

Tratamento enzimático em farelo de crambe e aplicação em dietas para *Rhamdia quelen*

Alexandra Pretto^{1*}, Leila Picolli da Silva², Marcelo Leite da Veiga³, Gabriela Alves Macedo⁴, Suzete Rossato⁵, Ana Carolina Kohlrausch Klinger⁶

Resumo

O estudo objetivou melhorar o valor nutricional do farelo de crambe (CR) através do tratamento com fitase comercial - FIT ou preparação não comercial (ação de fitase e tanase) – FITAN e utilização como substitutos proteicos na alimentação do jundiá. Verificou-se a eficiência dos tratamentos analisando compostos fenólicos, taninos (total, hidrolisáveis e condensados) e ácido fítico. A FIT atuou sobre o ácido fítico e a FITAN reduziu taninos (total e hidrolisáveis). No ensaio de alimentação, realizado em delineamento inteiramente casualizado (quatro repetições/tratamento), os farelos tratados foram acrescentados às dietas FIT ou FITAN. A dieta controle apresentava farinha de peixe e de carne e ossos como base proteica. Em cada um dos 12 tanques (capacidade 125 L) dispostos em sistema de recirculação de água, foram distribuídos 25 peixes, que durante nove semanas, foram alimentados com base na biomassa do tanque (duas alimentações diárias). Os dados de crescimento e aproveitamento de nutrientes foram submetidos à ANOVA e testes F e Dunnett ($p < 0,05$). O crescimento dos animais alimentados com os farelos tratados (FIT ou FITAN) foi estatisticamente igual, porém menor em comparação ao controle. Nos peixes do tratamento FITAN ocorreu redução na altura de vilosidades intestinais e espessura da camada muscular, redução da atividade de lipase, aumento de glicogênio e glicose hepáticos e menor proteína tecidual. Já, aqueles alimentados com a dieta FIT apresentaram menor glicose hepática. A inclusão do farelo tratado com fitase comercial, com menos taninos e ácido fítico, causou menores alterações metabólicas no organismo de jundiás.

Palavras-chave: Proteína vegetal. Antinutrientes. Fitase.

ABSTRACT

This study aimed at improving the nutritional value of crambe meal (CM) by treatment with commercial phytase – PHY or non-commercial enzyme preparation (action of phytase and tannase) – PHYTAN and use as a protein substitute in feeding silver catfish. The treatment efficiency was checked by analysis of phenolic compounds, tannins (total, hydrolysable and condensed) and phytic acid. FIT acted on the phytic acid and PHYTAN reduced tannins (total and hydrolysable). In the feeding trial, performed in a completely randomized design (four replications/treatment), the treated meals were added to PHY or PHYTAN diets. The control diet presented fish meal and meat and bone meal as protein base. In each

¹Curso de Tecnologia em Aquicultura, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil

*Autora para correspondência: ale.pretto@yahoo.com.br

²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

³Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

⁴Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

⁵Departamento de Zootecnia, Instituto Federal Farroupilha, Júlio de Castilhos, RS, Brasil

⁶Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Recebido para publicação em 13 de dezembro de 2016

Aceito para publicação em 28 de abril de 2017

of the 12 tanks (capacity 125 L) arranged in a water recirculation system, 25 fish were distributed, which during nine weeks were fed based on the biomass of the tank (two daily feeds). Growth and nutrient utilization data were submitted to ANOVA and F and Dunnett tests ($p < 0.05$). The growth of the animals fed with the treated meals (PHY or PHYTAN) was statistically the same, but smaller in comparison to the control. In the fish of the PHYTAN treatment there was a reduction in the height of intestinal villi and thickness of the muscular layer, reduction of lipase activity, increase of glycogen and hepatic glucose and lower tissue protein. The inclusion of commercial phytase-treated meal, with less tannins and phytic acid, caused less metabolic changes in the silver catfish organism.

Keywords: Protein plant. Antinutrients. Phytase.

Introdução

O Brasil tem apresentado evidente crescimento na produção de pescados nos últimos anos (IBGE, 2015). A aquicultura continental alcançou índices significativos, especialmente no último triênio, passando de cerca de 476 mil toneladas em 2013 para mais de 574 mil toneladas em 2015 (IBGE, 2013; 2015). Neste sentido, a produção aquícola aumentou a demanda por farinha de peixe. Estima-se que em 2010 a aquicultura utilizou 73% da produção mundial deste ingrediente (FAO, 2014).

Algumas fontes proteicas alternativas à farinha de peixe que podem ser utilizadas na nutrição piscícola são farelos, tortas e co-produtos gerados em grande quantidade a partir do processamento agroindustrial e da cadeia de biocombustíveis. O crambe, oleaginosa que pertence à família Brassicaceae, tem sido empregado na produção de biocombustíveis, pois o teor de óleo no grão varia de 36-38%. No Brasil é uma cultura alternativa para plantio na entressafra em regiões quentes (PITOL *et al.*, 2010). Estudos revelam que o farelo de crambe, co-produto obtido após a extração do óleo, apresenta nível proteico superior a 35%, podendo constituir fonte proteica para animais (PRETTO *et al.*, 2014).

Em relação à farinha de peixe, os farelos vegetais como o de crambe apresentam menos proteína e carboidratos de estrutura complexa e, por isso, menos digestíveis ao peixe (KROGDAHL *et al.*, 2010). Além disso, inibidores de protease, lectinas, saponinas e polissacarídeos não amiláceos, quando presentes, podem reduzir a palatabilidade do alimento e a eficiência nutricional (KROGDAHL *et al.*, 2010). Outro importante antinutriente é o ácido fítico, capaz de indisponibilizar 50 a 80% do fósforo do alimento, além de complexar outros minerais e aminoácidos (KUMAR *et al.*, 2012). Em relação aos compostos fenólicos, estes podem ser encontrados como

ácidos fenólicos, flavonoides, ligninas, taninos hidrolisáveis e condensados e podem contribuir para a adstringência, palatabilidade e estabilidade oxidativa do alimento (NACZK e SHAHIDI, 2006). Já os taninos podem quelar proteínas, amido e minerais prejudicando o aproveitamento de nutrientes (SILVA e SILVA, 1999).

Para minimizar os efeitos indesejáveis destes antinutrientes, a aplicação de enzimas exógenas como a fitase, capaz de disponibilizar fósforo inorgânico livre e a tanase, que ao quebrar taninos hidrolisáveis reduz a formação de complexos com proteínas, podem ser alternativas (RODRÍGUEZ-DURÁN *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2012). As melhorias no valor nutricional do alimento podem ser avaliadas através do desempenho zootécnico dos animais, avaliação da atividade de enzimas digestivas e de parâmetros relacionados ao metabolismo de proteínas e carboidratos em órgãos alvo como o fígado.

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um Siluriforme nativo do Sul do Brasil, com hábito alimentar omnívoro mas preferência por peixes, crustáceos, restos vegetais e detritos orgânicos (BALDISSEROTTO, 2004). No estado de Santa Catarina foram produzidos cerca de 740 toneladas em 2015, o que representa 1,9% da produção do Estado (EPAGRI, 2015). Em âmbito Nacional, os dados oficiais mais atuais revelam produção de 1747 toneladas em 2010 (MPA, 2011). A falta de estatísticas atualizadas dificulta visualizar a real situação da produção de jundiá no Brasil.

Em relação à nutrição da espécie, a combinação de proteína de origem animal e vegetal tem sido utilizada e em alguns estudos o emprego de farelos menos convencionais (farelo de linhaça demucilado, concentrado proteico de farelo de crambe) tem proporcionado crescimento semelhante ao farelo de soja (GOULART *et al.*, 2013; TYSKA *et al.*, 2013). Logo, o objetivo

do estudo foi avaliar o crescimento, atividade de enzimas digestivas e parâmetros bioquímicos em jundiás alimentados com farelo de crambe tratado com fitase comercial ou preparação não comercial com ação de fitase e tanase como substituto parcial de proteína de origem animal.

Material e métodos

O farelo de crambe foi obtido após extração da gordura (lavagem com hexano – proporção peso:volume 1:3 em triplicata) de amostras de torta de crambe (variedade FMS Brilhante – Fundação MS, Maracaju, Mato Grosso do Sul). O farelo foi pré-tratado com uma fitase comercial (FIT) produzida por *Aspergillus niger* (Natuphos® BASF, 10000 U.g⁻¹) ou enzima não comercial (FITAN) com atividade de fitase e tanase produzida por *Paecilomyces variotti* (460 U de fitase e 360 U de tanase.mg⁻¹) (MADEIRA *et al.*, 2011). Foi utilizado 1400 U de fitase e 1100 U de tanase por quilograma de farelo. Ao farelo foram adicionados água quente (40°C) (proporção peso:volume 1:3) e enzima (previamente dissolvida em água a 40°C). O pH da mistura foi verificado com peagâmetro digital (Servylab, MPA-210-P), logo após a homogeneização inicial, obtendo-se o valor 6,06. A incubação foi mantida durante duas horas em banho maria (40°C) com agitação constante da mistura, de acordo com STOREBAKKEN *et al.* (1998). Após completar a incubação, a mistura foi seca em estufa (55°C durante 24 horas). Após esfriar a temperatura ambiente por uma hora o farelo foi moído.

O farelo de crambe tratado com fitase, com fitase e tanase e os demais ingredientes utilizados na produção das rações foram analisados para matéria seca, cinzas, proteína bruta (AOAC, 1995), gordura (BLIGH e DYER, 1959), fibra em detergente neutro (VAN SOEST *et al.*, 1991), cálcio e fósforo (BAGINSKI *et al.*, 1982) e aminoácidos (BERNAL *et al.*, 2008) (TABELA 1).

Os antinutrientes analisados no farelo de crambe obtido após os tratamentos enzimáticos foram compostos fenólicos totais, taninos (total, condensados e hidrolisáveis), seguindo metodologias descritas em Makkar (2000) e ácido fítico, de acordo com Latta e Eskin (1980).

O farelo de crambe tratado enzimaticamente foi incorporado nas dietas para o jundiá (*Rhamdia quelen*) a fim de substituir 20% da proteína de origem animal. Os tratamentos FIT – dieta com inclusão de farelo de crambe tratado com fitase e FITAN – dieta com inclusão de farelo de crambe tratado com fitase e tanase foram aplicados. O tratamento controle (CON) apresentava farinha de carne e ossos suína e farinha de peixe como base proteica. As dietas foram formuladas para conter 36% de proteína bruta e 3200 Kcal.Kg⁻¹ de energia digestível (TABELA 2). Os ingredientes foram moídos, misturados, acrescidos de óleo de soja e água (50% do peso dos ingredientes secos). As misturas foram pelletizadas (4-5 mm) em moedor de carne, secas em estufa de circulação de ar forçado (50°C por 24 horas) e os peletes armazenados a -18°C até o uso.

Tabela 1 – Composição dos ingredientes utilizados nas rações experimentais

Nutrientes	Ingredientes					
	Farinha de peixe	Farinha de carne ossos	FIT	FITAN	Farelo trigo	Milho moído
	Composição proximal (%)					
Matéria seca	92,63	95,05	94,86	94,78	88,30	89,31
Proteína bruta	61,85	53,40	35,20	35,10	16,29	8,65
Gordura	8,25	14,68	6,86	6,64	2,92	3,10
Cinzas	23,35	24,84	7,67	7,78	4,57	1,31
FDN ¹	ND	ND	30,09	29,02	40,94	18,00
Carboidratos ²	0,00	2,13	15,04	16,24	23,58	58,25
Cálcio	4,70	3,46	0,90	0,88	0,14	0,03
Fósforo total	2,41	1,97	0,84	0,95	0,99	0,24
Lisina	4,34	3,00	1,71	1,71	0,62	0,24
Metionina	2,28	1,25	0,91	0,91	0,58	0,36
Arginina	3,77	3,54	2,35	2,35	1,07	0,39
Histidina	1,33	1,16	0,41	0,41	0,43	0,26
Isoleucina	2,52	1,63	1,26	1,26	0,50	0,29
Leucina	4,43	3,16	2,05	2,05	0,96	1,02
Fenilalanina	2,39	3,46	1,91	1,91	0,60	0,41
Treonina	2,54	1,75	1,20	1,20	0,51	0,32
Triptofano	0,58	0,40	ND	ND	0,23	0,07
Valina	3,06	2,22	1,86	1,86	0,72	0,40

Valores expressos como média (n=3) em base de matéria natural. ¹FDN = fibra em detergente neutro.

²Carboidrato calculado = 100-(proteína+cinzas+gordura+fibra detergente neutro+umidade). ND = não determinado

Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Tabela 2 – Formulação e composição proximal das dietas experimentais

Ingredientes (%)	Tratamentos ^a		
	CON	FIT	FITAN
Farinha de peixe	26,00	22,23	22,24
Farinha de carne e ossos	30,50	24,85	24,85
Farelo de crambe+fitase	-	18,90	-
Farelo de crambe+fitase+tanase	-	-	19,00
Farelo de trigo	13,57	7,58	8,25
Milho	11,80	8,00	6,45
Amido de milho	4,43	7,50	8,10
Óleo de soja	5,80	4,90	5,88
Sal	0,50	0,50	0,50
Fosfato bicálcico	0,55	0,45	-
Suplemento mineral-vitamínico ^b	2,00	2,00	2,00
Metionina	0,40	0,40	0,40
Areia	4,45	2,69	2,33
	Composição da dieta		
Proteína bruta ^c (%)	36,00	36,00	36,00
Gordura ^c (%)	13,16	12,13	13,04
Cinzas ^c (%)	14,42	13,26	13,31
Fibra em detergente neutro ^c (%)	7,68	10,23	10,05
Carboidratos ^d (%)	10,07	9,29	5,70
Energia digestível ^e (Kcal.Kg ⁻¹)	3.200	3.200	3.200
Cálcio ^c (%)	2,44	2,20	2,09
Fósforo total ^c (%)	1,49	1,36	1,30
Relação Ca:P	1,63	1,62	1,60

^aCON= dieta controle, base proteica consistindo de farinhas de origem animal; FIT=dieta com inclusão de farelo de crambe tratado com fitase; FITAN=dieta com inclusão de farelo de crambe tratado com fitase e tanase. ^bVitamina/mineral (kg produto): Ácido fólico: 300mg; Colina: 100g; Inositol: 10g; Niacina: 9000mg; Ácido pantotênico: 3000mg; Biotina: 0.1mg; Vit.A: 1000000UI; Vit. B1: 1500mg; Vit. B2: 1500mg; Vit. B6: 150mg; Vit. B12: 2000mg; Vit. C: 15g; Vit. D3: 240000UI; Vit. E: 10000mg; Vit. K3: 400mg; Cobre: 1000mg; Ferro: 6000mg; Iodo: 45mg; Manganês: 8000mg; Selênio: 60mg; Zinco: 14g. ^cCalculado baseado nos ingredientes analisados; ^dCarboidrato calculado: 100-(proteína bruta-cinzas-gordura-fibra em detergente neutro-umidade). ^eCalculado a partir da fórmula: $(\text{Proteína} \times 5,64 \times 0,83) + (-\text{Gordura} \times 9,44 \times 0,88) + (\text{Carboidrato} \times 4,11 \times 0,65) \times 10$ (MEYER *et al.*, 2004)

Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Foram utilizados 300 alevinos de jundiá com medidas iniciais de $7,6 \pm 0,1$ g e $9,5 \pm 1,0$ cm. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 12 unidades experimentais (tanques retangulares de fibra de vidro com capacidade de 125 L - 25 peixes/unidade experimental - 1520 g.m^{-3}) dispostas em circuito de recirculação de água com dois filtros biológicos contendo pedra britada e controle da temperatura da água (duas resistências elétricas - 1000 W). Assim, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três dietas e quatro repetições cada dieta. Os peixes foram aclimatados às condições experimentais durante uma semana e, a seguir, alimentados com as dietas teste durante nove semanas. As dietas foram fornecidas na proporção de 4-5% da biomassa da unidade experimental, ao longo do experimento, divididas em três refeições diárias (08:00, 13:00 e 17:00 horas). A cada três semanas foi realizada a pesagem da biomassa de cada tanque para ajuste de ração. As unidades experimentais foram limpas diariamente por sifonagem, às 09:00 e 15:30 horas, renovando-se 10% do volume total de água.

A qualidade da água do sistema experimental foi monitorada diariamente para temperatura ($26,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$) (termômetro de bulbo de mercúrio) e semanalmente para oxigênio dissolvido ($6,52 \pm 0,47 \text{ mg.L}^{-1}$) (oxímetro digital - YSI®, modelo 550A), pH ($7,08 \pm 0,25$ unidades) (peagâmetro digital-modelo MPA 210-P), amônia total ($0,23 \pm 0,06 \text{ mg.L}^{-1}$) (VERDOUW *et al.*, 1978), nitrito ($0,10 \pm 0,05 \text{ mg.L}^{-1}$), alcalinidade ($27,44 \pm 4,70 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) e dureza ($39,00 \pm 7,01 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) (BOYD e TUCKER, 1992).

No início e no final do experimento de crescimento todos os peixes de cada tanque foram pesados, após permanecerem em jejum por 18 horas. Antes da pesagem, os peixes foram anestesiados (protocolo 026/2011 - Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSM) com eugenol (20 μL de extrato puro por litro de água). A partir da pesagem dos animais foram obtidos dados de peso médio inicial (PMI), peso médio final (PMF), ganho de peso médio diário (GMD) = $((\text{peso final} - \text{peso inicial})/\text{período})$, taxa de crescimento específico (TCE) = $([\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})]/\text{período})$, conversão alimentar aparente (CAA) = $(\text{g alimento fornecido}/\text{g peso vivo ganho})$, biomassa (BM) e sobrevivência (S).

Ao final do ensaio de crescimento, dois peixes por tanque (oito por tratamento) foram capturados para coleta de sangue, feita por

punção na veia caudal com seringas heparinizadas. Alíquotas de plasma foram separadas após centrifugação do sangue a temperatura ambiente (10 minutos, $1200 \times g$) para determinar metabólitos plasmáticos. A seguir, os peixes foram anestesiados e eutanaziados por secção da medula espinhal para coleta do trato digestório e fígado. Estes órgãos foram pesados para determinar o índice digestivo-somático (IDS) = $((\text{peso do trato digestório}/\text{peso do peixe}) \times 100)$ e índice hepato-somático (IHS) = $((\text{peso do fígado}/\text{peso do peixe}) \times 100)$ e o trato digestório foi medido para determinar o quociente intestinal (QI) = $(\text{comprimento do trato digestório}/\text{comprimento do peixe})$ de acordo com Lovatto *et al.* (2014). Na sequência, o trato digestório e o fígado foram congelados (-20°C) para analisar a atividade de enzimas digestivas e parâmetros bioquímicos hepáticos.

Para análise morfológica intestinal, foi coletado o intestino de dois peixes em cada unidade experimental. Para tanto, amostras de intestino médio foram fixadas em formol 10% por 24 horas e desidratadas em série alcoólica, diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina. Os blocos foram trimados para obter cortes de seis μm de espessura em micrótomo (Easy Path modelo EP-31-20094) e as lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE). De forma aleatória, dois campos por lâmina foram fotografados para morfometria das vilosidades (altura da vilosidade até a lâmina própria e espessura da camada muscular) usando o *software* ImagePro Plus®.

Para análise de enzimas digestivas, o trato digestório foi separado em estômago e intestino total. No estômago foi analisada a atividade de protease ácida de acordo com Hidalgo *et al.* (1999) e no intestino determinadas tripsina e quimiotripsina, conforme Hummel (1959); lipase segundo Gawlicka *et al.* (2000) e α -amilase seguindo metodologia proposta por Hidalgo *et al.* (1999). As amostras foram ensaiadas em duplicata e as leituras corrigidas para soluções em branco. A proteína tecidual para expressar a atividade das enzimas foi realizada de acordo com Bradford (1976).

Para a quantificação de metabólitos hepáticos, o fígado foi fracionado em amostras de 50 mg. Foram determinados glicogênio (BIDINOTTO *et al.*, 1997), glicose (DUBOIS *et al.*, 1956) e proteína (BRADFORD, 1976). Para medir transaminases hepáticas (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase

- AST) e parâmetros plasmáticos (glicose, proteína total e colesterol) foram utilizados kits colorimétricos (Doles) e a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro.

Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via e a comparação dos tratamentos incluindo o farelo de crambe tratado enzimaticamente com o controle foi realizada pelo teste de Dunnett. O teste F foi usado para comparar as médias entre os tratamentos FIT em relação ao FITAN. Os dados sobre características nutricionais e antinutricionais estão expressos como médias \pm desvio padrão e os demais dados como média \pm erro padrão com $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS® versão 8.2.

Resultados

Resultados

Em relação ao farelo *in natura*, os tratamentos enzimáticos reduziram em torno de 35% o conteúdo de taninos hidrolisáveis. No entanto, os compostos fenólicos e taninos condensados foram similares independentemente do tipo de enzima usada, não havendo efeito significativo entre os tratamentos ($P > 0,05$). A concentração de ácido fítico no farelo de crambe foi reduzida em 29% após o tratamento com FIT em relação ao farelo tratado com FITAN e a forma *in natura* do mesmo (TABELA 3).

Tabela 3 – Antinutrientes analisados no farelo de crambe *in natura* e após tratamento com enzima comercial ou enzima não comercial

Antinutrientes (%)	Farelo de crambe		
	<i>In natura</i>	FIT	FITAN
Compostos fenólicos	0,98 \pm 0,08NS	0,98 \pm 0,03NS	0,90 \pm 0,03NS
Taninos totais	0,66 \pm 0,09A	0,43 \pm 0,01Ba	0,33 \pm 0,03Bb
Taninos hidrolisáveis	0,62 \pm 0,09A	0,394 \pm 0,002Ba	0,292 \pm 0,027Bb
Taninos condensados	0,040 \pm 0,008NS	0,035 \pm 0,002NS	0,035 \pm 0,001NS
Ácido fítico	2,26 \pm 0,01A	1,59 \pm 0,01Bb	2,24 \pm 0,03Aa

Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=4) em base de matéria seca. A,B- Médias seguidas de diferentes letras maiúscula, na linha, indicam diferença dos farelos tratados enzimaticamente em relação ao farelo *in natura* pelo teste Dunnett ($P < 0,05$). a,b – Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na linha, indicam diferença entre o FIT em relação ao FITAN pelo teste F ($P < 0,05$). NS- não significativo

Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

A substituição de farinhas de origem animal por farelo de crambe - FIT ou FITAN resultou em menor peso médio dos jundiás após nove semanas de alimentação (TABELA 4). Outros parâmetros como ganho de peso médio diário, a taxa de crescimento específico e biomassa (BM) apresentaram a mesma tendência.

A taxa de conversão alimentar aparente e a sobrevivência não diferiram após nove semanas de alimentação, do controle para os animais que receberam as dietas FIT ou FITAN. Entre os tratamentos FIT e FITAN não foram observadas diferenças para os parâmetros de crescimento ao final do estudo.

Tabela 4 – Desempenho zootécnico, parâmetros somáticos e morfométricos de juvenis de jundiá alimentados durante nove semanas com dieta baseada em proteína animal e dietas contendo farelo de crambe tratado com fitase ou com fitase e tanase

Variáveis	Tratamentos [‡]		
	CON	FIT	FITAN
Parâmetros de crescimento			
Peso médio inicial (g)	7,56±0,05NS	7,60±0,02NS	7,61±0,07NS
Peso médio final (g)	56,25±2,41A	42,33±3,11Ba	43,27±2,61Ba
Ganho médio diário (g.dia ⁻¹)	0,77±0,04A	0,55±0,05Ba	0,57±0,04Ba
Taxa de crescimento específico (%.dia ⁻¹)	3,18±0,08A	2,71±0,12Ba	2,75±0,11Ba
Conversão alimentar aparente	1,31±0,08NS	1,61±0,10NS	1,63±0,11NS
Biomassa (Kg)	1,17±0,05A	0,89±0,06Ba	0,90±0,06Ba
Sobrevivência (%)	99,0±2,0NS	100NS	98,91±2,17NS
Parâmetros somáticos			
Índice digestivo-somático (%)	2,87±0,13NS	3,02±0,18NS	2,95±0,21NS
Índice hepato-somático (%)	1,40±0,08NS	1,29±0,13NS	1,19±0,04NS
Quociente intestinal	1,21±0,08NS	1,21±0,06NS	1,37±0,10NS
Parâmetros morfométricos			
Altura de vilosidade (µm)	282,69±17,77A	276,32±21,97Aa	222,05 ±14,83Ba
Espessura da camada muscular (µm)	61,80±3,55A	67,07±4,20Aa	51,44±3,39Ab

CON= dieta controle, base proteica consistindo de farinhas de origem animal; FIT = inclusão de farelo de crambe tratado com fitase; FITAN = inclusão de farelo de crambe tratado com fitase e tanase. Valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n=4 para parâmetros de crescimento e n=8 para parâmetros somáticos e morfométricos). A,B- Médias seguidas de diferentes letras maiúscula, na linha, diferem entre si pelo teste Dunnett (P<0,05). a,b – Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na linha, indicam diferença entre o FIT em relação ao FITAN pelo teste F (P<0,05). NS- não significativo

Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Em relação aos parâmetros somáticos, os tratamentos contendo farelo de crambe tratados enzimaticamente não alteraram o índice digestivo-somático, índice hepato-somático e quociente intestinal quando comparado ao controle após nove semanas de alimentação. A análise da morfometria intestinal revelou redução na altura de vilosidades para os animais que receberam o tratamento FITAN em relação aos demais tratamentos. A espessura da camada muscular também foi inferior para este tratamento, diferindo somente do tratamento FIT.

Em relação às enzimas digestivas, houve redução da atividade de lipase no intestino de

peixes submetidos ao tratamento FITAN em relação aos peixes do tratamento controle (TABELA 5). As atividades de protease ácida, tripsina, quimotripsina e amilase não foram alteradas entre os tratamentos avaliados. Da mesma forma, os parâmetros plasmáticos de glicose, proteína total e colesterol não apresentaram variação significativa entre os tratamentos. No fígado, os peixes alimentados com a dieta FITAN apresentaram maior concentração de glicogênio e glicose em comparação aos peixes alimentados com a dieta FIT e menor nível de proteína tecidual em relação ao tratamento controle. A concentração das aminotransferases não diferiu entre os tratamentos avaliados.

Tabela 5 – Atividade de enzimas digestivas, parâmetros bioquímicos plasmáticos e hepáticos de juvenis de jundiá alimentados durante nove semanas com dieta baseada em proteína animal e dietas contendo farelo de crambe tratado com fitase ou com fitase e tanase

Variáveis	Tratamentos [‡]		
	CON	FIT	FITAN
Enzimas digestivas			
Protease ácida	78,42±4,47NS	87,55±8,35NS	74,86±7,51NS
Tripsina	7,07±0,39NS	7,06±0,58NS	7,15±0,49NS
Quimotripsina	8,58±0,24NS	8,50±0,52NS	8,14±0,55NS
Amilase	0,20±0,01NS	0,15±0,02NS	0,20±0,02NS
Lipase	13,46±0,57A	11,70±0,66A	10,85±0,85B
Parâmetros bioquímicos plasmáticos			
Glicose	40,42±2,91NS	42,43±1,03NS	41,20±2,11NS
Proteína total	4,09±0,16NS	3,75±0,17NS	3,62±0,07NS
Colesterol	191,61±8,95NS	159,01±15,41NS	167,20±9,84NS
Parâmetros bioquímicos hepáticos			
Glicogênio	573,29±45,68A	487,30±23,82Ab	587,92±20,71Aa
Glicose	490,10±15,82A	377,60±20,02Bb	489,31±25,45Aa
Proteína	57,52±1,50A	50,26±2,41A	48,63±2,54B
Alanina aminotransferase (ALT)	79,62±4,70NS	72,43±4,74NS	75,72±4,31NS
Aspartato amino transferase (AST)	1397,74±55,23NS	1285,90±60,82NS	1255,97±83,94NS

[‡]CON = dieta controle, base proteica consistindo de farinhas de origem animal; FIT = inclusão de farelo de crambe tratado com fitase; FITAN = inclusão de farelo de crambe tratado com fitase e tanase. ALT = Alanina aminotransferase. AST = Aspartato amino transferase. Valores expressos como média ± erro padrão da média (n=8). Protease ácida = μg tirosina. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ proteína $^{-1}$; tripsina = μmol TAME. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ proteína $^{-1}$; quimotripsina = mmol BTEE. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ proteína $^{-1}$; amilase = μmol glicose. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ proteína $^{-1}$; lipase = μg substrato. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ proteína $^{-1}$; glicose = $\text{mg}.\text{dL}^{-1}$; proteína total = $\text{g}.\text{dL}^{-1}$; colesterol = $\text{mg}.\text{dL}^{-1}$; glicogênio = μmol glicose.g tecido $^{-1}$; glicose = μmol glicose.g tecido $^{-1}$; proteína = $\text{mg}.\text{g}$ tecido $^{-1}$; ALT = $\text{UI}.\text{mg}$ tecido $^{-1}$; AST = $\text{UI}.\text{mg}$ tecido $^{-1}$. A,B - Médias seguidas de diferentes letras maiúscula, na linha, diferem entre si pelo teste Dunnett ($P<0,05$). a,b – Médias seguidas de diferentes letras minúsculas, na linha, indicam diferença entre o FIT em relação ao FITAN pelo teste F ($P<0,05$). NS- não significativo. Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Discussão

A análise química do farelo revelou que a aplicação das enzimas fitase ou fitase+tanase alterou a concentração de alguns antinutrientes em comparação ao farelo *in natura*. Os efeitos da fitase comercial (FIT) foram demonstrados sobre a concentração de ácido fítico (-29,6%).

Para incubação das enzimas FIT ou FITAN sobre o farelo de crambe foi utilizada a proporção peso:volume 1:3, temperatura de 40°C e duas horas de incubação. De acordo com Storebakken *et al.* (1998) este protocolo aumentou a concentração de fósforo solúvel (superior a 60%) e reduziu o conteúdo de ácido fítico (em torno de 95%) nas dietas contendo concentrado de soja

tratado com fitase. A maioria das fitases tem uma faixa de pH de 4,5-6,0 e temperatura de 45-60°C que otimizam sua atuação. No estudo de Storebakken *et al.* (1998), o teor de ácido fítico do concentrado proteico de soja, de 0,8%, é menor em relação ao farelo de crambe (2,26%), e a concentração de enzima utilizada foi suficiente para a desfitinização. De acordo com os resultados, para o farelo de crambe pode ser necessário maior concentração de enzima fitase.

Já, a fitase não comercial (FITAN) não atuou sobre o ácido fítico do farelo de crambe. Tal resultado pode estar relacionado ao tipo de substrato, a menor diluição usada e o reduzido tempo de incubação da enzima para atuar sobre o substrato, já que no estudo de Schons *et al.* (2011) a fitase comercial e tanase não comercial aplicadas sobre sorgo a uma proporção farelo:água 1:6 e na temperatura de 34°C, durante 24 horas de incubação, aumentaram em 255% a concentração de fósforo no meio. Neste estudo também houve redução de 87% em fenóis totais e 43% em taninos hidrolisáveis, utilizando a concentração de 100 U/Kg de farelo para cada enzima. Para ótima atividade e estabilidade da tanase produzida por *Paecilomyces variotii* são necessários temperatura de 40 a 65°C e pH 4,5 a 6,5 (BATTESTIN e MACEDO, 2007). A enzima FITAN não alterou a concentração de taninos condensados no farelo, pois de acordo com RODRÍGUEZ-DURÁN *et al.* (2011), a tanase não afeta as ligações entre moléculas de carbono e com isso, não hidrolisa taninos condensados. As demais frações de taninos analisadas (taninos totais e hidrolisáveis) foram reduzidas após aplicação de ambos os tratamentos enzimáticos. A redução nestes antinutrientes foi mais efetiva com a aplicação da enzima FITAN, porém o simples processo de agitar o farelo de crambe em água a 40°C também reduziu parte da concentração de taninos totais e hidrolisáveis, conforme observado no tratamento FIT. Em estudo de Mandal (2012) houve redução em 44 e 53% no conteúdo de taninos em amostras de torta de amendoim e folhas de *Pistia* sp., respectivamente, após a agitação destes ingredientes em água durante 12 horas (proporção peso:volume 1:5). Assim, os efeitos do tratamento prévio com FIT ou FITAN sobre características antinutricionais do farelo de crambe poderão refletir em diferentes respostas de desempenho zootécnico e metabolismo em jundiás.

Muitos estudos mostraram que a inclusão de enzimas tais como fitase em dietas con-

tendo ingredientes de origem vegetal melhora a resposta de crescimento, a digestibilidade e a deposição de nutrientes pelos peixes (BISWAS *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2007). No entanto, os resultados deste estudo revelaram que até mesmo com a redução de antinutrientes, o farelo de crambe tratado enzimaticamente não proporcionou desempenho similar ao tratamento controle quando substituiu 20% da proteína de origem animal (farinha de peixe e de carne e ossos). Resultados similares foram encontrados quando Fortes-Silva *et al.* (2011) substituíram parcialmente farinha de peixe por farelo de soja (31%) na dieta de sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Até mesmo com a adição de fitase (1500 FTU/Kg), os animais apresentaram menor ganho de peso e taxa de crescimento específico neste tratamento comparado a dieta contendo farinha de peixe como base proteica. Lim e Lee (2009) também observaram que a inclusão de fitase (1000 FTU/Kg) em dietas com substituição de 20 ou 30% de proteína animal pela mistura dos farelos de soja e algodão não teve efeito sobre a resposta de crescimento do peixe parrot (*Oplegnathus fasciatus*). Assim como nos outros estudos, a incorporação de farelos vegetais, neste caso o crambe, pode ter piorado a digestão e a absorção de nutrientes devido a persistência de antinutrientes não metabolizados pelas enzimas aplicadas. Além disso, as fibras caracterizam outra fração de antinutrientes que foram encontradas em porcentagem alta na fonte deste estudo e contribui para reduzir o valor nutricional do alimento. As alterações nos antinutrientes presentes no farelo de crambe após a ação de enzimas não foram suficientes para igualar a resposta de crescimento quando este farelo foi incluído na ração (FIT ou FITAN). Em vista da quantidade de farelo adicionada às rações, a redução de antinutrientes não foi suficiente para evitar a queda no desempenho zootécnico dos animais.

Os tratamentos contendo farelo de crambe não alteraram índices somáticos como índice digestivo-somático, índice hepato-somático e quociente intestinal em jundiás comparado ao controle. No intestino, a redução na altura de vilosidades nos peixes que receberam a dieta FITAN em relação ao controle apresenta relação com os antinutrientes ainda presentes no farelo, como por exemplo, o ácido fítico e taninos, resultando em menor ganho em peso e crescimento dos animais. Em outros estudos foram observadas alterações semelhantes quando da utilização de farelos vegetais na dieta. A inclusão

de farelo de semente de alfarrobeira (52%) em dietas para alevinos de *Sparus aurata* reduziu o comprimento de vilosidades e a espessura da camada cerosa no intestino distal, resultado que converge ao menor peso final e taxa de crescimento específico observado neste tratamento. O principal antinutriente presente neste farelo é tanino (MARTÍNEZ-LLORENZ *et al.*, 2012). Já, na alimentação de larvas de jundiá, a substituição de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) por farelo de soja (25-100%) reduziu a altura de enterócitos e a largura de pregas da mucosa na porção distal do intestino, devido à presença de antinutrientes (lectinas, proteínas alergênicas), ocasionando prejuízos à absorção de macromoléculas por pinocitose (HERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Estas respostas ajudam na compreensão da utilização de nutrientes de diferentes fontes vegetais pelos peixes.

O perfil ou a concentração de enzimas digestivas pode ser alterado pelo tipo, fonte e quantidade de nutrientes ingeridos (LUNDS-TEDT *et al.*, 2004). A absorção de nutrientes pelo peixe depende da taxa em que estes são absorvidos no lúmen intestinal. A inclusão de fontes vegetais na dieta de peixes pode causar redução na atividade de enzimas digestivas e digestibilidade e absorção de nutrientes (LIN e LUO, 2011), efeitos que podem ser associados à presença de fatores antinutricionais nestes alimentos. Entre as enzimas avaliadas neste estudo, a atividade da lipase intestinal sofreu redução nos peixes submetidos ao tratamento FITAN. Da mesma forma, as maiores alterações hepáticas (aumento de glicogênio e glicose e redução de proteína) foram encontradas nos animais alimentados com a dieta FITAN em relação ao farelo tratado com FIT. Segundo Kumar *et al.* (2011), a inclusão de 1,5% de fitato em dietas para tilápia do Nilo reduziu o total de proteína, cálcio, fósforo e glicose plasmáticos em relação ao grupo que recebeu fitato e fitase e àquele considerado controle (sem inclusão de fitato e enzima). O ácido fítico forma complexos com proteínas, lipídios e minerais, o que dificulta a

ação das enzimas e a disponibilidade de vários nutrientes (KUMAR *et al.*, 2012).

Assim, o tratamento com fitase comercial, que reduziu parcialmente o ácido fítico do farelo de crambe, resultou em menores prejuízos e desordens metabólicas nos jundiás. Desta forma, apesar dos animais demonstrarem menor crescimento ao serem alimentados com o farelo de crambe tratado (ambas as formas de enzimas) em detrimento à proteína de origem animal, os indicadores digestivos e metabólicos demonstraram maior eficiência do tratamento com fitase comercial em detrimento ao realizado com fitase não comercial. No entanto, adaptações na metodologia como maior tempo de atuação das enzimas e ajustes na concentração destas podem melhorar a retirada de antinutrientes do farelo de crambe. Ainda, outros níveis de inclusão deste farelo podem ser avaliados na alimentação do jundiá, buscando incrementar seu desempenho.

Conclusão

A retirada parcial de taninos e de ácido fítico do farelo de crambe não foi suficiente para igualar o crescimento dos animais ao tratamento controle, porém a ação da fitase comercial causou as menores alterações metabólicas em jundiás. A maior retirada de antinutrientes e melhorias no aproveitamento nutricional deste ingrediente pelos peixes a fim de recomendar sua utilização como substituto de farinhas de origem animal passa por ajustes no protocolo de tratamento enzimático (tempo de incubação e concentração de enzimas).

Agradecimentos

Ao CNPq e FAPERGS (processos 558861/2010-5; 5004592/2010-6 e 1008346, respectivamente) pelo apoio financeiro. À Fundação MS (Pesquisa e Difusão de Tecnologias Agropecuárias) (MS) pela doação do farelo de crambe. À BASF pela doação da enzima fitase (Natuphos®).

Referências

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

BAGINSKI, E. S.; SLAWA, S. M.; ZAK, B. Phosphate, inorganic. **Selected methods of clinical chemistry**. Washington, DC: American Association of Clinical Chemistry,

1982.

BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá. In: BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. (Ed.) **Criação de jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. p.67-72.

- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotti*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 191-199, 2007.
- BERNAL, J. L. *et al.* Use of supercritical fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry to obtain amino acid profiles from several genetically modified varieties of maize and soybean. **Journal of Chromatography A**, v. 1192, n. 2, p. 266-272, 2008.
- BIDINOTTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 10, p. 53-60, 1997.
- BISWAS, A. K. *et al.* Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 267, n. 1, p. 284-291, 2007.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. **Water quality and pond soil analysis for aquaculture**. Alabama: Alabama Agricultural Experiment Station, 1992, 183p.
- BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- DUBOIS M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-358, 1956.
- EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Dados de produção da piscicultura de água doce 2015**. Disponível em: <<https://goo.gl/fWLOXw>>. Acesso em: 20 mar. 2017.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2016.
- FORTES-SILVA, R.; SÁNCHEZ-VÁSQUEZ, F. J.; MARTÍNEZ, F. J. Effects of pretreating a plant-based diet with phytase on diet selection and nutrient utilization in European sea bass. **Aquaculture**, v. 319, n. 3, p. 417-422, 2011.
- GAWLICKA, A. *et al.* Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. **Aquaculture**, v. 184, n. 3, p. 303-314, 2000.
- GOULART, F. R. *et al.* Atividade de enzimas digestivas e parâmetros de crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com farelo de linhaça *in natura* e demucilada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3069-3080, 2013.
- HERNÁNDEZ, D. R. *et al.* Dietary soybean meal on growth and intestinal morphology of South American catfish, *Rhamdia quelen*, larvae. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1662-1668, 2012.
- HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, v. 170, n.3, p. 267-283, 1999.
- HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n.12, p. 1393-1399, 1959.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal 2013**. Disponível em: <<https://goo.gl/YoFP6O>>. Acesso em: 20 mar. 2017.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal 2015**. Disponível em: <<https://goo.gl/6W5XdE>>. Acesso em: 20 mar. 2017.
- KROGDAHL, A. *et al.* Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. **Aquaculture Research**, v. 41, n.3, p. 333-344, 2010.
- KUMAR, V. *et al.* Phytate and phytase in fish nutrition. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 96, n.3, p. 335-364, 2012.
- KUMAR, V. *et al.* Isolation of phytate from *Jatropha curcas* kernel meal and effects of isolated phytate on growth, digestive physiology and metabolic changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n.9, p. 2144-2156, 2011.
- LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n.6, p. 1313-1315, 1980.
- LIM, S-J.; LEE, K-J. Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. **Aquaculture**, v. 290, n.3, p. 283-289, 2009.
- LIN, S.; LUO, L. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activity in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 168, n.1, p. 80-87, 2011.
- LOVATTO, N. M. *et al.* Efeitos de dietas contendo concentrados proteicos vegetais no desempenho e atividade de enzimas digestivas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, p. 1071-1082, 2014.
- LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei:Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 137, n. 3, p. 331-339, 2004.
- MADEIRA JUNIOR, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous

- production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 102, n.15, p. 7343-7348, 2011.
- MAKKAR, H. P. S. **Quantification of Tannins in Tree Foliage**. 2000. Disponível em: <<https://goo.gl/jxPJ0k>>. Acesso em : 21 maio 2016.
- MANDAL, S. **Elimination of tannin for utilization of some plant feedstuffs in formulation of diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton)**. 244 f. Thesis (Doctorate - Philosophy). Department of Zoology, The University of Burdwan, Burdwan, 2012.
- MARTÍNEZ-LLORENZ, S. *et al.* Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. **Aquaculture**, v. 338, p. 124-133, 2012.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2011. 60 p.
- MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M.; BORBA, M. R. A importância da quantidade de energia na ração de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 14, p. 53-57, 2004.
- NACZAK, M.; SHAHIDI, F. Phenolic in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n.5, p. 1523-1542, 2006.
- PITOL, C.; BROCH, D. L.; ROSCOE, R. **Tecnologia e produção: crambe 2010**. Maracaju: Fundação MS para Pesquisa e Difusão de Tecnologias Agropecuária, 2010. 60p.
- PRETTO, A. *et al.* Nutrientes, antinutrientes e detoxificação do farelo de crambe para uso na nutrição animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 3345-3354, 2014.
- ROCHA, C.B. *et al.* Suplementação de fitase microbiana na dieta de alevinos de jundiá: efeito sobre o desempenho produtivo e as características de carcaça. **Ciência Rural**, v. 37, p. 772-1778, 2007.
- RODRÍGUEZ-DURÁN, L. *et al.* Novel strategies for upstream and downstream processing of tannin acyl hydrolase. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-20, 2011.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's guide**. Version 8.2. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 943p.
- SCHONS, P. F. *et al.* Effect of enzymatic treatments on tannins and phytate in sorghum (*Sorghum bicolor*) and its nutritional study in rats. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n.6, p. 1253-1258, 2011.
- SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 5-19, 1999.
- STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K. D.; ROEM, A. J. Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase treated soy-protein-concentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture**, v. 161, n.1, p. 365-379, 1998.
- TYSKA, D. *et al.* Concentrados proteicos vegetais na alimentação de jundiás (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1251-1257, 2013.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n.10, p. 3583-3597, 1991.
- VERDOUW, H.; VANECHTELDT, C. J. A.; DECKKERS, E. M. J. Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, v. 12, n. 6, p. 399-402, 1978.