

## Efeitos da Suplementação de Fitase sobre a Disponibilidade Aparente de Mg, Ca, Zn, Cu, Mn e Fe em Alimentos Vegetais para a Tilápia-do-Nilo

Giovani Sampaio Gonçalves<sup>1</sup>, Luiz Edivaldo Pezzato<sup>2</sup>, Margarida Maria Barros<sup>2</sup>, Geisa Karine Kleeman<sup>3</sup>, Dario Falcon Rocha<sup>4</sup>

**RESUMO** - Cem juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*; PV = 100.0 ± 5.0 g) foram distribuídos em 10 tanques-rede com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação da enzima fitase (0, 1.000 e 2.000 UFA/kg) sobre a disponibilidade de minerais em alguns alimentos energéticos (milho, milho extrusado, farelo de trigo, farelo de arroz e farelo de sorgo) e protéicos (farelo de soja extrusado, farelo de soja, farelo de girassol, farelo de algodão e glúten de milho) utilizados na alimentação de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Para determinação dos coeficientes de disponibilidade aparente (CDA) do cálcio (Ca), magnésio (Mg), zinco (Zn), cobre (Cu), ferro (Fe) e manganês (Mn), foram confeccionadas 31 rações, marcadas com 0,10% de óxido de crômio III – uma referência (ração purificada) e 30 contendo os dez alimentos e os diferentes níveis de suplementação da enzima fitase. O CDA dos nutrientes foi calculado com base no teor de crômio da ração e das fezes. A fitase aumenta, nos vegetais, a disponibilidade do Mg, Cu, Zn e Mn, os quais apresentam tendência diferenciada, em razão do seu valor biológico e do nível de suplementação de enzima.

Palavras-chave: minerais, disponibilidade, enzima, fitase, *Oreochromis niloticus*, tilápia

## Effects of Phytase Supplementation on Apparent Availability of Mg, Ca, Zn, Cu, Mn, and Fe of Plant Feedstuffs for Nile Tilapia

**ABSTRACT** - One hundred Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*; BW = 100.0 ± 5.0 g) were assigned to 10 experimental cages to evaluate the effects of phytase supplementation (0, 1,000, and 2,000 FTU/kg) on calcium (Ca), magnesium (Mg), zinc (Zn), copper (Cu), iron (Fe) and manganese (Mn) availability of ten feedstuffs: five energetic (corn, extruded corn, wheat meal, rice meal and low-tannin sorghum) and five protein (extruded soybean, soybean meal, sunflower meal, cottonseed meal and corn gluten meal). As reference, an albumin and gelatin-based diet [with 0.10 % chromic oxide (III) as external marker] was fed to the juveniles. Thirty-one diets (one reference and 30 based on all feedstuffs and increasing levels of phytase) were formulated to determine the coefficients of apparent availability of minerals (Mg, Cu, Zn and Mn). Phytase increased mineral availability in plant feedstuffs, that change according to its biological value and enzyme supplementation level.

Key Words: enzyme, availability, feedstuffs, *Oreochromis niloticus*, phytase, tilapia

### Introdução

Na natureza, os peixes suprem com facilidade suas exigências nutricionais com alimentos disponíveis no meio. Entretanto, quando confinados, suas necessidades precisam ser atendidas pela ração, mediante a utilização de dietas balanceadas.

Atualmente, em nosso país, tem aumentado de forma expressiva a produção de peixes em sistemas superintensivos. Esse sistema possibilita a obtenção de significativa produção por unidade de área, mas exige maior atenção ao valor nutritivo dos alimentos utilizados para compor a ração, uma vez que essa ração será o único alimento disponível para suprir a necessidade nutricional desses peixes.

Com base nas informações científicas disponíveis, as rações comercializadas no Brasil atendem parcialmente às reais exigências nutricionais das diferentes espécies cultivadas. Entre os nutrientes essenciais, os minerais se encontram super ou subdisponíveis nessas rações e, entre os minerais, apenas o fósforo tem merecido destaque nos estudos de nutrição de peixes. Entretanto, minerais como o cálcio, cobre, ferro, zinco, manganês e o magnésio, entre outros, também são vitais ao equilíbrio orgânico.

Minerais são exigidos para o processo normal de vida e todos os animais, incluindo os peixes, necessitam destes elementos inorgânicos (Watanabe, 1997), pois são responsáveis pela formação do esqueleto,

<sup>1</sup> Pesquisador Científico Instituto de Pesca – Centro Avançado de Pescado Continental, C.P. 1052, CEP: 15025-990. São José do Rio Preto, SP, Brasil. E.mail: gsgoncalves@pesca.sp.gov.br

<sup>2</sup> DMNA, FMVZ, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Aluna do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, DMNA - FMVZ, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

<sup>4</sup> Aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação do Centro de Aquicultura da Unesp – CAUNESP.

manutenção do sistema coloidal, regulação do equilíbrio ácido-base e são constituintes necessários para a produção de hormônios e enzimas.

Com exceção do cálcio e do fósforo, os demais minerais, por serem exigidos em baixas quantidades, são considerados traços na nutrição de peixes (Watanabe, 1997). Não somente a deficiência, mas também o excesso de minerais na alimentação, pode causar efeitos deletérios ao desempenho e, quando em excesso, os minerais podem ser letais à espécie, causando várias patologias bioquímicas, estruturais e funcionais aos peixes.

No Brasil, poucas pesquisas têm sido realizadas com os minerais na nutrição de peixes tropicais. Vários fatores dificultam a condução destes estudos, como: disponibilidade de alimentos purificados; contaminação pelo próprio alimento; dificuldade e custo das análises; disponibilidade dos minerais presentes nos alimentos, entre outros. Destaca-se ainda que pouca ou nenhuma atenção tem sido dada à disponibilidade dos minerais nos alimentos, fator fundamental na elaboração de rações.

Grande parte dos alimentos protéicos e/ou energéticos que constituem as rações é de origem vegetal. Peixes onívoros possuem adaptações morfofisiológicas que possibilitam a utilização de rações compostas exclusivamente por alimentos vegetais. Isso é possível pelo fato de os peixes onívoros utilizarem melhor os carboidratos (Kubarik, 1997) e a proteína (aminoácidos) dessas fontes (Tengjaroenkul et al., 2000). Entretanto, alimentos de origem vegetal apresentam baixa disponibilidade de minerais, por possuírem fatores antinutricionais como o fitato.

O avanço da tecnologia de processamento de alimentos, a engenharia genética, a disponibilidade de novos pró-nutrientes e aditivos, além do maior número de informações acerca das necessidades nutricionais dos peixes, têm possibilitado a elaboração de rações exclusivamente vegetais. No entanto, a mucosa intestinal dos peixes não secreta a enzima fitase, uma fosfatase que remove o fosfato do fósforo fítico (fitato) presente nos alimentos vegetais.

Os alimentos de origem vegetal podem conter de 0,5 a 6,0% de ácido fítico e apresentarem de 50,0 a 90,0% do total de fósforo na forma de fitato (Nolan & Dufafin, 1987). O fitato é capaz de se complexar com cátions, proteínas, lipídeos e amido, tornando não digestível grande parte desses nutrientes aos peixes.

No sentido de minimizar esse problema e tornar mais disponíveis os nutrientes contidos nas rações, os nutricionistas têm preconizado a utilização de pró-nutrientes. Entre os pró-nutrientes, a fitase tem se destacado como o que melhor responde à essa prática. Essa enzima melhora a eficiência de utilização dos nutrientes, sobretudo os minerais (Storebakken et al., 1998; Furuya et al., 2001).

Este estudo teve foi realizado com o objetivo de avaliar, em tilápias-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), o efeito da suplementação da enzima fitase (0, 1.000 e 2.000 UFA/kg de alimento-teste) sobre a disponibilidade aparente do cálcio, magnésio, zinco, cobre, manganês e ferro de alguns alimentos protéicos e energéticos de origem vegetal.

## Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (*AquaNutri*) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu, Laboratório Associado ao Centro de Aqüicultura da UNESP.

Foram avaliados dez alimentos, cinco protéicos (farelo de soja, farelo de soja extrusado, farelo de girassol, farelo de algodão e glúten de milho) e cinco energéticos (milho, milho extrusado, sorgo baixo tanino, farelo de arroz e farelo de trigo) (Tabela 1).

Para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA), foi elaborada uma ração-referência (purificada), segundo o Instituto de Nutrição Americano (AIN, 1977), com base na proteína da albumina e da gelatina, formulada para conter 32,0% de proteína digestível (PD) e 3.000 kcal de energia digestível (ED) por quilograma de alimento. A ração-referência foi adicionada na proporção de 40,0% aos alimentos a serem avaliados, conforme apresentado na Tabela 2.

Foram confeccionadas 31 rações: dez sem suplementação da enzima fitase; dez com 1.000 UFA/kg; dez com 2.000 UFA/kg; e uma ração-referência (purificada), sem adição de enzima. Adotou-se a ração-referência como referencial para determinação dos coeficientes de disponibilidade dos nutrientes.

A fitase (BASF - Natuphos<sup>®</sup>) utilizada apresentava concentração de 5.000 UFA/kg. Uma unidade de fitase ativa (UFA) é definida como a quantidade de fitase que libera fósforo inorgânico do fitato de sódio (5,1 mM) à uma taxa de 1 mmol/min em pH 5,5 e temperatura de 37°C (Kornegay, 1999).

Tabela 1 - Composição química dos alimentos utilizados nas rações experimentais, matéria seca<sup>1</sup>Table 1 - Chemical composition of feedstuffs, dry matter basis<sup>1</sup>

Alimento Feedstuff	Ca <sup>2</sup> (%)	Mg <sup>3</sup> (%)	Mn <sup>4</sup> (mg)	Cu <sup>5</sup> (mg)	Zn <sup>6</sup> (mg)	Fe <sup>7</sup> (mg)
<b>Energético (Energetic)</b>						
Milho (Corn)	0,20	0,07	29,40	3,85	37,52	116,66
Milho extrusado (Extruded corn)	0,19	0,08	5,00	2,68	21,92	17,79
Farelo de trigo (Wheat meal)	0,55	0,52	116,54	16,25	132,43	215,29
Sorgo baixo tanino (Low-tannin sorghum)	0,20	0,18	31,42	5,27	39,15	99,46
Farelo de arroz (Rice meal)	0,30	0,96	67,31	12,28	99,73	71,67
<b>Protéico (Protein)</b>						
Farelo de soja (Soybean meal)	1,07	0,37	55,83	21,36	73,03	62,82
Farelo de soja extrusado (Extruded soybean meal)	0,54	0,36	54,98	13,74	61,18	54,07
Glúten de milho (Corn gluten)	0,87	0,13	16,42	20,05	75,48	61,30
Farelo de algodão (Cottonseed meal)	0,51	0,52	33,89	15,18	61,18	143,87
Farelo de girassol (Sunflower meal)	1,19	0,66	63,90	6,02	123,09	177,04

<sup>1</sup>Análise realizada no laboratório de química e bioquímica do Instituto de Biociências, Unesp Botucatu (Analyses run at the Laboratory of Chemistry and Biochemistry, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brazil).

<sup>2</sup>Ca (%) = cálcio; <sup>3</sup>Mg (%) = magnésio; <sup>4</sup>Mn (mg/kg) = manganês; <sup>5</sup>Cu (mg/kg) = Cobre; <sup>6</sup>Zn (mg/kg) = Zinco; <sup>7</sup>Fe (mg/kg) = Ferro.

<sup>2</sup>Ca = calcium; <sup>3</sup>Mg = magnesium; <sup>4</sup>Mn = manganese; <sup>5</sup>Cu = copper; <sup>6</sup>Zn = zinc; <sup>7</sup>Fe = iron.

Tabela 2 - Composição percentual das rações (% matéria natural)

Table 2 - Composition (%) of diets (% as-fed)

Ingrediente Ingredient	Ref. <sup>1</sup>	UFA <sub>1</sub> <sup>2</sup>	UFA <sub>2</sub> <sup>3</sup>	UFA <sub>3</sub> <sup>4</sup>
Albumina (Albumin)	30,00	12,00	12,00	12,00
Dextrose (Dextrose)	25,00	10,00	10,00	10,00
Amido de milho (Corn starch)	25,00	10,11	10,09	10,07
Gelatina (Gelatin)	10,00	4,00	4,00	4,00
Óleo de soja (Soy oil)	4,38	1,75	1,75	1,75
α-celulose (α-cellulose)	5,00	2,00	2,00	2,00
Supl. vit. min. <sup>5</sup> (Suppl. vit. min.)	0,50	0,02	0,02	0,02
BHT <sup>6</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02
Óxido de crômio (Chromic oxid)	0,10	0,10	0,10	0,10
Fitase (Phytase)	-	-	0,02	0,04
<b>Alimento energético (Energetic feedstuff)</b>				
Milho (Corn)	-	60,00	60,00	60,00
Milho extrusado (Extruded corn)	-	60,00	60,00	60,00
Sorgo baixo tanino (Low-tannin sorghum)	-	60,00	60,00	60,00
Farelo de arroz (Rice meal)	-	60,00	60,00	60,00
Farelo de trigo (Wheat meal)	-	60,00	60,00	60,00
<b>Alimento protéico (Protein feedstuff)</b>				
Farelo de soja (Soybean meal)	-	60,00	60,00	60,00
Farelo de soja extrusado (Extruded soybean meal)	-	60,00	60,00	60,00
Farelo de girassol (Sunflower meal)	-	60,00	60,00	60,00
Farelo de algodão (Cottonseed meal)	-	60,00	60,00	60,00
Glúten de milho (Corn gluten meal)	-	60,00	60,00	60,00
Total (%)	100,00	100,00	100,00	100,00

<sup>1</sup> Ref. = tratamento referência (reference treatment); <sup>2</sup> UFA<sub>1</sub> = 0 unidade de fitase/kg; <sup>3</sup> UFA<sub>2</sub> = 1.000 unidades de fitase/kg; <sup>4</sup> UFA<sub>3</sub> = 2000 unidades de fitase/kg; <sup>5</sup> Supl. vit. min. (mineral and vitamin mix): níveis de garantia por kg do produto (guarantee levels per kg): vit. A = 1200.000 UI; vit. D3 = 200.000UI; vit. E = 12.000 mg; vit. K3 = 2.400 mg; vit. B1 = 4.800 mg; vit. B2 = 4.800 mg; vit. B6 = 4.000 mg; vit. B12 = 4.800 mg; ác. fólico (folic acid) = 1.200 mg; pantotenato de Ca (Calcium pantothenate) = 12.000 mg; vitamina C (vitamin C) = 48.000 mg; biotina (biotin) = 48 mg; colina (choline) = 65.000 mg; niacina (niacin) = 24.000 mg; ferro (iron) = 10.000 mg; cobre (copper) = 600 mg; manganês (manganese) = 4.000 mg; zinco (zinc) = 6.000 mg; iodo (iodine) = 20 mg; cobalto (cobalt) = 2 mg e selênio (selenium) = 20 mg; <sup>6</sup> BHT = antioxidante (antioxidant) - Butil hidroxi toluene (Butyl hydroxi toluene).

Na confecção das rações-teste, após pesagem e homogeneização dos alimentos, foi acrescida água ( $50,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ) na proporção de 30% do peso total da mistura. Quando necessário, a enzima fitase acrescentada na forma seca, juntamente ao alimento-teste. A mistura foi peletizada em equipamento eletrônico e desidratada em estufa de ventilação forçada ( $50 \pm 1^\circ\text{C}$ ), durante 24 horas.

Para obtenção das fezes, foi adotada a metodologia descrita por Pezzato et al. (2001), em que 100 juvenis de tilápia-do-nilo, pesando  $100,0 \pm 5,0$  g, receberam as rações-teste separadas do sistema de coleta de fezes. Durante o período de alimentação, os peixes foram alojados em tanques-rede de formato circular (80 cm de diâmetro e 60 cm de altura), confeccionados em tela plástica (malha de 1,5 cm entrens). Cada tanque fez parte de um conjunto de aquários circulares (aquários de alimentação), confeccionados em fibra de vidro, com capacidade para 250 L, em um sistema fechado de circulação, com renovação a cada 60 minutos. O sistema de alimentação era dotado de filtro físico e biológico, com aeração e controle digital, para manutenção da temperatura na faixa de conforto para a espécie ( $26,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ ). Os peixes permaneceram nesses aquários de alimentação das 8 às 17 h e receberam as rações à vontade, com maior frequência durante o final do período vespertino. As dez gaiolas de alimentação foram divididas em dois grupos (alimentos energéticos e protéicos) que, em dias subsequentes, eram submetidos aos cinco aquários de coleta de fezes. Essa medida foi aplicada a fim de se obter cinco repetições por tratamento.

Às 18 h, os tanques-rede foram transferidos para os aquários destinados aos estudos de digestibilidade, um para cada tanque-rede, com capacidade para 300 L, confeccionados em fibra de vidro. Esses aquários apresentavam seu terço inferior em formato cônico, provido de registro que se acopla hermeticamente a um frasco transparente de 200 mL, para coleta de fezes. Os aquários de digestibilidade eram providos de sistema individual de aeração e controle de temperatura. Os tanques-rede permaneceram nos aquários de digestibilidade até a manhã do dia seguinte, quando retornaram aos tanques de alimentação, para um novo ciclo de coleta. Esse procedimento possibilitou a obtenção de fezes sem que houvesse a contaminação desse material pela dieta e/ou pela água, em consequência da lixiviação dos nutrientes da ração. Após a retirada dos tanques-rede, por meio de centrifugação

manual da água, as micropartículas presentes também foram coletadas com o conteúdo dos frascos coletores. Toda a água utilizada nos aquários de digestibilidade foi substituída, a fim de se evitar contaminação nas coletas seguintes.

As fezes presentes em cada frasco foram congeladas a  $-20^\circ\text{C}$ , armazenadas e posteriormente desidratadas a  $55^\circ\text{C}$  por 48 horas. As escamas, quando presentes, foram retiradas com o auxílio de uma lupa, moídas e homogeneizadas, apresentando-se prontas para as análises químicas. Os CDA foram determinados pelo método indireto, utilizando-se óxido de cromo III como marcador inerte (0,10%).

As análises para determinação da concentração de cromo, cálcio, magnésio, zinco, cobre, manganês e ferro nas fezes, nas rações e nos alimentos foram realizadas a partir da mineralização ácida das amostras em forno de microondas, utilizando uma mistura ácida, composta por 3 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e 1 mL de ácido perclórico, e posterior quantificação dos minerais por espectrometria de absorção atômica, segundo metodologia proposta por Freire et al. (2001). Todas as análises químicas foram realizadas no laboratório de Química e Bioquímica – IB/UNESP-Botucatu.

Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes foram calculados com base na seguinte fórmula:

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

em que: CDA = coeficiente de disponibilidade aparente (%);  $\%Cr_2O_{3r}$  = porcentagem de óxido de cromo na ração;  $\%Cr_2O_{3f}$  = porcentagem de óxido de cromo nas fezes;  $\%N_f$  = porcentagem de mineral nas fezes;  $\%N_r$  = porcentagem de mineral na ração.

A disponibilidade aparente dos minerais dos alimentos foi calculada de acordo com a fórmula descrita por Cho & Slinger (1979):

$$CDA_N = \frac{CDA_{RT} - CDA_{RR} \cdot x}{y}$$

em que:  $CDA_N$  = coeficiente de disponibilidade aparente do mineral;  $CDA_{RT}$  = coeficiente de disponibilidade aparente do mineral na ração-teste;  $CDA_{RR}$  =

coeficiente de disponibilidade aparente do mineral na ração-referência;  $x$  = proporção da ração-referência;  $y$  = proporção do alimento-teste.

Os parâmetros de oxigênio dissolvido (mg/L) e pH foram determinados semanalmente e a temperatura da água foi controlada diariamente por meio de termostato digital.

Para análise estatística, foi utilizado o programa de Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG (Universidade Federal de Viçosa, 1982). Os resultados dos estudos foram avaliados pela técnica da análise de variância e, quando significativo, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de médias Tukey, a 5% de significância.

### Resultados e Discussão

Os valores obtidos para temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água dos aquários experimentais foram, respectivamente, de  $26,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ;  $7,2 \pm 1,0$  mg/L e  $7,5 \pm 0,6$  e encontram-se na faixa recomendada por Popma & Green (1990) para as tilápias.

Os valores de CDA dos minerais cálcio e ferro, suplementados ou não com a enzima fitase, apresentaram seus CDA negativos para todos os cinco alimentos, protéicos e energéticos, o que pode estar relacionado à maior presença desses minerais na água, uma vez que o cálcio presente na água é utilizado mesmo quando este mineral está disponível na ração, sendo sua absorção quantitativamente tão alta quanto à do alimento (Steffens, 1987).

Graf (1983) relatou baixa disponibilidade de ferro, e atribuiu-a à presença do fitato, que, em pH ácido, provoca precipitação quantitativa das moléculas desse mineral. Por isso, grande parte dessas moléculas pode estar livre na água e ser reabsorvida pelos peixes, ocasionando valores negativos de CDA. Isso pode ser reforçado com base nas informações de Thorstensen & Romslo (1990), que destacaram a poderosa ação da molécula de fitato em quelar moléculas de ferro.

As médias dos coeficientes de disponibilidade aparente (CDA) do magnésio (Mg), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) dos alimentos protéicos e energéticos de origem vegetal, suplementados ou não com a enzima fitase, encontram-se nas Tabelas 3, 4, 5 e 6.

Com exceção do milho extrusado (50,42%), todos os demais alimentos energéticos e protéicos apresentaram aumento ( $P < 0,05$ ) do coeficiente de disponibilidade aparente (CDA) do magnésio com a suplementação de

1.000 ou 2.000 UFA/kg (Tabela 3). Destaca-se ainda que, entre os alimentos sem a suplementação da enzima fitase, o glúten apresentou o menor CDA (38,91%).

Com o objetivo de determinar a disponibilidade verdadeira do magnésio, em alimentos para frangos, Guenter & Sell (1974) desenvolveram um procedimento utilizando uma combinação de balanço comparativo e técnicas de diluição isotópica com o  $^{28}\text{Mg}$  para estimar a disponibilidade verdadeira do magnésio. Estes autores obtiveram valores de 42,0 e 60,0% para o arroz e o farelo de soja, respectivamente.

Para o nível de suplementação de 1.000 UFA, houve aumento ( $P < 0,05$ ) no CDA do magnésio no milho (88,45%), sorgo baixo tanino (91,08%), farelo de soja (84,28%), farelo de soja extrusado (66,45%) e farelo de algodão (83,72%), com grande destaque para o farelo de sorgo, que apresentou um aumento de 55,99% para 91,08%. Entretanto, a suplementação com 2.000 UFA/kg elevou ( $P < 0,05$ ) o CDA do magnésio no farelo de trigo (99,39%), farelo de arroz (92,44%), glúten de milho (88,09%) e farelo de girasol (93,93%).

Maiores valores de CDA para o magnésio com a suplementação da enzima fitase também foram encontrados por Storebakken et al. (1998) que em estudo com juvenis (100 g) de salmão do Atlântico (*Salmo salar*), objetivando avaliar a suplementação da enzima fitase (8.000 UFA/kg) em rações à base de concentrado protéico de soja, obtiveram aumento no CDA do magnésio de 40,70% para 53,40%.

Os resultados de CDA do zinco nos diferentes tratamentos com ou sem a suplementação da enzima fitase estão apresentados na Tabela 4. O tratamento controle (sem a suplementação de fitase) apresentou valores de CDA negativos para o sorgo baixo tanino (-390,24%), farelo de arroz (-106,58%), farelo de soja extrusado (-21,33%) e glúten de milho (-98,46%). Os valores obtidos nesse estudo demonstram a baixa disponibilidade do zinco nesses alimentos de origem vegetal, sendo que parte deste mineral é mobilizada das reservas orgânicas e/ou da água, como relatado por Miranda (2000), que, encontrou valores negativos para o CDA do fósforo quando utilizou ração purificada para tilápia-do-nilo.

Segundo Baker & Ammerman (1995), os dois fatores que mais afetam a disponibilidade do mineral zinco são os agentes quelantes e a interação entre minerais. Os agentes quelantes são representados

Tabela 3 - Disponibilidade aparente (%) do magnésio (Mg) de alimentos de origem vegetal, suplementados ou não com a enzima fitase, para a tilápia-do-nylo, % da matéria seca

Table 3 - Mean ( $\pm$  SD, n = 5) apparent availability coefficient (% dry matter) of magnesium from plant feedstuffs with or without phytase supplementation for Nile tilapia, % dry matter

Alimento Feedstuff	Disponibilidade (%) Availability (%)		
	Nível de suplementação de fitase (UFA/kg) Phytase supplementation level		
	0	1.000	2.000
<b>Energético (Energetic)</b>			
Milho (Corn)	73,59 $\pm$ 3,41b	88,45 $\pm$ 0,99a	85,55 $\pm$ 1,78a
Milho extrusado (Extruded corn)	50,42 $\pm$ 2,99a	49,77 $\pm$ 1,74a	48,04 $\pm$ 1,99a
Farelo de trigo (Wheat meal)	82,14 $\pm$ 2,80b	86,44 $\pm$ 2,85b	99,39 $\pm$ 4,10a
Sorgo baixo tanino (Low-tannin sorghum)	55,99 $\pm$ 4,36b	91,08 $\pm$ 1,17a	90,24 $\pm$ 4,83a
Farelo de arroz (Rice meal)	62,90 $\pm$ 5,00c	83,36 $\pm$ 1,94b	92,44 $\pm$ 4,07a
<b>Protéico (Protein)</b>			
Farelo de soja (Soybean meal)	75,61 $\pm$ 3,99b	84,28 $\pm$ 1,84a	88,44 $\pm$ 3,88a
Farelo soja extrusado (Extruded soybean meal)	66,45 $\pm$ 3,93b	82,71 $\pm$ 1,60a	79,19 $\pm$ 2,22a
Glúten de milho (Corn gluten)	38,91 $\pm$ 3,52c	67,64 $\pm$ 6,07b	88,09 $\pm$ 5,98a
Farelo de algodão (Cottonseed meal)	73,43 $\pm$ 1,74b	83,72 $\pm$ 6,01a	86,39 $\pm$ 4,24a
Farelo de girassol (Sunflower meal)	73,08 $\pm$ 5,42b	67,11 $\pm$ 0,79c	93,93 $\pm$ 2,34a

Médias seguidas de letras iguais, na mesma linha, não diferem ( $P > 0,05$ ) significativamente pelo teste Tukey.Means  $\pm$  SD (n = 5) not sharing a common superscript letter within a row differ ( $P > 0,05$ ) by Tukey test.

Tabela 4 - Coeficiente de disponibilidade aparente (%) do zinco (Zn) de alimentos de origem vegetal, suplementados ou não com a enzima fitase, para a tilápia-do-nylo, % da matéria seca

Table 4 - Mean ( $\pm$  SD, n = 5) apparent availability coefficient of zinc from plant feedstuffs with or without phytase supplementation levels for Nile tilapia, % dry matter

Alimento Feedstuff	Disponibilidade (%) Availability (%)		
	Nível de suplementação de fitase (UFA/kg) Phytase supplementation level		
	0	1.000	2.000
<b>Energético (Energetic)</b>			
Milho (Corn)	59,42 $\pm$ 6,77 <sup>c</sup>	69,61 $\pm$ 5,37 <sup>b</sup>	88,18 $\pm$ 7,61 <sup>a</sup>
Milho extrusado (Extruded corn)	58,76 $\pm$ 7,65 <sup>a</sup>	60,98 $\pm$ 6,62 <sup>a</sup>	60,84 $\pm$ 5,67 <sup>a</sup>
Farelo de trigo (Wheat meal)	30,32 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>	29,11 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	30,72 $\pm$ 3,52 <sup>a</sup>
Sorgo baixo tanino (Low-tannin sorghum)	-390,24 $\pm$ 200	77,69 $\pm$ 1,75 <sup>a</sup>	76,60 $\pm$ 5,07 <sup>a</sup>
Farelo de arroz (Rice meal)	-106,58 $\pm$ 96	13,40 $\pm$ 16,30 <sup>b</sup>	19,04 $\pm$ 24,43 <sup>a</sup>
<b>Protéico (Protein)</b>			
Farelo de soja (Soybean meal)	48,00 $\pm$ 3,52 <sup>b</sup>	58,49 $\pm$ 6,66 <sup>a</sup>	55,70 $\pm$ 7,03 <sup>a</sup>
Farelo soja extrusado (Extruded soybean meal)	-21,33 $\pm$ 58	56,97 $\pm$ 7,37 <sup>a</sup>	56,90 $\pm$ 1,83 <sup>a</sup>
Glúten de milho (Corn gluten)	-98,46 $\pm$ 151	4,73 $\pm$ 14,73 <sup>b</sup>	47,64 $\pm$ 8,98 <sup>a</sup>
Farelo de algodão (Cottonseed meal)	72,05 $\pm$ 4,06 <sup>a</sup>	77,41 $\pm$ 3,77 <sup>a</sup>	68,52 $\pm$ 7,58 <sup>a</sup>
Farelo de girassol (Sunflower meal)	43,68 $\pm$ 3,55 <sup>a</sup>	40,62 $\pm$ 3,49 <sup>a</sup>	40,45 $\pm$ 4,94 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras iguais, na mesma linha, não diferem ( $P > 0,05$ ) significativamente, de acordo com o teste Tukey.Means  $\pm$  SD (n = 5) not sharing a common superscript letter within a row differ ( $P > 0,05$ ) by Tukey test.

pelos fitatos, mais especificamente o hexafosfato de inositol, comumente encontrado em sementes de plantas, óleos e cereais, e a interação entre minerais, pela inter-relação de minerais como zinco e cobre, em que um pode diminuir a disponibilidade do outro, dependendo de seu balanço.

Por outro lado, os mesmos alimentos do tratamento controle, cujos valores de CDA são negativos, com a suplementação da enzima fitase, apresentaram aumento na disponibilidade aparente do zinco. Para o sorgo baixo tanino, a disponibilidade de -390,24% foi aumentada para 77,69% com a suplementação de

Tabela 5 - Coeficiente de disponibilidade aparente (%) do cobre (Cu) de alimentos de origem vegetal, suplementados ou não com a enzima fitase, para a tilápia-do-nylo, % da matéria seca

Table 5 - Mean ( $\pm$  SD,  $n = 5$ ) apparent availability coefficient (% dry matter) of copper from plant feedstuffs with or without phytase supplementation levels for Nile tilapia, % dry matter

Alimento Feedstuff	Disponibilidade (%) Availability (%)		
	Nível de suplementação de fitase (UFA/kg) Phytase supplementation level		
	0	1.000	2.000
<b>Energético (Energetic)</b>			
Milho (Corn)	38,41 $\pm$ 4,06b	22,07 $\pm$ 2,07c	53,34 $\pm$ 5,00a
Milho extrusado (Extruded corn)	17,73 $\pm$ 5,59c	33,26 $\pm$ 4,99b	50,14 $\pm$ 8,20a
Farelo de trigo (Wheat meal)	35,12 $\pm$ 3,15a	42,49 $\pm$ 5,24a	36,06 $\pm$ 5,87a
Sorgo baixo tanino (Low-tannin sorghum)	30,72 $\pm$ 4,58c	60,14 $\pm$ 2,61a	50,41 $\pm$ 2,45b
Farelo de arroz (Rice meal)	15,86 $\pm$ 1,47c	85,30 $\pm$ 2,31a	57,24 $\pm$ 4,01b
<b>Protéico (Protein)</b>			
Farelo de soja (Soybean meal)	1,52 $\pm$ 0,62b	52,12 $\pm$ 6,46a	55,45 $\pm$ 6,26a
Farelo soja extrusado (Extruded soybean meal)	9,79 $\pm$ 3,98b	29,30 $\pm$ 4,51a	25,58 $\pm$ 3,22a
Glúten de milho (Corn gluten)	22,65 $\pm$ 1,79b	20,53 $\pm$ 2,04b	36,54 $\pm$ 5,75a
Farelo de algodão (Cottonseed meal)	48,06 $\pm$ 3,16c	81,22 $\pm$ 6,02a	56,25 $\pm$ 2,89b
Farelo de girassol (Sunflower meal)	24,13 $\pm$ 4,19c	46,30 $\pm$ 3,80b	58,64 $\pm$ 2,87a

Médias seguidas de letras iguais, na mesma linha, não diferem ( $P > 0,05$ ) significativamente, de acordo com o teste Tukey.Means  $\pm$  SD ( $n = 5$ ) not sharing a common superscript letter within a row differ ( $P > 0,05$ ) by Tukey test.

Tabela 6 - Coeficiente de disponibilidade aparente (%) do manganês (Mn) de alimentos de origem vegetal, suplementados ou não com a enzima fitase, para a tilápia-do-nylo, % da matéria seca

Table 6 - Mean ( $\pm$  SD,  $n = 5$ ) apparent availability coefficient (% dry matter) of manganese from plant feedstuffs with or without phytase supplementation levels for Nile tilapia, % dry matter

Alimento Feedstuff	Disponibilidade (%) Availability (%)		
	Nível de suplementação de fitase (UFA/kg) Phytase supplementation level		
	0	1.000	2.000
<b>Energético (Energetic)</b>			
Milho (Corn)	95,27 $\pm$ 2,49a	78,47 $\pm$ 7,57b	71,13 $\pm$ 3,57b
Milho extrusado (Extruded corn)	34,01 $\pm$ 3,44c	61,25 $\pm$ 2,07a	47,39 $\pm$ 3,38b
Farelo de trigo (Wheat meal)	39,32 $\pm$ 2,93b	39,07 $\pm$ 6,94b	65,56 $\pm$ 4,07a
Sorgo baixo tanino (Low-tannin sorghum)	54,90 $\pm$ 4,18b	59,60 $\pm$ 3,60b	90,05 $\pm$ 4,31a
Farelo de arroz (Rice meal)	6,29 $\pm$ 0,91c	43,42 $\pm$ 4,96b	53,38 $\pm$ 1,18a
<b>Protéico (Protein)</b>			
Farelo de soja (Soybean meal)	21,55 $\pm$ 3,18b	65,61 $\pm$ 6,30a	65,41 $\pm$ 5,18a
Farelo soja extrusado (Extruded soybean meal)	8,58 $\pm$ 3,79b	58,81 $\pm$ 6,06a	57,82 $\pm$ 6,03a
Glúten de milho (Corn gluten)	23,19 $\pm$ 3,70b	64,52 $\pm$ 1,18a	58,14 $\pm$ 8,42a
Farelo de algodão (Cottonseed meal)	7,80 $\pm$ 3,17c	68,18 $\pm$ 8,41b	96,92 $\pm$ 3,13a
Farelo de girassol (Sunflower meal)	45,01 $\pm$ 3,55a	42,32 $\pm$ 4,10a	48,42 $\pm$ 4,98a

Médias seguidas de letras iguais, na mesma linha, não diferem ( $P > 0,05$ ) significativamente pelo teste Tukey.Means  $\pm$  SD ( $n = 5$ ) not sharing a common superscript letter within a row differ ( $P > 0,05$ ) by Tukey test.

1.000 UFA/kg, que também aumentou o CDA do farelo de soja extrusado de -21,33% para 56,97%.

Nível superior da enzima fitase 2.000 UFA/kg foi necessário para o aumento ( $P < 0,05$ ) do CDA do zinco no farelo de arroz (de -106,58% para 19,04%) e no glúten de milho (de -98,46% para 47,64%).

Observou-se ainda aumento no CDA do zinco para o farelo de soja (58,49%) e para o milho (88,18%) com a suplementação com 1.000 UFA/kg e 2.000 UFA/kg, respectivamente.

Os melhores valores de CDA para o zinco com a suplementação da enzima fitase corroboram os resul-

tados obtidos por Storebakken et al. (1998), que, em estudo com juvenis de salmão do Atlântico (*Salmo salar*), avaliaram a suplementação da enzima fitase (8.000 UFA/kg) em rações à base de concentrado protéico de soja e obtiveram aumento do CDA do zinco de 16,0% para 52,2%.

A baixa disponibilidade do zinco em alimentos vegetais que possam compor as rações para peixes decorre da grande complexação desse mineral com o fitato, formando complexos menos solúveis (Gatlin & Phillips, 1989), os quais estão indisponíveis, em razão da ausência da enzima fitase nos peixes (Vielma, 1998), que é responsável pela hidrólise da molécula de fitato. Assim, a suplementação da enzima fitase pode aumentar a disponibilidade dos minerais presentes nos alimentos, proporcionando melhores respostas de desempenho produtivo e menores quantidades de efluentes.

Na Tabela 5 encontram-se os valores de CDA do cobre para os diferentes alimentos protéicos e energéticos.

Com exceção do farelo de trigo (35,12%), todos os demais alimentos apresentaram aumento ( $P < 0,05$ ) dos seus valores de CDA com a suplementação da enzima fitase. O nível de suplementação de 1.000 UFA/kg foi suficiente para aumentar o CDA do sorgo baixo tanino (60,145%), do farelo de arroz (85,13%), do farelo de soja (52,12%), do farelo de soja extrusado (29,30%) e do farelo de algodão (81,22%), enquanto o nível de 2.000 UFA/kg proporcionou maiores valores de CDA para o milho (53,34%), milho extrusado (50,14%), glúten de milho (36,54%) e farelo de girassol (58,64%).

Em alimentos como o sorgo baixo tanino, os farelos de arroz e de algodão apresentaram valores inferiores de CDA com a suplementação de 2.000 UFA/kg em comparação à suplementação com 1.000 UFA/kg (farelo de trigo, 65,56%; sorgo baixo tanino, 90,05%; farelo de arroz, 53,38%; e farelo de algodão, 96,92%).

A baixa disponibilidade aparente dos minerais avaliados nesse estudo resultou da presença do fitato nesses alimentos, o qual, além de se apresentar na forma de fosfato não disponível para os peixes, forma, em pH neutro, uma grande variedade de sais insolúveis com cátions di e trivalentes, como cálcio, magnésio, zinco, cobre, cobalto, manganês e ferro (Kornegay, 1999). Portanto, a suplementação da enzima fitase, que não é produzida pelos peixes, mostrou-se eficiente na disponibilização dos minerais avaliados, que são de grande importância para vários processos metabólicos, e na minimização da excreção desses minerais ao

meio ambiente, diminuindo o poder poluente dos resíduos produzidos pela aquicultura. Os resultados neste estudo confirmaram-se que a suplementação da enzima fitase melhorou a disponibilização de fósforo, cálcio, magnésio, manganês, zinco e cobre pela presença dessa enzima, como observado por Spinelli et al. (1983), Gatlin & Phillips (1989), Cain & Garling (1995), Rodehutsord & Pfeffer (1995), Robinson et al. (1996), Vielma et al. (1998), Storebakken et al. (1998), Hughes & Soares (1998), Forster et al. (1999) e Furuya et al. (2001).

## Conclusões

A enzima fitase aumenta, nos alimentos de origem vegetal, a disponibilidade aparente de Mn, Cu, Zn e Mg, uma vez que esses minerais respondem de maneira diferente, conforme o seu valor biológico e o nível de suplementação de enzima.

A suplementação de até 2.000 UFA/kg não eleva a disponibilidade aparente do Mg no milho extrusado; do Zn nos farelos de trigo e de algodão e no milho extrusado; do Cu no farelo de trigo; e do Mn no farelo de algodão.

O nível de suplementação da enzima fitase que proporciona melhor disponibilidade aparente dos minerais avaliados, assim como o mineral cujo CDA se pretende aumentar, está diretamente relacionado ao alimento.

## Literatura Citada

- AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION - AIN. Report of the american institute of nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. **Journal Nutrition**, v.107, p.1340-1348, 1977.
- BAKER, D.H.; AMMERMAN C.B. Zinc bioavailability. In: AMMERMAN, C.B.; BAKER, D.H.; LEWIS, A.J. (Eds.) **Bioavailability of nutrients for animals**. London: Academic Press, 1995. p.367-398.
- CAIN, K.; GARLING, D.L. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents. **The Progressive Fish Culturist**, v.57, n.2, p.114-119, 1995.
- CHO, C.Y.; SLINGER, S.I. Apparent digestibility measurement in feedstUFAf for rainbow trout. In: WORLD SYMPOSIUM ON FINFISH NUTRITION AND FISHFEED TECHNOLOGY, 1979, Hamburg. **Anais...**Hamburg: 1979. v.2, p.239-247.
- FORSTER, I.; HIGGS D.A.; DOSANJH, B.S. Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in 11°C fresh water. **Aquaculture**, v.179, p.109-125, 1999.



- FREIRE, E.S.; HISANO, H.; GONÇALVES, G.S. et al. Determinação de  $Cr_2O_3$  utilizado como marcador de rações em fezes de peixes por GFAAS após mineralização em forno de microondas. In: ENCONTRO REGIONAL DE QUÍMICA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2001, Araraquara. **Anais...** Araraquara: Instituto de Química da Unesp, 2001. p.73.
- FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S.; FURUYA, V.R.B. et al. Fitase na alimentação da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Desempenho e digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.924-929, 2001.
- GATLIN, D.M.; H.F. PHILLIPS. Dietary calcium, phytate and zinc interactions in channel catfish. **Aquaculture**, v.79, p.259-266, 1989.
- GRAF, E. Applications of phytic acid. **JAOCs**, v.60, p.1861-1867, 1983.
- GUENTER, W.; SELL, J.L. A method for determining "true" availability of magnesium from foodstUFAs using chickens. **Journal Nutrition**, v.104, p.1446, 1974.
- HUGHES, K.P.; SOARES Jr., J.H. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis*. **Aquaculture Nutrition**, v.4, p.133-140, 1998.
- KORNEGAY, E.T. Feeding to reduce nutrient excretion: effects of phytase on phosphorus and other nutrients. **Biotechnology in the Feed Industry**, v. único, p.461-489, 1999.
- KUBARIK, J. Tilapia on highly flexible diets. **Feed International**, v.6, p.16-18, 1997.
- MIRANDA, E.C. **Disponibilidade de fósforo e sua relação com o cálcio em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2000. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, 2000.
- NOLAN, K.B.; DUFACIN, P.A. Effects of phytase on mineral bioavailability, *in vitro* studies on  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  (also  $Cd^{2+}$ ) solubility in the presence of phytase. **Journal Science Food Agriculture**, v.40, p.79-85, 1987.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes**. Washington, D.C.: National Academy Press, 1993. 102p.
- PEZZATO, L.E. **Digestibilidade em peixes**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2001. 82p. Tese (Livre Docência) - Universidade Estadual Paulista, 2001.
- RODEHUTSCORD, M.; PFEFFER, E. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Water Science Technology**, v.31, n.10, p.143-147, 1995.
- SPINELLI, J.; HOULE, C.R.; WEKELL, J.C. The effect of phytate on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium. **Aquaculture**, v.30, p.71-83, 1983.
- STEFFENS, W. **Principios fundamentales de la alimentación de los peces**. Zaragoza: Acribia, 1987. 272p.
- STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K.D.; ROEN, 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, p.365-379, 1998.
- TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, T. et al. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v.182, p.317-327, 2000.
- THORSTENSEN, K.; ROMSLO, I. The role of transferring in the mechanism of cellular iron uptake. **Biochemistry Journal**, v.271, p.1-9, 1990.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **SAEG - Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 7.1. Viçosa, MG: 1997. 150p. (Manual do usuário).
- VIELMA, J.; LALL, S.P.; KOSKELA, J. et al. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.63, n.3/4, p.309-323, 1998.
- WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish Nutrition. **Aquaculture**, v.151, p.185-207, 1997.

Recebido em: 13/12/04

Aceito em: 08/06/05