

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA FITASE NA DIGESTIBILIDADE DE DIETAS PARA
GIRINOS DE RÃ-TOURO**

Náira Roberta Marucci

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta Verardino De Stéfani
Coorientador: Dr. Thiago Matias Torres do Nascimento

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para graduação em Zootecnia.

Jaboticabal – SP
1º Semestre / 2018

DEDICO

Ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, por que dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente.

Ofereço

Ofereço aos meus pais Cíntia e Nílton que são minha inspiração para prosseguir e motivação para me superar a cada dia.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente ao Senhor Jesus Cristo, o meu Salvador, o meu tudo, sem ele não posso fazer nada. Este trabalho é uma demonstração do seu amor e da sua misericórdia para comigo.

Gostaria de agradecer ao meus pais Cintia e Nilton, eles abaixo de Deus são tudo na minha vida, meus exemplos, obrigado por todo amor incondicional, paciência, carinho nos momentos mais sombrios da minha vida. Obrigado Mãe pelas suas orações diárias que me sustentaram nas minhas dificuldades. Obrigado por serem o meu alicerce durante toda a vida.

Agradeço a minha avó Zenaide e meu avô João (*in memoriam*), por me apoiarem e acreditarem em mim, por permanecer ao meu lado, quando ninguém mais ficou.

Agradeço a Bruna Cristina de Lima Candido, minha melhor amiga, por ser a pessoa que esteve ao meu lado nos momentos bons, mas principalmente nos momentos ruins. Por sempre me incentivar a ser melhor a cada dia, sem você este trabalho não seria possível, e muito menos a minha graduação. Existe uma citação bíblica que diz “Em todo tempo ama o amigo e para a hora da angustia nasce o irmão”, você é a irmã que eu nunca tive.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Marta Verardino De Stéfani por toda paciência, dedicação e carinho demonstrado em cada ensinamento, ao meu mentor Prof. Dr. Cleber Fernando Menegasso Mansano, pelos conhecimentos compartilhados e pela paciência, me ajudando a ser uma profissional melhor.

Agradeço ao Dr. Thiago Matias Torres do Nascimento pela ajuda durante o projeto.

Agradeço meus amigos de faculdade Andressa (Truta), Maria Luiza (Piriri), Lorena (Megusta), Lorraine (Karkada), Thalys (Pardo), Carol (Furada) e Paulo (Cookie-

Kh) por estarem ao meu lado durante esta jornada, ajudando a suportar esta fase de mudanças e incertezas.

Agradeço aos funcionários do CAUNESP Marcio (Perereca) e Valdecir (Val), por tudo que fizeram por mim, pela ajuda, paciência e principalmente pelo carinho demonstrado, são pessoas incríveis que a Unesp me apresentou e que vou levar para sempre.

Agradeço ao Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes por disponibilizar o Laboratório de Peixes Ornamentais para que o meu experimento fosse realizado.

Agradeço a minha turma Zoo 012, por ser uma parte muito feliz da minha história.

Agradeço a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes e pelo MSc Juliano José de Oliveira Coutinho, suas considerações foram de suma importância para a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
CAPÍTULO II	4
RESUMO:	4
ABSTRACT:	5
1 - INTRODUÇÃO	6
2 - MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1 - Material biológico e condições experimentais	7
Figura 1: Aquário de alimentação com os cestos e aquário coletor de fezes	7
Figura 2: Girinos de rã-touro no aquário coletor de fezes.	8
2.2 - Dietas experimentais	8
Tabela 1: Fórmula e composição nutricional da dieta basal.	9
Tabela 2: Dietas experimentais.	10
2.3 - Manejo alimentar e coleta de fezes	10
2.4 - Processamento das amostras e análises laboratoriais	11
2.5 - Delineamento experimental e análise estatística	11
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
Tabela 3: Coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e energia das dietas experimentais com níveis de fitase para girinos de rã-touro.	12
Tabela 4: Disponibilidade aparente de minerais (%) das dietas experimentais com diferentes níveis de fitase para girinos de rã-touro.	14
4- CONCLUSÕES	16
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Atualmente, as atividades zootécnicas demonstram grande preocupação no que se refere ao custo da ração. Na rancultura esse custo representa 57% do total da criação (LIMA e AGOSTINHO, 1992). Portanto, o sucesso e o fracasso desta atividade estão intimamente ligados ao custo e a eficiência das dietas.

Girinos de rã-touro são onívoros (OLIVEIRA-BAHIA, 2007) e se alimentam de resíduos de origem animal e vegetal. Os girinos são alimentados com rações de peixes carnívoros, podendo ocasionar desenvolvimento anormal e até mesmo mortalidade nos animais, o que são possíveis sinais de desordens nutricionais (ALBINATI et al., 2000).

Normalmente as rações comerciais incluem o fósforo inorgânico em sua formulação, pois nos ingredientes de origem vegetal o fósforo não é absorvido pelos monogástricos, estando na forma de fitato (JUNIOR et al., 2015). O ácido fítico, também conhecido como fitato ou hexafosfato de mio-inositol ($C_6H_{18}O_{24}P_6$ – IP6), é a forma primária de armazenamento de fósforo nos vegetais, encontrado principalmente em cereais, legumes e sementes oleaginosas (MAENZ e CLASSEN, 1998), sendo considerado um fator antinutricional, uma vez que quelata nutrientes importantes, diminuindo sua disponibilidade ou tornando-os totalmente indisponíveis (RODRIGUES, 2009).

A utilização de enzimas exógenas como a fitase é uma alternativa para disponibilizar o fósforo das moléculas de fitato, permitindo assim que ele seja absorvido e utilizado pelo organismo animal, visto que os monogástricos não possuem capacidade de sintetizá-la, o que faz com que as moléculas de ácido fítico não sejam hidrolisáveis no intestino. Dessa forma, quanto maior a quantidade de fitato na dieta e nos ingredientes utilizados, menor a disponibilidade e absorção de fósforo (CYRINO et al., 2010).

A fitase ou mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolase é uma enzima pertencente ao grupo das fosfatases de histina ácida que hidrolisam o fitato para o mio-inositol e ácido ortofosfórico necessário ao processo metabólico na biossíntese celular (PANDEY et al., 2001). A atividade da fitase é expressa pela sigla FTU que significa unidade de atividade de fitase, sendo que 1 FTU é a quantidade de fósforo inorgânico liberado (μmol) em um

minuto de reação numa solução de fitato de sódio na concentração de 5,1 mmol L⁻¹ em pH 5,5 e temperatura de 37°C (ENGELIN et al., 1994).

A preocupação com a utilização e liberação do fósforo é justificável, uma vez que ele é um dos minerais mais abundantes no organismo animal podendo conter cerca de 0,9 a 1,1 % em sua constituição (ANDRIGUETTO, 1990), nas cinzas este valor representa 16 a 17%. É extremamente importante para constituição da estrutura óssea, assim como para processos bioquímicos, como a geração e transferência de energia, o armazenamento dos compostos fosforilados como o ATP e fosfato de creatina e aminoácidos (DATO-CAJEGAS e YAKUPITIYAGE, 1996; STRAIN e CASHMAN, 2002; MARTINI, 2006; DA SILVA e COZZOLINO, 2007). A ausência do fósforo compromete o crescimento do animal, interferindo na digestibilidade de carboidratos e lipídios (RODEHUTSCORD et al., 2000).

Na ausência da produção de fitase endógena pelo organismo, e sem a suplementação da mesma por fontes exógenas, o ácido fítico é liberado através das fezes, resultando na necessidade de suplementar com fosfato inorgânico as dietas, para conseguir atender as exigências de fósforo, assegurando o bom desempenho (CAIPANG et al., 2011). Entretanto, com a adição de fósforo inorgânico nas dietas destes animais tem crescido a preocupação em relação ao despejo e impacto dos nutrientes no ambiente aquático, onde o fósforo é tido como um dos principais nutrientes responsáveis pela poluição dos corpos d'água (AMIRKOLAIE, 2011).

A adição de fitase busca um desempenho positivo do animal, auxiliando no atendimento de suas exigências nutricionais, sem que haja superdosagens de fósforo inorgânico, o que pode comprometer o lucro do produtor e aumentar o impacto nos corpos d'água. Para contornar essa situação é importante o estudo da digestibilidade de dietas com adição de fitase para avaliar a disponibilidade dos nutrientes e energia, sem contar que são fundamentais para a formulação de dietas adequadas nutricionalmente, econômicas e ambientalmente eficientes (FRACALOSSO et al., 2013).

Alguns estudos evidenciam que a fitase tem resultados benéficos na digestibilidade de nutrientes e aumenta a absorção de fósforo pelo animal. Bock et al. (2006) observaram que a inclusão de 1500 UF/kg em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo com 120g, contendo somente ingredientes vegetais, melhorou a disponibilidade do fósforo e cálcio, e também a digestibilidade da matéria seca e energia bruta da dieta; já

para adequada disponibilidade de zinco e manganês foi necessária a inclusão de 1000 UF/kg.

Entretanto, Furuya et al. (2006) observaram que a utilização de 1100 UF/kg em dieta para tilápia-do-Nilo pesando de 175 a 327g foi suficiente para o desempenho adequado, retenção de minerais e a disponibilidade de fósforo e do cálcio. Já Silva et al. (2007) observaram que a utilização de 500 UF/kg de fitase líquida melhorou o desempenho, digestibilidade da proteína e a disponibilidade do fósforo para juvenis de tilápia-do-Nilo com peso inicial de 45,84g. Para a fase inicial (peso inicial de 8,88g), Furuya et al. (2001) concluíram que 700 UF/kg de ração foi adequado para o desempenho, digestibilidade da proteína e disponibilidade de cálcio e fósforo em tilápias-do-Nilo.

Em frangos de corte, o efeito da suplementação da fitase sobre a digestibilidade do fósforo e da energia digestível só foi possível com a suplementação de 750 e 1000 UF/kg de ração, respectivamente (FUKAYAMA et al., 2008). Entretanto, Lelis et al. (2010) observaram que a suplementação de 500 UF/kg melhorou a digestibilidade da proteína e do fósforo, retenção de fósforo e posterior diminuição da excreção desses nutrientes em frangos de corte.

Para poedeiras comerciais, Viana et al. (2009) concluíram que a adição de 600 UF/kg foi suficiente para um desempenho adequado, melhorando o metabolismo dos nutrientes em dietas nutricionalmente deficientes.

Em suínos na fase de crescimento, o efeito da suplementação de fitase foi eficiente em disponibilizar o fósforo fítico até a inclusão de 750 UF/kg, enquanto que a inclusão de 500 UF/kg de dieta foi indicada para dietas à base de milho e farelo de soja, formuladas de acordo com o conceito de proteína ideal (MOREIRA et al., 2011).

Como não existem estudos sobre a digestibilidade de dietas suplementadas com fitase para girinos de rã-touro, torna-se essencial avaliar seu potencial e a viabilidade de sua inclusão nas dietas, não se limitando apenas ao crescimento animal, trazendo benefícios também na digestibilidade dos nutrientes e consequentemente na diminuição da descarga de fósforo no ambiente aquático.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DA FITASE NA DIGESTIBILIDADE DE DIETAS PARA GIRINOS DE RÃ-TOURO.

RESUMO:

Proporcionar ao produtor alternativas viáveis que contribuam para o aumento da digestibilidade de nutrientes contidos em dietas a base de ingredientes de origem vegetal e que reduzam os custos destinados a alimentação dos animais são fatores extremamente importantes para o sucesso da ranicultura. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da fitase na digestibilidade de nutrientes, energia e minerais de cinco dietas para girinos de rã-touro, suplementadas com níveis crescentes de fitase (0, 500, 1.000, 1.500 e 2.000 UF/kg) e uma dieta sem fitase (controle), porém com suplementação de fosfato bicálcico, utilizou-se um delineamento inteiramente ao acaso com seis tratamentos e duas repetições. As dietas experimentais foram isoenergéticas e isoprotéicas, com 3.600 kcal/kg de energia digestível e 27% de proteína digestível, respectivamente. Um total de 1.200 girinos de rã-touro foram utilizados com peso médio inicial de $3,5 \pm 1,6$ g, distribuídos em 12 aquários de alimentação (90 L). Para a coleta de fezes foram utilizados aquários cilíndricos com fundo cônico (120 L), onde as fezes depositadas no tubo de falcon foram coletadas a cada 30 minutos. Pode-se observar que para girinos de rã-touro a digestibilidade da proteína, extrato etéreo e energia das dietas, bem como a disponibilidade do cálcio e magnésio aumentaram com a inclusão de 500 UF/kg. Para o fósforo, sua maior disponibilidade ocorreu na dieta com 2000 UF/kg e para o manganês e zinco, com 1500 UF/kg.

Palavras-chave: biodisponibilidade, fósforo, *Lithobates catesbeianus*, nutrição

INFLUENCE OF THE PHYTASE IN THE DIGESTIBILITY OF DIETS FOR BULLFROG TADPOLES.

ABSTRACT:

Provide the producer with viable alternatives that contribute to the increasing the digestibility of nutrients contained in diets plant-based feed stuffs and that reduce the costs for feeding of the animals are extremely important factors for the success of frog farming. Therefore, the objective of this study was to evaluate the influence of phytase on nutrient, energy and mineral digestibility of five diets for bullfrog tadpoles, supplemented with increasing levels of phytase (0; 500; 1,000; 1,500 and 2,000 UF/kg) and a diet without phytase (control), but with supplementation of dicalcium phosphate, in a completely randomized design with six treatments and two replicates. The experimental diets were isoenergetic and isoproteic, with 3,600 kcal/kg of digestible energy and 27% of digestible protein, respectively. A total of 1,200 bullfrog tadpoles were used with average initial weight of 3.5 ± 1.6 g, distributed in 12 feeding aquariums (90 L). For the collection of feces were used cylindrical aquariums with conical bottoms (120 L), where the feces deposited in the falcon tube were collected every 30 minutes. It can be observed that for tadpoles of bullfrog the digestibility of the protein, ethereal extract and energy of the diets as well as the availability of the calcium and magnesium increased with the inclusion of 500 UF/kg. For the phosphorus, its greater availability occurred in the diet with 2,000 UF/kg and for the manganese and zinc with 1,500 UF/kg.

Key words: bioavailability, Phosphorus, *Lithobates catesbeianus*, nutrition

1 - INTRODUÇÃO

No Brasil, a espécie de rã criada com finalidade comercial é a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), anfíbio de origem norte americana, sendo considerada a melhor espécie utilizada para criação intensiva devido às suas características, tais como precocidade, prolificidade, rusticidade e adaptação às nossas condições climáticas (Ferreira, 2004 *apud* CARRARO, 2008).

O processo de criação de rãs pode ser dividido em duas etapas, a fase aquática, que abrange todo o processo de desenvolvimento dos girinos até a conclusão do processo de metamorfose e a fase terrestre que abrange todo o período de engorda dos animais. A produção de girinos conhecida pelos rancultores por “girinagem”, é a fase de maior importância, pois o sucesso nesse período é que viabilizará a produção de imagos com qualidade e quantidade adequada para a fase de engorda (CASTRO e PINTO, 2000; SOARES et al., 2001). Qualquer alteração nas condições adequadas de manejo, nutrição e sanidade pode aumentar a mortalidade dos girinos.

Devido ao crescimento das produções aquícolas, o fósforo tem sido uma preocupação constante, o que tem gerado interesse em pesquisas que estudam o seu impacto e alternativas para minimizar sua poluição, pois é tido como um dos principais poluentes da água doce (BOCK et al., 2006).

As rações comercialmente vendidas são suplementadas com uma fonte inorgânica de fósforo para atender as exigências dos animais, porém esse fato aumenta o custo econômico da dieta e causa um grande impacto ambiental. O fósforo presente nos ingredientes vegetais está na forma de fitato, indisponível aos monogástricos (BOCK et al., 2006), necessitando de uma enzima exógena, no caso a fitase, para ser liberado.

A inclusão da fitase em dietas contendo altos níveis de ingredientes vegetais, pode reduzir a necessidade de adição de fósforo inorgânico às dietas e diminuição do desperdício de nutrientes no meio (BOCK et al., 2006). Também foi observado que a fitase melhora a eficiência de utilização da proteína, energia e os minerais (GONÇALVES et al., 2004).

No entanto, ainda não existem estudos sobre a atuação da enzima fitase na alimentação de girinos de rã-touro. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da fitase na digestibilidade da proteína, energia e extrato etéreo, bem com a

disponibilidade do fósforo, cálcio, magnésio, manganês e zinco em dietas para girinos de rã-touro.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, no Laboratório de Peixes Ornamentais, no período de janeiro a março de 2015 totalizando 60 dias, de acordo com as normas exigidas pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da FCAV/ UNESP.

2.1 - Material biológico e condições experimentais

Foram utilizados 1.200 girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no estágio 25 da tabela simplificada de Gosner (1960), oriundos de uma mesma desova, com peso médio inicial de $3,5 \pm 1,6$ g. Os animais foram distribuídos em 12 aquários experimentais para alimentação, com 90 L de água, sob aeração e abastecimento contínuos, com água proveniente da mina e taxa de renovação de aproximadamente uma vez ao dia (Figura 1).



Figura 1: Aquário de alimentação com os cestos e aquário coletor de fezes.

Para a coleta de fezes foram utilizados seis aquários cilíndricos com fundo cônico, capacidade de 120 litros, equipados com um sistema de circulação contínua de água (Figuras 1 e 2). Na parte inferior de cada aquário, utilizou-se registro de esfera acoplado a tubo de Falcon (50 ml), mantido em caixa de isopor com gelo durante as coletas.



Figura 2: Girinos de rã-touro no aquário coletor de fezes.

2.2 - Dietas experimentais

Foi formulada uma dieta basal com ingredientes energéticos e protéicos de origem vegetal, isoenergética (3.600 kcal/kg de energia digestível) e isoprotéica (27% de proteína digestível) (Tabela1). Os valores utilizados de proteína digestível e energia digestível foram de acordo com Secco et al. (2005) e a exigência de proteína digestível de acordo com Pinto et al. (2015).

Foram testados seis tratamentos constituídos por um controle positivo (com suplementação de fósforo na forma de fosfato bicálcico) e cinco substituindo o fosfato bicálcico por caulim mais níveis de fitase (0, 500, 1.000, 1.500, 2.000 UF/kg) (Nathupos®5000, BASF, Brasil) na forma de pó, incorporada manualmente à dieta (Tabela 1). Para isso, foram confeccionados 5 kg de cada dieta experimental (Tabela 2).

Tabela 1: Fórmula e composição nutricional da dieta basal.

Ingredientes	Inclusão (%)	PD (%)	EE (%)	FB (%)	ED (cal/g)	Ca (%)	P (%)
Farelo de Soja	50,4	22,64	1,45	3,02	2011,72	0,017	0,156
Milho	26,6	2,62	0,96	2,28	893,97	0,005	0,006
Farelo de trigo	9,75	1,73	0,39	1,27	284,73	0,001	0,03
Amido	0,9	-	-	-	30,93	-	-
Óleo de Soja	5,94	-	5,94	-	379,46	-	-
Suplemento Vitamínico e Mineral	0,5	-	-	-	-	-	-
BHT	0,02	-	-	-	-	-	-
Calcário	1,74	-	-	-	-	0,959	-
Fosfato bicálcico	4,15	-	-	-	-	1,015	0,812
TOTAL	100,00	27,00	8,74	6,57	3600,81	2,00	1,00

(PD = Proteína Digestível, EE = Extrato Etéreo, FB = Fibra Bruta, ED = Energia Digestível, Ca = Cálcio, P = Fósforo e BHT = Hidroxitolueno butilado).

Tabela 2: Dietas experimentais.

UF/kg de dieta	Dieta Basal (g)	Caulim* (g)	Fitase (g)
0	4792,5	207,5	0
500	4792,5	205,0	2,5
1000	4792,5	202,5	5,0
1500	4792,5	200,0	7,5
2000	4792,5	197,5	10,0
Controle	5000,0	0	0

(UF- Unidade de Fitase). * Minério composto de silicatos hidratados de alumínio.

Para a determinação da digestibilidade, foi acrescido às dietas experimentais 0,5% de óxido de cromo III. Para o preparo das dietas os ingredientes foram moídos e posteriormente misturados manualmente. As dietas foram mantidas em refrigeração a 4,0°C durante todo o período experimental.

2.3 - Manejo alimentar e coleta de fezes

Foi adotado um período de cinco dias para adaptação às dietas experimentais, sendo oferecida à vontade, três vezes ao dia (7:00, 12:00 e às 17:00 horas).

Para cada dieta experimental, os girinos foram alimentados à vontade em dois aquários de alimentação (A e B), por um período de três horas. Ou seja, os girinos do aquário A de cada tratamento foram alimentados das 7:00 às 10:00 horas, após eram transferidos para o coletor de fezes onde permaneciam até as 14:00 horas e as fezes coletadas em intervalos de 30 minutos. Após, os girinos retornavam ao aquário A. Os animais do aquário B de cada tratamento foram alimentados das 11:30 às 13:30 horas, após foram transferidos para o coletor de fezes até às 17:30 horas sendo adotado o mesmo procedimento. Esses procedimentos foram realizados duas vezes, totalizando duas repetições por tratamento.

Após a coleta das fezes, as mesmas foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos para a retirada do excesso de água. Este manejo foi realizado para obter a quantidade de fezes suficiente para as análises laboratoriais, as quais foram armazenadas em freezer à -18°C.

2.4 - Processamento das amostras e análises laboratoriais

As amostras de fezes congeladas foram liofilizadas a -50°C em equipamento Thermo VLP 200, para obtenção da matéria pré-seca. Após, foram moídas em moinho de bola e encaminhadas ao laboratório para análise de proteína bruta (método de Dumas em aparelho Leco 528, ETHERIDGE et al; 1998), da energia bruta em bomba calorimétrica e do extrato etéreo pelo método de Soxhlet (AOAC, 2016). As análises do fósforo, cálcio, magnésio, manganês e zinco foram realizadas no Instituto de Biociências/ Departamento de Química e Bioquímica da Unesp, Câmpus de Botucatu, utilizando a metodologia de Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente, utilizando-se o equipamento ICP-OES que analisa simultaneamente todos os elementos.

As análises de óxido de cromo III das fezes e das dietas foram determinadas pelo método da digestão com ácido nítrico e perclórico, de acordo com a metodologia descrita por Furukawa e Tsukahara (1966).

Após a realização das análises quantitativas do Cr_2O_3 , dos nutrientes e minerais nas dietas e nas fezes, os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) das dietas foram estimadas por meio da seguinte equação (NOSE, 1966):

$$\text{CDA}(\%) = 100 - \left[100 \frac{(\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ na dieta})}{(\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ nas fezes})} \times \frac{(\% \text{ nutriente e/minerais nas fezes})}{(\% \text{ nutriente e/minerais na dieta})} \right]$$

2.5 - Delineamento experimental e análise estatística

As análises de variância dos resultados observados foram realizadas segundo um delineamento inteiramente ao acaso com seis tratamentos constituídos por cinco níveis de fitase e o tratamento controle, com duas repetições cada, totalizando 12 unidades experimentais. Os valores de CDA foram analisados pelo programa SAS (2014), por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando a ferramenta PROC ANOVA. Quando observado significância estatística, foi aplicado o teste de Duncan, para comparação entre as médias.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e energia avaliados aumentaram ($p < 0,05$) a partir da inclusão do primeiro nível de fitase (500 UF/kg) nas dietas dos girinos de rã-touro (Tabela 3).

Comparando-se o CDA da proteína das dietas controle e sem a adição da fitase com as dietas com fitase, observa-se um aumento dos valores médios de 78% para 81%, não ocorrendo diferença significativa entre os diferentes níveis de inclusão de fitase (Tabela 3). Esses resultados estão de acordo com Silva et al. (2007) que também observaram melhora na digestibilidade da proteína em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo com a inclusão de 500 UF/kg. Furuya et al. (2006) obtiveram aumento quadrático do CDA da proteína com a elevação dos níveis de inclusão de fitase (0, 250, 500, 1000, 2000 UF/kg de ração) em dietas para tilápia-do-Nilo.

Tabela 3: Coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e energia das dietas experimentais com níveis de fitase para girinos de rã-touro.

Tratamentos (UF/kg)	CDA Proteína (%)	CDA Energia (%)	CDA Extrato Etéreo (%)
Controle Positivo	78,6±0,6 ^b	60,6±2,1 ^{bc}	71,0±1,5 ^d
0	78,6±1,0 ^b	60,1±1,7 ^c	71,2±1,4 ^d
500	81,0±0,6 ^a	63,7±1,1 ^{ab}	86,1±0,6 ^a
1000	81,1±0,6 ^a	63,7±1,1 ^{ab}	79,2±0,6 ^c
1500	81,8±1,5 ^a	64,7±2,9 ^a	78,7±1,7 ^c
2000	81,7±1,2 ^a	65,4±1,2 ^a	83,4±1,1 ^b
Valor de p	0,0001	0,0095	0,0001

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não difere estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Estudos apontam para a possibilidade de aumento da disponibilidade de aminoácidos e, por consequência, uma melhor digestibilidade da proteína em dietas a base de ingredientes vegetais suplementadas com fitase (GONÇALVES et al., 2004). Isso pode ser explicado através da hidrolização do complexo proteína-ácido fítico e/ou à

suspensão ou redução do efeito inibidor do ácido fítico sobre a atividade das enzimas digestíveis (SPINELLI et al., 1983).

Segundo Kornegay et al. (1999), o ácido fítico influencia negativamente a digestão de proteínas e aminoácidos da dieta, pois inibe a ação das enzimas proteolíticas, nas quais podemos destacar a pepsina e a tripsina no trato digestório dos monogástricos.

Para o CDA da energia observou-se que as dietas que apresentaram as melhores médias foram com 1500 e 2000 UF/kg (64,7 e 65,4%, respectivamente), não diferindo entre os demais níveis de inclusão de fitase (Tabela 3). Resultado semelhante foi encontrado por Bock et al. (2006) com juvenis de tilápia-do-Nilo, onde a dieta suplementada com 1500 UF/kg apresentou significativa melhora na digestibilidade da energia. Fukayama et al. (2008) em estudo com frangos de corte, observaram que a melhora da digestibilidade da energia só foi possível quando houve a suplementação de fitase nos níveis de 750 e 1000 UF/kg.

Algumas dietas a base de alimentos vegetais foram avaliadas com sucesso utilizando a enzima fitase como suplemento para o aumento do coeficiente de digestibilidade da energia (Selle, 1997 apud GONÇALVES et al., 2004). Dentre esses ingredientes que obtiveram sucesso destacam-se o farelo de soja, farelo de trigo e o milho, que são os de maior inclusão neste estudo, representando juntos 86,75% da formulação total das dietas.

O maior CDA do extrato etéreo (86,1%) foi observado na dieta contendo 500 UF/kg, diferindo ($p < 0,05$) dos demais níveis de inclusão e da dieta controle (Tabela 3). A gordura é um nutriente importante para os girinos, auxiliando na manutenção dos mesmos no clímax metamórfico, quando ocorre a exteriorização dos membros anteriores, a cauda vai sendo gradativamente reabsorvida e o girino passa a se alimentar.

Os diferentes níveis de inclusão de fitase nas dietas dos girinos de rã-touro influenciaram ($p < 0,05$) a disponibilidade de todos minerais avaliados (Tabela 4).

Podemos observar que ocorreu aumento da disponibilidade do fósforo com a inclusão da fitase nas dietas dos girinos, apresentando valor máximo de 90% na dieta com 2000 UF/kg (Tabela 4). Em tilápias-do-Nilo com peso inicial de 120g, Bock et al. (2006) observaram melhor disponibilidade do fósforo na dieta com 1500 UF/kg; para a mesma espécie com peso inicial de 174 ± 38 g Furuya et al. (2006) encontraram melhores resultados com 1100 UF/kg.

Tabela 4: Disponibilidade aparente de minerais (%) das dietas experimentais com diferentes níveis de fitase para girinos de rã-touro.

Tratamentos (UF/kg)	Disponibilidade (%)				
	Fósforo	Cálcio	Magnésio	Manganês	Zinco
Controle	51,4±2,6 ^c	72,5±1,5 ^c	74,9±1,4 ^a	67,7±1,8 ^c	65,2±1,9 ^d
Positivo					
0	62,8±1,9 ^d	82,8±0,9 ^b	70,9±1,5 ^b	69,1±1,6 ^c	68,8±1,6 ^c
500	84,5±0,7 ^b	90,2±0,5 ^a	74,6±1,2 ^a	72,8±1,3 ^b	71,1±1,4 ^{bc}
1000	82,2±0,6 ^c	90,2±0,3 ^a	74,8±0,8 ^a	73,6±0,8 ^b	72,7±0,9 ^{ab}
1500	86,7±1,1 ^b	90,7±0,7 ^a	76,1±1,9 ^a	76,8±1,9 ^a	74,7±2,0 ^a
2000	90,0±0,7 ^a	90,8±0,6 ^a	74,8±1,7 ^a	76,8±1,5 ^a	70,8±1,9 ^{bc}
Valor de p	0,0001	0,0001	0,0019	0,0001	0,0001

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não difere estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

O fósforo é tido como o nutriente mais limitante do farelo de soja, assim como no caso de diversos outros alimentos vegetais utilizados em dietas para organismos aquáticos, pois possui mais de 50% do fósforo na forma de ácido fítico, indisponível para animais monogástricos, comprometendo sua utilização (SILVA et al., 2007). As dietas experimentais utilizadas continham 50,4% de farelo de soja, demonstrando que a inclusão de fitase foi fundamental para melhorar a disponibilidade do fósforo para os girinos, promovendo aumento de 62,8% na dieta sem fitase para 84,5% com 500 UF/kg.

A fitase hidrolisa um ou mais grupos fosfato da molécula de fitato, liberando o fósforo dos ingredientes vegetais para o animal, transferindo o grupo fosfato do substrato para a enzima, e da enzima para a água, liberando o fosfato inorgânico junto com o nutriente preso a sua estrutura para posterior absorção (PAULA et al., 2009).

A utilização da fitase promoveu melhora significativa na disponibilidade de cálcio (90,2%) no primeiro nível de inclusão (500 UF/kg), não diferindo dos demais níveis (Tabela 4). Vielma et al. (1998) também observaram melhor disponibilidade de cálcio e fósforo em truta arco-íris que receberam dietas com 500 UF/kg. Entretanto, para tilápia-

do-Nilo Bock et al. (2006) encontraram maior disponibilidade de cálcio na dieta controle com fosfato e sem a inclusão da fitase.

A disponibilidade do magnésio também melhorou ($p < 0,05$) com a inclusão de fitase na dieta dos girinos, não ocorrendo diferença entre os diferentes níveis (Tabela 4). Para juvenis de tilápia-do-Nilo houve aumento da disponibilidade de magnésio em vários alimentos de origem vegetal com a suplementação de 1000 UF/kg (milho, sorgo baixo tanino, farelo de soja, farelo de soja extrusado, farelo de algodão e farelo de sorgo) e 2000 UF/kg (farelo de trigo, farelo de arroz, glúten de milho e farelo de girassol) (GONÇALVES et al., 2005).

Com a suplementação de 1500 e 2000 UF/kg houve melhora significativa na disponibilidade do manganês para os girinos de rã-touro, não ocorrendo diferença significativa entre eles (Tabela 4). Bock et al. (2006) obtiveram melhores coeficientes de disponibilidade desse mineral com níveis iguais ou superiores a 1000 UF/kg para juvenis de tilápia-do-Nilo.

Em relação ao zinco (Tabela 4), o melhor coeficiente de disponibilidade ocorreu com a inclusão 1500 UF/kg (74,7%) não diferindo da inclusão de 1000 UF/kg (72,7%), semelhante aos resultados obtidos por Bock et al. (2006), que observaram melhor disponibilidade desse mineral para tilápias-do-Nilo nas dietas com níveis iguais ou superiores a 1000 UF/kg.

Os fatores que mais afetam a disponibilidade do zinco são os agentes quelantes, representados pelos fitatos, e a inter-relação de minerais como zinco e cobre, em que um pode diminuir a disponibilidade do outro, dependendo de seu balanço (Baker e Ammerman, 1995 apud GONÇALVES et al., 2005).

O fato da enzima fitase quebrar o complexo fitato-mineral, liberando os minerais para a absorção (SEBASTIAN et al., 1996), sua suplementação em dietas para girinos de rã-touro aumentou a disponibilidade dos minerais e a digestibilidade dos nutrientes presentes nas dietas, proporcionando melhor desempenho dos animais e menores quantidades de efluentes (CANDIDO, 2018).

4- CONCLUSÕES

A inclusão de 500 UF/kg aumentou a digestibilidade da proteína, energia, extrato etéreo e a disponibilidade do cálcio e magnésio nas dietas de girinos de rã-touro. Para a maior disponibilidade do fósforo é necessário 2000 UF/kg e para o manganês e zinco, 1500 UF/kg.

Portanto, o nível ideal de suplementação da enzima fitase em dietas para girinos de rã-touro vai estar relacionado com qual nutriente e/ou mineral se deseja maior disponibilidade.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINATI, R.C.B.; LIMA, S.L.; TAFURI, M.L.; DONZELE, J.L. Digestibilidade aparente de dois alimentos proteicos e três energéticos para girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.2151-2156, 2000.
- AMIRKOLAIE, A.K. Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. **Reviews in Aquaculture**, v.3, p.19-26, 2011.
- ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; FLEMMING, J. S.; GEMAEL, A.; SOUZA, G. A.; BONA FILHO, A. **Nutrição Animal**. 4. Ed. São Paulo: Nobel, 1990. 396p.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 20 ed., Gaithersburg: AOAC, 2016.
- BOCK, C.L.; PEZZATO, L.E.; CANTELMO, O.A.; BARROS, M.M. Fitase e digestibilidade aparente de nutrientes de rações por tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2197-2202, 2006.
- CAIPANG, C.M.A.; DECHAVEZ, R.B.; AMAR, M.J.A. Potential application of microbial phytase in aquaculture. Extreme Life, Biospeology & Astrobiology International **Journal of the Bioflux Society**, v.3, n.1, p.55-66, 2011.
- CANDIDO, B.C.L. **Fitase na dieta de girinos de rã-touro**. 2018. 25f. Trabalho de Conclusão de Curso (Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2018.
- CARRARO, K.C. Ranicultura: um bom negócio que contribui para a saúde. **Revista FAE**, v.11, n.1, p.111-118, 2008.
- CASTRO, J.C.; PINTO, A.T. Qualidade de água em tanques de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802, cultivadas em diferentes densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.1903-1911, 2000.
- CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. A piscicultura e o ambiente- o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.68-87, 2010.
- DA SILVA, A.Y.H.; COZZOLINO, S.M.F. Fósforo. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2ª Ed. Barueri: Manol e Interesse Geral, 2007.p. 447-458.

- DATO-CAJEGAS, C.R.S.; YAKUPITIYAGE, A. The need dietary mineral supplementation for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. **Aquaculture**, v.144, n.1-3, p.227-327, 1996.
- ENGELN, A.J; HEEFET, F.C.V; RANDSDRP, P.H.G.; SMIT, E.L.C. Simple and rapid determination of phytase activity. **Journal of Biotechnology**, v.77, n.3, p. 760-764, 1994.
- ETHERIDGE, R.D.; PESTI, G.M.; FOSTER, E.H. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. **Animal Feed Science and Tecnology**, v.73, p.21-28, 1998.
- FRACALLOSSI, D.M.; RODRIGUES, A.P.O.; SILVA, T.S.C.; CYRINO, J.E.P. Técnicas experimentais em nutrição de peixes. In: FRACALLOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. (Eds.). **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013, p.37-63.
- FUKAYAMA, E.H.; SAKOMURA, N.K.; DOURADO, L.R.B.; NEME, R.; FERNANDES, J.B.K.; MARCATO, S.M. Efeito da suplementação de fitase sobre o desempenho e a digestibilidade dos nutrientes em frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.4, p.629-635, 2008.
- FURUKAWA, A.A.; TSUKAHARA, H. On the acid digestion for the determination of chromic oxide as index substance in the study of digestibility of fish feed. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.32, p.502-506, 1966.
- FURUYA, W.M.; BOTARO, D.; DA SILVA, L.C.R.; DOS SANTOS, V.G.; SILVA, T.S.C.; DOS SANTOS, L.D.; FURUYA, V.R.B. Fitase em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (175 a 327 g). **Archivos de Zootecnia**, v.55, n.210, p.161-170, 2006.
- FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S.; FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C. Fitase na alimentação da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Desempenho e digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.924-929, 2001.
- GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; HISANO, H.; FREIRE, E.S.; FERRARI, J.E.C. Digestibilidade aparente e suplementação de fitase em alimentos vegetais para tilápia do Nilo. **Acta Scientiarum**, v.26, n.3, p.313-321, 2004.

- GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; KLEEMAN, G.K.; ROCHA, D.F. Efeito da suplementação de fitase sobre a disponibilidade aparente de Mg, Ca, Zn, Cu, Mn, e Fe em alimentos vegetais para tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2155-2163, 2005.
- GOSNER, K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v.16, p.183-190, 1960.
- JUNIOR, V.R.; RIBEIRO, C.L.N.; MESSIAS, R.K.G.; ROCHA, T.C. Importância da enzima fitase na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.12, n.4, p.4127-4139, 2015.
- KORNEGAY, E.T. Feeding to reduce nutrient excretion: effects of phytase on phosphorus and other nutrients. **Biotechnology in the feed industry: Proceedings of Alltechs 15th Annual Symposium**, (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds). Nottingham University Press, UK, p.461-490, 1999.
- LELIS, G.R.; ALBINO, L.F.T.; SILVA, C.R.; ROSTAGNO, H.S.; GOMES, P.C.; BORSATTO, C.G. Suplementação dietética de fitase sobre o metabolismo de nutrientes de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p.1768-1773, 2010.
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. **A tecnologia de criação de rãs**. Viçosa: Impr. Univ., 1992. 168p.
- MAENZ, D.D.; CLASSEN, H.L. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. **Poultry Science**, v.77, n.19, p.557-563, 1998.
- MARTINI, L.A. **Cálcio e fósforo**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 236p.
- MOREIRA, J.A.; BERENCHTEIN, B.; VITTI, D.M.S.S.; PATINO, R.M.; SILVA, T.S.; SANTOS, T.T.; LOPES, J.B. Biodisponibilidade do P e digestibilidade aparente do N em dietas de suínos suplementadas com níveis crescentes de fitase, balanceadas de acordo com o conceito de proteína ideal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1511-1518, 2011.
- NOSE, T. Recent advances in the study of fish digestion in Japan. In: SYMPOSIUM ON FINFISH NUTRITION AND FISH FEED TECHNOLOGY, 1996, Belgrade. **Proceedings...**Belgrade: EIFAC/FAO, 1996, 15p.
- OLIVEIRA-BAHIA, V.R.L. **Morfologia e enzimologia do sistema digestório dos girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose**.

2007. 148f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; SOCCOL, V.T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource technology**, v.77, p.203-2014, 2001.
- PAULA, E.F.E.; CHEN, R.F.F.; MAIA, F.P. Enzimas exógenas na nutrição de animais monogástricos. **PUBVET**, n.14, 2009.
- PINTO, D.F.H.; MANSANO, C.F.M.; STÉFANI, M.V.; PEREIRA, M.M. Optimal digestible protein level for bullfrog tadpoles. **Aquaculture**, v.440, p.12-15, 2015.
- RODEHUTSCORD, M.; BORCHET, F.; GREGUS, Z.; PFEFFER, E. Availability and utilization of free lysine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparison of L-lysine sulphate. **Aquaculture**, v.187, n.2, p.177-183, 2000.
- RODRIGUES, V.V. **Redução de nutrientes em ração com fitase para suínos em crescimento**. 2009. 52f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R.; LAGUE, P.C. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper and zinc in broilers chickens fed corn-soybean diets. **Poultry Science**, v.75, n.6, p.729-736, 1996.
- SECCO, E.M.; STÉFANI, M.V.; VIDOTTI, R.M. Apparent digestibility of different ingredients in diets for bullfrog *Rana catesbeiana* tadpoles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.36, n.1, p.135-140, 2005.
- SILVA, T.S.C.; FURUYA, W.M.; SANTOS, L.D.; FUJII, K.M.; MICHELATO, M.; IWAMOTO, B.S. Fitase líquida em dieta extrusada para juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal. Sciences**, v.29, n.4, p.449-455, 2007.
- SOARES, C.M.; HAYASHI, C.; GALDIOLI, E.M. Utilização de diferentes níveis proteicos em rações para girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 12., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: AEP-SUL e FAEP-BR, 2001. (CD-ROM)

- SPINELLI, J.; HOULE, C.R.; WEKELL, J.C. The effect of phytase 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.
- STRAIN, J.J.; CASHMAN, K.D. **Minerais e Oligoelementos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. 205 p.
- VIANA, M.T.S.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; BARRETO, S.L.T.; SILVA, E.A.; FLORENTINO, W.M. Efeito da suplementação de enzima fitase sobre o metabolismo de nutrientes e o desempenho de poedeiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.6, p.1074-1080, 2009.
- VIELMA, J.; LALL, S.P.; KOSKELA, J.; MATTILA, P. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.163, p.309-323, 1998.