



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável

SILVIO MAGRI FILHO

ENZIMAS EXÓGENAS NA DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES DA RAÇÃO
PARA JUVENIS DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

GOIÂNIA
2012

SILVIO MAGRI FILHO

**ENZIMAS EXÓGENAS NA DIGESTIBILIDADE DA RAÇÃO PARA JUVENIS DE
TAMBAQUI *Colossoma macropomum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Produção Sustentável da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do grau de MESTRE em Ecologia e Produção Sustentável.

GOIÂNIA
2012

SILVIO MAGRI FILHO

ENZIMAS EXÓGENAS NA DIGESTIBILIDADE DA RAÇÃO PARA JUVENIS DE
TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

APROVADO EM: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Prof^a. Dr^a. Delma Machado Cantisani Padua - Orientadora

Avaliador Interno: Prof. Dr. Breno de Faria e Vasconcellos (PUC Goiás)

Avaliadora Externa: Zootecnista Dra. Janaína Gomes Araújo Santos (FAO/MPA)

Suplente: Prof. Dr. Jales Teixeira Chaves Filho (PUC Goiás)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa, amiga e companheira Regina Cláudia das Dores Magri e meus dois amados filhos Leonardo Vitor Magri e Éric Vicent Magri.

AGRADECIMENTOS

Várias pessoas contribuíram direta ou indiretamente na construção deste trabalho. Todas merecem meu agradecimento. Porém, algumas delas devem ser destacadas: minha família em primeiro lugar, esposa, filhos e mãe (Dona Alvídia) principalmente pela compreensão dos momentos passados longe de casa; minha incrível e admirável orientadora Dr^a Delma Machado, pelo conhecimento e paciência transmitidos na execução deste projeto; à Dr^a Janaína Gomes Araújo Santos que me treinou e ajudou muito em todas as etapas do trabalho; ao estagiário e futuro Zootecnista Thiago Aguiar, que pôs a mão na massa junto comigo; a Zootecnista Carol Mota, que tanto contribuiu, principalmente nas análises bromatológicas, ao Prof. Igo Guimarães da UFG Campus de Jataí, a toda equipe do Laboratório de Fisiologia da Digestão da UFG, em especial na pessoa da Dr^a Cristine Cysneiros e do Dr. Cirano e também ao Dr. Reginaldo Nasser pelas sugestões e pela preparação do complexo. Ao corpo docente do MEPS e aos funcionários dos laboratórios do Departamento de Zootecnia e também do Departamento de Engenharia de Alimentos da PUC-GO. E, finalmente, a FAPEG, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho foi produzido e determinado a atividade de um complexo enzimático extraído do fungo *Aspergillus awamori* e avaliou-se os coeficiente de digestibilidade aparente (CDa) da proteína bruta, energia bruta e matéria seca de ração referência para juvenis de tambaqui com 3 níveis crescentes de solução enzimática obtida do fungo. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (100ml de água sem solução enzimática/Kg de ração; 100 ml de solução enzimática/Kg da ração; 150 ml de solução enzimática/Kg da ração e 200 mL de solução enzimática/Kg da ração) e três repetições no tempo. Foi instalado no Laboratório de Pesquisas em Aquicultura LAPOA do Departamento de Zootecnia da PUC Goiás. Foram utilizados 96 juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, com peso médio de 55,69 ($\pm 2,55$) g, distribuídos em doze aquários de 100 litros, em sistema de fechado de recirculação de água, contendo 8 peixes por unidade experimental. Os peixes foram alimentados de hora em hora no período matutino, as 8:00h, 9:00h, 10:00h, 11:00h e 12:00h. Trinta minutos após a última refeição os peixes foram transferidos para as unidades de coleta de fezes, com capacidade para 300 L. Para determinação da digestibilidade foi adicionado á ração o óxido de crômio-III como marcado inerte. A adição da solução enzimática melhorou a digestibilidade aparente da ração, aumentando o aproveitamento da matéria seca, da proteína bruta e da energia bruta no nível de inclusão de 0,05% ($P < 0,05\%$).

Palavras-chave: nutrição, peixes, óxido de crômio, *Aspergillus awamori*, proteases, amilases, pectinases, aquicultura.

ABSTRACT

This work was produced and determined the activity of an enzyme complex extracted from the fungus *Aspergillus awamori* and evaluated the apparent digestibility coefficients (CDAs) of crude protein, gross energy and dry matter ration reference tambaqui with 3 increasing levels of enzyme solution obtained from the fungus. The experiment was a completely randomized design with four treatments (100ml water solution without enzyme/kg of ration, 100 ml of enzyme/kg feed, 150 ml of enzyme/kg of ration and 200 mL of enzymatic solution/Kg ration) and three replications in time. It was installed on Aquaculture Research Laboratory in the Department of Animal Science LAPOA - PUC Goiás. A total of 96 tambaqui, *Colossoma macropomum*, with an average weight of 55.69 (\pm 2.55) g, distributed in twelve tanks of 100 liters, system in closed recirculating water containing 8 fish per experimental unit. Fish were fed every hour in the morning, at 8:00 h, 9:00 h, 10:00 h, 11:00 h and 12:00 h. Thirty minutes after the last meal the fish were transferred to units collect feces for up to 300 L. To determine digestibility was added will feed the chromic oxide-III marked as inert. The addition of the enzyme solution improved the digestibility of the ration, increasing the utilization of dry matter, crude protein and gross energy in the inclusion level of 0.05% ($P < 0.05\%$).

Keywords: nutrition, fish, chromium oxide, *Aspergillus awamori*, proteases, amylases, pectinases, aquaculture.

LISTAS DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1. Recomendações de diversos estudos sobre os níveis de proteína bruta (PB%) na ração do tambaqui	22
2. Biomassa de peixes nas unidades experimentais (aquários), e peso médio por peixe	30
3. Composição centesimal dos ingredientes das dietas experimentais.....	33
4. Composição calculada e determinada da matéria seca, energia bruta, proteína bruta e extrato etéreo da dieta referência	33
5. Ensaio do complexo enzimático em tampão citrato/fosfato, em pH 5,0 e 6,8; 50 mmol/L a temperatura de 40°C	36
6. Médias dos coeficientes de digestibilidade total aparente, da MS, da PB e da EB das dietas.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

μl – microlitro

μm - micrômetro

$^{\circ}\text{C}$ – grau Celsius

AOAC - Association of Official Analytical Chemists/Official methods of analysis

CBHs - celobiohidrolases

CDA – coeficiente de digestibilidade aparente

CMCase – carboximetilcelulase

Cr_2O_3 – óxido de cromo

EE – extrato etéreo

et al. – e colaboradores

FAPEG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás.

g – grama

GHs - glucanohidrolases

Fpase – endoglucanase + exoglucanase

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

Inc - Incorporation

Kcal – Quilocaloria

Kcal/g – quilocaloria por grama

Kcal/kg – Quilocaloria por quilograma

LAPOA – Laboratório de Pesquisas de Organismos Aquáticos

mg/dia – miligrama por dia

mg/L – miligrama por litro

mmol.L^{-1} – milimol por litro

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura

MS – matéria seca

nm - nanômetro

NRC - National Research Council

x

PB – proteína bruta

pH – potencial hidrogeniônico

PNA - polissacarídeos não amiláceos

PUC – GO – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

RNAs – Ácidos ribonucleicos

rpm – rotações por minuto

sp – espécie

UE – unidade experimental

UFG – Universidade Federal de Goiás

USA – United States of America

Sumário

INTRODUÇÃO.....	12
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 Aspergillus	15
1.2 Enzimas	16
1.2.1 Amilases	18
1.2.2 Xilanases	19
1.2.3 Carboximetilcelulase	11
1.2.4 Avicelase	20
1.3 Tambaqui.....	21
1.4 Ensaio de digestibilidade.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Linhagem utilizada e manutenção do fungo.....	27
2.2 Produção, inoculação, filtragem e liofilização da solução enzimática	27
2.3 Determinação da atividade enzimática	18
2.3.1 CMCase	28
2.3.2 Avicelase.....	28
2.3.3 Xilanase	28
2.3.4 Amilase	29
2.4 Delineamento Experimental.....	30
2.5 Preparo das dietas	31
2.6 Composição da dieta.....	31
2.7 Manejo de alimentação.....	32
2.8 Coleta das fezes.....	32
2.9 Análise bromatológica	34
2.10 Determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDa)	34
2.11 Análise estatística.....	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 Ensaio do complexo enzimático	35
3.2 Monitoramento da qualidade da água.....	37
3.3 Resultados do Coeficiente de Digestibilidade Aparente.....	38
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXOS	53

INTRODUÇÃO

A aquicultura brasileira vem passando por um processo expansionista que requer a utilização de técnicas de manejo eficientes, que possibilitam um maior desempenho dos animais criados. Dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2011) demonstram que a produção brasileira de pescado aumentou 25% nos últimos oito anos e que nos últimos dois anos, houve um crescimento de 15,7%. A produção da pesca extrativa, tanto marítima quanto continental (rios, lagos, etc.) passou no mesmo período de 783.176 toneladas para 825.164 toneladas/ano no mesmo período, um aumento em torno de 5,4%.

Nesse aspecto, a criação de animais em sistemas de arraçamento que usam rações de boa qualidade e balanceadas conforme a exigência dos animais é de fundamental importância na piscicultura. A alimentação representa um alto custo na produção de peixes, portanto a formulação de rações com os componentes químicos exatos e nas quantidades certas, nas diferentes fases de vida dos animais, é de fundamental importância, pois minimiza os custos e maximiza o desempenho. Para Cavero (2004), devido ao custo cada vez maior das matérias-primas tradicionais utilizadas nas formulações de rações, o interesse no uso de enzimas exógenas em dietas tem aumentado e sua utilização é, portanto, uma alternativa para aumentar a digestibilidade dos alimentos e desempenho dos animais.

Atualmente, as enzimas de origem exógena são largamente utilizadas na produção animal, principalmente na suinocultura e na avicultura. Em piscicultura seu uso tem aumentado bastante. Diversos trabalhos foram conduzidos nessa área, destacando-se Soares et al. (2008) com tucunaré, Silva et al. (2007) com tambaqui e Guimarães et al. (2006) com tilápia-do-nilo.

Segundo Yin et al. (2001) a utilização de enzimas exógenas como aditivo alimentar tem como objetivo incrementar a disponibilidade dos nutrientes presentes nos alimentos, apesar de não possuírem valor nutricional. De acordo com Walsh et al. (1993), as enzimas podem remover fatores antinutricionais, tornando certos nutrientes disponíveis para absorção e também aumentando o valor energético de ingredientes mais baratos.

O tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) pertence à família Characidae e é uma espécie originária dos rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes. A alimentação do tambaqui é do tipo onívora, baseada, principalmente, no consumo de frutas, sementes e organismos aquáticos de pequeno porte. Em sistemas de cultivo, aceita muitos tipos de alimento como grãos, frutos, batatas, subprodutos agrícolas, dejetos de animais domésticos e rações (WOYNAROVICH, 1986). A produção de tambaqui no país está em franca expansão, passando de 8 mil toneladas em 1994 para 46 mil toneladas em 2009 (MPA,2011). O crescimento do ano de 2007 para 2008 foi de 27% e de 2008 para 2009 foi na ordem de 20%, atingindo assim 46.454 toneladas. A produção de tambaqui representa 14% da produção de pescado no país.

Outro fator importante no uso de aditivos enzimáticos para melhorar a digestibilidade da ração é a redução de impactos ambientais. Fialho et al. (2008) cita a importância da redução da excreção de elementos poluentes pelos dejetos, principalmente o nitrogênio. O fósforo e o nitrogênio são dois nutrientes limitantes para o crescimento das algas e, quando estes nutrientes alcançam os mananciais hídricos, provocam o aceleramento da eutrofização e com isso, a poluição da água. Este fato é especialmente importante para regiões com grandes concentrações de criatórios de suínos, aves e peixes. A morte e a deterioração destas algas diminui a quantidade de oxigênio na água, dificultando ou impedindo a vida neste ambiente. O nitrogênio pode transformar-se em nitrato, nitrito e amônia, que representam as principais substâncias poluentes do ar e das águas. Para amenizar este problema, estratégias nutricionais como formular dietas com base em nutrientes digestíveis (proteína ideal), alimentos processados, diminuir margens de segurança e utilizar enzimas exógenas são pertinentes.

Uma das fontes de enzimas exógenas usadas na nutrição animal é de origem microbiológica com os fungos. Os fungos destacam-se pela sua capacidade de

atacar tecidos vegetais através da secreção de enzimas que degradam biopolímeros tais como polissacarídeos, lignina e proteínas.

A biotecnologia enzimática utilizando fungos é outra atividade que tem crescido muito nas últimas décadas. A utilização dos fungos como fonte de enzimas vem adquirindo um status de destaque nas mais variadas áreas industriais e comerciais (SOARES et al., 2010). Fungos filamentosos como *Aspergillus nidulans* (SOARES, 2010), *Aspergillus awamorii* (PEVEZZI, 2008), *Moniliella* sp SB9 e *Penicillium* sp EGC5 (MARTIN et al., 2004), *Aspergillus caespitosus*, *Aspergillus phoenicis*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus caespitosus*, *Mucor rouxii* (GUIMARÃES et al., 2006) ganham destaque neste aspecto.

A determinação da digestibilidade, que segundo Andriquetto et al. (1982), é definida como a fração do alimento consumido que não é recuperada nas fezes, é de fundamental importância para se avaliar a qualidade do alimento. De acordo com Sadiku e Juancey (1995), a determinação dos coeficientes de digestibilidade tem sido instrumento de grande importância na área da nutrição na aquicultura, uma vez que pode avaliar ingredientes ou a qualidade das rações.

Estudos de digestibilidade associados com a adição de enzimas podem trazer alternativas para melhorar o desempenho do tambaqui, uma vez que podem melhorar a digestibilidade dos nutrientes presentes na ração e, portanto maior aproveitamento destes. Além do que pode minimizar os impactos ambientais gerados pela criação destes peixes, visto que menos nutrientes serão perdidos pelas fezes. Neste sentido, faz-se necessário que sejam realizados estudos sobre alternativas para a melhoria de aproveitamentos de rações pelo tambaqui, sejam elas com novas fontes de ingredientes regionais com potenciais para utilização em rações comerciais, seja com o uso de produtos da biotecnologia disponível no mercado, que possam maximizar sua produção em cultivos a baixo custo no Brasil. Além do que a literatura sobre digestibilidade em tambaquis é muito escassa.

Este trabalho tem como objetivo geral produzir e avaliar o efeito de um complexo enzimático sintetizado pelo fungo *Aspergillus awamorii* sobre a digestibilidade dos nutrientes de uma ração para juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Aspergillus*

Os fungos são organismos heterotróficos e saprofíticos, que decompõem a matéria orgânica. Crescem a expensas dos produtos de degradação (açúcares e radicais), incorporando as moléculas nutricionais e adquirindo massa protéica (ARAÚJO et al., 1983). De acordo com Machida e Gomi (2010) o gênero *Aspergillus* é o nome usado para um grupo de fungos que se reproduzem apenas por meios assexuados. A morfologia do conidióforo, estrutura que carrega esporos assexuados, é o mais importante caráter taxonômico usado na taxonomia de *Aspergillus*. Espécies de *Aspergillus* são comuns e generalizadas. Eles estão entre os grupos mais bem sucedidos de organismos com papéis importantes em ecossistemas naturais e à economia humana. Estes incluem agentes patogênicos, tais como o notório *Aspergillus flavus*, que produz uma potente toxina, a aflatoxina. Por outro lado, também estão incluídos os outros fungos, tais como *Aspergillus oryzae*, implicadas na produção industrial de molho de soja e saquê ou *Aspergillus niger* utilizado para a produção de ácido cítrico e enzimas tais como glicose oxidase e lisozima. Tal é o interesse em *Aspergillus* que, até agora, as sequências de 15 diferentes genomas de *Aspergillus* foram determinadas.

Segundo Hocking (1993), os alimentos utilizados por seres humanos e animais domésticos são boas fontes nutricionais para *Aspergillus*. Palavras como "decomposição", "podridão" e "deterioração" são usadas para descrever a utilização de fungos nesses gêneros alimentícios, que podem ocorrer no campo, durante o armazenamento e depois do processamento comercial ou ainda após a cocção. Embora alimentos com um pH ácido, alimentos secos, e aqueles com elevada concentração de açúcares normalmente não suportam a ação microbiana.

Os fungos destacam-se pela sua capacidade de atacar tecidos vegetais através da secreção de enzimas que degradam biopolímeros tais como polissacarídeos, lignina e proteínas. O *Aspergillus awamori* vem sendo utilizado pela indústria para produção de amilases, amiloglicosidases e proteases. Seu uso é

vantajoso, pois é seguro para fabricação de produtos alimentícios destinados ao consumo humano, sendo considerado não tóxico e não patogênico (CUI et al., 1998). De acordo com Lemos et al. (2000) os fungos filamentosos têm sido amplamente estudados, e o gênero *Aspergillus* mostrou uma grande capacidade de produzir hemicelulases.

Trabalhos que testam a inclusão de enzimas digestivas exógenas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* nas rações mostram resultados positivos no desempenho zootécnico de diferentes animais. Mora-Jaimes et al. (2002), usando a amilase produzida a partir de *Aspergillus niger* aumentou a digestibilidade do amido do sorgo, na alimentação de cordeiros.

1.2 Enzimas

As enzimas são proteínas globulares que aceleram as reações químicas metabólicas, diminuindo a energia de ativação das reações e estão envolvidas com todo o metabolismo dos animais. Com exceção de um pequeno grupo de RNAs com função catalítica todas as enzimas são proteínas. Segundo Lehninger (2000), as enzimas são fundamentais para qualquer processo biológico, pois catalisam centenas de reações sucessivas pelos quais moléculas dos nutrientes são degradadas e macromoléculas biológicas são formadas a partir de precursores simples. Possuem um alto grau de especificidade por seus substratos, acelerando as reações químicas e que funcionam em soluções aquosas sob condições muito suave de temperatura e pH.

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Sob condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas – muitas das moléculas biológicas são bastante estáveis no ambiente aquoso, de pH neutro e temperatura moderada, do interior das células. Além disso, muitas reações químicas comuns envolvem eventos químicos que são desfavoráveis em ambiente celular. Sem catálise, as reações necessárias para digerir os alimentos, por exemplo, não ocorrem com uma velocidade útil (LEHNINGER, 2000).

De acordo com a sua finalidade, as enzimas usadas em rações animais podem ser divididas em dois tipos: 1) enzimas destinadas a complementar

quantitativamente as próprias enzimas digestórias endógenas dos animais (proteases, amilases, fitases) e 2) enzimas que esses animais não podem sintetizar e/ou sintetizam em pequenas proporções (β -glucanases, pentosanas, e α -galactosidases).

Segundo Nsereko et al. 2000, o uso de enzimas exógenas é uma tecnologia em desenvolvimento. Iniciou-se no final da década de 60 e durante os últimos tempos vem avançando graças ao seu vasto campo de aplicação. As enzimas exógenas têm sido amplamente utilizados para remover fatores anti-nutricionais de alimentos, para aumentar a digestibilidade dos nutrientes existentes, e para complementar a atividade das enzimas endógenas. (Classen et al., 1991). Os efeitos benéficos de sua utilização na alimentação de animais têm sido observados por pesquisadores de todo o mundo.

As enzimas produzidas a fim de aumentar a digestibilidade de nutrientes e melhorar a sua utilização são provenientes, geralmente, de bactérias do gênero *Bacillus sp* ou fungos do gênero *Aspergillus sp* (FERKET, 1996). A enzima adicionada ao alimento seco só é ativada no trato digestivo quando é misturada aos fluidos digestivos e sob a temperatura do organismo (ROTTER, 1990). A enzima pode ser ministrada tanto na forma de coquetel o que, segundo Inborr e Meulen (1993), é uma prática muito comum na Europa, principalmente na forma de carbohidrase, ou pode ser ministrada em separado (fitase, celulase, xilanase, β -glucanase, queratinase, etc.). A utilização da enzima em separado deve ser feita quando se tem o objetivo de degradar determinado fator antinutricional conhecido que venha prejudicar o aproveitamento dos nutrientes da dieta ou quando se sabe que o uso de determinada enzima em conjunto com outra pode diminuir a atividade de ambas (WENK et al., 1993). O fornecimento de enzimas na forma de coquetel é feito quando determinada dieta apresenta uma variada quantidade de fatores anti-nutricionais.

Segundo Wyatt & Bedford (1998), existem duas abordagens econômicas ao considerar a incorporação de enzimas exógenas nas formulações das dietas. Uma aplicação mais simples e provavelmente mais prática, chamada de *over the top* (por cima) com intuito de melhorar o desempenho de forma mais econômica, consiste em adicionar enzimas em uma formulação padrão, sem alterar os níveis nutricionais. A segunda alternativa seria alterar a formulação da ração reduzindo os nutrientes e

adicionando enzimas exógenas para restaurar o valor nutricional da dieta-padrão, visando o mesmo desempenho de uma dieta com os níveis nutricionais normais.

De acordo com Cowan (1994), as enzimas são produzidas por fermentação a partir de uma cultura específica de microrganismos em meio de crescimento. Além disso, as enzimas são produzidas por fermentação a partir de uma cultura específica de microrganismos em meio de crescimento. Uma vez que o processo se completa, são separadas dos resíduos de fermentação e dos organismos que lhes deram origem. Ainda que a fonte de organismo entre os produtos enzimáticos seja geralmente semelhante, o tipo e a atividade de enzimas produzidas podem variar amplamente, a depender da linhagem selecionada, do substrato de crescimento e do meio de cultura usado (CONSIDINE & COUGHLAN, 1989; GASHE, 1992; LEE et al., 1998). Os produtos enzimáticos em comparação aos extratos de fermentação são relativamente concentrados e purificados, contendo atividades de enzimas controladas e específicas (PENDLETON, 2000).

1.2.1 Amilases

As amilases constituem o grupo de enzimas que possuem ação sobre o amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (GUPTA, et al., 2003). Existem basicamente quatro tipos de enzimas conversoras de amido: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases. As endoamilases, como as α -amilases, são capazes de quebrar ligações glicosídicas presentes na parte interna (endo) das cadeias de amilose ou amilopectina, formando oligossacarídeos ramificados de tamanhos variados com configurações α e α -dextrinas limites (MORAES 2004). As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1 e 4 (β -amilase) ou ambas as ligações α -1,4 e α -1,6, como as amiloglicosidas e α -glicosidase. Outros exemplos de exoamilases são a ciclodextrina glicosiltransferase e α -amilase maltogênica (glicano 1,4- α -glicanohidrolase. O terceiro grupo de enzimas conversoras de amido são as amilases desramificadoras que hidrolisam exclusivamente ligações α -1,6, incluindo as isoamilases, que clivam amilopectina em polissacarídeos lineares de cadeia longa e as pululanases tipo I com habilidade de hidrolisar ligações α -1,6 em pululana e amilopectina. Pululanases do tipo II (α -amilase-pululanase ou amilopululanase) atuam sobre

ligações α -1,4 e α -1,6, produzindo maltose e maltotriose (MORAES, 2004). Enzimas transferases constituem o quarto grupo de enzimas conversoras ou modificadoras de amido. Quebram ligações glicosídicas α -1, 4 da molécula doadora e transferem para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica. Enzimas como amilomaltase e ciclodextrina glicosiltransferase formam uma nova ligação α -1, 4 e ao mesmo tempo liga a extremidade redutora à não redutora. Amilomaltases são similares as ciclodextrinas glicosiltransferases em relação ao tipo de reação enzimática. A maior diferença é que a ação da amilomaltases origina produto linear enquanto que ciclodextrinas glicosiltransferases formam produto cíclico (MORAES 2004).

1.2.2 Xilanases

As proteínas do tipo xilanases são uma classe de enzimas que degradam o polissacarídeo linear beta-1,4-xilana em xilose, decompondo assim a hemicelulose, um dos principais componentes das paredes celulares das plantas, sendo assim desempenha um papel importante em microorganismos que se desenvolvem em plantas. Adicionalmente, as xilanases estão presentes em fungos, que as usam na degradação de matéria vegetal em nutrientes utilizáveis. (DASHEK, 1997).

De acordo com Moore-Landecker (1996) as hemiceluloses são os mais abundantes polissacarídeos não celulósicos da natureza, estão dispostas entre a celulose e a lignina, nas paredes celulares das células vegetais. Possuem polímeros lineares ou ramificados, contendo de dois a seis carboidratos ou seus derivados, por isso existem diferenças entre as hemiceluloses de diferentes espécies vegetais, sendo a xilana um dos seus principais componentes.

A hemicelulose é um polímero amorfo composto de xilose, arabinose, galactose, glucose e manose. As hemiceluloses e celulose representam mais de 50% do peso seco de resíduos agrícolas (FERREIRA-FILHO, 2004), pois eles podem ser convertidos em açúcares solúveis, quer por hidrólise ácida ou enzimática, para que eles possam ser utilizados como uma fonte abundante e barata de energia renovável no mundo. Para muitos resíduos xilana é o principal componente da fracção hemicelulose. É degradado por xilanases produzidas por fungos, bactérias, algas, protozoários gastrópode e artrópodes. De acordo com Hasper et al (2002), os

fungos são importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas e os principais celulolíticos produtores de celulases e xilanase incluem: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* e *Humicola* sp.

Na biotecnologia enzimática referente à indústria do papel, as enzimas xilanas são muito importantes, pois auxiliam no branqueamento da polpa, facilitando a retirada da lignina, podendo ser utilizadas para modificar a polpa na fabricação do papel, ou ainda serem utilizadas na reciclagem do papel (BIELY, 1993). São ainda utilizadas para remoção de óleos vegetais, na produção de sucos de frutos, na clarificação de sucos e vinhos, na fabricação de café solúvel, no aumento do teor nutricional da silagem (WONG e SADDLER, 1992).

A degradação completa da hemicelulose requer enzimas que hidrolisem cadeias principais, como as exo e endo-hidrolases, e laterais. As exo-hidrolases atuam nas ligações glicosídicas terminais e liberam unidades de monossacarídeos das extremidades não redutoras. Endo-hidrolases clivam ligações localizadas no interior da molécula de modo aleatório ou específico. Segundo Ferreira-Filho (1994), várias enzimas atuam na degradação da cadeia principal, tais como: β -D-xilanase (1,4- β -D-xilana xilanhidrolase), β -D-xilosidase (1,4--D-xilana xilohidrolase), β -D-manosidase (1,4- β -D-manopiranosídeo hidrolase, α -L-arabinase (1,5- α -L-arabinase) e β -D-galactanase (1,4- β -D-galactana galactanhidrolase).

1.2.3 Carboximetilcelulase - CMCase

O estudo e a produção de celulases representam um papel importante em diversas áreas como a ecologia, nutrição e a microbiologia industrial. No ramo industrial, estas enzimas têm sido comumente usadas a fim de facilitar o beneficiamento de produtos de indústrias têxteis, de papel, farmacêutica e alimentícia, dentre outras.

O grupo enzimático envolvido na hidrólise da celulose é genericamente denominado de complexo-celulase. Esse complexo é dividido em três grupos: Endoglucanases: enzimas que iniciam a hidrólise e solubilizam o polímero celulósico, produzindo oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais,

sendo um redutor e um não redutor; Exoglucanases: enzimas divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs). As GHs promovem a hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero. Já as CBHs são responsáveis pela liberação de celobiose (dímero de glicose) a partir de extremidades da celulose, e por fim, as β -glicosidases que são enzimas que têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose (ZAHNG et al. 2006).

1.2.4 Avicelase

As enzimas carboximetilcelulase (endoglucanase) e avicelase (exoglucanase) formam um sistema enzimático hidrolítico importantes para a degradação da celulose (BAYER e LAMED, 1992).

A celulose é um polímero de glicose não ramificado, composto de anidro- β -1,4-glicose unidades ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas, é o biopolímero mais abundante sobre a terra. A degradação enzimática da celulose para glicose exige a ação cooperativa de três enzimas que agem sinergicamente, a saber: endoglucanase (CM celulase), o qual cliva ligações glicosídicas internas e exoglucanase (Avicelase,) que cliva unidades celobiose a partir das extremidades das cadeias de celulose, e β -glicosidase, que cliva unidades de glicose a partir de de oligossacáridos (WOOD, 1989).

De acordo Kari et al. (1994), as avicelases possuem aplicações potenciais em bioconversão de materiais de resíduos agrícolas para produtos úteis.

1.3 TAMBAQUI

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é uma espécie pertencente à família Serrasalminidae e à subfamília Serrasalminae. Peixe de piracema nativo das bacias dos rios Solimões, Amazonas e Orinoco é amplamente distribuído na parte tropical da América do Sul e na Amazônia Central, e muito apreciado por seu sabor, sendo importante fonte de proteína animal (Araújo-Lima & Goulding, 1997). Segundo este

mesmo autor é uma espécie onívora com tendência a herbivoria e frugivoria. Tem grande capacidade de digerir proteína animal e vegetal e de fácil adaptação à alimentação fornecida.

De acordo com Silva et al. (2007), o tambaqui é uma das espécies de peixe que possui alto valor comercial e grande importância econômica e social na América Latina. A espécie possui potencial para aquicultura, pois se adapta ao confinamento e arraçoamento. Diversos estudos avaliaram a resposta em crescimento no tambaqui (Vidal Jr. et al., 1998; Macedo, 1979), porém estes resultados são bastantes incertos, devido as diferenças de biometria dos peixes, da composição da ração, das condições ambientais durante os experimentos, na frequência e na taxa de alimentação empregada e outras particularidades de cada experimento. Os estudos de exigência de proteína bruta para as diversas fases do tambaqui ainda divergem em resultados conclusivos. A tabela 1 mostra as recomendações de diversos estudos realizados sobre os níveis de proteína bruta na ração do tambaqui.

Tabela 1 - Recomendações de diversos estudos sobre os níveis de proteína bruta (PB%) na ração do tambaqui.

Fase dos peixes	PB(%)	Referência
Alevinos de 5 a 20g	37	Eckman (1987)
Alevinos de 5 a 20g	23	Macedo (1983)
Juvenis de 20 a 300g	28	Macedo (1983)
Alevinos até 20g	25	Van der Meer (1995)
Juvenis entre 20 e 250g	26	Vidal Jr et al. (1998)

Fonte: Panorama da Aquicultura, 2004.

Proteína dietética adequada promove boas taxas de crescimento e utilização de alimentos sem causar acúmulo excessivo de lipídios no fígado (Dos SANTOS et al., 1993). No entanto, informações sobre as exigências de proteína de tambaqui ainda é esparsa. Santos et al. (2010) observaram que em situações de privação alimentar, rações com 32% e 36% de proteína bruta foram as que proporcionaram melhor taxa de eficiência protéica pelo tambaqui, sendo observado, também, que a ração contendo 32% além de ter sido a mais eficiente na taxa de eficiência protéica (88,3%), proporcionou menor consumo de proteína pelos peixes, quando comparado

à ração com 36% com a qual os peixes obtiveram taxa de eficiência protéica de 85,8%. Os peixes que se alimentaram com a ração com 32% de proteína bruta conseguiram ter melhor aproveitamento protéico com menor consumo. PÉREZ (2000) trabalhando com níveis de proteína bruta (18,5 e 24,69%) indicaram que o nível de 24,69 % de proteína bruta obteve melhores efeitos sobre o crescimento do que com o nível de 18,50% de proteína bruta para alevinos de tambaqui. Da Silva et al (2006) concluiu que 26% de proteína bruta foram suficientes para atender à exigência de proteína bruta para um bom desempenho produtivo de alevinos de tambaqui proporcionando também melhor índice de eficiência econômica e de custo. Porém ainda não há unanimidade entre os resultados de pesquisas sobre os níveis de proteína bruta mais adequada para as diversas fases de desenvolvimento dos peixes redondos, como o tambaqui.

Com relação à energia das rações para o tambaqui, segundo estudos realizados por Camargo et al. (1998) o nível de 3300 Kcal de energia metabolizável por quilograma de ração proporcionou melhor ganho de peso e conversão alimentar como uma maior taxa de deposição de proteína na carcaça de juvenis de tambaqui entre 30 e 180g. Registrou-se aumento linear na deposição de gordura corporal (de 55 a 65mg/dia) com o aumento da energia de 2850 a 3300 kcal/kg e observou-se que a energia metabolizável nas rações deve variar entre 12,5 e 14 kcal/g de proteína.

Para Cho et al. (1985) a quantidade de energia requerida pelos peixes varia dentro da mesma espécie: os animais jovens, em crescimento, necessitam, para a sua manutenção, de mais energia por unidade de peso corporal que os maduros, sendo, inclusive, estas necessidades energéticas incrementadas em função dos processos reprodutivos). A exigência de energia está intimamente relacionada ao balanço energia-proteína e à digestibilidade da fonte não protéica de energia (PAGE e ANDREWS, 1973).

Para o tambaqui o uso de enzimas exógenas nas rações pode se fazer necessário visto que estes peixes não degradam os polissacarídeos não amiláceos (PNA) com a mesma facilidade que o amido. PNA são polímeros de açúcares simples, devido à natureza das cadeias de ligações das unidades de açúcares que são resistentes a hidrólise no trato gastrointestinal dos animais não-ruminantes. Os PNA fazem parte da parede celular e consistem principalmente de pentoses,

rafinose, estaquiose e sacarose, encontradas nas sementes de oleaginosas, β -glucanos que se encontram em altas concentrações na cevada e aveia e pentosanas como as arabinoxilanas, que são encontradas no trigo, triticale e centeio. As sementes de oleaginosas, como a soja e a canola, os grãos de cereais com os seus respectivos subprodutos, tais como o trigo, cevada, aveia, centeio, triticale, farelos de arroz e de trigo, apresentam em sua composição bromatológica, constituintes que os animais não-ruminantes não digerem ou sua digestão é incompleta, como os PNA. Polissacarídeos não-amiláceos (PNA's) existem em várias formas na natureza e são componentes da parede celular. Os motivos para as propriedades antinutricionais de PNA's são sua elevada capacidade de ligarem-se a grandes quantidades de água, resultando num aumento da viscosidade do conteúdo intestinal quando o alimento contendo PNA's for consumido.

Além da baixa digestibilidade, uma alta inclusão desses carboidratos pode causar um aumento da viscosidade intestinal e conseqüentemente reduzir a digestibilidade de outros componentes da dieta, comprometendo o desempenho dos animais (CONTE et al., 2003).

1.4 ENSAIOS DE DIGESTIBILIDADE

A digestibilidade é definida como a fração do alimento consumido que não é recuperada nas fezes (ANDRIGUETTO et al., 1982). Já Van Soest (1994) cita que a digestibilidade dos nutrientes nos alimentos é comumente expressa como porcentagem do nutriente que desaparece no balanço entre a ingestão e a excreção. De acordo com Jones & De Silva (1997), os estudos relacionados à digestibilidade são importantes para o desenvolvimento de rações para o uso na aquicultura.

Segundo Hanley (1987) a digestibilidade é um dos fatores primordiais para se avaliar a capacidade de uma determinada espécie animal em utilizar os nutrientes de um tipo de alimento. Hepher (1988) cita que vários fatores podem influenciar a digestibilidade dos alimentos nos peixes, sendo os principais: espécie, idade, condições fisiológicas, temperatura da água, salinidade, composição do alimento, quantidade de alimento ingerido e tamanho da partícula.

O coeficiente de digestibilidade pode ser calculado por dois métodos, o indireto, em que a coleta de excretas é parcial, utilizando-se indicadores como substância referência, e o direto, no qual a quantificação do alimento ingerido e a coleta de excretas são totais (PEZZATO et al., 1988; NRC, 1993). Tampouco, o método direto ou o indireto consideram a inclusão de material endógeno na excreta. No entanto, os dados de digestibilidade obtidos atualmente estão aparentemente bastante próximos aos valores verdadeiros (NRC, 1993), daí a digestibilidade calculada é aparente (coeficiente de digestibilidade aparente – CDA).

Segundo os estudos de Morales et al. (1999), a quantificação do alimento consumido e a coleta total das fezes é dificultada pelo meio aquático, por isso, usa-se preferencialmente o método indireto de determinação de digestibilidade. Para isso usa-se um indicador inerte. Segundo NRC (1993), o óxido de crômio é usado como indicador inerte em experimentos de digestão e balanço de nutrientes para animais domésticos, e este indicador tem sido utilizado com sucesso para a determinação da digestibilidade aparente em várias espécies de peixes, principalmente pelo volume limitado de fezes produzidas por estes animais. Já Titgemeyer, (1997) diz que o óxido de crômio é o indicador mais amplamente usado em experimentos de digestibilidade em peixes devido seu baixo custo e pela facilidade de análise.

Em estudos utilizando óxido crômio como indicador, o nutriente componente da dieta é calculado por intermédio da taxa do indicador para o nutriente no alimento e nas fezes (Hanley, 1987). Entretanto, sua recuperação difere de 100%, e sua recuperação fecal varia entre animais e também há variação na concentração nas fezes no decorrer do dia, sendo este um dos problemas relacionados a esse indicador. Merchen (1993) cita que nenhuma das substâncias usadas como indicadores atende a todas as características, mas várias são adequadas para fornecer dados significativos, por isso, a procura por melhores indicadores constitui um dos assuntos de grande interesse na pesquisa de técnicas que facilitem estudos de nutrição animal. O uso de óxido de crômio como indicador inerte para avaliação da digestibilidade pode ser observado em diversos trabalhos com peixes: Silva et al. (2003) com tambaquis; Guimarães et al. (2001) com tilápias; Teixeira et al. (2010) com surubins, dentre outros.

Segundo Maynard et al. (1997), o indicador ideal para determinar a digestibilidade e a produção fecal total deve possuir algumas propriedades fundamentais: indigestibilidade total, ser farmacologicamente inativo no trato digestivo, taxa de passagem no trato digestivo uniforme, poder ser determinado quimicamente e, de preferência, ser uma substância naturalmente presente nos alimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em duas etapas, primeiramente no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas/ICB II, da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, localizado no município de Goiânia – Goiás, no período de junho a dezembro de 2011, referente ao preparo da solução enzimática e a segunda no Laboratório de Pesquisa de Organismos Aquáticos (LAPOA), no Departamento de Zootecnia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Campus II, localizada no município de Goiânia – Goiás, no período de dezembro de 2011 a agosto de 2012. Sendo neste local realizada a confecção das dietas, as análises bromatológicas das dietas e das fezes, bem como o experimento com os animais (Anexo 1).

2.1 Linhagem utilizada e manutenção do fungo

A amostra do fungo *Aspergillus awamori* utilizada no presente trabalho foi isolada do solo da Universidade de Brasília (UnB). O fungo foi cultivado em Meio MEX [extrato de malte 3,0% e Ágar 2,0%], autoclavado a 120°C durante 20 minutos. A cultura foi mantida por quatro dias a 30°C, em estufa de ventilação forçada e, posteriormente as placas foram estocadas a 4°C para utilização no experimento.

2.2 Produção, inoculação, filtração e liofilização da solução enzimática

Três discos de cultura (5 mm), contendo esporos do fungo *Aspergillus awamori* foram inoculados em erlenmeyers de 1,0 L, contendo 250 ml de meio de indução (a própria ração – composta por farelo de soja, glúten de milho, farinha de peixe, fubá de milho, farelo de trigo e microminerais e vitaminas). Os erlenmeyers foram incubados em agitador rotatório (Controlled Environment Incubator Shaker, Brunswick Scientific Co. Inc., U.S.A) a 30°C e velocidade de 180 rpm . Após 48 horas de cultivo, a solução enzimática foi filtrada a vácuo. As alíquotas foram retiradas e congeladas para avaliação da atividade enzimática de amilase, CMCase, avicelase, Fpase, xilanase, pectinase, protease e lipase e posterior utilização.

A solução enzimática foi concentrada pelo processo de liofilização por 24 horas (Liofilizador IISHIN) e ressuspensa para utilização. A solução enzimática foi mantida em geladeira a temperatura de 4 a 8 °C para utilização.

2.3 Determinação da atividade enzimática

2.3.1 CMCase

A 200 µl de solução de carboximetilcelulose 1% (média viscosidade - Sigma), dissolvido nos tampões acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,5, citrato fosfato e Kansas, 50 mmol.L⁻¹, pH, 6,8, foram acrescentados 200 µl do extrato enzimático. Após incubação da mistura a 39° C por 1 hora, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml de ADNS e aquecida por 10 minutos.

A concentração de enzima foi estimada após a quantificação espectrofotométrica a 550 nm de açúcar redutor liberado. A curva padrão foi feita com utilização de glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de açúcar redutor por minuto da reação.

2.3.2 Avicelase

A 200 µl de solução de celulose microcristalina Avicel, 1%, dissolvido em tampão citrato fosfato, 50 mmol.L⁻¹, pH, 6,8 e Kansas, 50 mmol.L⁻¹, pH, 6,8 foram acrescentados 200 µl do extrato enzimático. Após incubação da mistura a 39° C por 1 hora, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ADNS e aquecida por 10 minutos.

A concentração de enzima foi estimada após a quantificação de açúcar redutor liberado, a 550 nm. A curva padrão foi feita com utilização de glicose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de açúcar redutor por minuto da reação.

2.3.3 Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada nos tampões acetato de sódio 50 mmol. L⁻¹, pH 5,5, citrato fosfato 50 mmol.L⁻¹, pH 6,8 e Kansas 50 mmol.L⁻¹, pH 6,8. A mistura de reação foi incubada a 50°C por 30 minutos.

O ensaio enzimático realizado foi: teste: 50 µl do extrato enzimático, 100 µl de xilana (oatspelts - sigma), 350 µl de tampão, 500 µl de DNS; a mistura da reação foi incubada por 10 minutos em água fervente, com posterior adição de 1000 µl de água; controle 1: 50 µl do extrato enzimático, 450 µl de tampão, 500 µl de ADNS; a mistura de reação foi incubada por 10 minutos em água fervente, com posterior adição de 1000 µl de água; controle 2: 100 µl de xilana, 400 µl de tampão, 500 µl de ADNS; a mistura de reação foi incubada por 10 minutos em água fervente, com posterior adição de 1000 µl de água.

A concentração de açúcar redutor liberado foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm pelo método do ADNS, utilizando xilose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de açúcar redutor por minuto da reação.

2.3.4 Amilase

A atividade amilolítica foi determinada pelo método sacarificante que se baseia na produção de açúcares redutores (Miller, 1959).

A 40 µl de tampão citrato-fosfato (50 mmol. L⁻¹, pH 6,8) foram adicionados 60 µl de amostra enzimática e 100 µl de solução de amido 0,5%. A mistura foi incubada a 39°C por 15 minutos. Posteriormente, 1,0 ml de reagente ácido dinitrosacilico (10 g.L⁻¹ ácido dinitrosacilico (DNS), 100 ml de NaOH (2mmol.L⁻¹), 300 g.l⁻¹ de tartarato de sódio e potássio foi adicionado nos tubos de ensaio. A mistura foi fervida por 5 minutos em banho-maria a 96°C e absorvância determinada a 550 nm. A quantidade de açúcares redutores formados é calculada de acordo com uma curva padrão de glicose (Miller, 1959). Uma unidade (U) de atividade sacarificante foi definida como a quantidade de enzima que libera 0,1 mg de açúcar redutor por minuto de reação. e a reação interrompida com adição de 200 µl de ácido acético (1,0 mol.L⁻¹) e 200 µl de

solução de iodo-iodeto a 1%, iodeto de potássio e água destilada na proporção de (1v:1v:3v). O volume foi completado com água destilada para 10 ml, homogeneizado e a absorbância determinada a 660 nm.

2.4 Delineamento Experimental

Para o presente estudo foram distribuídos 96 animais da espécie *Colossoma macropomum* com peso médio de $55,69 \pm 2,55$ gramas em doze aquários retangulares de PVC de 100 litros, constituindo uma unidade experimental, contendo oito peixes cada. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 3 repetições. A biomassa em cada aquário, e o peso médio por peixe das UEs é vista na tabela 2.

Tabela 2 Biomassa de peixes nas unidades experimentais (aquários), e peso médio por peixe.

LOTE	BIOMASSA POR UNIDADE EXPERIMENTAL (g) (N=8)	PESO MÉDIO/PEIXE (g)
1	430	53,8
2	441	55,1
3	420	52,5
4	446	55,8
5	431	53,9
6	470	58,8
7	438	54,8
8	457	57,1
9	423	52,9
10	435	54,4
11	480	60,0
12	475	59,4
TOTAL	5326	55,71

As UEs foram instaladas em sistema fechado de recirculação de água, com renovação de 20% da água/dia. Neste sistema equipadas com filtro biológico e físico

e a temperatura da água mantida por meio de termostato eletrônico e digital a 28,0°C, monitorado e regulado diariamente.

Os aquários foram abastecidos por água proveniente de poço semi-arteziano com 60 metros de profundidade, e passou por sistema de reservatório de estabilização, após este armazenamento, a água foi tratada respectivamente por filtros físicos e biológicos antes de retornar aos aquários de alimentação. Este sistema fechado de recirculação de água possuía aeração individual realizada por meio de pedra porosa acoplada à tubulação conectada em turbina de ar, e a temperatura mantida a 28°C por aquecedores individuais com termostatos.

Para o monitoramento da qualidade da água dos aquários, foram medidos diariamente a temperatura, o teor de oxigênio dissolvido (mg/L), e o pH por meio de termômetro, oxímetro e peagâmetro digitais, respectivamente. O teor de amônia foi medido semanalmente por meio de kit comercial marca Indutest.

2.5 Preparo das dietas

Os ingredientes da dieta (farelo de soja, glúten de milho, farinha de peixe, farelo de trigo, fubá de milho, mistura mineral e vitamínica) foram moídos com diâmetro inferior a 500µm. A dieta referência (padrão) foi formulada para atender as exigências nutricionais do tambaqui na fase de vida em que se encontrava no início do experimento (NRC, 1993). Como marcador inerte externo, foi utilizado o óxido de cromo na concentração de 0,1% na dieta, como sugerido por Lovell (1998).

2.6 Composição da dieta

A composição percentual das dietas pode ser observada na Tabela 3, enquanto na Tabela 4 a composição percentual calculada e determinada da matéria seca, energia bruta, proteína bruta e extrato etéreo da dieta referência.

Tabela 3 Composição centesimal dos ingredientes das dietas experimentais.

Ingrediente (%)	Controle – T1	T2	T3	T4
Farelo de soja	45	45	45	45
Glúten de milho	8	8	8	8
Farinha de peixe	10	10	10	10
Fubá de milho	18	18	18	18
Farelo de trigo	11	11	11	11
DL – metionina	0,07	0,07	0,07	0,07
Cr ₂ O ₃	0,1	0,1	0,1	0,1
Óleo de soja	3	3	3	3
Fosfato bicálcico	4	4	4	4
Calcário	1	1	1	1
Vitamina C	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Solução enzimática (mL/Kg)</i>	0	100	150	200

Tabela 4 Composição calculada e determinada da matéria seca, energia bruta, proteína bruta e extrato etéreo da dieta referência.

	Calculado	Determinado
Energia Bruta (cal/g)	4100,00	4259,23
Proteína Bruta (%)	33,90	34,58
Extrato etéreo (%)	5,72	6,45

Laboratório de de Solos – Departamento de zootecnia – PUC-GO

Os ingredientes após finamente triturados, foram pesados e homogeneizados mecanicamente para a adição de 30% de água. A mistura foi homogeneizada novamente e a solução enzimática adicionada pelo método de aspersão. Foram produzidos quatro tratamentos, sendo eles:

- T1 - controle – aspersão de 100 mL de água em solução enzimática/Kg de ração;
- T2 - 100 mL de solução enzimática/Kg da ração;
- T3 - 150 mL de solução enzimática/Kg da ração e
- T4 - 200 mL de solução enzimática/Kg da ração.

Após a adição da solução enzimática, as dietas foram pelotizadas em moedor de carne elétrico e em seguida desidratadas em estufa de ventilação forçada de ar a 55,0 °C durante 24 horas e posteriormente armazenadas em freezer a –18,0 °C para serem utilizadas no experimento.

2.7 Manejo de alimentação

Os peixes foram submetidos a um período de quinze dias de adaptação, sendo alimentados com a ração referência (sem a solução enzimática) três vezes ao dia, às 08:00h, 12:00h e 17:00h *ad libitum*. As sobras da ração eram sifonadas e descartadas três vezes por semana.

Durante o período experimental, os peixes foram alimentados de hora em hora no período matutino, as 8:00h, 9:00h, 10:00h, 11:00h e 12:00h. Após 30 minutos do o último arraçoamento foram transferidos para as unidades de coleta de fezes, compostas por incubadoras de ovos de peixes adaptadas para este fim, com capacidade para 200 L, com água de poço artesiano e aeração com pedra porosa. A temperatura da água dos tanques coletores de fezes era mantida por meio de termostato eletrônico e digital a 28,0°C, aferida diariamente.

2.8 Coleta das fezes

Após a transferência, esperava-se o início da sedimentação das fezes, marcando, assim, uma hora para acúmulo e coleta do material nos recipientes acoplados ao fundo dos coletores, iniciaram-se as coletas, realizadas de hora em hora até totalizar cinco coletas diárias. Ao término das coletas os peixes retornavam para as suas respectivas UEs e eram arraçoados apenas no dia seguinte. Foi adaptado um registro e um recipiente de acrílico com volume de 100 mL na parte inferior das incubadeiras. Antes das coletas de fezes, o registro permanecia fechado, durante a coleta o registro era aberto para que as fezes decantassem no recipiente. Nesse momento as fezes passavam por gravidade e para a coleta fechava-se o registro, retirando-se os recipientes. As fezes decantadas eram armazenadas em frasco de vidro constituindo um “pool” de amostra por repetição do tratamento. Os frascos com as fezes seguiam para congelamento em freezer (-20 °C) para posterior secagem em estufa, moagem e análises bromatológicas.

As coletas das fezes foram realizadas por grupo. No primeiro dia as UEs 1,2,3 e 4, no segundo as 5, 6, 7 e 8 e no terceiro as 9, 10, 11 e 12. Cada grupo tinha então dois dias de descanso e alimentação pós-coleta. Foram realizadas quatro “pool” de coletas por grupo, sendo três repetições por tratamento.

2.9 Análise bromatológica

As análises bromatológicas dos ingredientes e das dietas foram realizadas no laboratório de solos, no Departamento de Zootecnia da PUC-GO e determinadas segundo metodologia proposta pela AOAC (1995), realizadas em triplicata. Enquanto que a análise das fezes foi feita em duplicata, devido a reduzida quantidade de amostras. Já a determinação do óxido de crômio foi feita pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida das dietas, de acordo com a metodologia de Bremer Neto et al. (2005).

2.10 Determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDa)

O CDA dos nutrientes foi calculado com base na seguinte fórmula, proposta por Cho et al, (1985):

$$Da_{(n)} = 100 - \left[100 \left(\frac{\%Cr_2O_{3r}}{\%Cr_2O_{3f}} \right) \times \left(\frac{\%N_f}{\%N_r} \right) \right]$$

onde:

Da(n) = Digestibilidade aparente do nutriente;

Cr₂O_{3r} = % de óxido de crômio-III na ração;

Cr₂O_{3f} = % de óxido de crômio-III nas fezes;

N r = Nutrientes na ração;

Nf= Nutriente nas fezes

Para determinação da digestibilidade da MS foi utilizada a fórmula: DMS% = (MS consumida – MS fezes) x 100 / MS consumida.

2.11 Análise estatística

Os resultados dos coeficientes de digestibilidade aparente do experimento foram analisados mediante a análise de variância (ANOVA). Quando os tratamentos apresentaram efeitos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (Mendes, 1999). As análises foram realizadas a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio do complexo enzimático

Os resultados do ensaio do complexo enzimático podem ser observados na tabela 5:

Tabela 5 Ensaio do complexo enzimático em tampão citrato/fosfato, em pH 5,0 e 6,8; 50 mmol/L a temperatura de 40°C.

Enzimas	Atividade específica (UI/mL) em pH 5,0	Atividade específica (UI/mL) em pH 6,8
Celulase total	2,27	3,08
CMCase	1,56	1,95
Avicelase	0,83	0,97
Xilanase	5,07	8,32
Amilase	16,75	20,09

Ruegger e Tauk-Tornisielloa (2003) obtiveram atividade de 1,64UI/mL de CMCase com o cultivo de *Trichoderma harzianum* em meio de farelo de trigo após cultivo por 4 dias, a 25 °C evidenciando que este fungo é potencialmente bom produtor de celulase, sob condições adequadas de cultivo. Estes resultados demonstram que nas condições deste trabalho, o *Aspergillus awamorii* pode ser considerado também um bom produtor de CMCase.

Aguero et al. (1990) estudaram a influência do pH na síntese e liberação de glicoamilase produzida por *Aspergillus awamorii* NRRL 3112 e *Aspergillus niger* NRRL 337, em meio como substrato amiláceo a farinha de mandioca. Estes autores verificaram em valores crescentes de pH, de 3,0 a 6,0, uma maior atividade de enzima intracelular. Estes resultados foram similares aos aqui obtidos, o que confirma a maior atividade enzimática em amilase (e também das outras enzimas) em pH 6,8.

Umsza-Guez et al. (2011) obtiveram alta atividade de xilanase em pH 5,0 e 50°C em *A. awamorii* cultivado em bagaço de tomate, resultados também similares ao encontrados neste experimento, demonstrando mais uma vez a capacidade deste

fungo em degradar os componentes da parede celular da célula vegetal, tornando assim uma boa alternativa para seu uso em monogástricos, visto que estes não possuem estas enzimas no seu trato digestório. No caso de α -amilase, estes mesmos autores relatam que a produção permaneceu praticamente constante ao longo do 15 dias de fermentação, com valores médios de 21,5 UI/gds. Resultado este próximo ao obtido neste experimento, que revela a grande capacidade deste fungo para degradação do amido. Isto provavelmente está relacionado com a capacidade de degradação deste polissacarídeo por este fungo decompositor. Já que o amido é um dos substratos mais comuns para se encontrar esta espécie de fungo.

Couri et al. (2000) estudaram a produção de xilanase por *Aspergillus niger* 3T5B8 usando dois resíduos agroindustriais: casca de manga e farelo de trigo como substratos sólidos. No caso das experiências, 40 g do sólido estéril com um nível de umidade de cerca de 60% foram incubadas a 32 ° C. Atividade máxima da xilanase, 100 UI/gds foi alcançada após 72 h de incubação utilizando o farelo de trigo como substrato sólido. Com cascas de manga, um pico de atividade de 50,4 UI/gds foi atingido após 24 h de fermentação.

Yang et al. (2006) cultivou *Penicillium decumbens* em uma mistura de palha de milho a 90% e de 10 % de farelo de trigo, umedecido com uma solução mineral obtiveram 13,59 UI/gds de xilanase após 4 dias de cultura a 28°C. A produção de xilanases por *Aspergillus oryzae* RIB 128, também tem sido testada em farelo de trigo, farelo de arroz e casca de laranja. A produtividade mais alta, cerca de 60 IU/gds foi alcançada quando o farelo de trigo foi utilizado como substrato. Estes resultados mostram a capacidade de degradação dos polímeros fibrosos pelos fungos testados.

3.2 Monitoramento da qualidade da água

Os resultados do monitoramento da qualidade da água foram: para o pH, o valor médio obtido no experimento foi 7,20 \pm 0,35, para temperatura foi 27,37 \pm 0,72 °C e para a amônia foi 1,32 \pm 0,87mg/L-1 (N-NH₃) e para o oxigênio dissolvido foi 6,28 \pm 0,56 mg/L

Os valores obtidos estão de acordo com os parâmetros exigidos para o tabaqui, de acordo com Castro et al (2002), Araújo-Lima e Goulding (1997), Vidal Jr et al. (2004), Castagnolli (1992), Parma de Croux et al (1994) e Dessarollo (1992).

3.3 Resultados do Coeficiente de Digestibilidade Aparente

Os resultados referentes aos coeficientes de digestibilidade aparente estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 Médias dos coeficientes de digestibilidade total aparente, da MS, da PB e da EB das dietas.

Tratamento	CDA MS (%)	CDA PB (%)	CDA EB (%)
T1	51,47 ^b	70,54 ^b	45,68 ^b
T2	59,04 ^b	84,23 ^a	44,47 ^b
T3	61,41 ^b	87,88 ^a	64,44 ^a
T4	71,30 ^a	82,24 ^a	44,40 ^b

Média seguidas de letras iguais nas linhas não diferem entre si pelo teste Tuckey, a 5% de probabilidade; T1 = sem complexo enzimático; T2 = 100ml do complexo enzimático/kg da ração; T3 = 150ml do complexo enzimático/kg da ração; T4 = 200ml do complexo enzimático/kg da ração.

Segundo Percival (2001), estimativas sobre os coeficientes de digestibilidade aparente podem variar dependendo da metodologia utilizada na coleta das fezes. Os métodos de coletas de fezes em organismos aquáticos são variados e podem ser escolhidos segundo as características das espécies estudadas, tais como, tamanho, comportamento ou valor comercial. De acordo com Menezes et al. (2012), a acurácia da determinação dos coeficientes de digestibilidade está relacionada a diversos fatores os quais incluem o estado fisiológico dos peixes, a composição das dietas e os métodos de coleta de excretas utilizados. É importante ressaltar que nem sempre a suplementação de enzimas digestivas proporciona resposta positiva. Para a enzima atuar, faz-se necessário que haja o substrato específico na dieta e a dosagem correta de enzimas e que a capacidade das enzimas ultrapasse as barreiras presentes no estômago – baixo pH e ação das enzimas proteolíticas como a pepsina – e a temperatura à qual a ração é submetida durante o processo de peletização.

Os resultados obtidos para os coeficientes de digestibilidade aparente demonstraram que houve aumento nos coeficientes de digestibilidade com a suplementação do complexo enzimático na ração, em relação ao controle. Estes resultados coincidem com os estudos realizados por Silva et al. (2003), indicando que a suplementação enzimática aumenta a digestibilidade aparente dos nutrientes das rações experimentais avaliadas.

O CDA da PB aumentou proporcionalmente a adição do complexo enzimático à dieta. Isto pode ser atribuído à maior superfície de contato do substrato com a enzima e à consequente melhora da digestão da proteína da ração, disponibilizando o substrato para a ação das proteases do trato digestório do animal e do complexo multienzimático. A utilização de enzimas exógenas nas rações reduz a síntese de enzimas endógenas, disponibilizando mais aminoácidos para a síntese protéica (Yin et al., 2001). A adição de protease na ração pode neutralizar os efeitos negativos dos fatores antinutricionais da proteína vegetal e otimiza a quebra de moléculas protéicas existentes (Sheppy, 2001).

Os resultados deste trabalho em relação ao CDA da PB divergem dos resultados obtidos por Carter e Houlihan (1994) que trabalhando com juvenis salmão do Atlântico não obtiveram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos com e sem a adição de complexo multienzimático. Já Caverio (2004) observou que a adição de protease exógena teve influência positiva no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu, que exigem alta concentração de proteína na dieta, em razão do seu hábito alimentar, pois o pirarucu é um peixe carnívoro e precisa degradar a proteína muscular de suas presas.

Apesar das espécies onívoras de peixes não apresentam problemas para digerir o amido por secretarem amilase em todas as porções do intestino (Baldisserotto, 2002). O tambaqui, como espécie de peixe onívoro, apresenta maior atividade enzimática na região dos cecos pilóricos e intestino proximal (TONIOLO, 2001). O aumento na digestibilidade da fração energética (EB) deve-se principalmente ao aumento na digestibilidade dos demais nutrientes da ração, proteína, lipídios e carboidratos, que podem ser utilizadas como fonte energética, corroborando os resultados de Classen (1996), que relatou correlação positiva entre a digestibilidade do amido e o aumento da digestibilidade da energia da ração. Uma hipótese para o aumento da digestibilidade da fração energética obtida nesse

experimento seria o fato de a amilase ter disponibilizado uma quantidade excessiva de glicose, oriunda de ingredientes como o farelo de soja, fubá de milho, glúten de milho e farelo de trigo contido na ração.

Oliveira (2006) avaliou os efeitos da suplementação de ração com um complexo enzimático contendo celulase, protease e amilase sobre a digestibilidade de nutrientes em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). O autor concluiu que a adição do complexo enzimático à ração, composta à base de farelo de soja e milho, melhora o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta, energia bruta, no nível de 0,05%, o que corrobora com os resultados apresentados para o tambaqui neste experimento.

A presença de celulasas no complexo enzimático pode ter sido um fator em destaque nos resultados alcançados, uma vez que podem ser explicados levando-se em consideração que essa enzima tem ação na degradação dos constituintes das paredes celulares presentes nos ingredientes da ração à base de produtos vegetais, que em conjunto com as xilanases e glucanases, constituem as principais enzimas de degradação dos PNAs (Polissacarídeos Não Amiláceos), as quais não são sintetizadas pelos não-ruminantes, tornando biodisponíveis os monômeros de carboidratos, proteínas e lipídios das células vegetais para os peixes.

CONCLUSÕES

O complexo enzimático sintetizado pelo fungo *Aspergillus awamorii* quando adicionado à ração de juvenis de tambaqui melhorou a digestibilidade aparente dos nutrientes da ração, aumentando o aproveitamento da matéria seca, da proteína bruta e da energia bruta. Para a matéria seca, o nível de 200 ml do complexo enzimático/kg da ração teve a melhor digestibilidade. Para a proteína bruta, não houve diferença significativa entre os grupos testes, e para a energia bruta, o nível 150 ml do complexo enzimático/kg da ração obteve a melhor digestibilidade. Esses resultados mostram que do ponto de vista nutricional a suplementação enzimática pode ser uma alternativa viável na nutrição de juvenis de tambaquis, devendo ser testado para o desempenho zootécnico destes animais. Os resultados aqui obtidos sugerem que esta técnica pode ser usada na alimentação desta espécie. Assim, verifica-se que a adição do complexo enzimático na ração teve efeito positivo, em nível de 0,05%, uma vez que possibilitou maior aproveitamento dos nutrientes e energia bruta pelos juvenis do tambaqui.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUERO, J. M. Z.; MACEDO, G. R.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Influência do pH na síntese e liberação de glicoamilase por *Aspergillus awamorii* NRRL 31112 e *Aspergillus niger* NRRL 337. **Rev. Microb**: 21(4):355-60. 1990.

ANDRIGUETO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I. **Nutrição animal**. Paraná: Nobel, 1982. v.1. 395p.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists/Official methods of analysis**. 17ed., Arlington. 1141p. 1995.

ARAÚJO, E. F.; BARROS, E. G.; CALDAS, R. A.; SILVA, D. O. Beta-glycosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus *Humicola* sp. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 781- 784, 1983

ARAÚJO-LIMA, C.A e GOULDING, M. *So fruitful a fish: ecology, conservation and aquaculture of the Amazon's tambaqui*. **Columbia University press**. New York. 191p. 1997

ARIDE, P.H.R. **Efeito do pH nos parâmetros hematológicos e no ganho de peso de *Colossoma macropomum* (Cuveier, 1818)**. 1998. 52p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2002. 92p.

BAYER, E.A.; LAMED, R. 1992. The cellulose paradox: Pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource. **Biodegradation**, 3:171-188.

BIELY, P. **Biochimcal aspects of the production of microbial hemicellulases**. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD G. P. (Ed) *Hemicelluloses and hemicellusases*. London : Portland Press. p.29-52. 1993.

BIUDES, J.F.V.; PEZZATO, L.E.; CAMARGO, A.F.M. Digestibilidade aparente da farinha de aguapé em tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2079-2085, 2009.

BREMER NETO, H.; FESSEL. C. A.; PEZZATO, L. E.; PADOVANI, C. R. Determinação de rotina do crômio em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.691-697, mai-jun, 2005.

CAMARGO, A. C. S., VIDAL Jr, M. V.; DONZELE, J. L.; ANDRADE, D. R.; SANTOS, L. C. Níveis de Energia Metabolizável para Tambaqui (*Colossoma macropomum*) dos 30 aos 180 gramas de Peso Vivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.3, p.409-401, 1998.

CARTER, C.G.; HOULIHAN, D.F.; BUCHANAN, B.; MITCHELL, A.I. Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon *Salmo solar* L., fed a diet containing supplementary enzymes. **Aquaculture and Fisheries Management**, 25: 37-46. 1994.

CARTER, C.G; HAULER, R. C. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic Salmon, *Salmo solar* L. **Aquaculture**, 185: 299-311. 2000.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 189p.

CASTRO, A. L.; SOUZA, N. H.; BARROS, L. C., Avaliação do sistema de produção de Tambaqui intensivo em viveiro de terra com aeração. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Comunicado Técnico**, Aracajú – Se, 2002.

CAVERO, B.A.S. **Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de Pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier,1829)**. 2004. 79p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Doutorado da Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2004.

CHO, C.Y. Digestibility of feedstuffs as a major factor in aquaculture waste management. In: KAUSHIK, S.J.; LAQUET, P. (Eds.) **Fish nutrition practice**. Paris: INRA, 1993.

CHO, C.Y., COWEY, C.W., WATANABE, T. Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development Ottawa: **IDRC**, 1985.

CLASSEN, H. L., GRAHAM, H., INBORR, J. and BEDFORD, M. R. Growing interest in feed enzymes to lead to new products. **Feedstuffs** 63, 22-24. 1991.

CLASSEN, H.L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.62, p.21-27, 1996.

CONTE, A.J., et al. Efeito da Fitase e Xilanase sobre o Desempenho e as características Ósseas de Frangos de Corte Alimentados com Dietas Contendo Farelo de Arroz. In: **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.5, p.1147-1156, 2003.

COWAN, W. D. **Factors affecting the manufacture, distribution, application and overall quality of enzymes in poultry feeds**. In: Joint Proc. 2nd Int. Roundtable on Animal. Feed Biotechnology-Probiotics, and Workshop on Animal, Feed Enzymes, Ottawa. p.175-184.1994.

CUI, Y.Q., VAN DER LANS, R.G.J.M., GIUSEPPIN, M.L.F, LUYBEN, K.C.A.M., Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, n. 23, p. 157-167, 1998.

DA SILVA, L. F. L.; DE MIRANDA, E. C.; BOSSI, A. F.; SANTOS, E. L. FONSECA, L. A. P.; PACHECO, K. M. G.; PONTES, E. C. Níveis de proteína bruta no desenvolvimento de alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: **Congresso Brasileiro de Zootecnia**, Recife-Pe. 2006.

DASHEK, W. V. **Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology**. [S.I.]: CRC Press, 1997.

DESSARROLLO del cultivo de Colossoma y Piaractus en America Latina. **Red Acuicultura boletín**, v.6, n.3-4, p.1-28, 1992.

Dos SANTOS, J.; BURKOW, I.C; JOBLING, M. Patterns of growth and lipid deposition in cod (*Gadus morhua* L) fed natural prey and fish-based feeds. **Aquaculture**, 110: 173-189. 1993.

EL-SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture** , v.179, p.149-168, 1999.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions. New York, Walter de Gruyter, Inc., 1989.

FERKET, P. Enzymes of ferway to reduce waste, improve performance. **Feedstuffs**, January 22, p. 30-34, 1996.

FERREIRA-FILHO, E.X. **Xilanases**. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Eds). *Enzimas como agentes Biológicos*. Legis Summa, Ribeirão Preto. p. 137-148,, 2004,

FIALHO, E. T; RODRIGUES, P. B.; AMARAL, N. O.; ZANGERÔNIMO, M. G.; CANTARELLI, V. S. Redução da poluição ambiental dos dejetos de suínos utilizando os instrumentos da nutrição. I **Congresso Brasileiro de Nutrição Animal**. Fortaleza – CE, 2008.

FURUKAVA, A.; TSUKAHARA, H. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as in index substance in the study of digestibility of fish feed. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, 32(6): 502-506. 1966.

FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S.; FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C. Fitase na Alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.): Desempenho e Digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30: 924-929. 2001.

GUIMARÃES, I. G., FALCON, D. R. SCHICH, D., BARROS, M. M., PEZZATO, L.E. Digestibilidade aparente de rações contendo complexo enzimático para tilápia-do-nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.6, p.1397-1402, 2009.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HANLEY, F. The digestibility of foodstuffs and the effects of feeding selectivity determinations in Tilapia(*Oreochromis niloticus* L). **Aquaculture**, v.66, n.2, p.163-179, 1987.

HASPER, A. A.; DEKKERS, E.; VAN MIL, M.; VAN DE VONDERVOORT, P. J. HEPHER, B. Nutrition of Pond Fishes. Cambridge University Press, New York, 388p. 1988.

HOCKING, A. **Responses of xerophilic fungi to changes in water activity**. In: Stress Tolerance of Fungi, Jennings, D.H., ed. (New York, USA: Marcel Dekker, Inc), pp. 233–256.

I.; DE GRAAFF, L. H. EGLC. A new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. Applied and Environmental **Microbiology**, v. 68, p. 1556-1560, 2002

INBORN, J, MEULEN, J. V. Residual activity of added enzymes in relation to fibre digestibility in the terminal ileum of growing pigs. in: WENK, C. and BOESSINGER, M. Enzymes in animal nutrition - 1 st symposium. **Proceedings...** Kartauselttingen, Switzerland. October 13-16, p. 34-37, 1993.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JONES, P.L.; De SILVA, S.S. Apparent nutrient digestibility of formulated diets by the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* Clark (Decapoda, Parastacidae). **Aquaculture Research**, v.28, n.11, p.881-891, 1997.

KARI, A.; R. FLENGSRUD; LINDAHL,V.; TRONSMO, A. Characterization of production and enzyme properties of an endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* ek-2 isolated from compost soil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 66: 319-326. 1994.

LEGATE, N.J.; BONEN, A.; MOON, T.W. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bulhead catfish (*Ameiurus melas*). **General and Comparative Endocrinology**, v.122, p.48-59, 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3ed. New York: Worth Publishers, 2000.

LOVELL, Tom. Nutrition and feeding of fish. London: **Academic Press**, 267p. 1998.

MACEDO, E.M. **Exigência de proteína na nutrição de tambaqui, *Colossoma macropomum* Curvier, 1818. (Pisces, Characidae)**. Jaboticabal, SP, UNESP, 1979. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Estadual de São Paulo, 1979.

MACHIDA, M.; GOMI K. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press Tokyo-Japan, 238. 2010.

MARTIN, N. et al. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Brazilian archives biology technology*. Curitiba, vol.47, no.5, Sept. 2004.

MAYNARD, L.A.; LOOSLI, J.K.; HINTZ, H.F. et al. **Animal nutrition**. 7.ed. New York: McGraw-Hill, p.44-46. 1979.

MENDES, P.P. **Estatística aplicada à aquicultura**. Recife: Bagaço, 1999.265p.

MENEZES, N. G. A.; ARAÚJO, J. G.; PEREIRA, H. V.; PÁDUA, D. M. C.; BRAGA, W. F.; GUIMARÃES, I. G. Efeito da taxa de lixiviação de nutrientes em fezes de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) sobre o coeficiente de digestibilidade aparente. **Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia : A produção animal no mundo em transformação**. Brasília – DF. 2012

MERCHEN, N.R. Digestion, absorption and excretion in ruminantes In: CHURCH, D.C. (Ed.) **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. 4.ed. Carvallis: O&B Books, 1993. p.172-201.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). **Produção de pescado aumenta 25% nos últimos oito anos.** Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/nt_AGO_19-08-Producao-de-pescado-aumenta. Acesso em: 24/09/2011> Acesso em 29/01/2012 as 08:35h.

MOORE-LANDECKER, E. Fundamentals of the Fungi. 4^a ed. New Jersey: Prentice Hall, 574p. 1996.

MORA-JAÍMES, G.; BÁCENA-GAMA, R.; MENDOZA-MARTÍNEZ, G.D.; GONZÁLES-MUÑOZ, S.S.; HERRERA-HARO, J.G. Respuesta productiva y fermentación ruminal en borregos alimentados con grano de sorgo tratado con amilases. **Agrociencia**, v.36, p.31-39, 2002.

MORAES, L. M. P. **Amilases**. In: SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas como agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, cap. 13, 222 - 242. 2004.

MORALES, A.E.; CARDENETE, G.; SANZ, A.; et al. Re-avaluation of crude fiber and acid-insoluble ash as intermarkers, alternative to cromic oxide, in digestibility studies with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.179, p.71-79, 1999.

NRC (National Research Council). Nutrient Requirements of Fish. **National Academy Press**, Wasington, DC, 114 pp. 1993.

NSEREKO, V. L.; MORGAVI, D. P.; RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; McALLISTER, T. A. Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, p. 153-170, 2000.

NUNES, I, J. Nutrição animal básica. 1^a Ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998.

OLIVEIRA e ALMEIDA, M. C. **Análise da produção de amiloglucosidase e alfa-amilase por *Aspergillus awamori* através de fermentação batelada em frascos agitados.** VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia – MG, 2009.

OLIVEIRA, G.R. **Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**.Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 102pp. 2006

PAGE, J.W., ANDREWS, J.W. Interactions of dietary levels of protein and energy on channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal Nutrition.**, v.103, n.9, p.1339-1346, 1973.

Panorama da Aquicultura. Coletânea de Informações Aplicadas ao Cultivo de Tambaqui, do Pacu e de Outros Peixes Redondos. Vol.14, nº 83, maio/junho 2004.

PARMA-DE-CROUX, M. J. Tolerância respiratória de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae) a condiciones críticas de oxígeno. **Ilheringia**, Série Zoologia. v. 79, p.135-140, 1995.

PAVEZZI, F. C; GOMES, E.; SILVA, R. Produção e caracterização de glicoamilase do fungo *Aspergillus awamori* expressa em levedura *Saccharomyces cerevisiae* com diferentes fontes de carbono. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, vol.39 no. 1 Mar. 2008

PERCIVAL, S.B; LEE, P. S.; CARTER, C. G. Validation of a technique for determining aparent digestibility in large (uo to 5 Kg) Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seacages. **Aquaculture**, 201: 315-327. 2001.

PÉREZ, P. P. Efecto del contenido proteico y energético de dietas em el crecimiento alevinos de Gamitana (*Colosssoma macropomum*). **Folia Amazonica**, V. 10 (1-2). 2000.

PEZZATO, L.E. **Alimentação de peixes - Relação custo e benefício.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, Porto Alegre: SBZ, 109-118, 1999.

PEZZATO, L.E.; PEZZATO, A.C.; SILVEIRA, A.C. Digestibilidade aparente de fontes protéicas pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO, 6., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 5., 1988, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SIMBRAq, 1988. p.373-378.

ROTTER, B. A. The future of crude enzyme supplements in pig nutrition. **Pig News Information**. v. 11, n. 1, p. 15-17, 1990.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Rev. Brasil. Bot.**, V.27, n.2, p.205-211, abr.-jun. 2004.

SADIKU, S.O.E.; JUANCEY, K. Digestibility, apparent amino acid availability and waste generation potential of soybean flour: poultry meat meal blend based diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fingerlings. **Aquaculture Research**, 26:651-657. 1995.

SANTOS, L.; PEREIRA FILHO, M.; SOBREIRA, C. ITUASSÚ, D.; da FONSECA, F. A. L. Exigência protéica de juvenis de tambaqui (*Colossomacropomum*) após privação alimentar. **Acta amazonica**. vol.40 no.3 Manaus Sept. 2010.

Sheppy, C. The current feed enzyme market and likely trends. In: Bedfors, M. Partridge, G. (Rds). Enzymes in farm animal nutrition. **Finnfeeds International**, Marlborough, Wiltshire, UK. p. 1-10. 2001.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; CAVERO, B. A. S.; OLIVEIRA-PEREIRA, M..I. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier 1818). **Acta Amazonica**, Manaus, vol 37 (1) 157 – 164, 2007.

SOARES, C. E. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, vol.37, nº6, Jun, 2008.

SOARES, I. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. Campinas – SP, vol.30 no.3 July/Sept. 2010.

TITGEMEYER, E.C. Design and interpretation of nutrient digestion studies. **Journal of Animal Science**, v.75, n.8, p.2235-2247, 1997.

TONIOLO, C.F.C. Estudo dos padrões de digestão enzimática e perfil metabólico em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), alimentados

com diferentes teores de proteína e carboidratos em regime de confinamento. 2001. 115p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

UMSZA-GUEZ, M.A.;DÍAZ A. B.; ORY, I.; BLANDINO, A.; GOMES, E.; CARO. I. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42: 1585-1597. (2011).

Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant.** 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 476p. 1994.

VIDAL Jr. M.V.; DONZELE, J.L.; da SILVA CAMARGO, A.C.; de ANDRADE, D.R.; dos SANTOS, L.C. Níveis de proteína bruta para tambaqui (*Colossomacropomum*), na fase de 30 a 250 gramas. 1. Desempenho dos tambaquis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 27: 421-426. 1998.

VIDAL JR., M.V.; DONZELE, J.L.; ANDRADE, D.R. et al. 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**, v.33, n.6, p.2193-2200, 2004.

WALSH.G.A. et al. Enzymes in the animal feed industry. **Trends in Biotechnology**, V.11,n.10, p.946-957, 1993.

WENK, C., WEISS, E, BEE, G. Interaction between a phytase and a carbohydrase in a pig diet.in: WENK, C. and BOESSINGER, M. Enzymes in animal nutrition - 1 st symposium. **Proceedings...** Kartauselttingen, Switzerland. October 13-16, p. 160-164, 1993.

WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. Trichoderma xylanases.Their properties and application. **Crit. Rev. Biothechnol.** V12, n.5/6, p413-435, 1992.

WOOD, T. M., S. I. McCRAE K.; BHAT M. The mechanism of fungal cellulase action: synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. **Biochemistry Journal.** 260:37-43. 1989.

WOYNAROVICH, E. Tambaqui e Pirapitinga. Propagação artificial e criação de alevinos. Brasília, **CODEVASF**, 69p,1986.

WYATT, C.L.; BEDFORD, M. O uso de enzimas nutricionais para maximizar a utilização de nutrientes pelo frango de corte em dietas à base de milho: Recentes processos no desenvolvimento e aplicação prática. In: SEMINÁRIO TÉCNICO FINNFEEDS, 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FINNFEEDS, p.2-12. 1998.

YANG, S.Q.; YAN, Q.J.; JIANG, Z.Q.; Li, L.T.; TIAN, H.M.; WANG, Y.Z. High level of xylanase production by the thermophilic *Paecylomices themophila* J18 on wheat straw in solid state fermentation. **Biores. Technol.** 97:1794-1800. 2006.

YIN, Y.-L.; BAIDOO, S.K.; JIN, L.Z. The effect of different carbohydrase and protease supplementation on apparent (ileal and overall) digestibility of nutrients of five hulless barley varieties in young pigs. **Livest. Prod. Sci.**, v.71, p.109-120, 2001.

ZHANG P., HIMMEL M.E., MIELENZ. J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnol Adv**; 24:452-81. 2006

ANEXOS

Documentação fotográfica dos procedimentos experimentais.

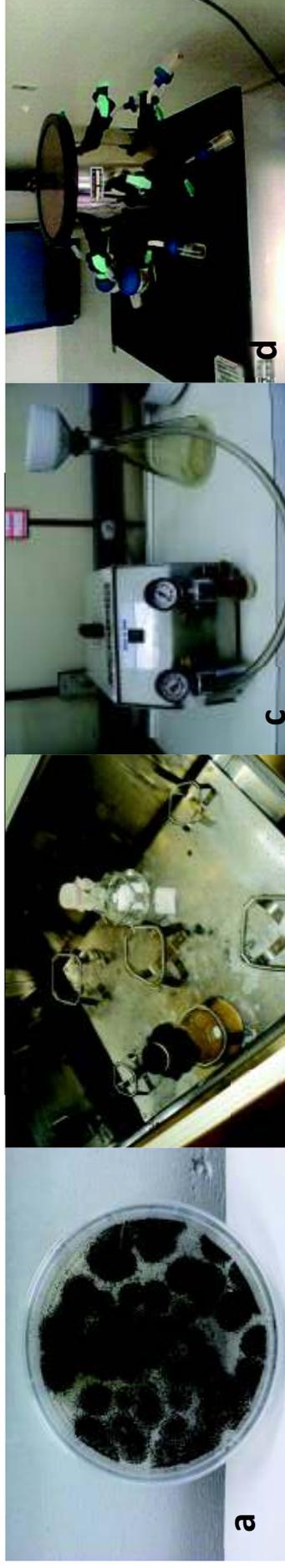


Figura 1. Sequência de eventos realizados na primeira etapa experimental: a) Amostra da cultura do fungo *Aspergillus awamorii* cultivado no Laboratório de Enzimologia da UFG. b) Erlenmeyers incubados em agitador rotatório no Laboratório de Fisiologia da Digestão da UFG c) Filtração a vácuo da solução enzimática realizada no Laboratório de Fisiologia da digestão, na UFG. D) Liofilização da solução enzimática realizada no Laboratório de engenharia de Alimentos da PUC-GO.

ANEXOS

Documentação fotográfica dos procedimentos experimentais.



Figura 2. Sequência de eventos realizados na segunda etapa experimental: a) Um exemplar de juvenil de tambaqui (*Colossoma macropomum*) peso médio de 55,6g, usado neste experimento. b) Adição da solução enzimática aos tratamentos, pelo método de aspersão, realizada no Laboratório de Solos da PUC-GO. c) Passagem das rações em moedor de carne elétrico, Laboratório de Solos da PUC-GO. d) Secagem da ração em estufa de ventilação forçada por 24h a 55 °C.

ANEXOS

Documentação fotográfica dos procedimentos experimentais.



Figura 2. Sequência de eventos realizados na segunda etapa experimental (Continuação): e) As doze Unidades Experimentais (aquários) que receberam os peixes, LAPOA, PUC-GO. f) – Filtro físico e biológico, dentro do sistema de recirculação da água, usado nas UEs. g) Tanque coletor de fezes – Incubadoras de ovos adaptadas.