologia intestinal de tilápias alimentadas com dietas sem e com adição de xilanase e β -glucanase após 90 dias de criação;

- Avaliar o microbioma intestinal de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dieta sem e com adição de xilanase e β -glucanase após 90 dias de criação.

II - Coeficientes de digestibilidade aparente da energia, proteína, aminoácidos e minerais em dietas contendo baixo ou alto teor de arabinosídeos e β -glucanos utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores para juvenis de tilápias do Nilo¹

RESUMO: Objetivou-se avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da energia e nutrientes para juvenis de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alimentadas com dietas formuladas com baixo e alto teor de arabinosídeos e β -glucanos (AB), utilizando óxido de cromo ou celulose. Os peixes ($n = 96$) foram distribuídos em esquema fatorial 2×2 , com duas repetições, sendo dois teor de AB (baixo ou alto) e dois indicadores de digestibilidade (óxido de cromo ou celulose). Os peixes foram alojados em oito aquários de digestibilidade e as fezes foram coletadas pelo sistema modificado de Guelph, durante 21 dias. Houve interação entre o teor de AB e indicador sobre os CDA da matéria seca ($P = 0,002$), energia bruta ($P = 0,006$), fibra bruta ($P = 0,002$), cálcio ($P = 0,031$) e fósforo ($P = 0,044$), sendo os melhores resultados obtidos em peixes alimentados com dieta com baixo teor de AB utilizando óxido de cromo como indicador. O teor de AB não influenciou o CDA da proteína bruta ($P = 0,069$) e os peixes alimentados com a dieta com alto teor de AB apresentaram menor CDA dos lipídios ($P = 0,013$) e a celulose superestimou os CDA da proteína bruta e lipídios. Foi observado interação do teor de AB e tipo de indicador sobre os CDA aparente da leucina ($P = 0,001$), isoleucina ($P = 0,009$), treonina ($P = 0,031$), valina ($P = 0,011$), alanina ($P = 0,017$) e tirosina ($P = 0,038$), sendo os melhores CDA obtidos em peixes que consumiram dieta com baixo teor de AB e utilizando óxido de cromo como indicador. Não foi observada interação entre o teor de AB e indicador para arginina ($P = 0,164$), histidina ($P = 0,058$), lisina ($P = 0,708$) e metionina ($P = 0,150$) e os maiores CDA foram obtidos em peixes que consumiram a dieta com baixo teor de AB e a utilização de celulose superestimou os CDA dos aminoácidos. Conclui-se que a celulose não é recomendada como indicador para determinar os coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes, independente do teor de arabinosídeos e β -glucanos em dietas para tilápias do Nilo.

¹OS artigos foram elaborado de acordo com as normas da revista “*Animal Feed Science and Technology*”; <https://www.journals.elsevier.com/animal-feed-science-and-technology>, ISSN: 0377-8401, fator de impacto 2,143.

Palavras-chave: arabinosilanos, indicadores, *Oreochromis niloticus*, peixes, polissacarídeos não amiláceo.

Abreviações: AB, arabinosilanos e β -glucanos, CDA, coeficientes de digestibilidade aparente; PNA, polissacarídeos não amiláceos.

II - Apparent digestibility coefficients of energy, protein, amino acids and minerals in diets containing low or high content of arabinoxylans and β -glucans using chromium oxide and cellulose as markers for Nile tilapia juveniles

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the apparent energy and nutrient digestibility coefficients (ADC) for Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus*, fed diets formulated with low and high arabinoxylans and β -glucans content using chromium oxide or cellulose. The fish (n = 96) were distributed in a 2 x 2 factorial scheme, with two replicates, two AB contents (low or high) and two digestibility indicators (chromium oxide or cellulose). The fish were housed in eight digestibility aquaria and feces were collected by the modified Guelph system for 21 days. There was interaction between AB content and dry matter (P = 0.002), crude energy (P = 0.006), crude fiber (P = 0.002), calcium (P = 0.031) and phosphorus, and the best results were obtained in fish fed with low AB diet using chromium oxide as marker. The AB content did not influence crude protein ADC (P = 0.069) and fish fed with high diet had lower lipid ADC (P = 0.013) and cellulose overestimated crude protein and lipid ADC. It was observed interaction of AB marker and indicator type on the apparent ADC of leucine (0.001), isoleucine (P = 0.009), threonine (P = 0.031), valine (P = 0.011), alanine (P = 0.017) and tyrosine (P = 0.038). The best ADC were obtained in fish that consumed a low AB diet and using chromium oxide as an marker. No interaction between AB content and marker for arginine (P = 0.164), histidine (P = 0.058), lysine (P = 0.708) and methionine (P = 0.150) and higher ADC were obtained in fish that consumed diet with low AB content and the cellulose use overestimated the ADC of the amino acids. It was concluded cellulose is not recommended as a marker to determine the apparent energy and nutrients digestibility coefficients, regardless of arabinoxylans and β -glucans contents in diets for Nile tilapia.

Key words: arabinoxylan, indicators, *Oreochromis niloticus*, fish, non-starch polysaccharides.

Abbreviations: AB, arabinoxylans and β -glucans; ADC, apparent digestibility coefficients; NSP, non-starch polysaccharides.

1. Introdução

A determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da energia e nutrientes de um alimento é um dos principais fatores a ser considerado para avaliar o valor nutritivo de uma dieta, objetivando maior precisão na formulação de dietas para peixes. Essas informações também são importantes para elaboração de dietas de mínimo custo e ambientalmente sustentáveis (Castillo e Gatlin III, 2015).

Para melhorar os CDA da energia e nutrientes dos alimentos de origem vegetal, os tratamentos hidrotérmicos como a extrusão e a utilização de enzimas exógenas para reduzir os efeitos negativos dos fatores antinutricionais e aumentar a disponibilidade dos nutrientes têm sido amplamente utilizados na elaboração de dietas para peixes (Castillo e Gatlin III, 2015).

Os arabinosilanos e β -glucanos (AB) são os principais polissacarídeos não amiláceos (PNA) presentes no milho, soja e trigo (Steenfeldt et al. 1995; Malathi e Devegowda, 2001) esses PNA aumentam a viscosidade da dieta, dificultando a atuação das enzimas digestivas (Classen, 1996) e a digestão, absorção e ingestão dos nutrientes (Zijlstra et al., 2010) e da energia (Adeoye et al., 2016).

A escolha do indicador pode influenciar na análise do valor nutritivo de um alimento ou dieta, subestimando ou superestimando os CDA da energia e dos nutrientes. Os indicadores empregados em estudos para determinação dos CDA em animais são classificados em externos, se adicionados à dieta, ou como interno, se for de ocorrência natural nos alimentos (Owens e Hanson, 1992). Dentre os indicadores externos, o óxido de cromo (Cr_2O_3) é o mais utilizado na determinação dos CDA dos nutrientes, energia e minerais de alimentos e dietas para tilápias do Nilo, devido a sua inércia química no trato digestório desses peixes (Bremer Neto et al., 2005). A presença natural da celulose nos alimentos de origem vegetal permite a sua utilização como indicador interno em ensaios de digestibilidade, utilizando dietas práticas. No entanto, existem poucos trabalhos que relatam a eficiência desse indicador para determinação da digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais e dos minerais.

Novos indicadores têm sido avaliados para substituir o óxido de cromo como cinza insolúvel em ácido, cinza insolúvel em detergente ácido, fibra em detergente ácido (Vidal et al., 2004), fibra bruta (Krontveit et al., 2014) e matéria orgânica resistente à hidrólise (Da et al., 2013). Recentemente, a celulose foi validada como indicador em dietas práticas para tilápias do Nilo (Pezzato et al., 2017). No entanto, ainda não há estudos que

demonstram o uso da celulose como indicador em ensaios de digestibilidade de dietas com elevados teores de arabinosilanos e β -glucanos para determinar os CDA dos aminoácidos e minerais para tilápias do Nilo. Os resultados dos trabalhos usando indicadores internos para determinar os CDA ainda são contraditórios por causa das variações na composição química das dietas, alimentos utilizados, processamento dos ingredientes, fase de vida e espécie de peixe utilizado.

A composição da dieta pode influenciar as estimativas de nutrientes, pois o conteúdo de alguns componentes da parede celular, como as fibras, podem afetar a taxa de passagem do alimento e conseqüentemente a taxa de recuperação do marcador (Dourado et al., 2010). Atualmente, a formulação de dietas com alimentos alternativos tem sido utilizada para reduzir os custos de produção. No entanto, ainda são poucas as informações sobre os efeitos dos AB sobre os CDA de dietas elaboradas em dietas extrusadas para tilápias do Nilo.

Alguns alimentos possuem elevados teores de AB, tornando-se necessário estudos para avaliar indicadores apropriados para determinar os CDA da energia e nutrientes. Ainda não há referências de pesquisas elaboradas para avaliar a celulose como indicador interno em dietas para tilápias do Nilo com diferentes níveis de arabinosilanos e β -glucanos.

Com a crescente demanda para inclusão de alimentos de origem vegetal em dietas comerciais para tilápias, torna-se de grande relevância a avaliação de diferentes indicadores em dietas que possuem fatores antinutricionais como os arabinosilanos e β -glucanos que alteram a taxa de passagem e de mistura da digesta, com conseqüente valor sobre a digestão e absorção dos nutrientes. Assim, a presente pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar dietas formuladas com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos para juvenis de tilápias do Nilo utilizando óxido de cromo ou celulose como indicadores dos CDA da energia, proteína, aminoácidos, extrato etéreo e minerais.

2. Material e Métodos

2.1. Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa-PR. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, com Certificado Experimental no uso de Animais em Pesquisa-CEUA (Protocolo 879/2018).

2.2. *Dietas experimentais*

As dietas foram misturadas, moídas e extrusadas no Laboratório de Nutrição de Peixes (AquaNutri, Botucatu, SP, Brasil). A moagem foi realizada em moinho centrífugo em peneiras de 0,8 mm (Viera MC 680B, Tatuí, SP, Brasil) e extrusado em extrusora de rosca simples com matriz de 3 mm e um furo, três “facas” com rotação de 40/min e temperatura de 105 °C (Exteec EX30, Ribeirão Preto, SP, Brasil), obtendo grânulos com diâmetros de 4 a 5 mm e secas em estufa de ventilação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, SP, Brasil) 55°C, durante 24 horas.

As dietas experimentais foram formuladas para atender às exigências dietéticas de juvenis de tilápias do Nilo (NRC, 2011) (Tabela 1), com baixo e alto teor de AB, conforme descrito nas Tabelas 2 e 3. As dietas foram elaboradas com base em valores de composição dos alimentos previamente analisadas e confirmadas por análises das dietas após extrusão e secagem dos pellets.

Tabela 1

Composição das dietas experimentais (g/kg).

Ingredientes	Arabinoxilanos e β -glucanos ¹	
	Baixo	Alto
Milho	489,40	0,00
Farinha de trigo integral	0,00	579,00
Farelo de soja	399,00	295,00
Farinha de peixe	80,00	80,00
Amido de milho	0,00	7,90
DL-metionina	2,50	2,70
L-lisina	2,00	5,00
L-treonina	0,00	0,90
L-histidina	2,00	2,70
L-triptofano	0,10	0,00
Fosfato bicálcico	14,20	16,00
Sup. min. e vitamínico ²	5,00	5,00
Antioxidante ³	0,20	0,20
Antifúngico ⁴	1,00	1,00
Sal	3,50	3,50
Cr ₂ O ₃	1,10	1,10
Total	1000	1000

Arabinoxilanos e β -glucanos¹, dieta com baixo ou alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos;

²Misturas de minerais e vitaminas (composição por kg de dieta): vitamina A, 600 UI; vitamina D₃, 1,000 UI; vitamina E, 60 mg; vitamina K₃, 12 mg; vitamina B₁, 24 mg; vitamina B₂, 24 mg; vitamina B₆, 20 mg; vitamina B₁₂, 24 mg; ácido fólico, 6 mg; Pantotenato D-cálcio, 60 mg; ácido ascórbico, 240 mg; biotina, 0,24 mg; colina, 325 mg; ácido nicotínico, 120 mg; ferro, 50 mg; sulfato de cobre, 3 mg; sulfato de manganês, 20 mg; sulfato de zinco, 30 mg; iodeto de potássio, 0,1 mg; selênio, 0,1mg; ³Antioxidante - Banox[®] (Alltech Agroindustrial Ltda, São Paulo, Brasil); ⁴Antifúngico, Mold Zap Aquática[®], composição: dipropionato de amônio, ácido acético, ácido sórbico e ácido benzoico (Alltech Agroindustrial Ltda, São Paulo, Brasil).

Tabela 2

Composição analisada das dietas experimentais (g/kg, base na matéria seca).

Ingredientes	Arabinosilanos e β -glucanos ¹	
	Baixo	Alto
Matéria seca	946,60	944,50
Energia bruta (MJ/kg)	18,74	18,75
Proteína bruta	320,20	320,30
Lipídios totais	38,50	37,80
Fibra bruta	37,70	54,13
Fibra em detergente ácido	20,00	24,50
Fibra em detergente neutro	40,90	67,40
Cinzas	68,18	68,28
Cálcio	12,90	13,80
Fósforo	10,40	11,50
Cr ₂ O ₃	10,50	10,80
Celulose	10,30	15,30
Arabinosilanos	37,36	53,69
β -glucanos	0,49	5,79

Arabinosilanos e β -glucanos¹, dieta com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos.

Tabela 3

Composição analisada dos aminoácidos essenciais e não essenciais das dietas com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos (g/kg, base na matéria seca).

Aminoácidos	Arabinosilanos e β -glucanos ¹	
	Baixo	Alto
Essenciais		
Arg	20,30	19,50
His	9,80	10,10
Ile	12,50	11,60
Leu	25,40	22,00
Lys	19,30	20,20
Met	6,90	6,90
Phe	14,60	14,10
Thr	11,00	11,00
Val	13,10	12,40
Não essenciais		
Ala	16,30	14,10
Asp	28,40	23,30
Cys	4,30	4,00
Glu	50,90	61,00
Gly	16,60	17,00
Pro	18,60	21,80
Ser	15,40	15,40
Tyr	9,30	9,00

Arabinosilanos e β -glucanos¹, dieta com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos.

2.3. Peixes e condições experimentais

Foram adquiridos 1000 alevinos de tilápia do Nilo (Aquabel, Rolândia, PR, Brasil), com peso inicial médio de $1,0 \pm 0,2$ g, distribuídos em tanques-rede de 1 m^3 (1 x 1 x 1 m) com tela plástica interna (malha com furos de 4 mm) e alimentados com dieta comercial micro extrusada (0,4 mm diâmetro) com 45% de proteína bruta durante 70 dias, até atingirem 40 g de peso corporal. Em seguida, 300 peixes foram transferidos para o Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Ponta Grossa e adaptados às instalações e manejo durante sete dias.

Durante o período de adaptação, foram alimentados com as respectivas dietas experimentais, quatro vezes por dia e até saciedade aparente. Noventa e seis juvenis de tilápia do Nilo com peso inicial de $50,0 \pm 1,2$ g foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2 x 2, sendo dois nível de AB (baixo ou Alto) e dois indicadores (óxido de cromo ou celulose), com duas repetições. Os peixes foram

distribuídos em oito gaiolas cilíndricas (50 L cada), confeccionados com *polivinil* (malha de 1,5 cm entre nós), mantidas em aquário de alimentação (150 L) cilíndrico de fibra de vidro com aeração de forma a manter o oxigênio dissolvido entre 6,0 a 6,5 mg/L e aquecedor acoplado a termostato para manter a temperatura entre 27,8 a 28 °C. Durante o dia os peixes foram mantidos nos aquários de alimentação, em que receberam seis refeições diariamente (8h, 10h, 11h, 15h, 16h e às 17h). Após esse período, foram transferidos para os aquários de coleta de fezes, e permaneciam até a manhã do dia subsequente.

Para coleta das amostras de fezes, foram utilizados oito aquários cônicos (150 L) confeccionados em fibra de vidro, com coletor de fezes e mantidos com água com os mesmos teores de oxigênio e temperatura dos aquários de alimentação. A oxigenação dos aquários de coleta e digestibilidade foi realizada por meio de sistema com pedras micro porosas acopladas a mangueiras de silicone com ar fornecido por meio de compressor de ar radial de 0,5 CV (JKW002, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) mantendo o teor de oxigênio dissolvido entre 6,0 e 6,5 mg/L. Após a transferência dos peixes para os aquários de coleta de fezes, efetuava-se a limpeza dos aquários de alimentação e após a coleta de fezes realizava-se a limpeza dos aquários de coleta, com substituição de toda água dos aquários (Pezzato et al., 2002).

O período de coleta de fezes foi de 21 dias. As fezes coletadas foram secas em estufas de ventilação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, SP, Brasil) a 55 °C por 48 horas, moídas em pistilo e armazenadas a -20 °C, para posteriores análises no laboratório CBO – (Valinhos, SP, Brasil).

Os parâmetros de qualidade de água: oxigênio dissolvido (mg/L) e temperatura (°C) foram monitorados diariamente com uma sonda multi-parâmetro (YSI® 550A, Florianópolis, SC, Brasil), semanalmente foram determinados o pH ($6,5 \pm 0,05$) com pHmetro de bancada (TEC-2, Tecnal®, Piracicaba, SP, Brasil). A amônia tóxica ($0,001 \pm 0,000$ ppm), nitrito ($0,001 \pm 0,000$ ppm) e nitrato ($0,001 \pm 0,000$ ppm) foram analisados com kit (Alfakit®, Florianópolis, SC, Brasil).

2.4. Análises laboratoriais e cálculos de digestibilidade

As análises de matéria seca (método 934,01), matéria mineral (método 942,05), nitrogênio (método 981,10), extrato etéreo (método 920,85) e fibra bruta (método 991,43) das dietas experimentais foram determinadas de acordo com a *Association of Official*

Analytical Chemists (AOAC, 1995). A proteína bruta foi calculada pelo percentual de nitrogênio multiplicado por 6,25.

Os teores de óxido cromo das dietas e fezes foram determinados de acordo com Bremer-Neto et al. (2005). A celulose foi estimada conforme metodologia sequencial descrita previamente (Van Soest et al., 1991). Os valores de arabinosilanos e β -glucanos foram calculados de acordo com: Englyst (1989) e Huisman et al. (1998). As análises foram realizadas na "CBO Análises Laboratoriais" (Campinas, São Paulo, Brasil).

Os CDA da energia e nutrientes foram determinados pelo método indireto levando em consideração o teor de Cr_2O_3 ou celulose das rações e das fezes, de acordo com a fórmula de (Austreng, 1978).

$$CDA_{(n)} = 100 - \left[100 \left(\frac{\%I_D}{\%I_f} \right) \times \left(\frac{\%N_f}{\%N_D} \right) \right]$$

Em que:

$CDA_{(n)}$ = Digestibilidade aparente da energia ou nutriente;

I_D = % de óxido de cromo ou celulose na dieta;

I_f = % de óxido de cromo ou celulose nas fezes;

N_D = Energia ou nutrientes na dieta;

N_f = Energia ou nutrientes nas fezes.

2.5. Análises estatísticas

As variáveis consideradas foram analisadas de acordo com o modelo matemático: $Y_{ijk} = U + D_i + I_j + DI_{ij} + e_{ijk}$, em que: Y_{ijk} = observação k, nos peixes que receberam a dieta com baixo teor de AB i e alto teor de AB j; U = média geral; D_i = efeito do teor de AB i; I_j = efeito do tipo de indicador j; DI_{ij} = efeito da interação do teor de AB i * indicador j; e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação. Foi feito o teste de normalidade dos dados, utilizando o teste do Shapiro-Wilk, análise de homocedasticidade (igualdade de variância) usando o teste de Brown Forsythe, feito a análise paramétrica dos dados da ANOVA, em caso de teste F significativo para a interação (teor de AB x indicador), realizou-se o desdobramento do fatorial com comparação das médias pelo teste de Tukey com $\alpha = 0,05$, utilizando-se os Proc GLM do Statistical Analysis System (Versão, 9.0).

3. Resultados

3.1. *Digestibilidade da energia e dos nutrientes*

Os valores médios dos CDA da matéria seca, proteína bruta, energia bruta, fibra bruta, lipídeos totais, cálcio e fósforo estão representados na Tabela 4. Houve interação entre o teor de AB e indicador sobre os CDA da matéria seca ($P = 0,002$), energia bruta ($P = 0,006$), fibra bruta ($P = 0,002$), cálcio ($P = 0,031$) e fósforo ($P = 0,044$), sendo observado melhores resultados nos peixes que receberam dieta com baixo teor de AB, utilizando o óxido de cromo como indicador. Não houve interação ($P > 0,05$) entre o teor de AB e o tipo de indicador para o CDA da proteína bruta ($P = 0,899$) e lipídios ($P = 0,086$).

Peixes que receberam dieta com baixo teor de AB, apresentaram melhores resultados nos CDA da matéria seca (0,884 vs 0,791), energia bruta (0,904 vs 0,822), fibra bruta (0,383 vs 0,104), lipídios (0,868 vs 0,758), cálcio (0,427 vs 0,062) e fósforo (0,548 vs 0,250), quando comparados com os peixes que foram alimentados com alto teor de AB utilizando o óxido de cromo como indicador. Observou-se diferença entre os indicadores, em que a celulose superestimou os CDA da matéria seca ($P = 0,001$), proteína bruta ($P = 0,001$), energia bruta ($P = 0,001$), fibra bruta ($P = 0,001$), lipídios ($P = 0,002$), cálcio ($P = 0,001$) e fósforo ($P = 0,001$).

Tabela 4

Coefficientes de digestibilidade aparente (g/kg) da matéria seca, energia bruta, proteína bruta, fibra bruta, lipídios, cálcio e fósforo, por juvenis tilápia do Nilo, alimentadas com dietas formuladas com baixo ou alto teor de arabinosídeos e β -glucanos, utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores.

Parâmetros ¹	MS	EB	PB	FB	EE	Ca	P	
Baixo ²	Cr ₂ O ₃	0,884	0,904	0,961	0,383	0,868	0,427	0,548
	Celulose	0,850	0,869	0,960	0,473	0,824	0,379	0,498
Alto ³	Cr ₂ O ₃	0,791	0,822	0,938	0,104	0,758	0,062	0,250
	Celulose	0,943	0,951	0,983	0,456	0,934	0,744	0,795
EPM ⁴		0,003	0,003	0,002	0,039	0,041	0,004	0,011
AB		0,001	0,007	0,069	0,001	0,013	0,004	0,001
Indicador		0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001
AB x indicador		0,002	0,006	0,899	0,002	0,086	0,031	0,044

¹Parâmetros, MS, matéria seca, EB, energia bruta, PB, proteína bruta, FB, fibra bruta, EE, extrato etéreo, Ca, cálcio, P, fósforo; Baixo², dieta com baixo teor de arabinosídeos e β -glucanos (AB); Alto³; dieta com alto teor de arabinosídeos e β -glucanos; EPM⁴ - erro padrão da média.

Na Tabela 5 estão representados os desdobramentos das interações fonte e indicador para matéria seca, energia bruta, fibra bruta, cálcio e fósforo. Para os CDA de todos os parâmetros, houve diferenças ($P < 0,05$) entre os indicadores Cr_2O_3 e celulose.

Tabela 5

Desdobramento da interação para os coeficientes de digestibilidade da matéria seca, energia bruta, fibra bruta, cálcio e fósforo, por juvenis de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas formuladas com baixo ou alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos, utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores.

Parâmetros	AB	Indicadores	
		Cr_2O_3	Celulose
Matéria seca	Baixo	0,867Aa	0,837Ab
	Alto	0,867Aa	0,896Bb
Energia bruta	Baixo	0,886Aa	0,863Ab
	Alto	0,885Aa	0,910Bb
Fibra bruta	Baixo	0,428Aa	0,243Ab
	Alto	0,430Aa	0,614Bb
Cálcio	Baixo	0,403Aa	0,244Ab
	Alto	0,403Aa	0,561Bb
Fósforo	Baixo	0,523Aa	0,399Ab
	Alto	0,522Aa	0,646Ab

AB¹, dieta formulada com baixo ou alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si para o fator ingrediente e letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si para o fator indicador (Tukey 5%).

3.2. Digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais

Os valores dos CDA dos aminoácidos essenciais e não essenciais são apresentados na Tabela 6. Observou-se interação entre o teor de AB e indicador utilizado nos CDA dos aminoácidos essenciais da leucina ($P = 0,001$), isoleucina ($P = 0,009$), fenilalanina ($P = 0,006$), treonina ($P = 0,031$), valina ($P = 0,011$). Os melhores CDA foram obtidos nos peixes alimentados com dieta contendo baixo teor de arabinoxilanos e β -glucanos e óxido de cromo como indicador. Não houve interação ($P > 0,05$) para os CDA da arginina, histidina, lisina e metionina. Houve interação nos CDA dos aminoácidos não essenciais alanina ($P = 0,017$) e

tirosina ($P = 0,038$). Os melhores CDA foram obtidos nos peixes alimentados com dieta contendo baixo teor de AB e o óxido de cromo como indicador. Não houve interação para os CDA da cistina ($P = 0,474$), ácido aspártico ($P = 0,107$), ácido glutâmico ($P = 0,250$), glicina ($P = 0,917$), prolina ($P = 0,147$) e serina ($P = 0,495$)

Observou-se efeito do teor de AB sobre os CDA dos aminoácidos não essenciais, alanina ($P = 0,002$), ácido aspártico ($P = 0,017$) e tirosina ($P = 0,003$), com os melhores valores em peixes alimentados com dieta com baixo teor de AB e óxido de cromo como indicador. Não houve efeito para os CDA da cistina ($P = 0,128$), ácido glutâmico ($P = 0,160$), glicina ($P = 0,296$) e serina ($P = 0,112$). Houve efeito ($P < 0,05$) do indicador nos CDA de todos os aminoácidos essenciais e não essenciais, com os maiores valores nos peixes alimentados com dieta contendo alto teor de AB e usando a celulose como indicador.

Observou-se efeito do teor de AB sobre os CDA dos aminoácidos essenciais para arginina ($P = 0,028$), histidina ($P = 0,006$), leucina ($P = 0,001$), isoleucina ($P = 0,003$), metionina ($P = 0,002$), fenilalanina ($P = 0,003$), treonina ($P = 0,003$) e valina ($P = 0,009$). Não foram observados efeitos para os CDA da lisina ($P = 0,079$). Os melhores valores foram observados nos peixes alimentados com dieta contendo baixo teor de AB e utilizando o óxido de cromo como indicador.

Na Tabela 7 estão representados os desdobramentos das interações teor de AB e indicador para leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, valina, alanina e tirosina. Para os CDA e indicador para leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, valina, alanina e tirosina houve diferenças ($P < 0,05$) entre o teor de AB e indicador, com os maiores obtidos nos peixes alimentados com a dieta contendo alto teor de AB e utilizando a celulose como indicador.

Tabela 6

Coefficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos essenciais e não essenciais, por juvenis tilápia do Nilo, alimentadas com dietas formuladas com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos, utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores.

Aminoácidos	Baixo ¹		Alto ²		EPM ²	Valor de <i>P</i>		
	Cr ₂ O ₃	Celulose	Cr ₂ O ₃	Celulose		AB	Indicador	AB x indicador
Essenciais								
Arg	0,987	0,983	0,976	0,994	0,005	0,028	0,004	0,164
His	0,980	0,976	0,965	0,990	0,002	0,006	0,001	0,058
Leu	0,971	0,965	0,950	0,986	0,003	0,001	0,001	0,001
Ile	0,964	0,960	0,940	0,984	0,002	0,003	0,001	0,009
Lys	0,982	0,980	0,970	0,992	0,001	0,079	0,001	0,708
Met	0,988	0,987	0,980	0,995	0,006	0,002	0,001	0,150
Phe	0,971	0,966	0,950	0,976	0,004	0,003	0,001	0,006
Thr	0,948	0,934	0,917	0,985	0,001	0,003	0,001	0,031
Val	0,960	0,952	0,931	0,981	0,002	0,009	0,001	0,011
Não essenciais								
Ala	0,966	0,953	0,946	0,988	0,009	0,002	0,001	0,017
Cys	0,960	0,953	0,932	0,982	0,006	0,128	0,007	0,474
Asp	0,991	0,988	0,984	0,996	0,003	0,017	0,005	0,107
Glu	0,991	0,992	0,987	0,997	0,002	0,160	0,006	0,250
Gly	0,957	0,955	0,931	0,981	0,003	0,296	0,002	0,917
Pro	0,970	0,970	0,953	0,987	0,021	0,460	0,001	0,147
Ser	0,973	0,969	0,954	0,988	0,001	0,112	0,003	0,495
Tyr	0,971	0,965	0,961	0,986	0,003	0,003	0,001	0,038

Baixo¹, dieta com baixo teor de arabinosilanos e β -glucanos (AB); Alto²; dieta com alto teor de arabinosilanos e β -glucanos; EPM³ - erro padrão da média.

Tabela 7

Desdobramento da interação para os coeficientes de digestibilidade dos aminoácidos leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, valina, alanina e tirosina, por juvenis tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo baixo e alto teor de arabinosilanos e β -glucanos utilizando óxido de cromo e celulose como indicadores.

Parâmetros	AB ¹	Indicadores	
		CR ₂ O ₃	Celulose
Leu	Baixo	0,968Aa	0,960Aa
	Alto	0,969Aa	9,975Ba
Ile	Baixo	0,962Aa	0,952Aa
	Alto	0,960Aa	0,972Ba
Phe	Baixo	0,968Aa	0,960Aa
	Alto	0,963Aa	0,971Ba
Thr	Baixo	0,941Aa	0,932Aa
	Alto	0,951Aa	0,952Ba
Val	Baixo	0,951Aa	0,945Aa
	Alto	0,956Aa	0,966Ba
Ala	Baixo	0,959Aa	0,956Aa
	Alto	0,967Aa	0,970Ba
Tyr	Baixo	0,968A	0,966Aa
	Alto	0,973A	0,975Ba

AB¹, dieta formulada com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si para o fator ingrediente e letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si para o fator indicador (Tukey 5%).

4. Discussão

4.1. Digestibilidade da energia e dos nutrientes

No presente estudo, peixes alimentados com dieta contendo baixo teor apresentaram maiores CDA da matéria seca, energia bruta, fibra bruta, extrato etéreo, cálcio e fósforo em relação aos peixes que consumiram dieta com alto teor de AB.

Os valores dos CDA da energia e dos nutrientes da dieta com alto teor de AB estão relacionados com a quantidade de fibra, teor de amido dos cereais, teor de amilose e amilopectina, e teor de fibra bruta, os AB pioram os CDA devido a influência desses

constituintes sobre a taxa de passagem, viscosidade da digesta, menor atuação das enzimas digestivas, interferindo na absorção dos nutrientes (Madar e Thorne 1987).

Em relação aos CDA obtidos na dieta baixo teor de AB, os menores CDA da energia bruta, cálcio e fósforo da dieta com alto teor de AB também estão associados com altos teores de PNA dessa dieta. O maior conteúdo de AB presentes no trigo em relação ao milho, atuam negativamente na digestibilidade da energia e a menor disponibilidade de minerais já que aumentam a viscosidade da digesta e diminuem a ação das enzimas endógenas sobre os substratos e conseqüentemente a absorção dos nutrientes (Zijlstra et al., 2010). Os PNA também atuam, prejudicando a saúde intestinal e desempenho dos animais (Castillo e Gatlin III, 2015).

Foram observados valores elevados da utilização da fração fibrosa da dieta com baixo e alto teor de AB quando o óxido de cromo foi utilizado como indicador. Zhou et al. (2013) relataram alterações nas espécies de bactérias e densidade da microbiota intestinal de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) alimentadas com dietas suplementadas com celulase. Os efeitos da adição de carboidrases sobre a composição da comunidade bacteriana do intestino já foram demonstrados em tilápias do Nilo (Pedrotti et al., 2015). Os resultados do presente trabalho evidenciam a necessidade de estudos para quantificar a digestibilidade da fibra em tilápias alimentadas com dietas que possuem diferentes teores de AB com adição de carboidrases relacionando os resultados com a microbiota intestinal.

A superestimação da fibra bruta com o uso da celulose como indicador pode estar relacionado com a capacidade da tilápia do Nilo em degradar frações da fibra bruta. A presença de carboidrases endógenas pode interferir na recuperação do indicador e conseqüentemente nos CDA da energia e dos nutrientes. Taniguchi e Takano (2004) observaram alta atividade de β -galactosidases nas partes anterior e média do intestino de tilápia do Nilo, com capacidade de degradar vários polissacarídeos. A microbiota intestinal produz enzimas que atuam sobre substratos de difícil digestão como a celulose (Smith, 1989). As fontes de carboidratos dietéticos utilizados em dietas para peixes apresentam variação na estrutura das paredes celulares que envolve o amido, viscosidade da digesta e atividade de fermentação microbiana interferindo nos CDA dos nutrientes (Bach Knudsen, 2001).

Foram observados melhores resultados de CDA da energia e nutrientes quando o óxido de cromo foi utilizado como indicador. Comparando-se com dados da literatura, no presente trabalho foram observados valores superestimados de CDA quando celulose foi

utilizada como indicador. A utilização de celulose como indicador resultou em valores superestimados dos CDA da matéria seca, energia bruta, fibra bruta, cálcio, fósforo e dos aminoácidos essenciais e não essenciais, devido ao teor de arabinosilanos e β -glucanos. A ausência de interação nos CDA da proteína bruta e extrato etéreo está relacionada com a elevada atuação das enzimas endógenas sob esses substratos no intestino.

4.2. *Digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais*

No presente estudo, os CDA dos aminoácidos essenciais e não essenciais foram melhores em peixes que consumiram a dieta com baixo teor de AB, comprovando o efeito antinutricional desses PNA em dietas para peixes. Esses resultados estão relacionados com o menor teor de fibra das dietas, sendo necessário o uso de enzimas exógenas para maximizar a digestibilidade dos aminoácidos em peixes alimentados com dietas conteúdo elevados teores de PNA. As tilápias possuem bom aproveitamento dos aminoácidos e amido e a adição de carboidrases permite hidrólise das frações de AB maximizando o aproveitamento energético e proteico (Oliveira et al., 2007).

O menor teor de AB da dieta permite melhor degradação das frações de polissacarídeos presentes na parede celular dos ingredientes. Entretanto, na dieta a com alto teor de AB as enzimas endógenas não conseguem degradar completamente esses PNA que acabam interferindo negativamente na digestibilidade dos aminoácidos e desempenho dos peixes. A elevada taxa de crescimento dos peixes durante a fase juvenil, está diretamente relacionada à deposição de tecido muscular, os aminoácidos estão relacionados diretamente com crescimento e eficiência de utilização da proteína (aminoácidos) (Castillo e Gatlin III, 2015).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tipo de indicador utilizado nos ensaios de digestibilidade pode influenciar nos resultados dos CDA da energia e nutrientes. O teor de AB da dieta interfere nos CDA da energia, proteína, aminoácidos e minerais, evidenciando a importância de estudos de digestibilidade com o uso de carboidrases para melhorar os CDA da energia e dos nutrientes de dietas para tilápias do Nilo.

5. Conclusão

A celulose não é recomendada como indicador para determinar os coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes, independente do teor de arabinosilanos e β -glucanos em dietas para tilápias do Nilo.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores agradecem à BASF – Ludwigshafen an Rhein, Alemanha, pela doação da enzima e análises laboratoriais.

Referências

- Adeoye, A.A., Jaramillo-Torres, A., Fox, S.W., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2016. 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. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.002>
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. 1995. Official methods of analysis, 16th ed. AOAC Int., Arlington, VA. 1995.
- Austreng, E., 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture* 13, 266–272.
- Bach Knudsen, K.E., 2001. The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal Feed Science and Technology* 90, 3–20. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00193-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00193-6)
- Bremer Neto, H., Augusto, C., Graner, F., Pezzato, L.E., Padovani, C.R., 2005. Determinação de rotina do cromo em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1, 5-difenilcarbazida 35, 691–697.
- Burr, G., Gatlin, D., Ricke, S., 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in Finnish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 36, 425-435. h
- Castillo, S., Gatlin III, D.M., 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture* 435, 286–292.
- Classen, H.L., 1996. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. *Animal*

- Feed Science and Technology 62, 21–27. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01002-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01002-4)
- Corbett, B.Y.J.L., Greenhalgh, J.F.D., McDonald, I., Florence, E., 1960. Excretion of chromium sesquioxide administered as a component of paper to sheep. *British Journal of Nutrition Society* 14, 289–299.
- Da, C.T., Lundh, T., Lindberg, J.E., 2013. Digestibility of dietary components and amino acids in plant protein feed ingredients in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 19, 619–628. <https://doi.org/10.1111/anu.12011>
- Dourado, L.R.B., Siqueira, J.C., Sakomura, N.K., Pinheiro, S.R.F., Marcato, S.M., Fernandes, J.B.K., Silva, J.H., 2010. Poultry Feed Metabolizable Energy Determination. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 12, 129–132.
- Englyst, H., 1989. Classification and measurement of plant polysaccharides. *Animal Feed Science and Technology* 23, 27–42. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(89\)90087-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(89)90087-4)
- Fabregat, T.E.H.P., Fernandes, J.B.K., Rodriguez, L.A., Borges, T.S.P., Nascimento, T.M.T., 2008. Digestibilidade aparente da energia e da proteína de ingredientes selecionados para juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais* 6, 459–464.
- Högberg, A., Lindberg, J.E., 2004. Influence of cereal non-starch polysaccharides and enzyme supplementation on digestion site and gut environment in weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology* 116, 113–128.
- Huisman, M.M.H., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 1998. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterisation. *Carbohydrate Polymers* 37, 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00111-2)
- Krontveit, R.I., Bendiksen, E.Å., Aunsmo, A., 2014. Field monitoring of feed digestibility in Atlantic salmon farming using crude fiber as an inert marker. *Aquaculture* 426–427, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.015>
- Madar, Z., Thorne, R., 1987. Dietary fiber. *Progress in Food and Nutrition Science* 11, 153–174.
- Malathi, V., Devegowda, G., 2001. In vitro evaluation of nonstarch polysaccharide digestibility of feed ingredients by enzymes. *Poultry Science* 80, 302–305. <https://doi.org/10.1093/ps/80.3.302>
- National Research Council - NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academy Press, Washington, DC, USA. 2011.

- Oliveira, G.R., Logato, P.V.R., De Freitas, R.T.F., Rodrigues, P.B., Fialho, E.T., Diodatti, F.C., 2007. Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36, 1945–1952.
- Owens, F.N., Hanson, C.F., 1992. Symposium : external and internal markers external and internal markers for appraising site and extent. *Journal of Dairy Science* 2605–2617. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78023-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78023-0)
- Pedrotti, F.S., Davies, S., Merrifield, D.L., Marques, M.R.F., Fraga, A.P.M., Mouriño, J.L.P., Fracalossi, D.M., 2015. The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research* 46, 472–481. <https://doi.org/10.1111/are.12195>
- Pezzato, L.E., da Silva, R.L., de Araújo, E.P., Rocha, M.K.H.R., Damasceno, F.M., de Freitas, J.M.A., Sartori, M.M.P., de Lima Meirelles, P.R., Barros, M.M., 2017. Diet components as internal indicators in the determination of the apparent digestibility coefficients for Nile tilapia. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 52, 393–400. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017000600003>
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C. De, Gabriel, L., Pinto, Q., Furuya, W.M., Barros, M.M., Magalhães, G.J., Arruda, E., Lanna, T., 2002. Avaliação de dois métodos de determinação do coeficiente de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Scientiarum* 965–971.
- Smith, L.S., 1989. Digestive functions in teleost fishes. In *Fish nutrition*, 2nd edn, (Halver, J. E., eds),.pp. . San Diego, CA: Academic press 2, 331–421.
- Steenfeldt, S., Knudsen, K.E., Borsting, C., Eggum, B., 1995. the Nutritive-Value of Decorticated Mill Fractions of Wheat .2. Evaluation With Raw and Enzyme-Treated Fractions Using Adult Cockerels. *Animal Feed Science and Technology* 54, 249–265.
- Taniguchi, A.Y., Takano, K., 2004. Purification and properties of beta-galactosidase from Tilapia intestine: Digestive enzyme of Tilapia-X. *Fisheries Science* 70, 688–394. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2004.00858.x>
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vidal, M.V., Donzele, J.L., De Andrade, D.R., Dos Santos, L.C., 2004. Determinação da

digestibilidade da matéria Seca e da proteína bruta do fubá de milho e do farelo de soja para tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizando-se técnicas com uso de indicadores internos e externos. Revista Brasileira de Zootecnia 33, 2193–2200. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000900003>

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

Zijlstra, R.T., Owusu-Asiedu, A., Simmins, P.H., 2010. Future of NSP-degrading enzymes to improve nutrient utilization of co-products and gut health in pigs. Livestock Science 134, 255–257. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.07.017>

III - Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de dietas contendo baixo e alto teor de arabinosilanos e β -glucano com adição de xilanase e β -glucanase para juvenis de tilápias do Nilo

RESUMO: Este estudo foi realizado para determinar os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da energia, proteína bruta, aminoácidos, lipídios e minerais de dietas com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucano (AB), sem ou com xilanase e β -glucanase (XB) para juvenis de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Noventa e seis juvenis de tilápias do Nilo ($60,0 \pm 1,4$ g) foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2×2 , com duas repetições, avaliando dois teores de AB (baixo ou alto) e dois níveis de XB (0 ou 0,2 g/kg). Os peixes foram distribuídos em aquários de digestibilidade (150 L) e as fezes foram coletadas pelo sistema modificado de Guelph durante 21 dias. Houve interação entre o teor de AB e enzima sobre os CDA da matéria seca ($P = 0,007$), cálcio ($P = 0,033$) e fósforo ($P = 0,048$) e os maiores CDA foram obtidos em peixes que consumiram a dieta com baixo teor de AB. Houve efeito ($P < 0,05$) da adição de XB sobre os CDA da energia e nutrientes. Os maiores CDA da matéria seca, energia bruta, proteína bruta, fibra bruta e cálcio foram observados em peixes alimentados com dieta com alto teor de AB com XB. Não foi observada interação ($P > 0,05$) entre o teor de AB e adição de XB sobre os CDA dos aminoácidos essenciais e não essenciais. Foi observada diferença para o teor de AB sobre os CDA da histidina ($P = 0,023$) e valina ($P = 0,002$), em que os maiores resultados foram obtidos nos peixes alimentados com baixo teor de AB em relação aos peixes alimentados com alto teor de AB. Observou-se efeito da adição de XB no CDA valina ($P = 0,025$) e os melhores CDA foram observados em peixes alimentados com baixo teor de AB sem adição de XB. Não foi observado efeito da adição de XB sobre os CDA da arginina ($P = 0,377$), histidina ($P = 0,073$), leucina ($P = 0,138$), isoleucina ($P = 0,133$), lisina ($P = 0,192$), metionina ($P = 0,816$), fenilalanina ($P = 0,130$) e treonina ($P = 0,133$). A adição de xilanase e β -glucanase melhora os coeficientes de digestibilidade aparente da energia e dos nutrientes de dietas formuladas com alto teor de arabinosilanos e β -glucanos.

Palavras-chave: aminoácidos, enzimas exógenas, glucanase, parede celular, polissacarídeos não amiláceos.

Abreviações: AB, arabinosilanos e β -glucanos; CDA, coeficientes de digestibilidade aparente; PNA, polissacarídeos no amiláceos; XB, xilanase e β -glucanase.

III - Apparent digestibility of energy and nutrients from diets containing low and high content of arabinoxylans and β -glucan with xylanase and β -glucanase addition for Nile tilapia juveniles

ABSTRACT: This study was carried out to determine the apparent digestibility coefficients (ADC) of energy, crude protein, amino acids, lipids and minerals in diets with low or high arabinoxylans and β -glucan content, without or with xylanase and β -glucanase (XB) for Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus*. Ninety-six Nile tilapia juveniles (60.0 ± 1.4 g) were distributed in a completely randomized design in a 2 x 2 factorial scheme, with two replicates, evaluating two AB levels (low or high) and two XB levels (0 or 0.2 g / kg). The fish were distributed in digestibility aquaria (150 L each) and the feces were collected by the modified Guelph system for 21 days. There was interaction between AB content and enzyme on the ADC of dry matter ($P = 0.007$), calcium ($P = 0.033$) and phosphorus ($P = 0.048$), and higher ADC were observed in fish fed with high AB content with XB. There was XB effect ($P < 0.05$) on energy and nutrients ADC and the best ADC values of dry matter, crude energy, crude protein, crude fiber and calcium were observed in fed wheat-based diets with XB. No interaction ($P > 0.05$) was observed between the AB content and XB addition on the ADC of essential and non-essential amino acids. A difference was observed for AB content on the histidine ($P = 0.023$) and valine ($P = 0.002$) ADC, in which the highest results were obtained in fish fed with low AB content in relation to high AB content. There was XB addition effect on valine ADC ($P = 0.025$) and the best ADC were observed in fish fed with low AB content without XB addition. No XB addition effect was observed for arginine ($P = 0.377$), histidine ($P = 0.073$), leucine ($P = 0.138$), isoleucine ($P = 0.133$), lysine ($P = 0.192$), methionine ($P = 0.816$), phenylalanine ($P = 0.130$) and threonine ($P = 0.133$). The xylanase and β -glucanase addition improves the apparent energy and nutrients digestibility coefficients diets formulated with high arabinoxylans and β -glucans content.

Key words: amino acids, exogenous enzymes, glucanase, cell wall, non-starch polysaccharides.

Abbreviations: AB, arabinoxylans and β -glucans; ADC, coefficients of apparent digestibility; NSP, non-starch polysaccharides, XB, xylanase and β -glucanase.

1. Introdução

A soja, o milho e o trigo e os coprodutos têm sido utilizados para elaborar dietas mais econômicas e sustentáveis para tilápias (Vidal et al. 2015, 2017). Entretanto, possuem polissacarídeos não amiláceos (PNA) que exercem efeitos fisiológicos negativos sobre a digestão e absorção dos nutrientes, com implicações sobre o desempenho produtivo e saúde dos peixes (Zijlstra et al., 2010).

O aumento da viscosidade do quimo no intestino, reduz a atividade das enzimas digestivas sobre os nutrientes, com particular importância sobre a diminuição da digestibilidade da gordura pela inativação dos sais biliares e aumento na secreção pancreática de enzimas (Classen, 1996), reduzindo o valor energético dos alimentos. Além disso, os PNA causam aumento da viscosidade intestinal, que conseqüentemente resulta em taxa reduzida de digestão, absorção de nutrientes e redução do consumo (Zijlstra et al., 2010) e comprometem o desempenho dos animais (Conte et al., 2003).

Os arabinoxilanos e β -glucanos de ligação mista são os principais componentes das paredes celulares das plantas e não são digeridos pelos peixes (Adeoye et al., 2016). Os arabinoxilanos, que são constituídos de arabinoses e xiloses, são os principais PNA presentes no milho. Na soja, os arabinoxilanos constituem 4,21% dos PNA (Malathi e Devegowda 2001), enquanto o trigo apresenta 8,3 e 9,8% de PNA, sendo os arabinoxilanos os seus principais constituintes, compreendendo 50% deste total (Henry, 1987; Steinfeldt et al., 1995).

O uso de enzimas microbianas na alimentação animal é a forma mais eficiente para melhorar o aproveitamento do carboidrato dos cereais e leguminosas ricos em PNA (Classen, 1996). Enzimas exógenas como xilanases e β -glucanases são capazes de degradar alguns componentes da parede celular da planta, reduzindo seu peso molecular (Adeoye et al., 2016) e a viscosidade do intestino (Zijlstra et al. 2010; Bedford e Cowieson 2012), melhorando os coeficientes digestibilidade aparente (CDA) da energia e nutrientes (Gomes et al., 2018).

Nos últimos anos, as enzimas exógenas foram utilizadas para aumentar a disponibilidade dos nutrientes de alimentos de origem vegetal em dietas para peixes. Entretanto, os resultados obtidos ainda são inconsistentes (Adeola e Cowieson 2011; Kumar et al. 2012; Castillo e Gatlin 2015), pelo o nível de adição e teor de PNA na dieta, principalmente arabinoxilanos e β -glucanos. Com os avanços na nutrição de tilápias, torna-se importante a aplicação do conceito de “Nutrição de Precisão”, havendo

necessidade de determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da energia e nutrientes, incluindo aminoácidos, para elaborar de dietas comerciais que atendam às exigências nutricionais. Além disso, com a utilização de carboidrases, há melhoria do valor nutritivo da dieta, contribuindo para melhorar a resposta econômica da criação de tilápias de forma ambientalmente sustentável. Assim, a presente pesquisa foi realizada com o objetivo de determinar os CDA da energia e nutrientes de dietas com diferentes teores arabinosilanos e β -glucanos, com ou sem adição de xilanase e β -glucanase para juvenis de tilápias do Nilo.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa-PR. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, com Certificado Experimental para o uso de Animais em Pesquisa-CEUA, sob o protocolo 879/2018.

2.1. Dietas experimentais

As dietas foram misturadas, moídas e extrusadas no Laboratório de Nutrição de Peixes (AquaNutri, Botucatu, SP, Brasil). A moagem foi realizada em moinho centrífugo em peneiras de 0,8 mm (Viera MC 680B), Tatuí, SP, Brasil) e extrusadas em extrusora de rosca simples com matriz de 3 mm com um furo, três “facas” com rotação de 40/min e temperatura de 105°C (Exteec EX30, Ribeirão Preto, SP, Brasil), obtendo grânulos com diâmetros de 4 a 5mm e secas em estufa de ventilação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, SP, Brasil) 55°C, durante 24 horas. As dietas experimentais foram formuladas com base em alimentos de origem vegetal tendo milho ou trigo como principais fontes de energia, com diferentes níveis de arabinosilanos e β -glucanos (Tabela 1) e para atender às exigências dietéticas de juvenis de tilápias do Nilo (NRC, 2011), conforme descrito nas Tabelas 2 e 3. As dietas foram elaboradas com base em valores de composição dos alimentos previamente analisadas e confirmadas por análises das dietas após extrusão e secagem.

Tabela 1

Composição das dietas experimentais (g/kg).

Ingredientes	Baixo ¹	Alto ²
	0/0,2	0/0,2
Milho	489,40	0,00
Farelo de Soja	399,00	295,00
Farinha de Peixe	80,00	80,00
Farinha de Trigo	0,00	579,00
Amido de Milho	0,00	7,70
DL-Metionina	2,50	2,70
L-Lisina	2,00	5,00
L-Treonina	0,00	0,90
L-Histidina	2,00	2,70
L-Triptofano	0,10	0,00
Fosfato Bicálcico	14,20	16,00
Sup. min. e vitamínico ³	5,00	5,00
Antioxidante	0,20	0,20
Antifúngico ⁴	1,00	1,00
Natugrain ⁵	0,00	0,20
Sal	3,50	3,50
Cr ₂ O ₃	1,10	1,10
Total	1000	1000

¹Dieta com baixo teor de AB sem ou com adição de 0,2 g/kg de xilanase e β -glucanase;

²Dieta com alto teor de AB, sem ou com adição de xilanase e β -glucanase; ³Misturas de minerais e vitaminas (composição por kg de dieta): vitamina A, 600 UI; vitamina D3, 1,000 UI; vitamina E, 60 mg; vitamina K₃, 12 mg; vitamina B₁, 24 mg; vitamina B₂, 24 mg; vitamina B₆, 20 mg; vitamina B₁₂, 24 mg; ácido fólico, 6 mg; Pantotenato D-cálcio, 60 mg; ácido ascórbico, 240 mg; biotina, 0,24 mg; colina, 325 mg; ácido nicotínico, 120 mg; ferro, 50 mg; sulfato de cobre, 3 mg; sulfato de manganês, 20 mg; sulfato de zinco, 30 mg; iodeto de potássio, 0,1 mg; selênio, 0,1mg; ^cAntioxidante - Banox[®] (Alltech Agroindustrial Ltda, São Paulo, Brasil); ⁴Antifúngico, Mold Zap Aquática[®], composição: dipropionato de amônio, ácido acético, ácido sórbico e ácido benzoico (Alltech Agroindustrial Ltda, São Paulo, Brasil); ⁵Natugrain[®], complexo enzimático constituído por endo-1,4-beta-xilanase (5600 TXU/g) e endo-1,4-beta-glucanase (2500 TGU/g), fornecida pela empresa BASF.

Foi adicionado na dieta 0,20 g/kg de xilanase e β -glucanase líquida (Natugrain[®], Basf, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha), complexo enzimático constituído por endo-1,4-beta-xilanase 5600 TXU/g e endo-1,4-beta-glucanase 2500 TGU/g. Preparou-se uma solução “mãe” em que se diluiu 10 ml de Natugrain[®] em 990 ml de água destilada, em seguida adicionou-se 20 ml da solução mãe em 300 ml de água destilada, essa foi

aspergida *on top* na dieta de forma parcelada e homogênea. Posteriormente a ração foi seca em estufa com circulação forçada de ar (HexisHX00) Jundiaí, SP, Brasil) a 42°C por 2 horas.

Tabela 2

Composição analisada das dietas experimentais (g/kg, base na matéria seca).

Nutrientes	Baixo ¹	Alto ²
	0/0,2	0/0,2
Matéria seca	941,40	940,60
Energia bruta (kcal/g)	4503,01	4.491,32
Proteína bruta	314,21	314,20
Lipídios brutos	38,35	37,10
Fibra bruta	33,70	54,13
Cinza	68,00	68,20
Cálcio	12,90	13,75
Fósforo	10,50	11,55
Arabinosilanos	37,36	54,69
β-glucanos	0,49	5,79
Viscosidade (pa. s) ³	103/71	155/61
⁴ TXU/0,20 g	ND/1131,99	ND/1128,99
⁵ TGU/0,20 g	ND/512,47	ND/510,97
Óxido de Cromo	10,48	10,79

¹Dieta com baixo teor de AB sem ou com adição de 0,2 g/kg de xilanase e β-glucanase;

²Dieta com alto teor de AB, sem ou com adição de xilanase e β-glucanase; ³Viscosidade (pa.s), viscosidade absoluta das dietas na taxa de cisalhamento de 1 a 23 minutos, com temperatura de 0 a 100°C. ⁴TXU, unidades de Endo-1,4-beta-xilanase termostável (5.600 TXU/g) e ⁵TGU, unidades de endo-1,4-beta-glucanase termostável (2500 TGU/g), fornecida pela empresa BASF: ND⁶, atividade enzimática não detectada. Os valores de arabinosilanos e β-glucanos foram calculados de acordo com Englyst (1989) e Huisman et al. (1998).

Tabela 3

Composição analisada de aminoácidos essenciais e não essenciais das dietas contendo baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos, com ou sem adição de xilanase e glucanase (g/kg, base na matéria seca).

Aminoácidos	Baixo ¹	Alto ²
	0/02	0/0,2
Essenciais		
Arg	20,45	19,50
His	9,90	10,05
Isso	12,75	11,85
Leu	25,60	22,10
Lys	19,50	20,35
Met	6,95	7,10
Phe	14,70	14,15
Thr	11,10	11,05
Val	13,25	12,55
Não essenciais		
Ala	16,45	14,20
Asp	27,60	23,35
Cys	4,65	3,90
Glu	51,20	61,20
Gly	16,75	17,15
Pro	18,80	21,90
Ser	15,45	15,30
Tyr	9,45	9,00

¹Dieta com baixo teor de AB sem ou com adição de 0,2 g/kg de xilanase e β -glucanase;

²Dieta com alto teor de AB, sem ou com adição de xilanase e β -glucanase.

2.2. Peixes e condições experimentais

Foram adquiridos 1000 alevinos de tilápia do Nilo (Aquabel, Rolândia, PR, Brasil), com peso inicial médio de $1,5 \pm 0,3$ g, distribuídos em tanques-rede de 1 m^3 ($1 \times 1 \times 1 \text{ m}$) com tela plástica interna (malha com furos de 4 mm) e alimentados com dieta comercial micro extrusada (0,4 mm diâmetro) com 45% de proteína bruta durante 70 dias, até atingirem 40 g de peso corporal. Em seguida, 300 juvenis de tilápias foram transferidos para o Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Ponta Grossa e adaptados às instalações e manejo durante quinze dias. Durante o período de adaptação, foram alimentados com as respectivas dietas experimentais, quatro vezes por dia e até saciedade aparente. Noventa e seis juvenis de tilápias do Nilo com peso inicial de ($60,0 \pm 1,4$ g), foram distribuídos em delineamento em esquema fatorial 2×2 , com duas repetições,

sendo dois teor de AB (baixo ou alto), sem ou com adição de xilanase e β -glucanase (0,2 g/kg).

Os peixes foram distribuídos em oito gaiolas cilíndricas (50 L cada), confeccionados com cloreto de polivinil (malha de 1,5 cm entre nós), mantidas em aquários de alimentação (150 L cada) com aeração de forma a manter o oxigênio dissolvido entre 6,0 a 6,2 mg/L e aquecedor acoplado a termostato para manter a temperatura entre 27 a 28 °C.

Durante o dia, os peixes foram mantidos nos aquários de alimentação, e receberam seis refeições diariamente (8h, 10h, 11h, 15h, 16h e às 17h). Em seguida, os peixes foram transferidos para os aquários de coleta de fezes, onde permaneceram até a manhã do dia subsequente. Para coleta das amostras de fezes, foram utilizados oito aquários cônicos (150 L cada) confeccionados em fibra de vidro, com coletor de fezes e mantidos com água com os mesmos teores de oxigênio e temperatura dos aquários de coleta. A oxigenação dos aquários de coleta e digestibilidade foi realizada por meio de sistema com pedras micro porosas acopladas a mangueiras de silicone com ar fornecido por meio de compressor de ar radial de 0,5 CV (JKW002, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) mantendo o teor de oxigênio dissolvido entre 6,0 e 6,5 mg/L. Após a transferência dos peixes para os aquários de coleta de fezes, efetuava-se a limpeza dos aquários de alimentação e após a coleta de fezes realizava-se a limpeza dos aquários de coleta, com substituição de toda água dos aquários (Pezzato et al., 2002).

O período de coleta de fezes foi de 21 dias. As fezes coletadas foram secas em estufas de ventilação forçada de ar (HexisHX00) Jundiaí, SP, Brasil) a 55°C por 48 horas, moídas em um moinho de bolas e armazenadas a -20 °C, para posteriores análises laboratoriais (CBO, Valinhos, SP, Brasil).

Cada aquário possuía sistema de aquecimento e oxigenação individual e constante, a temperatura foi controlada com aquecedor acoplado a um termostato mantendo a temperatura a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Aeração consistiu de um sistema com mangueiras de silicone com pedras micro porosas acoplada a um compressor de ar central de 0,5 CV mantendo o teor de oxigênio dissolvido entre 6,0 e 6,5 mg/L.

Os parâmetros de qualidade de água: oxigênio dissolvido (mg/L) e temperatura (°C) foram monitorados diariamente com uma sonda multi-parâmetro (YSI® 550A, Florianópolis, SC, Brasil). Semanalmente, foram determinados o pH ($6,5 \pm 0,05$) com pHmetro de bancada (TEC-2, Tecnal®, Piracicaba, SP, Brasil) e a amônia tóxica ($0,001 \pm$

0,000 ppm), nitrito ($0,001 \pm 0,000$ ppm) e nitrato ($0,001 \pm 0,000$ ppm) foram analisados com kit (Alfakit[®], Florianópolis, SC, Brasil).

2.3. Viscosidade das dietas experimentais

As análises de viscosidade absoluta das dietas foram realizadas com registros de dados comuns de temperatura ($50 - 100^{\circ}\text{C}$) com uma taxa de aquecimento de 6°C por minuto, mantendo um platô de 95°C durante 5 minutos, rotação (160 rpm) e tempo (0 – 23 minutos), e dados variáveis de torque (%), no viscosímetro rotacional Brookfield DV-II + PRO (Newport Scientific, Narabeen, Austrália) de acordo com (Demiate et al., 2005; Zortéa et al., 2011).

2.4. Análises laboratoriais e cálculos de digestibilidade

As análises de matéria seca (método 934,01), matéria mineral (método 942,05), nitrogênio (método 981,10), sendo a proteína bruta calculada pelo percentual de nitrogênio multiplicado por 6,25, extrato etéreo (método 920,85) e fibra bruta (método 991,43) das dietas experimentais foram determinadas de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). O teor de óxido de cromo das dietas e fezes foram determinados de acordo com (Bremer Neto et al., 2005). As análises foram realizadas na "CBO Análises Laboratoriais" (Campinas, São Paulo, Brasil).

Os cálculos dos valores digestíveis dos nutrientes e energia foram calculados pela relação entre a composição química das dietas e os CDA dos nutrientes e energia de cada dieta. Os CDA da matéria seca, nutrientes, energia, aminoácidos e minerais foram determinados pelo método indireto usando o óxido de cromo (Cr_2O_3) como indicador, levando em consideração o teor de (Cr_2O_3) da ração e das fezes, de acordo com a equação estabelecida previamente (Austreng, 1978).

$$CDA_{(n)} = 100 - \left[100 \left(\frac{\%Cr_2O_{3D}}{\%Cr_2O_{3f}} \right) x \left(\frac{\%N_f}{\%N_D} \right) \right]$$

Em que:

$CDA_{(n)}$ = Digestibilidade aparente da energia ou nutriente;

Cr_2O_{3D} = % de óxido de cromo na dieta;

Cr_2O_{3f} = % de óxido de cromo nas fezes;

N_D = Energia ou nutrientes na dieta;

N_f = Energia ou nutriente nas fezes.

2.5. Análise estatística

As variáveis consideradas foram analisadas de acordo com o modelo matemático: $Y_{ijk} = U + D_i + E_j + D_{Eij} + eijk$, em que: Y_{ijk} = observação k, nos peixes que receberam a dieta com baixo teor de AB i e alto teor de AB j ; U = média geral; D_i = efeito do teor de AB i ; E_j = efeito do nível da enzima j ; D_{Eij} = efeito da interação teor de AB i x enzima j ; $eijk$ = erro aleatório a cada observação. Foi feito o teste de normalidade dos dados, utilizando o teste do Shapiro-Wilk, análise de homocedasticidade (igualdade de variância) usando o teste de Brown Forsythe, feito a análise paramétrica dos dados da ANOVA, em caso de teste F significativo para a interação (teor de AB x enzima) foi realizado desdobramento fatorial com comparação das médias pelo teste de Tukey com $\alpha = 0,05$, de acordo com os Proc GLM do *Statistical Analysis System* (Versão, 9.0).

3. Resultados

3.1. Digestibilidade da energia e dos nutrientes

Houve interação significativa entre o teor de AB e a adição enzimática nos CDA da matéria seca ($P = 0,007$), cálcio ($P = 0,003$) e fósforo ($P = 0,048$). A adição de XB melhorou os CDA da matéria seca (0,805 vs 0,791), cálcio (0,131 vs 0,117) e fósforo (0,287 vs 0,293) da dieta com alto teor de AB, obtendo-se resultados similares aos peixes que foram alimentados com dieta com baixo teor de AB sem a adição de XB (Tabela 4).

Observou-se diferença entre a dieta formulada com baixo e alto teor de AB para os CDA da matéria seca ($P < 0,001$), energia bruta ($P = 0,002$), proteína bruta ($P = 0,048$), fibra bruta ($P = 0,007$), lipídeos totais ($P = 0,024$), cálcio ($P = 0,003$) e fósforo ($P = 0,001$), em que os maiores CDA foram obtidos em peixes alimentados com dieta com baixo teor de arabinoxilanos e β -glucanos.

Observou-se diferença para a adição de XB sobre os CDA da matéria seca ($P = 0,003$), energia bruta ($P = 0,011$), proteína bruta ($P = 0,008$), fibra bruta ($P = 0,006$), lipídeos totais ($P = 0,048$), cálcio ($P = 0,006$) e fósforo ($P = 0,004$) em que os melhores valores foram observados nos peixes alimentados com a dieta contendo alto teor de AB e com adição de adição de XB.

Tabela 4

Coefficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes, matéria seca, energia bruta, cálcio e fósforo, por juvenis de tilápias do Nilo alimentadas, com dietas contendo baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos, com ou sem adição de xilanase e glucanase.

Parâmetros ¹		MS	EB	PB	FB	EE	Ca	P
Baixo ²	0	0,791	0,822	0,941	0,048	0,807	0,117	0,293
	0,2	0,821	0,852	0,938	0,075	0,808	0,112	0,280
Alto ³	0	0,778	0,804	0,939	0,206	0,750	0,076	0,243
	0,2	0,805	0,834	0,942	0,232	0,799	0,131	0,287
EPM ⁴		0,002	0,002	0,003	0,064	0,110	0,012	0,011
AB		<,001	0,002	0,048	0,001	0,024	0,003	0,001
Enzima		0,003	0,011	0,008	0,006	0,048	0,006	0,004
AB x Enzima		0,007	0,183	0,496	0,950	0,591	0,033	0,048

¹Parâmetros, MS, Matéria seca, EB, energia bruta, PB, proteína bruta, FB, fibra bruta, EE, extrato etéreo, Ca, cálcio, P, fósforo; ²Dieta com baixo teor de arabinosilanos e β -glucanos (AB), sem ou com adição de 0,2 g/kg de xilanase e β -glucanase; ³Dieta com alto teor de arabinosilanos e β -glucanos, sem ou com adição de xilanase e β -glucanase; ⁴EPM, erro padrão da média.

Na Tabela 5 estão representados os desdobramentos das interações fonte e enzima para matéria seca, cálcio e fósforo. Com os melhores valores observados nos peixes que foram alimentados com a dieta com alto teor de AB com a adição de XB.

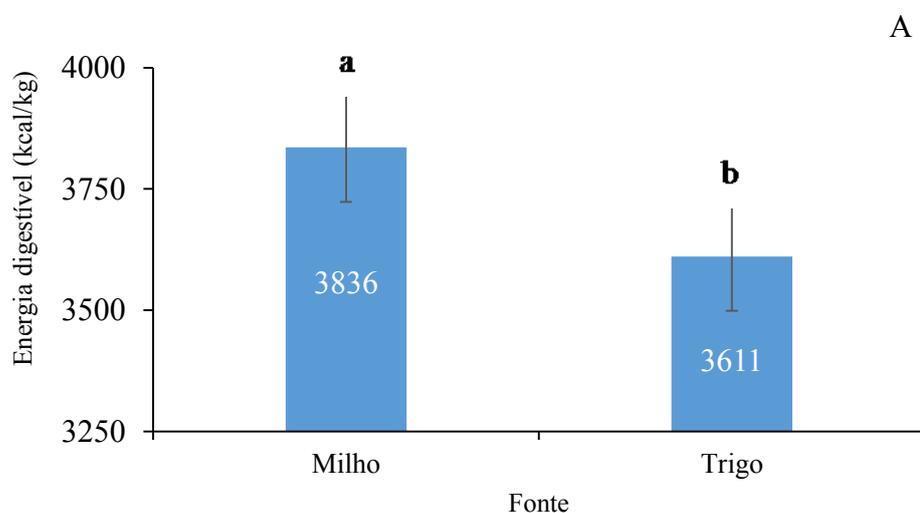
Tabela 5

Desdobramento da interação para os coeficientes de digestibilidade da matéria seca, cálcio e fósforo, por juvenis de tilápias do Nilo alimentadas, com dietas contendo baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos, com ou sem adição de xilanase e glucanase.

Parâmetros	AB ¹	Xilanase e β -glucanase	
		0	0,2
MS	Baixo	0,806Aa	0,799Ab
	Alto	0,791Aab	0,798Ab
Ca	Baixo	0,114Aa	0,096Ab
	Alto	0,103Aa	0,121Bb
P	Baixo	0,286Aa	0,268Ab
	Alto	0,243Ba	0,263Ab

AB¹, dieta formulada com baixo ou alto teor de arabinosilanos e β -glucanos, sem e com adição de Xilanase e β -glucanase. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si para o fator ingrediente e letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si para o fator enzima (Tukey 5%).

A adição de XB na dieta com alto teor de AB aumentou o valor de energia digestível em 134 kcal/kg, em relação a dieta com alto teor de AB que não foi adicionada a XB (3745 vs 3611), conforme o ilustrado na figura 1.



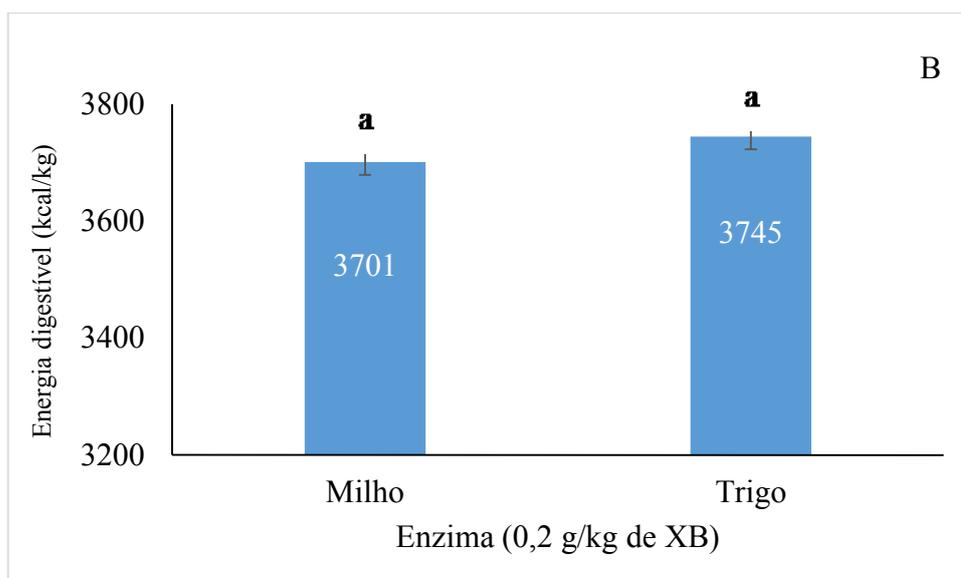


Figura 1. A - Energia digestível de dieta com baixo e alto teor de arabinosilanos e β -glucanos; B – Efeito da adição de xilanase e β -glucanase (0 ou 0,2 g/kg) nas dietas com baixo e alto teor de arabinosilanos e β -glucanos. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 0,05 de significância.

3.2. Digestibilidade dos aminoácidos

Não foi observada interação nos CDA dos aminoácidos essenciais e não essenciais ($P > 0,05$). Foi observada diferença para o teor de AB sobre os CDA da histidina ($P = 0,023$) e valina ($P = 0,002$), em que os maiores resultados foram obtidos nos peixes alimentados com dieta com baixo teor de AB em relação a dieta com alto teor de AB. Não observou efeito do teor de AB nos CDA da arginina ($P = 0,080$), isoleucina ($P = 0,126$), lisina ($P = 0,545$), metionina ($P = 0,542$), fenilalanina isoleucina ($P = 0,121$) e treonina isoleucina ($P = 0,118$). Os CDA dos aminoácidos essenciais e não essenciais estão apresentados na Tabela 6.

Observou-se efeito da adição de XB no CDA valina ($P = 0,025$) e os melhores CDA foram observados em peixes alimentados com dieta contendo baixo teor de AB. Não foi observado efeito da adição de XB sobre os CDA da arginina ($P = 0,377$), histidina ($P = 0,073$), leucina ($P = 0,138$), isoleucina ($P = 0,133$), lisina ($P = 0,192$), metionina ($P = 0,816$), fenilalanina ($P = 0,130$) e treonina ($P = 0,133$).

Verificou-se efeito do teor de AB sobre os CDA dos aminoácidos não essenciais alanina ($P = 0,003$), ácidos aspártico ($P = 0,039$), prolina ($P = 0,021$) e tirosina ($P = 0,004$), para a alanina, ácido aspártico e tirosina (0,945, 0,986, 0,948 e 0,956 respectivamente) e os melhores valores de CDA foram obtidos em peixes alimentados com dieta com baixo

teor de AB. Para prolina ($P = 0,021$) o melhor CDA foi observado nos peixes alimentados com dieta contendo alto teor de AB. Não houve efeito da dieta nos CDA da cistina ($P = 0,162$), ácido glutâmico ($P = 0,286$), glicina ($P = 0,613$) e serina ($P = 0,594$).

Observou-se efeito da adição de XB sobre os CDA da tirosina ($P = 0,049$), obtendo-se o maior resultado nos peixes alimentados com dieta contendo baixo teor de AB, sem adição de XB. Não houve efeito da adição de XB sobre os CDA dos aminoácidos não essenciais alanina ($P = 0,883$), cistina ($P = 0,497$), ácido aspártico ($P = 0,269$), ácido glutâmico ($P = 0,081$), glicina ($P = 0,864$), prolina ($P = 0,483$) e serina ($P = 0,514$).

Tabela 6

Coefficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos essenciais e não essenciais por juvenis de tilápias do Nilo alimentadas, com dietas contendo diferentes fontes de energia, com ou sem adição de xilanase e glucanase ¹.

Aminoácidos	Baixo ²		Alto ³		EPM ⁴	AB	Valor-P	
	0	0,2	0	0,2			Enzima	AB x Enzima
Essenciais								
Arg	0,979	0,976	0,975	0,978	0,001	0,080	0,377	0,316
His	0,969	0,965	0,964	0,968	0,007	0,023	0,073	0,328
Leu	0,954	0,950	0,949	0,953	0,001	0,024	0,138	0,133
Ile	0,945	0,940	0,940	0,945	0,002	0,126	0,133	0,916
Lys	0,972	0,970	0,971	0,972	0,001	0,545	0,192	0,630
Met	0,978	0,980	0,981	0,979	0,011	0,542	0,816	0,417
Phe	0,955	0,950	0,950	0,955	0,008	0,121	0,130	0,433
Thr	0,919	0,907	0,906	0,918	0,004	0,118	0,133	0,089
Val	0,940	0,931	0,927	0,936	0,009	0,002	0,025	0,500
Não essenciais								
Ala	0,945	0,936	0,928	0,937	0,002	0,003	0,883	0,309
Cys	0,937	0,932	0,930	0,935	0,007	0,162	0,497	0,414
Asp	0,986	0,984	0,982	0,985	0,008	0,039	0,269	0,502
Glu	0,988	0,987	0,989	0,989	0,004	0,286	0,081	0,460
Gly	0,930	0,931	0,933	0,932	0,013	0,613	0,864	0,328
Pro	0,948	0,953	0,951	0,956	0,001	0,021	0,483	0,139
Ser	0,956	0,954	0,955	0,956	0,004	0,594	0,514	0,320
Tyr	0,956	0,950	0,947	0,953	0,008	0,004	0,050	0,635

¹Coefficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos essenciais e não essenciais; ²Dieta com baixo teor de arabinosilanos e β -glucanos (AB), sem ou com adição de 0,2 g/kg de xilanase e β -glucanase (XB); ³Dieta, com alto teor de AB, sem ou com adição de xilanase e β -glucanase; ⁴EPM, erro padrão médio.

4. Discussão

4.1. *Digestibilidade da energia e dos nutrientes*

No presente estudo, o CDA de matéria seca, cálcio e fósforo da dieta com alto teor de AB melhorou com o uso da XB. Esses resultados estão associados a degradação da parede celular do trigo pela XB, reduzindo o peso molecular dos arabinosilanos e β -glucanos, reduzindo a viscosidade da dieta e aumentando o tempo de digestão, melhorando assim o CDA da matéria seca, nutrientes e minerais (Castillo e Gatlin III, 2015; Zijlstra et al., 2010). A redução na viscosidade da digesta melhor os CDA da energia e nutrientes (Maas et al., 2018). A maior disponibilidade dos minerais em dietas para peixes com adição de XB já foi demonstrada (Ogunkoya et al., 2006; Oliveira et al., 2007).

A adição de XB reduziu a viscosidade absoluta da dieta com alto teor de AB de 155 para 61, comprovando a atuação das enzimas adicionadas sobre os respectivos substratos, resultando em diminuição na viscosidade intestinal. Os efeitos da adição de XB já foi demonstrado em dietas para suínos (Owusu-Asiedu et al., 2010; Yin et al., 2001), sendo essa a primeira referência sobre os efeitos da inclusão de XB sobre a redução da viscosidade de dietas para tilápias do Nilo.

A adição de XB melhora a disponibilidade de P e Ca de dietas à base de trigo porque a maioria dos minerais no trigo está associada a fibra dietética, especialmente com os PNA. A xilanase libera o P e Ca ligados durante os processos de clivagem dos PNA (Frolich & Asp, 1995). A cerca de 40% do Ca e 30 % do P presentes na parede celular do trigo estão presente na parede celular e não estão associados com o fitato. Dessa forma, a XB atuam sobre os arabinosilanos e β -glucanos, aumentando a disponibilidade desses minerais associados com a fibra (Kim et al., 2005). O aumento da disponibilidade do cálcio e fósforo com o uso da XB contribui para melhorar o atendimento das exigências nutricionais dos peixes, minimizar a excreção dos minerais para o meio ambiente e para reduzir a inclusão de minerais inorgânicos em dietas para tilápias.

Os melhores CDA da energia e dos nutrientes foram obtidos em peixes que receberam a dieta com baixo teor de AB, em virtude da melhor digestão e disponibilidade dos nutrientes dessa dieta em relação ao observado com as dietas com alto teor de AB. Entretanto, o uso da XB na dieta com alto teor de AB melhorou a digestibilidade da energia e dos nutrientes, resultando em dieta nutricionalmente semelhante em relação à dieta elaborada com baixo teor de AB. A parede celular dos cereais e leguminosas é

constituída principalmente por celulose, hemicelulose, arabinosilanos e uma fração menor de β -glucanos. A XB degradam os respectivos substratos da parede celular, permitindo a hidratação e conseqüentemente a atuação das proteases e amilases, melhorando a digestão da proteína e amido (Sinha et al., 2011).

A adição de XB não melhorou os CDA da dieta com baixo teor de AB por causa da baixa quantidade de arabinosilanos e β -glucanos para atuação das enzimas adicionadas. O tipo e nível de PNA presentes nas dietas influenciam os efeitos da atuação das enzimas exógenas, principalmente pelas influências sobre a viscosidade e taxa de passagem da digesta (Glencross et al., 2012). Destaca-se no Brasil que a farinha e farelo de trigos são alimentos empregados em dietas para tilápias objetivando melhoria da qualidade física dos pellets e contribuindo para a flutuabilidade dos pellets. Assim, as enzimas avaliadas no presente estudo podem ser empregadas comercialmente para melhoria do valor nutritivo de dietas comerciais destinadas para tilápias.

Nesse estudo, a XB foi efetiva somente na dieta com alto teor de AB. A adição de xilanase melhora a digestibilidade dos lipídeos e amido aumentando a disponibilidade de energia digestível, devido a atenuação dessa enzima sobre o efeito de viscosidade provocada pela maior quantidade de arabinosilanos e β -glucanos presente na dieta com alto teor de AB (Adeola e Bedford, 2004). A melhoria dos CDA da proteína bruta e lipídeos em dietas com adição de XB em dietas para juvenis de tilápias do Nilo formuladas à base de milho, farelo de soja e farelo de trigo já foi comprovada anteriormente (Guimarães et al., 2009).

A adição de XB maximiza a digestão da proteína, lipídeos e amido ligados à parede das células (Chesson, 1993), resultando em maior valor de energia digestível e proteína digestível ao animal. Semelhantemente ao observado no presente estudo, o efeito positivo da adição de xilanase sobre o CDA da matéria seca, proteína bruta, carboidratos e energia já foi reportado em tilápias do Nilo (Maas et al., 2018).

Na presente pesquisa, tanto o teor de AB quanto a adição de XB influenciaram a utilização da fibra bruta dietética. É possível que a fonte e nível de fibra tenha alterado a microbiota intestinal dos peixes. Tal fenômeno já foi demonstrado anteriormente em dourada, *Sparus aurata*, Carpa Jian, *Cyprinus carpio var. Jian* e Carpa capim, *Ctenopharyngodon idella* alimentadas com dietas com adição de carboidrases (Dimitroglou et al., 2010; Jiang et al., 2014; Zhou et al., 2013) e em jundiá, *Rhamdia quelen* e tilápias do Nilo (Pedrotti et al., 2015).

A adição de carboidrases nas dietas degradam os PNA da parede celular, reduzindo o comprimento das cadeias e produzindo polímeros e oligômeros menores. Essa degradação diminui o tamanho das partículas e facilita a atuação das enzimas sobre os substratos para a fermentação bacteriana, modulando assim a população de microrganismo no intestino (Bedford & Apajalahti, 2001; Sinha et al., 2011). Assim, a avaliação dos efeitos da microbiota e sua relação com a utilização dos nutrientes é uma nova fronteira em estudos de nutrição de tilápias.

4.2. Digestibilidade dos aminoácidos

No presente estudo, a adição de XB melhorou os CDA da proteína e diversos aminoácidos na dieta com alto teor de AB. O aumento do CDA da fração proteica é de fundamental importância, uma vez que a proteína está presente em elevada proporção em dietas para peixes. As carboidrases aumentam a utilização de aminoácidos, aumentando a atuação da protease digestiva em função da redução da viscosidade intestinal (Tahir et al., 2008). Os efeitos positivos da adição de XB sobre os CDA da proteína e aminoácidos do triticale, um híbrido do trigo com centeio já foram reportados previamente em tilápias do Nilo (Tachibana et al., 2010). Da mesma forma, já foi demonstrado que a adição da xilanase, amilase, celulase, protease e β -glucanase aumentou os CDA da matéria seca, proteína bruta, aminoácidos também já foram demonstrados em truta-arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Ogunkoya et al., 2006).

Nesse estudo, a adição da dieta contendo alto teor de AB com adição de XB aumentou a digestibilidade da proteína e aminoácidos, equiparando aos valores obtidos com a dieta formulada com baixo teor de AB. Assim, demonstrou-se que as enzimas foram efetivas para melhorar a utilização de nutrientes potencialmente indisponíveis, melhorando o valor nutritivo da dieta, indicando que dieta com alto teor de AB com adição de XB pode substituir dieta formulada com baixo teor de AB para juvenis de tilápias do Nilo.

A utilização XB melhora o valor nutritivo de dietas com alto teor de AB para tilápias do Nilo, permitindo a utilização de dietas a partir de ingredientes de menor valor econômico e nutricional. Além disso, a melhoria do valor nutritivo por meio da adição de XB pode ser considerada como ferramenta nutricional para reduzir a excreção de poluentes ao ambiente de criação de peixes.

5. Conclusões

A adição de xilanase e β -glucanase melhora os coeficientes de digestibilidade aparente da energia e dos nutrientes de dietas formuladas com alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos. Dieta formulada com alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos com adição de xilanase e β -glucanase apresenta valor nutricional equivalente a dieta com baixo teor de arabinoxilanos e β -glucanos para juvenis de tilápias do Nilo.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores agradecem à BASF - Ludwigshafen an Rhein, Alemanha, pela doação da enzima e análises laboratoriais.

Referências

- Adeola, O., Bedford, M.R., 2004. Exogenous dietary xylanase ameliorates viscosity-induced anti-nutritional effects in wheat-based diets for White Pekin ducks (*Anas platyrinchos domesticus*). *British Journal of Nutrition* 92, 87. <https://doi.org/10.1079/BJN20041180>
- Adeola, O., Cowieson, A.J., 2011. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *Journal of Animal Science* 89, 3189–218. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3715>
- Adeoye, A.A., Jaramillo-Torres, A., Fox, S.W., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2016. 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. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.002>
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. 1995. Official methods of analysis, 16th ed. AOAC Int., Arlington, VA. 1995.
- Austreng, E., 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture* 13, 265–272. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(78\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(78)90008-X)
- Bedford, M.R., Apajalahti, J., 2001. Implications of Diet and Enzyme Supplementation on the Microflora of the Intestinal Tract. In advances in nutritional technology Proceedings of the 1st. World Feed conference 197–206.

- Bedford, M.R., Cowieson, A.J., 2012. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Animal Feed Science and Technology* 173, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.018>
- Bremer Neto, H., Graner, C.A.F., Pezzato, L.E., Padovani, C.R., 2005. Determinação de rotina do crômio em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. *Ciência Rural* 35, 691–697. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300033>
- Castillo, S., Gatlin III, D.M., 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture* 435, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.011>
- Chesson, A., 1993. Feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology* 45, 65–79. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(93\)90072-R](https://doi.org/10.1016/0377-8401(93)90072-R)
- Classen, H.L., 1996. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. *Animal Feed Science and Technology* 62, 21–27. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01002-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01002-4)
- Conte, A.J., Teixeira, A.S., Fialho, E.T., Schoulten, N.A., Bertechini, A.G., 2003. Efeito da fitase e xilanase sobre o desempenho e as características ósseas de frangos de corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32, 1147–1156. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000500015>
- Demiato, I.M., Wosiacki, G., Cereda, M.P., Mestres, C., 2005. Características viscoamilográficas de amidos de mandioca quimicamente modificados. *Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias* 11, 7–17.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300, 182–188.
- Englyst, H., 1989. Classification and measurement of plant polysaccharides. *Animal Feed Science and Technology* 23, 27–42. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(89\)90087-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(89)90087-4)
- Frolich, W., Asp, N.G., 1995. Minerals and phytate in the analysis of dietary fiber from cereals. III. *Cereal Chemistry* 62, 238–242.
- Glencross, B., Rutherford, N., Bourne, N., 2012. The influence of various starch and non-starch polysaccharides on the digestibility of diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 356–357, 141–146.
- Gomes, V.D.S., Silva, J.H.V. da, Ribeiro, C.C., Filho, J.J., Almeida, J.L. dos S., Amâncio,

- A.L. de L., Lucena, C.É.A. de, 2018. Advances in the use of enzymes in nutrition of tilápias. *Visão Acadêmica* 19, 1518–8361.
- Guimarães, I.G., Falcon, D.R., Schich, D., Barros, M.M., Pezzato, L.E., 2009. Digestibilidade aparente de rações contendo complexo enzimático para tilápia-do-nylo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 61, 1397–1402. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000600020>
- Huisman, M.M.H., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 1998. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterisation. *Carbohydrate Polymers* 37, 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00111-2)
- Henry, R.J., 1987. Pentosan and (1 → 3),(1 → 4)-β-Glucan concentrations in endosperm and wholegrain of wheat, barley, oats and rye. *Journal of Cereal Science* 6, 253–258. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(87\)80062-0](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(87)80062-0)
- Jiang, T.T., Feng, L., Liu, Y., Jiang, W.D., Jiang, J., Li, S.H., Tang, L., Kuang, S.Y., Zhou, X.Q., 2014. 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. <https://doi.org/10.1111/anu.12125>
- Kim, J.C., Simmins, P.H., Mullan, B.P., Pluske, J.R., 2005. The effect of wheat phosphorus content and supplemental enzymes on digestibility and growth performance of weaner pigs 118, 139–152.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96, 335–364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Dersjant-Li, Y., Schrama, J.W., 2018. The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture* 487, 7–14.
- Malathi, V., Devegowda, G., 2001. In vitro evaluation of nonstarch polysaccharide digestibility of feed ingredients by enzymes. *Poultry Science* 80, 302–305. <https://doi.org/10.1093/ps/80.3.302>
- National Research Council - NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academy Press, Washington, DC, USA. 2011.
- Ogunkoya, A.E., Page, G.I., Adewolu, M.A., Bureau, D.P., 2006. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*

- 254, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.032>
- Oliveira, G.R., Logato, P.V.R., De Freitas, R.T.F., Rodrigues, P.B., Fialho, E.T., Diodatti, F.C., 2007. Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36, 1945–1952.
- Owusu-Asiedu, A., Simmins, P.H., Brufau, J., Lizardo, R., Péron, A., 2010. Effect of xylanase and β -glucanase on growth performance and nutrient digestibility in piglets fed wheat-barley-based diets. *Livestock Science* 134, 76–78.
- Pedrotti, F.S., Davies, S., Merrifield, D.L., Marques, M.R.F., Fraga, A.P.M., Mouriño, J.L.P., Fracalossi, D.M., 2015. The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research* 46, 472–481. <https://doi.org/10.1111/are.12195>
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C. De, Gabriel, L., Pinto, Q., Furuya, W.M., Barros, M.M., Magalhães, G.J., Arruda, E., Lanna, T., 2002. Avaliação de dois métodos de determinação do coeficiente de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Scientiarum* 965–971.
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chemistry* 127, 1409–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.042>
- Steenfeldt, S., Knudsen, K.E., Borsting, C., Eggum, B., 1995. the Nutritive-Value of Decorticated Mill Fractions of Wheat .2. Evaluation With Raw and Enzyme-Treated Fractions Using Adult Cockerels. *Animal Feed Science and Technology* 54, 249–265.
- Tachibana, L., Gonçalves, G.S., Guimarães, I.G., Pezzato, L.E., 2010. Digestibilidade aparente do triticale para a tilápia-do-Nilo. *Boletim do Instituto de Pesca* 36, 39–44.
- Tahir, M., Saleh, F., Ohtsuka, A., Hayashi, K., 2008. An effective combination of carbohydrases that enables reduction of dietary protein in broilers: Importance of hemicellulase. *Poultry Science* 87, 713–718. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00340>
- Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Michelato, M., Tadeu, E.N., Pezzato, L.E., Furuya, W.M., 2015. Apparent Protein and Energy Digestibility and Amino Acid Availability of Corn and Co-products in Extruded Diets for Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 46, 183–190. <https://doi.org/10.1111/jwas.12184>
- Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Moura, L.B., Graciano, T.G., Martins, E.N., Furuya, W.M.,

2017. Apparent digestibility of soybean coproducts in extruded diets for Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition* 23, 228–235. <https://doi.org/10.1111/anu.12383>
- Yin, Y.L., Baidoo, S.K., Schulze, H., Simmins, P.H., 2001. Effects of supplementing diets containing hulless barley varieties having different levels of non-starch polysaccharides with β -glucanase and xylanase on the physiological status of the gastrointestinal tract and nutrient digestibility of weaned pigs. *Livestock Production Science* 71, 97–107. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00214-7](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00214-7)
- Zhou, Y., Yuan, X., Liang, X.F., Fang, L., Li, J., Guo, X., Bai, X., He, S., 2013. Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: The effect of exogenous cellulase. *Aquaculture* 416–417, 1–7.
- Zijlstra, R.T., Owusu-Asiedu, A., Simmins, P.H., 2010. Future of NSP-degrading enzymes to improve nutrient utilization of co-products and gut health in pigs. *Livestock Science* 134, 255–257. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.07.017>
- Zortéa, Manoela Estefânea B., Demiate, I.M., Praxedes, M.A., Wosiacki, G., 2011. Avaliação da viscosidade aparente de pastas de amidos nos viscosímetros Brookfield RVDV-II + Pro e rápido visco-analisador RVA-4 evaluation of apparent viscosity of starch pastes in Brookfield RVDV-II + Pro. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* 05, 326–335.

IV - Desempenho produtivo, parâmetros bioquímicos, histologia intestinal e microbioma de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas com xilanase e β -glucanase

RESUMO: O presente estudo teve por objetivo avaliar o desempenho produtivo, histologia intestinal, parâmetros bioquímicos e microbioma de juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, após 90 dias de experimento alimentadas com dietas sem ou com adição de xilanase e β -glucanase (XB). Cento e trinta e seis juvenis de tilápia do Nilo ($12 \pm 1,4$ g) foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso considerando dietas sem ou com 0,2 g/kg de XB e quatro repetições de 17 peixes por aquário. Após 90 dias, peixes alimentados com dieta com XB apresentaram maior peso corporal final ($P = 0,011$), ganho de peso ($P = 0,010$), ganho de peso diário ($P = 0,010$), consumo de ração ($P = 0,001$), conversão alimentar ($P = 0,002$), taxa de eficiência proteica ($P = 0,001$), menor índice hepatossomático ($P = 0,024$), índice de gordura visceral ($P = 0,004$), comprimento absoluto ($P = 0,011$) e relativo ($P = 0,003$) do intestino em comparação com aqueles alimentados com dieta sem adição de XB. Peixes alimentados com a dieta com adição de XB apresentaram-se com maiores níveis plasmáticos de glicose ($P = 0,028$) e triglicérides ($P = 0,036$). Peixes alimentados com a dieta com XB apresentaram intestino com maior altura, largura dos vilos e espessura do epitélio quando comparados com os peixes alimentados com dieta sem XB. Na análise da microbiota intestinal foram identificados 243 táxons e os mais abundantes foram os gêneros *Barnesiella*, seguido por *Bacteroides*, *Alistipes* e *Faecalibacterium*, respectivamente. Foram identificados 25 gêneros com abundância diferente ($P < 0,05$) entre peixes alimentados com a dieta com e sem adição de XB. A comparação detalhada mostrou aumento significativo dos gêneros *Barnesiella*, *Bacteroides*, *Ruminococcus torques*, *Peptoclostridium*, *Anaerofilum*, *Butyricicoccus* e *Parasutterella* nos peixes alimentados com dieta com adição de xilanase e β -glucanase. Concluiu-se que a adição de xilanase e β -glucanase melhora o desempenho produtivo, aumenta a morfometria intestinal dos vilos intestinais, e modula a microbiota intestinal de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: carboidrases, morfometria intestinal, microbiota, *Oreochromis niloticus*, polissacarídeos não amiláceos.

Abreviação: AB, arabinosilanos e β -glucanos; PNA, polissacarídeos não amiláceos; XB, xilanase e β -glucanase.

IV - Productive performance, biochemical parameters, intestinal histology, and microbiome of Nile tilapia juveniles fed diets with xylanase and β -glucanase

ABSTRACT: The present study aimed to evaluate the productive performance, intestinal histology, biochemical parameters and microbiome of Nile tilapia juvenile, *Oreochromis niloticus*, after 90 days of experimentation fed diets with or without xylanase and β -glucanase (XB) addition. One hundred and thirty-six Nile tilapia juveniles (12 ± 1.4 g) were distributed in a completely randomized design in diets with or without 0.2 g / kg of XB and four replicates of 17 fish per aquaria. After 90 days, fish fed diet with XB showed higher final body weight ($P = 0.011$), weight gain ($P = 0.010$), daily weight gain ($P = 0.010$), feed intake ($P = 0.001$), feed conversion $P = 0.002$), protein efficiency ratio ($P = 0.001$), lower hepatosomatic index ($P = 0.024$), visceral fat index ($P = 0.004$), and absolute ($P = 0.011$) and relative ($P = 0.003$) intestine length compared to those fed diet without XB. Fish fed with XB presented higher plasma glucose levels ($P = 0.028$) and triglycerides ($P = 0.036$). Fish fed with XB showed intestine with higher height, villi width and thickness of epithelium compared to fish fed without XB. In the intestinal microbiota analysis 243 taxa were identified and the most abundant were the genera *Barnesiella*, followed by *Bacteroides*, *Alistipes* and *Faecalibacterium*, respectively. 25 genera with different abundance ($P < 0.05$) were identified among fish fed with and without XB addition. The detailed comparison showed a significant increase of the genera *Barnesiella*, *Bacteroides*, *Ruminococcus torques*, *Peptoclostridium*, *Anaerofilum*, *Butyricicoccus* and *Parasutterella* in fish fed with xylanase and β -glucanase addition. It was concluded that xylanase and β -glucanase addition improves the productive performance, increases the intestinal morphometry of intestinal villi, and beneficially modulates the intestinal microbiota of Nile tilapia.

Key words: Carbohydrases, intestinal morphometry, microbiota, *Oreochromis niloticus*, non-starch polisaccharydes.

Abbreviation: AB, arabinoxylans and β -glucans; NSP, non-starch polysaccharides; XB, xylanase and β -glucanase.

1. Introdução

A produção de tilápias tem aumentado de forma exponencial nos países em desenvolvimentos nos últimos anos (FAO, 2016). O uso de alimentos alternativos de origem vegetal tem sido recomendado como alternativa sustentável para reduzir o custo com a alimentação e reduzir a utilização da farinha de peixes originada da pesca extrativa (NRC, 2011).

O milho, a soja, o trigo e os coprodutos possuem polissacarídeos não amiláceos (PNA) que são fatores antinutricionais que limitam o uso desses alimentos. Os PNA compreendem vários constituintes como a celulose, hemicelulose, arabinosilanos, β -glucanos, pectinas entre outros. Os PNA exercem efeitos negativos no desempenho dos animais, devido a alteração na taxa de passagem dos alimentos pelo trato gastrointestinal, redução da digestibilidade, alteração dos parâmetros hematológicos e diminui a ação das enzimas intestinais (Bedford, 1995) e modificação da microbiota intestinal (Sinha et al., 2011).

Dietas com elevado teor de PNA reduz a largura e densidade das vilosidades dos peixes (Pedrotti et al., 2015) em consequência ao aumento da viscosidade da digesta, que influencia negativamente a digestão e absorção da energia e dos nutrientes e modifica os parâmetros bioquímicos como glicose, lipídios, aminoácidos e minerais (Sinha et al., 2011). Dietas ricas em PNA aumentam o tempo de permanência da digesta no intestino e podem diminuir a quantidade de oxigênio e favorecem o desenvolvimento indesejável da microbiota anaeróbica (Choct, 1997). A proliferação de alguns organismos anaeróbicos pode levar à produção de toxinas e desconjugação de sais biliares que são essenciais para a digestão de gordura (Carre et al., 1995). As carboidrases influenciam na quantidade e tipo de microbiota intestinal das tilápias do Nilo (Jiang et al., 2014; Zhou et al., 2013).

A utilização de enzimas microbianas em dietas dos peixes melhora o aproveitamento dos nutrientes dos alimentos de origem vegetal ricas em PNA (Classen, 1996). A adição “*on-top*” de enzima líquida após o processamento das dietas permitem a garantia da sua atividade, e é uma grande vantagem, considerando que a extrusão é um processo globalmente empregado na elaboração de dietas para tilápias. No entanto, ainda há poucas informações sobre o uso de XB em dietas para tilápias do Nilo considerando o desempenho produtivo, histologia e microbiota intestinal. Assim, o presente estudo foi elaborado com o objetivo de avaliar o desempenho produtivo, parâmetros bioquímicos,

histologia e microbioma intestinal de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dieta sem e com adição de xilanase e β -glucanase.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, Ponta Grossa-PR. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, com Certificado Experimental para o uso de Animais em Pesquisa (CEUA), sob o protocolo 879/2018.

2.1. Dietas experimentais

As dietas foram misturadas, moídas e extrusadas no Laboratório de Nutrição de Peixes (AquaNutri, Botucatu, SP, Brasil). A moagem foi realizada em moinho centrífugo em peneiras de 0,8 mm (Viera MC 680B), Tatuí, SP, Brasil) e extrusadas em extrusora de rosca simples com matriz de 3 mm com um furo, três “facas” com rotação de 40/min e temperatura de 105°C (Exteec EX30, Ribeirão Preto, SP, Brasil), obtendo grânulos com diâmetros de 4 a 5mm e secas em estufa de ventilação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, SP, Brasil) 55°C, durante 24 horas. As dietas experimentais foram formuladas com base em alimentos de origem vegetal tendo milho ou trigo como principais fontes de energia, com diferentes níveis de arabinosilanos e β -glucanos (Tabela 1) e para atender às exigências dietéticas de juvenis de tilápias do Nilo (NRC, 2011), conforme descrito nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 1
Composição das dietas experimentais (g/kg).

Ingredientes	Xilanase e β -glucanase (g/kg) ¹	
	0,0	0,2
Milho	328,60	328,40
Farelo de soja	200,00	200,00
Farelo de trigo	200,00	200,00
Conc. Prot. Soja	80,00	80,00
Farinha de trigo	80,00	80,00
Farinha de peixe	40,00	40,00
Farinha de sangue	30,00	30,00
Fosfato bicálcico	20,00	20,00
Sup. min. e vitamínico ²	5,00	5,00
L-Lisina	5,00	5,00
Sal	3,50	3,50
DL-Metionina	2,70	2,70
L-Histidina	2,00	2,00
Antifúngico	1,00	1,00
L-Treonina	0,90	0,90
Antioxidante	0,20	0,20
Natugrain ³	0,00	0,20
Óxido de cromo	1,10	1,10
Total	1000	1000

¹Xilanase e β -glucanase, dieta com alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos sem e com adição de xilanase e glucanase; ²Misturas de minerais e vitaminas (composição por kg de dieta): vitamina A, 600 UI; vitamina D₃, 1,000 UI; vitamina E, 60 mg; vitamina K₃, 12 mg; vitamina B₁, 24 mg; vitamina B₂, 24 mg; vitamina B₆, 20 mg; vitamina B₁₂, 24 mg; ácido fólico, 6 mg; Pantotenato D-cálcio, 60 mg; ácido ascórbico, 240 mg; biotina, 0,24 mg; colina, 325 mg; ácido nicotínico, 120 mg; ferro, 50 mg; sulfato de cobre, 3 mg; sulfato de manganês, 20 mg; sulfato de zinco, 30 mg; iodeto de potássio, 0,1 mg; selênio, 0,1mg; ³Antioxidante - Banox[®] (Alltech Agroindustrial Ltda, São Paulo, Brasil); ^dAntifúngico, Mold Zap Aquática[®], composição: dipropionato de amônio, ácido acético, ácido sórbico e ácido benzoico (Alltech Agroindustrial Ltda, São Paulo, Brasil); ^eNatugrain[®], complexo enzimático constituído por endo-1,4-beta-xilanase (5600 TXU/g) e endo-1,4-beta-glucanase (2500 TGU/g), fornecida pela empresa BASF.

As dietas foram elaboradas com base em valores de composição dos alimentos previamente analisadas e confirmadas por análises das dietas após extrusão e secagem. Foi adicionado na dieta 0,20 g/kg de xilanase e β -glucanase líquida (Natugrain[®], Basf, Ludwigshafen am Rhein, Alemanha), complexo enzimático constituído por endo-1,4-beta-xilanase 5600 TXU/g e endo-1,4-beta-glucanase 2500 TGU/g. Preparou-se uma solução “mãe” em que se diluiu 10 ml de Natugrain[®] em 990 ml de água destilada, em seguida adicionou-se 20 ml da solução mãe em 300 ml de água destilada, essa foi aspergida *on top* na dieta de forma parcelada e homogênea. Posteriormente a ração foi seca em estufa com circulação forçada de ar (HexisHX00) Jundiaí, SP, Brasil) a 42°C por 2 horas.

Tabela 2

Composição analisada das dietas experimentais (g/kg, base na matéria seca).

Nutrientes	Xilanase e β -glucanase ¹	
	0	0,2
Matéria seca	951,48	951,60
Proteína bruta	313,60	313,20
Extrato etéreo	38,35	40,30
Fibra bruta	22,70	23,05
Fibra em detergente ácido	30,05	29,20
Fibra em detergente neutro	99,65	99,75
Energia bruta (kcal/g)	4200,00	4199,5
Matéria mineral	62,99	62,00
Cálcio	10,00	10,15
Fósforo total	10,12	10,40
² TXU/0,20 g	ND ⁴	1161,00
³ TGU/0,20 g	ND ⁴	526,78

¹Dieta formulada com alto teor de arabinoxilanos e β -glucanos sem ou com a adição de xilanase e β -glucanase; ²TXU, unidades de Endo-1,4-beta-xilanase termostável (5.805 TXU/g) e ³TGU, unidades de endo-1,4-beta-glucanase termostável (2,633,9 TGU/g), fornecida pela empresa BASF: ND⁴, Atividade enzimática não detectada.

2.2. Peixes e condições experimentais

Foram adquiridos 1000 alevinos de tilápia do Nilo (Aquabel, Rolândia, PR, Brasil), com peso inicial médio de $1,8 \pm 0,3$ g, distribuídos em tanques-rede de 1 m³ (1 x 1 x 1 m) com tela plástica interna (malha com furos de 4 mm) e alimentados com dieta

comercial micro extrusadas (0,4 mm diâmetro) com 45% de proteína bruta durante 20 dias, até atingirem 10 g de peso corporal. Em seguida, os peixes foram transferidos para o Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Ponta Grossa e adaptados às instalações e manejo durante 7 dias. Durante o período de adaptação, foram alimentados com as respectivas dietas experimentais, quatro vezes por dia e até saciedade aparente.

Cento e trinta e seis juvenis de tilápia do Nilo com peso inicial de $12,0 \pm 1,4$ g foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso (DIC) com dois tratamentos, dietas sem e com adição de XB (0,2 g/kg) e quatro repetições. Os peixes foram distribuídos oito aquários de fibra de vidro (150 L cada), com aeração e aquecimento da água constante. Os peixes receberam seis refeições diariamente (8h, 10h, 11h, 15h, 16h e às 17h). A oxigenação dos aquários foi realizada por meio de sistema com pedras micro porosas acopladas a mangueiras de silicone com ar fornecido por meio de compressor de ar radial de 0,5 CV (JKW002, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) mantendo o teor de oxigênio dissolvido entre 6,0 e 6,5 mg/L. E o aquecimento da água dos aquários foi realizada com aquecedores acoplados a termostatos mantendo a temperatura a 27 ± 1 °C.

Os parâmetros de qualidade de água como o oxigênio dissolvido (mg/L) e temperatura (°C) foram monitorados diariamente com uma sonda multi-parâmetro (YSI® 550A, Florianópolis, SC, Brasil), semanalmente foram determinados o pH ($6,5 \pm 0,05$) com pHmetro de bancada (TEC-2, Tecnal®, Piracicaba, SP, Brasil). A amônia ($0,001 \pm 0,000$ ppm), nitrito ($0,001 \pm 0,000$ ppm) e nitrato ($0,001 \pm 0,000$ ppm) foram analisados com kit (Alfakit®, Florianópolis, SC, Brasil).

2.3. *Ensaio de desempenho*

Para determinação do desempenho produtivo aos 90 dias no início e final do ensaio de desempenho, após 24 horas de jejum todos os peixes foram anestesiados com 100 mg/L de ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222, Sigma-Aldrich, tricaine 98%, *Missouri, USA*). Em seguida, foram pesados utilizando uma balança de precisão de 0,01g (Shimadzu, AUW220, Toledo, PR, Brasil), o desempenho foi determinado de acordo com as expressões: Ganho de peso (g) = peso final (g) - peso inicial (g); Ganho de peso diário(g) = peso ganho no período / quantidade de dias do período; Consumo de ração = \sum da ração fornecida durante o experimento; Conversão alimentar = alimento fornecido (g) / ganho de peso (g); Taxa de eficiência proteica = ganho de peso (g) / ingestão de proteína (g); Gordura visceral (%) = peso de gordura visceral e somática (g) / peso corporal (g) x100; Índice hepatossomático (%) = peso do fígado (g) / peso corporal

$(g) \times 100$ e Sobrevivência (%) = número de peixes no final do experimento / número de peixes no início do experimento $\times 100$.

2.4. *Análises bromatológicas*

As análises de matéria seca (método 934,01), matéria mineral (método 942,05), nitrogênio (método 981,10), proteína bruta (calculada pelo percentual de nitrogênio multiplicado por 6,25), extrato etéreo (método 920,85) e fibra bruta (método 991,43) das dietas experimentais e da composição corporal dos peixes foram determinadas de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). As análises foram realizadas na "CBO Análises Laboratoriais" (Campinas, São Paulo, Brasil).

2.5. *Análises hematológicas*

Ao final do experimento, três peixes de cada unidade experimental foram anestesiados com 100 mg/L ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (Sigma-Aldrich, tricaine 98%, MO, USA). Em seguida, foi coletado sangue 3 ml, por meio de punção caudal com auxílio de seringas (3 ml) e agulhas heparinizadas. Posteriormente, uma alíquota de sangue foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos para obtenção de 100 μ L de plasma. O plasma foi utilizado para realização das análises bioquímicas de aspartato aminotransferase (mg/dl), alanina aminotransferase (U.I/L), fosfatase alcalina (U.I/L), colesterol total (mg/dl), proteína total (g/dl), glicose (mg/Dl) e triglicerídeos (mg.dL-1). As análises foram realizadas por espectrometria em analisador bioquímico semiautomático (BIO-2000 IL, Barueri, SP, Brasil), utilizando kits comercial (BIOTÉCNICA®, Varginha, MG, Brasil).

2.6. *Comprimento absoluto e relativo do intestino*

Para determinação do comprimento do intestino quarenta e oito peixes por tratamento foram eutanasiados com 100 mg/ L de ethyl 3 aminobenzoate methanesulfonate, em seguida foi realizada uma incisão na região ventral dos peixes para retirada do intestino. O comprimento do intestino dos peixes foi mensurado com auxílio de um ictiômetro. O comprimento relativo do intestino foi estabelecido pela relação do comprimento do intestino / comprimento corporal, de acordo com (Ferreira et al., 2014).

2.7. *Análises histológicas*

Para realização das análises de histologia intestinal e microbiota intestinal no final do ensaio experimental, os peixes foram removidos aleatoriamente de cada aquário e imediatamente eutanasiados com 100 mg/L de ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate. Uma amostra do intestino médio (após 45 cm da parte pilórica do estômago, de três peixes de cada aquário (12 peixes por tratamento), foram coletadas e fixados em solução de *Bouin* durante oito horas, desidratadas em série ascendente de álcool, diafanizadas em xilol, embutidos em blocos de parafina (Prophet et al., 1992), para a obtenção de cortes histológicos de secções transversais (5,0 μm) e corados com hematoxilina-eosina (HE) (Dimitroglou et al., 2010).

Para a determinação da altura e largura das vilosidades analisou-se 100 vilosidades aparentemente intactas por peixe. Considerou-se a média de 300 vilosidades como a altura média das vilosidades para cada unidade experimental, totalizando 1200 vilosidades por tratamento. A determinação da altura total das vilosidades correspondeu a medida do ápice das vilosidades até o início da camada muscular e a altura das vilosidades do ápice das vilosidades até o término da camada serosa. Foram analisadas também a largura e espessura do epitélio das vilosidades.

Os cortes histológicos foram examinados sob um microscópio óptico, anexado a uma câmera Olympus (Pro-Series da Media Cybernetics, Olympus, Japão) para captura de imagens. A altura de análise das vilosidades (desde o ápice das vilosidades até o início da camada muscular) foram realizadas usando o software Image-Pro Plus (Image Pro Plus - versão 5.2- Media Cibernética).

2.8. *Microbioma intestinal*

O conteúdo do intestino de quatro peixes do mesmo aquário foi reunido em uma amostra composta para análise do microbioma intestinal, totalizando quatro repetições por tratamento. A porção do intestino médio (10 cm) foi removida de cada peixe, e amostra de aproximadamente 750 mg do conteúdo intestinal foi coletado com micropipeta (100 μl), armazenado em tubo criostato e imediatamente transferido para freezer -80°C para extração de DNA. A extração do DNA, sequenciamento e análise bioinformática. Foi empregado o kit comercial “ZR Fecal DNA MiniPrep[®] da Zymo Research para extrair o DNA das amostras seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260nm. Para avaliar

a integridade do DNA extraído, todas as amostras foram corridas por eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com uma solução de brometo de etídeo 1% e visualizadas com luz ultravioleta.

Foi amplificado um segmento de 250 bases da região hipervariável V4 do gene ribossomal 16S rRNA utilizando-se os primers universais 515F e 806R e as seguintes condições de PCR: 94°C por 3 min; 18 ciclos de 94°C por 45 seg, 50°C por 30 seg e 68°C por 60 seg; seguido de 72°C por 10 min. A partir destes amplificados foi construída a biblioteca metagenômica utilizando-se o kit comercial “Nextera DNA Library Preparation Kit” da Illumina®. Os amplificados foram reunidos em pools e posteriormente sequenciados no sequenciador “MiSeq” da Illumina® (Degnan & Ochman, 2012).

As leituras ou “reads” obtidos no sequenciador foram analisadas na plataforma QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2010; Caporaso et al., 2011), seguindo-se um fluxo de trabalho desde a remoção de sequências de baixa qualidade, remoção de quimeras e classificação taxonômica. As sequências foram classificadas em gêneros bacterianos através do reconhecimento de unidades taxonômicas operacionais (OTUs).

Foi considerada a identidade (>97%) entre as sequências quando comparadas contra uma base de dados. Para comparar as sequências foi utilizada a atualização (SILVA 128) do ano 2017 do banco de dados de sequências ribossomais SILVA data-base (Yilmaz et al., 2013). Para gerar a classificação das comunidades bacterianas por identificação de OTUs, foram utilizadas 56.812 leituras por amostra, com a finalidade de normalizar os dados e não comparar amostras com diferente número de leituras, evitando dessa forma um viés na taxonomia. Um resumo das sequências utilizadas na classificação taxonômica está detalhado na (Tabela 3).

Tabela 3

Resumo das sequências usadas na classificação taxonômica.

Contagem/Resumo da amostra	
Número de amostras	8
Número de OTUs	6152
Número de leituras	454496
Número mínimo de leituras por amostra	56812
Número máximo de leituras por amostra	56812

2.9. Análise estatística

O modelo matemático adotado foi: $Y_{ij} = \mu + E_i + e_{ij}$ em que: Y_{ij} , são variáveis dependentes; μ , valor médio comum a todas as observações; E_i , efeito fixo das dietas com e sem adição de xilanase e β -glucanase; e_{ij} , erro aleatório de cada observação, em caso de teste F significativo para, foi realizado a comparação das médias pelo teste de Tukey com $\alpha = 0,05$, os dados foram analisados de acordo com os Proc GLM do *Statistical Analysis System* (Versão, 9.0).

Os valores foram apresentados com média \pm erro padrão médio. Foi feito o teste de normalidade dos dados, utilizando o teste do Shapiro-Wilk, análise de homocedasticidade (igualdade de variância) usando o teste de Brown Forsythe, feito a análise paramétrica dos dados da ANOVA.

Para a análise estatística da microbiota foi aplicado o teste de Welch ($P < 0,05$) seguido por teste de correção de Bonferroni. As análises foram feitas no programa estatístico de metagenômica STAMP: statistical analysis of metagenomic profiles (Parks et al., 2014). São apresentados unicamente resultados estatisticamente diferentes entre tratamentos. As médias referentes à biodiversidade entre tratamentos foram comparadas através do número de unidades taxonômicas operacionais observadas (OTUs) e ao índice de Chao1 pelo teste de Kruskal Wallis ($P < 0,05$), porque apresentaram distribuição não paramétrica pelo teste de Shapiro Wilk.

3. Resultados

3.1. Desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo

Para o desempenho produtivo aos 90 dias, houve efeito no peso final ($P = 0,011$), ganho de peso ($P = 0,010$), ganho de peso diário ($P = 0,010$), consumo de ração ($P = 0,029$), conversão alimentar ($P = 0,002$) e taxa de eficiência proteica ($P = 0,001$). Os melhores resultados foram obtidos em peixes alimentados com dieta com adição de XB. O ganho de peso dos peixes que foram alimentados com a dieta com adição de XB foi 24,11% maior e o consumo de ração 17,52% menor que dos peixes alimentados com dieta sem adição de XB. Não houve efeito na sobrevivência ($P = 0,356$) Tabela 4.

3.2. Índice hepatossomático, gordura visceral e comprimento do intestino

Houve efeito no índice hepatossomático ($P = 0,024$) e taxa de gordura visceral ($P = 0,004$) os maiores valores foram observados nos peixes alimentados com a dieta contendo XB. Observou-se efeito para o comprimento absoluto do intestino ($0,011$) e comprimento relativo do intestino ($P = 0,003$), os menores valores foram obtidos nos peixes alimentados com a dieta com adição de XB, Tabela 4.

Tabela 4

Desempenho produtivo de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem ou com adição de xilanase e β -glucanase aos 90 dias de cultivo.

Parâmetros	Xilanase e β -glucanase		EPM ³	Valor de P
	0,0	0,20		
Peso inicial (g)	12,09	12,00	0,119	0,694
Peso final (g)	179,41	232,50	0,083	0,011
Consumo de ração (g)	232,68	191,91	0,097	0,029
Ganho de peso (g)	167,32	220,49	0,112	0,010
Ganho de peso diário (g)	1,86	2,45	0,125	0,010
Conversão alimentar	1,40	0,87	0,064	0,002
Taxa de eficiência proteica	2,39	3,73	0,157	0,001
Índice hepatossomático (%)	1,97	2,55	0,170	0,024
Taxa de gordura visceral (%)	0,62	0,99	0,126	0,004
CAI (cm) ¹	134,23	108,10	0,094	0,011
CRI ²	6,92	5,59	0,154	0,003
Sobrevivência (%)	94,12	98,53	0,029	0,356

¹CAI: comprimento absoluto do intestino; ²CRI, comprimento relativo do intestino, ³EPM, erro padrão da média.

3.3. Composição corporal

Houve efeito ($P = 0,041$) na quantidade de proteína bruta na carcaça, o maior valor foi obtido nos peixes que foram alimentados com a dieta com adição de XB. Não se observou efeito na umidade ($P = 0,120$), lipídios ($P = 0,518$), energia bruta ($P = 0,258$), matéria mineral ($P = 0,351$), cálcio ($P = 0,283$) e fósforo ($P = 0,263$) corporal (Tabela 5).

Tabela 5

Composição corporal (g/kg com base na matéria seca) de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem ou com adição de xilanase e β -glucanase, após 90 dias de experimento.

Parâmetros	Xilanase e β -glucanase (g/kg)		EPM ¹	Valor de P
	0	0,20		
Umidade	661,50	688,10	0,087	0,120
Proteína bruta	218,30	240,60	0,067	0,041
Extrato etéreo	93,60	97,90	0,026	0,518
Energia bruta (MJ/kg)	9,04	9,24	0,008	0,258
Matéria mineral	42,70	45,80	0,013	0,351
Cálcio	11,80	14,20	0,010	0,283
Fósforo	7,50	8,70	0,005	0,263

¹EPM: erro padrão da média.

3.4. Parâmetros bioquímicos do sangue

Nos parâmetros sanguíneos houve efeito na glicose (P = 0,028) e triglicerídeos (P = 0,036) com os maiores valores em peixes alimentados com a dieta com adição de XB. Não houve efeito para alanina aminotransferase (P = 0,523), aspartato aminotransferase (P = 0,424), fosfatase alcalina (P = 0,300), colesterol (P = 0,207) e proteína total (P = 0,629) (Tabela 6).

Tabela 6

Parâmetros bioquímicos de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem ou com adição de xilanase e β -glucanase, após 90 dias de experimento.

Parâmetros	Xilanase e β -glucanase (g/kg)		¹ EPM	Valor de P
	0,0	0,2		
Alanina aminotransferase (U.I/L)	5,00	5,00	0,001	0,523
Aspartato aminotransferase	18,50	29,00	0,051	0,424
Fosfatase alcalina (U.I/L)	12,00	9,50	0,088	0,300
Colesterol (mg/dl)	75,00	92,00	0,038	0,207
Proteína total (g/dl)	3,35	3,55	0,014	0,629
Glicose (mg/dl)	41,50	61,00	0,016	0,028
Triglicerídeos (mg/dl)	221,00	331,00	0,099	0,036

¹EPM: erro padrão da média.

3.5. Histologia intestinal

Na Figura 1, observa-se a altura total das vilosidades (ATV), altura das vilosidades (AV), largura das vilosidades (LV) e espessura do epitélio das vilosidade (EP).

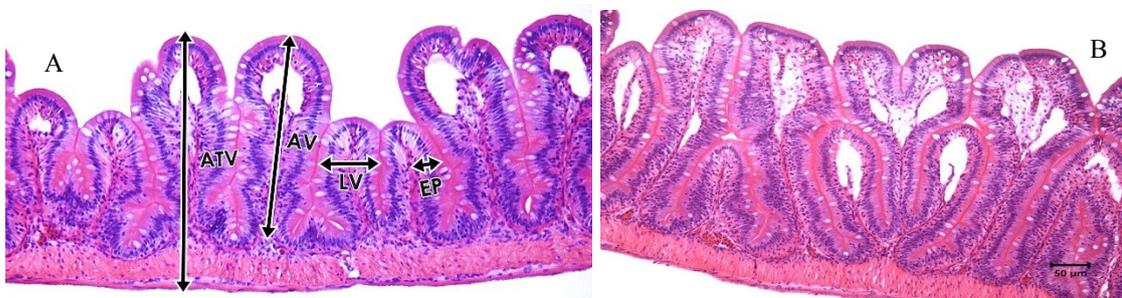


Figura 1. Parede do intestino médio de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem (A) e com (B) adição de xilanase e β -glucanase. Objetiva: 20X. Coloração: Hematoxilina-eosina.

No presente trabalho foi observado efeito ($P < 0,05$) da adição de XB na dieta sobre a morfologia intestinal. A adição de XB resultou em maior altura, largura das vilosidades e maior espessura do epitélio das vilosidades quando comparados com os peixes que receberam a dieta sem adição de XB. Não houve efeito ($P = 0,374$) da adição de XB sobre a relação entre altura e largura das vilosidades (Tabela 7).

Tabela 7

Histologia intestinal da porção média (μm) de juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem ou com adição de xilanase e β -glucanase após 90 dias de experimento.

Parâmetros	Xilanase e β -glucanase		EPM ²	Valor de P
	0	0,20		
Altura total das vilosidades	125,15	152,79	3,030	0,010
Altura das vilosidades	96,03	119,95	1,050	0,001
Largura das vilosidades	31,28	38,20	0,759	0,001
AV:LV ¹	3,06	3,07	0,008	0,374
Espessura do epitélio das vilosidades	20,87	25,96	0,583	0,011

¹AV:LV: relação entre altura e largura das vilosidades, ²EPM, erro padrão da média.

3.6. Microbiota intestinal

Foram identificados 243 táxons e os mais abundantes foram os gêneros *Barnesiella*, seguido por *Bacteroides*, *Alistipes* e *Faecalibacterium*, respectivamente (Figura 2).

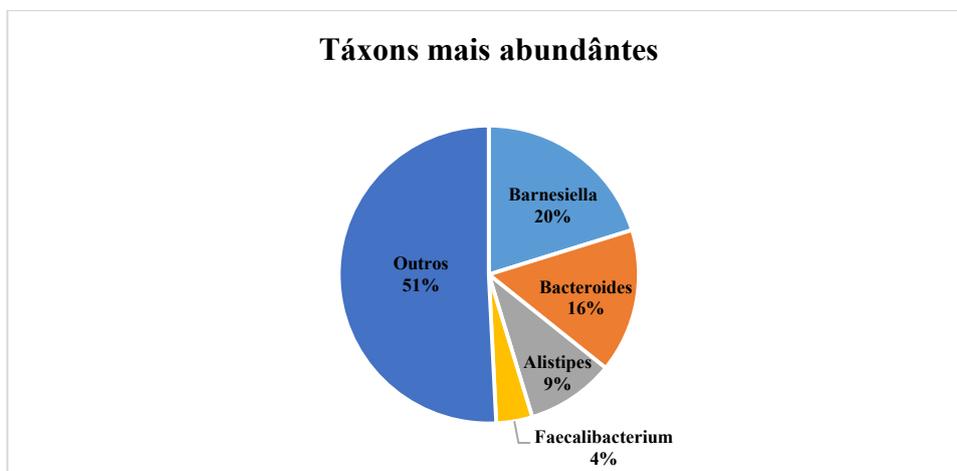


Figura 2. Composição taxonômica das amostras de microbiota juvenis de tilápias do Nilo alimentadas com dietas sem ou com adição de xilanase e β -glucanase, após 90 dias de experimento.

Foram identificados 25 gêneros com abundância diferente ($P < 0,05$) entre os peixes alimentados com a dieta sem e com adição de XB (Tabela 8). A comparação detalhada mostrou aumento significativo dos gêneros *Barnesiella*, *Bacteroides*, *Ruminococcus torques*, *Peptoclostridium*, *Anaerofilum*, *Butyricoccus* e *Parasutterella* nos peixes alimentados com dieta com adição de xilanase e β -glucanase, quando comparados com os peixes que foram alimentados com dieta sem adição de xilanase e β -glucanase. Em peixes alimentados com dieta sem adição de xilanase e β -glucanase foi observado aumento significativo dos gêneros *Faecalibacterium*, *Ruminiclostridium* 9, *Desulfovibrio*, *Escherichia-Shigella* e *Lachnoclostridium* quando comparados aos peixes alimentados com dieta com adição xilanase e β -glucanase.

Tabela 8

Gêneros bacterianos que foram significativamente diferentes em relação à abundância entre as tilápias alimentadas com dietas sem e com adição de xilanase e β -glucanase pelo teste de Welch ($P < 0,05$).

Gêneros	Xilanase e β -glucanase (g/kg)		Valor de P
	0,0	0,2	
<i>Barnesiella</i>	22,435 \pm 0,833	31,878 \pm 0,346	0,003
<i>Bacteroides</i>	16,351 \pm 0,735	20,530 \pm 0,578	0,020
<i>Ruminococcus torques</i>	1,963 \pm 0,191	4,892 \pm 0,308	0,002
<i>Peptoclostridium</i>	0,126 \pm 0,023	2,372 \pm 0,058	0,001
<i>Faecalibacterium</i>	8,712 \pm 0,495	2,289 \pm 0,165	0,004
<i>Ruminiclostridium 9</i>	2,556 \pm 0,093	2,041 \pm 0,064	0,024
<i>Desulfovibrio</i>	2,740 \pm 0,141	1,977 \pm 0,130	0,030
<i>Anaerofilum</i>	0,274 \pm 0,022	1,287 \pm 0,068	0,002
<i>Butyricoccus</i>	0,738 \pm 0,026	1,167 \pm 0,044	0,002
<i>Parasutterella</i>	0,001 \pm 0,001	1,121 \pm 0,053	0,003
<i>Lachnoclostridium</i>	1,365 \pm 0,061	0,763 \pm 0,063	0,001
<i>Eisenbergiella</i>	0,883 \pm 0,063	0,497 \pm 0,026	0,038
<i>Ruminiclostridium 5</i>	0,737 \pm 0,037	0,379 \pm 0,039	0,002
<i>Coprococcus 1</i>	0,474 \pm 0,031	0,215 \pm 0,027	0,002
<i>Escherichia-Shigella</i>	2,223 \pm 0,103	0,117 \pm 0,009	0,003
<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	1,295 \pm 0,035	0,109 \pm 0,006	0,000
<i>Bilophila</i>	0,132 \pm 0,003	0,095 \pm 0,006	0,022
<i>Roseburia</i>	0,192 \pm 0,013	0,076 \pm 0,008	0,003
<i>Tyzzereella</i>	0,187 \pm 0,011	0,071 \pm 0,012	0,001
<i>Blautia</i>	0,091 \pm 0,008	0,034 \pm 0,009	0,013
<i>Lachnospira</i>	0,084 \pm 0,008	0,024 \pm 0,004	0,012
<i>Ruminococcus 1</i>	1,005 \pm 0,101	0,009 \pm 0,004	0,027
<i>Bifidobacterium</i>	0,042 \pm 0,003	0,007 \pm 0,001	0,002
<i>Oxalobacter</i>	0,019 \pm 0,002	0,004 \pm 0,002	0,005
<i>Streptococcus</i>	0,102 \pm 0,012	0,002 \pm 0,003	0,030

Foi observado claro agrupamento das amostras por tratamento na análise de componentes principais (PCA), sugerindo uma diferenciação das comunidades bacterianas como resultado da adição de xilanase e β -glucanase. Foi observado que a comunidade bacteriana dos peixes que foram alimentados com dieta sem adição de xilanase e β -glucanase ficou mais dispersa quando comparada aos peixes que foram alimentados com dieta com adição de xilanase e β -glucanase, e sugere um efeito mais definido pela ação da adição das enzimas. Assim, o eixo PC1 (efeito da adição de XB na dieta) explicaria 94,2% das mudanças nos gêneros bacterianos presentes na microbiota (Figura 3).

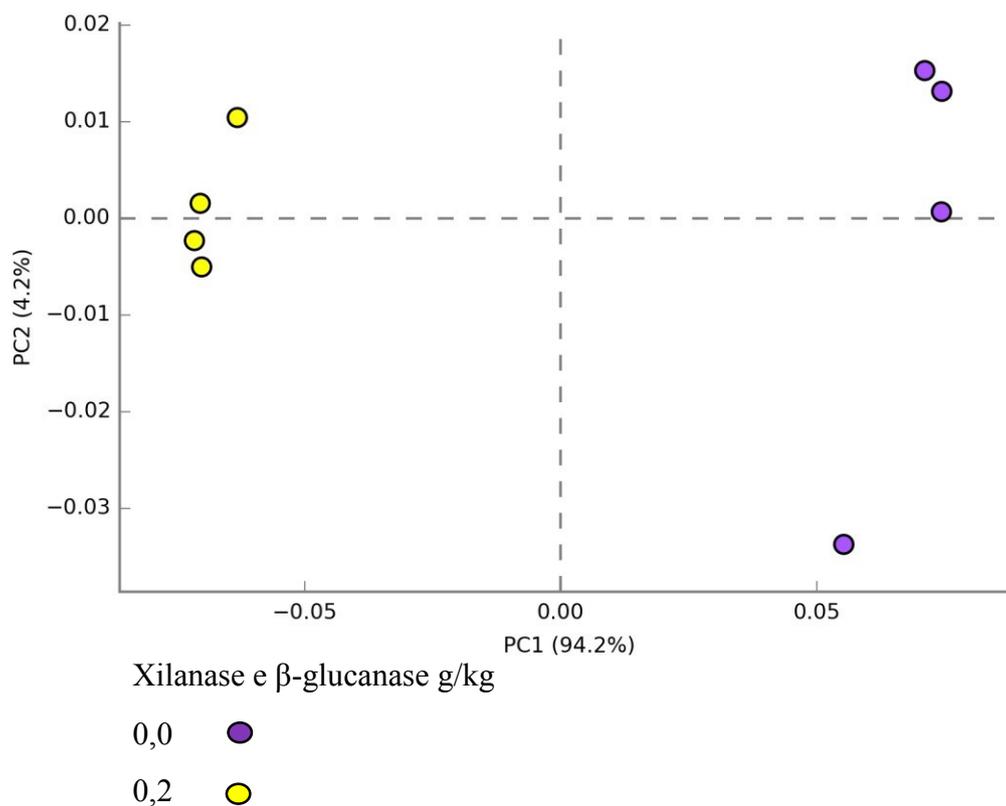


Figura 3. Análise de componentes principais (PCA) dos gêneros das comunidades bacterianas em tilápias alimentadas com dieta sem e com adição de xilanase e β -glucanase. A figura foi construída empregando o método de distância Bray-Curtis e representa a distância filogenética entre amostras, ou seja, um resumo da composição bacteriana de cada amostra. Cada ponto representa toda a microbiota de uma amostra. Pontos distantes têm microbiotas mais diferentes entre si.

Análises do “core microbiota” mostraram que a composição bacteriana de cada tratamento é diferente, apresentando OTUs únicas. Os peixes que foram alimentados com a dieta sem adição de xilanase e β -glucanase apresentaram 1900 OTUs únicas, não compartilhadas com os peixes que receberam a dieta com adição xilanase e β -glucanase. Os peixes que foram alimentados com a dieta com a dição de xilanase e β -glucanase apresentaram 2355 OTUs únicos. O “core microbiota” (compartilhado entre os grupos) apresentou 1897 OTUs. No “core microbiota” foram identificados alguns gêneros bacterianos como *Barnesiella*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium* e *Butyricoccus* entre outros, (Figura 4).

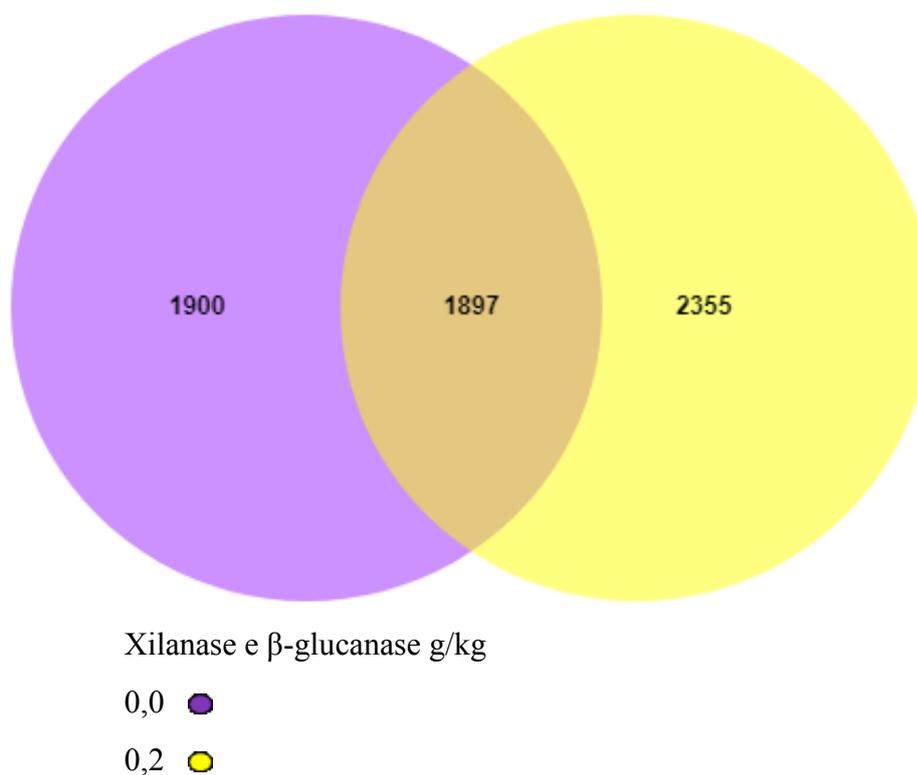


Figura 4. Diagrama de Venn que representa o “core microbiota” e número de OTUs únicos de tilápias alimentadas com dieta sem e com adição de xilanase e β -glucanase. Nem todos os OTUs puderam ser classificados em gêneros, visto que os bancos de dados disponíveis não apresentam a nomenclatura para todos os OTUs encontrados (foram classificados como “desconhecidos”, portanto).

4. Discussão

4.1. Desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo

Os melhores resultados de desempenho produtivo dos peixes alimentados com dieta com adição de XB estão associados a melhor digestibilidade e absorção dos nutrientes. As enzimas atuaram degradando os arabinosilanos e β -glucanos presentes na parede celular, disponibilizando mais energia e nutrientes para a síntese proteica, resultam em maior ganho de peso e melhor conversão alimentar. As carboidrases melhoram a eficiência energética, por causa da diminuição do gasto energético para os processos de digestão, absorção e mobilização de nutrientes para corpo. Dietas com alto teor de PNA, com adição de xilanase, melhora a digestibilidade dos nutrientes e o desempenho produtivo de tilápias do Nilo (Maas et al., 2018).

As carboidrases atuam hidrolisando os polímeros de carboidratos, gerando oligo ou polissacarídeos de peso molecular menor (Adeola e Cowiesonf, 2011). Dessa forma, a adição de XB em dietas com elevado teor de PNA aumenta a digestibilidade dos nutrientes que produzem energia, como o amido e a gordura. Os PNA aumentam a viscosidade intestinal reduzindo a acessibilidade das enzimas aos substratos, minimizando a capacidade de digestão e absorção dos nutrientes (Adeola e Bedford, 2004). Essa atuação enzimática permite que os peixes utilizem os nutrientes de forma mais eficiente, resultando em melhor conversão alimentar e maior ganho de peso.

A degradação dos PNA presentes na parede celular promove a liberação de nutrientes e / ou melhoram o acesso de enzimas (endógenas e / ou exógenas) aos nutrientes da dieta. A adição β -glucanase ou protease em dietas à base de trigo melhorou a degradação dos PNA e reduz a viscosidade aumentando a disponibilidade de macronutrientes em dietas para truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Dalsgaard et al., 2012, 2016). Os efeitos das carboidrases sobre o desempenho produtivo foram demonstrado anteriormente em tilápias do Nilo (Castillo e Gatlin III, 2015; Maas et al., 2018; Pedrotti et al., 2015).

Os arabinosilanos e β -glucanos presentes no farelo de trigo interferem na disponibilidade de aminoácidos (Silva et al., 2000). A XB aumentam a disponibilidade de energia e nutrientes de dietas que contenham arabinosilanos e β -glucanos (Tachibana et al., 2010) melhorando a conversão alimentar e maximizando o desempenho produtivo dos peixes.

Os peixes alimentados com dieta com adição de XB apresentaram maior taxa de gordura visceral e índice hepatossomático. Esses resultados estão associado a adição de

XB que atuaram sobre os PNA disponibilizando elevada quantidade de energia digestível, resultando em deposição de gordura visceral e aumentando o tamanho do fígado dos peixes, assim como observado previamente por outros autores (Martino et al., 2002; Mohanta et al., 2009).

No presente estudo, peixes alimentados com dietas com adição de XB apresentaram com menor comprimento absoluto e relativo do intestino. Esse fato deve-se, a maior digestibilidade e disponibilidade dos nutrientes da dieta que contribuem para ao aumento das vilosidades intestinais. Os peixes possuem a capacidade de modificar a estrutura e as propriedades absorptivas do seu sistema digestório em resposta a mudança da dieta (Rotta, 2003).

4.2. Composição corporal

No presente estudo, a adição de XB aumentou a retenção de proteína corporal dos peixes. A XB atuaram aumentando o acesso das proteases endógenas sob a proteína da dieta, disponibilizando maior quantidade de nutrientes para síntese proteica. As carboidrases melhoram a utilização da proteína, devido, a maximização do acesso das proteases digestivas sob os substratos (Tahir et al., 2008). A adição XB na dieta melhora a digestibilidade da proteína e dos aminoácidos aumentando a deposição de tecido muscular.

4.3. Parâmetros bioquímicos do sangue

No presente estudo, o nível de glicose e triglicerídeos foram menores em peixes alimentados com dieta sem adição de XB. Os PNA influenciam na quantidade de glicose plasmática, devido a menor digestão e absorção dos carboidratos e gordura (Sinha et al., 2011). Geralmente, em animais não ruminantes alimentados com dietas com maior teor de PNA ocorre menor taxa de esvaziamento gástrico, reduzida digestão dos carboidratos e atraso na síntese e absorção de glicose (Bach Knudsen, 2001). O aumento da viscosidade promovida pelos PNA afeta negativamente a emulsificação das gorduras e minimiza a lipólise (Pasquier et al., 1996). A baixa emulsificação das gorduras em dietas com alto teor de PNA formam complexos com os sais biliares impedindo a adequada digestão e absorção dos lipídeos (Ebiharam e Schneeman, 1989).

Os baixos níveis de glicose e triglicerídeos dos peixes alimentados com a dieta sem adição de XB corroboram com os de Kumar et al. (2011). O maior teor de glicose e triglicerídeos dos peixes alimentados com dietas com adição de XB indica maior reserva

endógena de energia (glicogênio hepático). A mobilização desse glicogênio para as atividades metabólicas de crescimento culmina em aumento da glicemia. Em situações de excesso de glicose a mesma é convertida em ácidos graxos e glicerol, aumentando a deposição de triglicerídeos (Ren et al., 2011).

4.4. *Histologia intestinal*

Nesta pesquisa, a adição de XB na dieta aumentou a altura e largura das vilosidades dos peixes. O maior desenvolvimento das vilosidades nos peixes alimentados com a dieta com XB está associado com a redução da viscosidade da digesta e com a maior disponibilidade de energia e nutrientes. Os PNA interferem no desenvolvimento da morfometria intestinal e conseqüentemente o ganho de peso e conversão alimentar dos peixes.

O consumo de uma dieta rica em PNA altera a fisiologia intestinal e anatomia por sua capacidade de aumentar as viscosidades da digesta. As taxas de proliferação das células das criptas, a migração celular ao longo do eixo cripta-vilosidade e a morte celular do vértice viloso via apoptose e descamação celular controlam o processo dinâmico de renovação celular do intestino delgado (Sinha et al., 2011). A presença de alta viscosidade da digesta no lúmen pode aumentar a taxa de perdas de células das vilosidades, levando à atrofia das vilosidades (Montagne et al., 2003).

A adição de fitase na dieta de tilápias, *Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus* aumenta o tamanho e a densidade das vilosidades intestinais (Hu et al., 2016). Afsharmanesh et al. (2013) avaliaram o efeito da adição de xilanase e β -glucanase em dietas à base de trigo e cevada para frangos e verificaram que os animais alimentados com as dietas suplementadas apresentaram-se com maior altura e largura das vilosidades, atrelando esses resultados com a melhor utilização da ração, melhora da microflora benéfica e redução das bactérias prejudiciais do intestino.

4.5. *Microbioma intestinal*

Essa é a primeira pesquisa realizada para avaliar o efeito da adição de xilanase e β -glucanase em dieta para juvenis de tilápias do Nilo sobre a microbiota intestinal. Os resultados do presente estudo sugerem que a microbiota intestinal de tilápias foi modulada com a inclusão de xilanase e β -glucanase na dieta. A adição de XB aumentou a quantidade de bactérias do gênero *Barnesiella*, *Bacteroides*, *Ruminococcus torques*, *Peptoclostridium*, *Anaerofilum*, *Butyricoccus* e *Parasutterella* dos peixes que foram alimentados com a

dieta com adição de XB, mostrando que a atuação das enzimas sobre os substratos também modifica a microbiota intestinal, podendo reduzir ou aumentar a quantidade de algumas bactérias.

Os resultados deste estudo mostraram que a microbiota intestinal dos animais foi dominada pelo gênero bacteriano *Barnesiella*, Trabalhos preliminares em peixes relataram enriquecimento deste gênero. Ray et al. (2017) analisaram o microbioma intestinal da tilápia do Nilo, *Oreochromis Niloticus* L. alimentadas com dietas suplementadas com Previda® e saponinas, observaram a presença de três filos em todas as amostras: *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. *Fusobacteria* foi o filo predominante em todas as amostras, representando mais de 80% das OTUs. Dentro da *Fusobacteria*, o gênero predominante foi *Cetobacterium* com mais de 76% das sequências atribuídas a essa espécie. *Barnesiella* foi o segundo gênero mais comum com mais de 6% das sequências totais.

Os resultados do presente estudo corroboram com os de Adeoye et al. (2016) que relataram que a inclusão de enzimas exógenas (fitase, protease e carboidrases) na dieta de tilápias alterou a composição da comunidade bacteriana no intestino dos peixes em contraste com os peixes que foram alimentados com a dieta controle. A microbiota intestinal influencia a resistência a doenças, o desenvolvimento e a sobrevivência (Denev et al., 2009). O tamanho da população e composição da microbiota intestinal altera a taxa de digestão e absorção de nutrientes pelo hospedeiro (Ray et al., 2012).

Diferentes ingredientes dietéticos, alimentos e aditivos alimentares exercem efeitos sobre a comunidade microbiana do intestino dos peixes (Ringø et al., 2016). Jiang et al. (2014) avaliaram os efeitos da adição de xilanase em dietas enriquecidas com proteína vegetal sobre a microflora intestinal de carpa juvenil (*Cyprinus carpio* var. Jian) e mostraram que a xilanase pode influenciar no equilíbrio da microflora intestinal, promovendo o crescimento de *Lactobacilos* e deprimindo o crescimento de *E. coli* e *Aeromonas*.

5. Conclusões

A adição de xilanase e β -glucanase melhora o desempenho produtivo, morfometria intestinal e modula a microbiota intestinal de tilápias do Nilo.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores agradecem à BASF - Ludwigshafen an Rhein, Alemanha, pela doação da enzima e análises laboratoriais.

Referências

- Adeola, O., Bedford, M.R., 2004. Exogenous dietary xylanase ameliorates viscosity-induced anti-nutritional effects in wheat-based diets for White Pekin ducks (*Anas platyrinchos domesticus*). *British Journal of Nutrition* 92, 87. <https://doi.org/10.1079/BJN20041180>
- Adeola, O., Cowieson, A.J., 2011. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production - Review. *American Society of Animal Science*. 89, 3189–3218.
- Adeoye, A.A., Fox, S.W., Merrifield, D.L., Davies, S.J., 2016. 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*.
- Afsharmanesh, M., Paghaleh, A.S., Kheirandish, R., 2013. Effects of sprouted and nonsprouted wheat and barley with and without enzyme on intestinal morphometry of broiler chickens 993–998. <https://doi.org/10.1007/s00580-012-1517-3>
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. 1995. Official methods of analysis, 16th ed. AOAC Int., Arlington, VA. 1995.
- Ayaz A and Karatas, S., 2010. Dominant aerobic bacterial community of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.1758) larvae during weaning from Artemia to dry feed in culture conditions. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 34: 501–506.
- Bach Knudsen, K.E., 2001. The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal Feed Science and Technology* 90, 3–20. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00193-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00193-6)

- Bedford, 1995. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology* 53, 145–155. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)02018-U](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)02018-U)
- Bedford, M.R., Apajalahti, J., 2001. Implications of Diet and Enzyme Supplementation on the Microflora of the Intestinal Tract. In advances in nutritional technology Proceedings of the 1st. World Feed conference 197–206.
- Bruce, T.J., Neiger, R.D., Brown, M.L., 2018. Gut histology, immunology and the intestinal microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed process variants of soybean meal. *Aquaculture Research* 49, 492–504. <https://doi.org/10.1111/are.13480>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Jeremy, E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., Mcdonald, D., Muegge, B.D., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303.QIIME>
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 4516–4522, 2011.
- Carre, B., Gomez, J., Chagneau, A.M., 1995. Contribution of oligosaccharide and polysaccharide digestion, and excreta losses of lactic acid and short chain fatty acids, to dietary metabolisable energy values in broiler chickens and adult cockerels. *British Poultry Science* 36, 611–629. <https://doi.org/10.1080/00071669508417807>
- Castillo, S., Gatlin III, D.M., 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture* 435, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.011>
- Cantas L, Sørby J.R.T., Alestro, P and Sørum H., 2012. Culturable gut microbiota diversity in zebrafish. *Zebrafish* 9: 26–37.
- Choct, M., 1997. Feed non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. *Feed milling international* 13–26.
- Classen, H.L., 1996. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. *Animal Feed Science and Technology* 62, 21–27. <https://doi.org/10.1016/S0377->

8401(96)01002-4

- Conte, A.J., Teixeira, A.S., Fialho, E.T., Schoulten, N.A., Bertechini, A.G., 2003. Efeito da fitase e xilanase sobre o desempenho e as características ósseas de frangos de corte alimentados com dietas contendo farelo de arroz. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32, 1147–1156. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000500015>
- Dalsgaard, J., Bach Knudsen, K.E., Verlhac, V., Ekmann, K.S., Pedersen, P.B., 2016. Supplementing enzymes to extruded, soybean-based diet improves breakdown of non-starch polysaccharides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* 22, 419–426. <https://doi.org/10.1111/anu.12258>
- Dalsgaard, J., Verlhac, V., Hjermitsev, N.H., Ekmann, K.S., Fischer, M., 2012. 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* 171, 181–191.
- Degnan, P. H., Ochman, H. 2012. Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The ISME Journal* 6, 1, 183-194.
- Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G., 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research* 1, 1–29.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300, 182–188.
- Ebiharam, K., Schneeman, B.O., 1989. Interaction of bile acids, phospholipids, cholesterol and triglyceride with dietary fibres in the small intestine of rats. *The Journal of Nutrition* 119, 1100–1106.
- Ferreira, C.M., Antoniassi, N.A.B., Silva, F.G., Povh, J.A., Potença, A., Moraes, T.C.H., Silva, T.K.S.T., Abreu, J.S., 2014. Características histomorfométricas do intestino de juvenis de tambaqui após uso de probiótico na dieta e durante transporte. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34, 1258–1260. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001200020>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. 2016., *The state of world fisheries and aquaculture*, Roma. 209.
- Hu, J., Ran, C., He, S., Cao, Y., Yao, B., Ye, Y., Zhang, X., Zhou, Z., 2016. Dietary microbial phytase exerts mixed effects on the gut health of tilapia : a possible reason

- for the null effect on growth promotion 1958–1966.
- Jiang, T.T., Feng, L., Liu, Y., Jiang, W.D., Jiang, J., Li, S.H., Tang, L., Kuang, S.Y., Zhou, X.Q., 2014. 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. <https://doi.org/10.1111/anu.12125>
- Kumar, V., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2011. Nutritional, physiological and haematological responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed detoxified *Jatropha curcas* kernel meal. *Aquaculture Nutrition* 17, 451–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00825.x>
- Larsen, A.M., Mohammed, H.H., Arias, C.R., 2014. Comparison of DNA extraction protocols for the analysis of gut microbiota in fishes. *Fems Microbiology Letters* 362, pii: fnu031.
- Leenhouders, J.I., Adjei-Boateng, D., Verreth, J.A.J., Schrama, J.W., 2006. Digesta viscosity, nutrient digestibility and organ weights in African catfish (*Clarias gariepinus*) fed diets supplemented with different levels of a soluble non-starch polysaccharide. *Aquaculture Nutrition* 12, 111–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00389.x>
- Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Dersjant-Li, Y., Schrama, J.W., 2018. The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture* 487, 7–14.
- Martino, R.C., P., J.E., C, C., C, L.P., Luiz, C., 2002. A case presenting with delayed motor milestones. *Neuromuscular Disorders* 15, 817–818. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2005.07.007>
- Mohanta, K.N., Mohanty, S.N., Jena, J., Sahu, N.P., Patro, B., 2009. Carbohydrate level in the diet of silver barb, *puntius gonionotus* (Bleeker) fingerlings: Effect on growth, nutrient utilization and whole body composition. *Aquaculture Research* 40, 927–937. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02186.x>
- Montagne, L., Pluske, J.R., Hampson, D.J., 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals 108, 95–117. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00163-9)
- Nitrayová, S., Heger, J., Patráš, P., Kluge, H., Broz, J., 2009. Effect of xylanase on apparent ileal and total tract digestibility of nutrients and energy of rye in young

- pigs. *Archives of Animal Nutrition* 63, 281–291.
- National Research Council- NRC., 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academy Press, Washington, DC, USA. 2011.
- Pasquier, B., Armand, M., Castelain, C., Guillon, F., Borel, P., Larion, D., 1996. Emulsification and lipolysis of triacylglycerols are altered by viscous soluble dietary fibre in acidic gastric medium in vitro. *Biochemical Journal* 314, 269–275.
- Pedrotti, F.S., Davies, S., Merrifield, D.L., Marques, M.R.F., Fraga, A.P.M., Mouriño, J.L.P., Fracalossi, D.M., 2015. The autochthonous microbiota of the freshwater omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the effect of dietary carbohydrates. *Aquaculture Research* 46, 472–481. <https://doi.org/10.1111/are.12195>
- Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H., 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology.
- Ray, A., Ghosh, K., Ringø, E., 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition* 18, 465–492.
- Ray, C., Bujan, N., Tarnecki, A., Davis, A.B., Arias, C. 2017. Analysis of the Gut Microbiome of Nile Tilapia *Oreochromis Niloticus* L. Fed Diets Supplemented with Previda® and Saponin. *Journal of Fisheries Sciences*.com 11, 36849.
- Ren, M., Ai, Q., Mai, K., Ma, H., Wang, X., 2011. Effect of dietary carbohydrate level on growth performance, body composition, apparent digestibility coefficient and digestive enzyme activities of juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L. *Aquaculture Research* 42, 1467–1475.
- Ringø, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S., Krogdahl, Å., 2006. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 261, 829–841. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.030>
- Rotta, M., 2003. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. EMBRAPA.
- Silva, V. José H., Mukami, F., Teixeira, F.L.A., 2000. Uso de Rações à Base de Aminoácidos Digestíveis para Poedeiras. *Revista Brasileira de Zootecnia* 29, 1446–1451.
- Sinha, A.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., De Boeck, G., Becker, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chemistry* 127, 1409–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.042>

- Tachibana, L., Pinto, L.G., Gonçalves, G., Pezzato, L., 2010. Xylanase and beta-glucanase on nutrient apparent digestibility of triticale by Nile tilapia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 62, 445–452.
- Tahir, M., Saleh, F., Ohtsuka, A., Hayashi, K., 2008. An effective combination of carbohydrases that enables reduction of dietary protein in broilers: Importance of hemicellulase. *Poultry Science* 87, 713–718. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00340>
- Ubeda, C., Bucci, V., Caballero, S., Djukovic, A., Toussaint, N.C., Equinda, M., Lipuma, L., Ling, L., Gobourne, A., Pamer, E.G., 2013. Intestinal Microbiota Containing *Barnesiella* Species Cures Vancomycin-Resistant. *Infection and Immunity* 81, 965–973. <https://doi.org/10.1128/IAI.01197-12>
- Yildirim, Y.B., Turan, F., 2010. Growth and feed utilization of tilapia (*Oreochromis aureus*) fed diets containing supplementary enzymes. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 62, 139–145.
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Ludwig, W., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glockner, O., 2013. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acid Research* 42, D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Zijlstra, R.T., Owusu-Asiedu, A., Simmins, P.H., 2010. Future of NSP-degrading enzymes to improve nutrient utilization of co-products and gut health in pigs. *Livestock Science* 134, 255–257. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.07.017>
- Zhou, Y., Yuan, X., Liang, X.F., Fang, L., Li, J., Guo, X., Bai, X., He, S., 2013. Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: The effect of exogenous cellulase. *Aquaculture* 416–417, 1–7.

V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de alimentos alternativos é importante para a elaboração de dietas práticas para os peixes. A realização de estudos para avaliar os coeficientes de digestibilidade aparente desses ingredientes, principalmente dos aminoácidos que estão relacionados diretamente com a síntese proteica e desempenho produtivo dos peixes é de suma importância para a elaboração de dietas que atendam de forma precisa as exigências nutricionais dos peixes e que sejam ambientalmente sustentáveis.

Atualmente, com o intuito de maximizar a digestibilidade da energia e dos nutrientes dos alimentos alternativos, as enzimas exógenas líquidas sugeriram como ferramenta inovadora nessa área, com alto nível de garantia da concentração enzimática após o processamento da ração, sendo de grande importância para melhorar os índices produtivos e para garantir a criação sustentável de organismos aquáticos.

No presente estudo demonstrou-se que os arabinosilanos e β -glucanos influenciam negativamente a utilização da energia e nutrientes em dietas de juvenis de tilápias do Nilo. A celulose não é um bom indicador por superestimar os coeficientes de digestibilidade aparente da energia e dos nutrientes de dietas com altos teores de arabinosilanos e β -glucanos. Evidenciou-se ainda a eficiência da xilanase e β -glucanase para melhorar a digestibilidade e disponibilidade da energia e dos nutrientes de dietas formuladas com alto teor de arabinosilanos e β -glucanos. Nessa pesquisa, a adição de 0,20 g/kg de xilanase e β -glucanase reduziu o consumo de ração em 17,52%, melhorando de forma expressiva a conversão alimentar dos peixes e maximizando o ganho de peso em 24,11%. A adição de xilanase e β -glucanase promove alterações na morfologia e microbiota intestinal de juvenis de tilápia do Nilo.

A utilização de enzimas exógenas como a xilanase e β -glucanase tem surgido como uma técnica inovadora que permite melhorar o valor nutritivo de dietas formuladas com alimentos de origem vegetal que possuem alto teor de polissacarídeos não amiláceos, principalmente arabinoxilanos e β -glucanos que se fazem presentes em quantidade significativa na parede celular de alimentos como o milho, soja e trigo. Os polissacarídeos não amiláceos exercem efeitos negativos sobre a digestibilidade da energia e nutrientes, e no desempenho produtivo dos peixes.

Com base nesse contexto, a adição XB em dietas elaboradas com alto teor de polissacarídeos não amiláceos é primordial para alcançar bons índices produtivos, entretanto, ainda é necessário a realização de estudos com outros alimentos alternativos para validar o efeito da adição de carboidrases sobre esses alimentos. É de grande valia estudos futuros com diferentes níveis de adição de XB para avaliação dos custos de produção e determinação dos níveis de excreção dos nutrientes para o meio aquático. A utilização de carboidrases líquidas em dietas à base de alimentos alternativos para tilápias surge como ferramenta inovadora para melhorar o desempenho produtivo dos peixes de forma sustentável e de menor custo de produção.

Os estudos de microbiota intestinal dos peixes é uma tecnologia inovadora que possibilita melhor entendimento sobre a digestibilidade dos nutrientes e desempenho produtivo dos peixes, é de suma importância a realização de estudos futuros que visem caracterizar a microbiota intestinal dos peixes nas diferentes fases de vida, sistema de criação e alimentados com diferentes tipos de dieta e elucidar os efeitos da microbiota sobre os parâmetros fisiológicos, sanitários e nutricionais.