

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Campus de Botucatu

Polímero de óleo de soja como potencial veículo termoprotetor para a Fitase em dietas para a
Tilápia-do-Nilo

EDGAR JUNIO DAMASCENO RODRIGUES

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção ao título
de Mestre

BOTUCATU – SP

Outubro – 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Campus de Botucatu

Polímero de óleo de soja como potencial veículo termoprotetor para a Fitase em dietas para a
Tilápia-do-Nilo

EDGAR JUNIO DAMASCENO RODRIGUES

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato

COORIENTADOR: Prof. Adj. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção ao título
de Mestre

BOTUCATU – SP

Outubro – 2019

R696p

Rodrigues, Edgar Junio Damasceno

Polímero de óleo de soja como potencial veículo termoprotetor para a Fitase em dietas para a Tilápia-do-Nilo / Edgar Junio Damasceno Rodrigues. -- Botucatu, 2020

69 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Luiz Edivaldo Pezzato

Coorientador: Pedro de Magalhães Padilha

1. Oreochromis niloticus. 2. Digestibilidade. 3. Antinutricionais. 4. Minerais. 5. Polímero. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA

Nascido em Formiga-MG em 1991, filho de Lúcia e Edgar, teve criação humilde junto a seu irmão e avós. Sua mãe, professora, sempre muito exigente quanto à educação de seus filhos, os estimulava a serem esforçados e nunca cessarem os estudos. Ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Lavras (UFLA) em julho de 2010. Estimulado por seu padrinho, Mozar Brito, professor do Departamento de Administração na UFLA, pleiteou uma vaga no programa de Iniciação Científica (IC) para o setor de aquicultura da UFLA em seu primeiro semestre de graduação, obteve êxito sendo contemplado com outras bolsas de IC até o final de sua graduação no mesmo setor. Em 2013, foi aprovado no processo seletivo para o programa de intercâmbio acadêmico “Ciência Sem Fronteiras”, passando 18 meses em estudos intensos de Língua Inglesa e *Animal Science* na *The University of Queensland* em Brisbane QLD, Austrália. Retorna em 2015 para retomar os estudos no Brasil, e em 2018 gradua-se Zootecnista e inicia o curso de mestrado na Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu, onde atualmente aspira realizar seu Doutorado.

Agradeço a Olorum pela oportunidade, força e saúde concedida.

Aos meus pais Lucia Brito e Edgar Rodrigues pelo amor e apoio.

Ao meu irmão Euler Rodrigues, pelo apoio incondicional e incentivo.

À minha esposa, Gabriela pelo companheirismo e amor.

Às minhas filhas, Helena e Sofia, que torcem pelo seu pai mesmo lá de cima.

Muito obrigado.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Olorum que em nenhum momento me abandonou e me concedeu saúde e força para seguir nessa caminhada.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade de realizar este curso.

Aos meus pais, em especial à minha mãe, pelo amor incondicional, pelos anos de luta e trabalho árduo necessários para a minha criação, pelo apoio e compreensão.

Ao meu irmão Euler Rodrigues, que esteve ao meu lado nessa jornada, me apoiando, motivando e que sempre se fez presente para o que fosse preciso. Seremos sempre nós dois contra o mundo.

À minha esposa, Gabriela Maria dos Santos, pelos anos juntos, me apoiando, motivando e fazendo a caminhada mais leve.

Ao meu padrinho Mozar José de Brito, que me incentivou desde o ensino médio a ingressar em uma universidade, me deu todo o suporte necessário para a conclusão de minha graduação, sempre disposto a auxiliar e compartilhar os mais diversos ensinamentos e que me apresentou ao mundo acadêmico.

Aos meus familiares, que mesmo distantes se fizeram presentes através de ligações, cartas, mensagens. Em especial a minha avó Maria de Lourdes que nunca duvidou do meu potencial e sempre me confortou com seu amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato que me concedeu o privilégio de ser orientado pela maior referência em digestibilidade de alimentos para peixes do Brasil. Que me acolheu em sua equipe e pacientemente compartilhou tanto conhecimento e experiências de vida, além de fundamentalmente contribuir para a minha formação, acreditar em meu potencial e ser um exemplo em quem se espelhar.

À Prof. Dra. Margarida Maria Barros, pelos ensinamentos compartilhados, acolhimento e exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha por abrir as portas de seu laboratório e prontificar-se a auxiliar nas diferentes análises necessárias para a execução deste trabalho e também pelos ensinamentos.

A todos os professores desta instituição que contribuíram para a minha formação.

À toda equipe do laboratório AQUANUTRI, Igor Simões Tiágua Vicente, Matheus Gardim Guimarães, Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho, William dos Santos Xavier, Jaqueline de Oliveira Fonseca e demais estagiários pelo acolhimento, companheirismo, confiança, dedicação aos trabalhos e desafios que encaramos juntos e pela amizade construída ao longo dos anos.

À minha orientadora de iniciação científica, Priscila Vieira Rosa e equipe de pesquisa, que durante a minha graduação, lapidaram e moldaram meu perfil acadêmico, acreditaram no meu potencial, forneceram apoio e compartilharam conhecimentos importantes para minha vida profissional e pessoal.

Aos meus irmãos de fé, orixás e guias, que me apresentaram e acolheram em uma religião tão linda, repleta de fé e axé, como a Umbanda.

O apoio, ensinamentos e amizade de todos foi fundamental durante meu mestrado e os levarei para a vida toda. Todos vocês foram de suma importância para a conclusão desta etapa de minha carreira, a todos minha gratidão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2018/19293-1), pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo: 134366/2018-2), pela bolsa concedida.

RESUMO GERAL

A enzima fitase é utilizada em dietas de animais monogástricos objetivando minimizar o efeito antinutricional do fitato presente nos alimentos de origem vegetal. A elevação da temperatura durante o processamento das rações próprias à piscicultura diminuiu significativamente a ação dessa enzima e, portanto, este estudo objetivou avaliar o polímero do óleo de soja, obtido pelos princípios da química verde, como veículo termoprotetor para a fitase durante o processamento de dietas para tilápia-do-Nilo. Foram utilizados 192 juvenis de tilápia-do-Nilo (peso médio de 140g), dispostos em 12 aquários de alimentação (250 litros). O experimento foi delineado em esquema fatorial (3x2) que consiste em três métodos de inclusão da enzima (revestida ao pellet pós processamento -CPP, associada ao polímero -PAE e sem enzima -NE) x dois tipos de processamento da dieta (extrusão ou peletização). Foi adicionada a mesma quantidade de polímero (43,1 g/kg/ração) com o mesmo nível de fitase (1500 unidades de fitase/kg/ração) seguindo as formas de inclusão e processamento descritas no esquema fatorial. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia, até a saciedade aparente, e suas excretas coletadas uma vez ao dia, intercalando a repetição de cada tratamento. Para a determinação da eficácia do produto teste, os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas foram determinados. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (two-way ANOVA), com 5% de significância, e teste Tukey para comparação das médias. Houve interação significativa para os valores de coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) para fósforo (P), cálcio (Ca), matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE) ($p < 0.05$). O método CPP determinou os maiores valores de CDA para P, Ca, MM, seguido pelo método PEA em dietas extrudadas ($p < 0.05$). Para as dietas peletizadas, PEA promoveu os maiores valores de CDA para P e Ca, seguido pelo método CPP ($p < 0.05$). Estes resultados sugerem que o polímero de óleo de soja pode ser utilizado com veículo para a fitase.

Palavras chave: *Oreochromis niloticus*, digestibilidade, antinutricionais, minerais, polímero.

ABSTRACT

Phytase is supplemented in non-ruminant diets in order to reduce the antinutritional effects of the phytate content of vegetable ingredients. Aquafeed processing can reach elevated temperatures, which could impair phytase activity. In this sense, this study aimed to evaluate a heat and acidic pH resistant soybean oil polymer, produced following the principles of “green chemistry” as a vehicle to protect phytase during fish feed processing. Juvenile Nile tilapia (140 ± 4.3 g) were randomly distributed and kept in 12 feeding aquaria (250 L). The experimental design was factorial (3×2) with three phytase supplementation methods (coating post processing - CPP, polymer associated to enzyme - PAE, and no enzyme - NE) and two feed processing methods (extrusion or pelletizing) with one enzyme level: 1500 phytase units kg^{-1} (FTU kg^{-1}) and the same amount of polymer 43.1 g kg^{-1} , accordingly to the methods described previously. Fish were fed the experimental diets four times a day until apparent satiation and feces samples were collected once a day. The efficacy of the polymer as a thermoresistant vehicle to phytase during feed processing was evaluated by assessing the apparent digestibility coefficient (ADC) of nutrients in the diets. The data obtained were subject to a two-way ANOVA at 5% of significance and Tukey’s test. There was a positive interaction for ADC values of phosphorus (P), calcium (Ca), mineral matter (MM) and crude fat (CF) ($p < 0.05$). Coating determined higher ADC values for P, Ca and MM, followed by PEA in extruded diets ($p < 0.05$). For pelletized diets, PEA determined higher ADC values for P and Ca, followed by coating ($p < 0.05$). These results suggest that the polymer may be a potential protective carrier for phytase and other thermo labile additives.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, digestibility, sustainability, aquafeed, edible polymer

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.	Suplementação de fitase em dietas baseadas em ingredientes vegetais para Truta Arco-Íris sobre a emissão sólida ou dissolvida de Nitrogênio (N) e Fósforo (P)	6
Figura 2.	Estrutura química do Ácido fítico	8
Figura 3.	Fitato complexado a nutrientes, complexo binário (*), complexo ternário (**).	13
Figura 4.	Mecanismo de ação da fitase em peixes	17

CAPÍTULO II

Figure S1.	TG/DTG-DTA curves for phytase (a), polymer (b), and polymer-associated phytase (c)	62
-------------------	--	-----------

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.	Concentração de fósforo total e fítico em ingredientes vegetais	9
Tabela 2.	Disponibilidade de fósforo em ingredientes vegetais para tilápia-do-Nilo	10
Tabela 3.	Características de algumas fitases comerciais	19
Tabela 4.	Os doze princípios da “Química Verde”	30

CAPÍTULO II

Table 1.	Ingredient composition and proximate analysis of the diets.....	59
Table 2.	Apparent digestibility coefficient (ADC) values of phosphorus and calcium for Nile tilapia fed phytase-supplemented diets subjected to different processing and incorporation methods.....	60
Table 3.	Apparent digestibility coefficient (ADC) values of CP, CE, CF, DM, MM for Nile tilapia fed phytase-supplemented diets subjected to different processing and incorporation methods.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADC	Apparent digestibility coefficient
Ca	Calcium
CP	Crude protein
CDA	Coeficiente de digestibilidade aparente
CF	Crude fat
CPP	Coating post processing
DM	Dry matter
FAPESP	The São Paulo Research Foundation
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FTU	Unidades de fitase
GE	Gross energy
MM	Mineral matter
NRC	National Research Council
NE	No enzyme inclusion
P	Phosphorus
PAE	Polymer associated to enzyme
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
Considerações iniciais.....	2
1. Revisão da Literatura.....	3
1.1. Expansão aquícola e seus impactos ambientais.....	3
1.2. Fitato na alimentação de peixes.....	7
1.3. Alternativas para inativar o fitato.....	14
1.4. Fitase.....	16
1.5. Fitase na nutrição de peixes.....	22
1.6. A digestibilidade dos alimentos.....	25
1.7. Polímeros de óleos vegetais e aplicações.....	27
Referências Bibliográficas.....	31
 CAPÍTULO 2. “A plant-based polymer as a potential thermoresistant carrier to phytase in Nile tilapia diets”	 47
Abstract	48
1. Introduction	48
2. Material and Methods	50
2.1. Experimental diets and phytase incorporation.	50
2.2. Digestibility Assessment	52
2.3. Chemical Analysis	52
2.4. Statistical Analysis	53
2.5. Simultaneous Thermogravimetry-Differential Thermal Analysis (TG- DTA).....	53
2.6. Ethics statement.....	53
3. Results and Discussion	53
4. Conclusion	57
Acknowledgements.....	58
Conflict of interest statement.....	58
References	63
 CAPÍTULO III	 67
Implicações	68

Capítulo I

Considerações Iniciais

O **Capítulo I** discorre sobre alguns dos impactos no ambiente aquático promovidos pelo desenvolvimento do setor aquícola assim como estratégias que visam minimizar tais efeitos. Dentre as diferentes consequências, a eutrofização de corpos d'água tem sido amplamente discutida. Este fenômeno ocorre naturalmente ao longo dos anos; entretanto, pode ser acelerado pelo aumento na concentração de nutrientes limitantes para o ecossistema aquático, como fósforo e nitrogênio, inviabilizando o consumo de água e a produção de organismos aquáticos nas áreas afetadas. Sistemas de produção de peixes não sustentáveis podem exacerbar este problema, sendo responsáveis pelo aumento significativo dos nutrientes lançados no ambiente aquático, na forma de ração não consumida ou excretas. Apesar disso, existem soluções para reduzir os efeitos negativos promovidos pela expansão da aquicultura. Uma das estratégias que podem ser adotadas é a suplementação de fitase. Essa enzima aumenta a disponibilidade de alguns nutrientes contidos em dietas à base de ingredientes vegetais para os animais, além de reduzir a necessidade de suplementação de fósforo. Embora a fitase possa contribuir com a sustentabilidade da aquicultura, a sua incorporação em dietas para peixes ainda é um desafio. Tal enzima tem sua atividade reduzida ao ser exposta às altas temperaturas, necessárias durante o processamento de dietas para peixes. Dessa forma, o desenvolvimento de veículos para aumentar a estabilidade térmica desta enzima, como polímeros vegetais, pode ser uma importante ferramenta para viabilizar o seu uso em dietas comerciais para peixes. Considerando tais informações redigiu-se o Capítulo II, com o intuito de testar o polímero de óleo de soja como veículo termoprotetor para a enzima fitase em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo. Este capítulo é intitulado: *A plant-based polymer as a potential thermoresistant carrier to phytase in Nile Tilapia diets*, o qual foi escrito seguindo as normas do periódico **Food Chemistry** (fator de impacto 5.399).

Revisão da Literatura

1.1. Expansão aquícola e seus impactos ambientais

A aquicultura pode ser definida como a produção de diferentes organismos aquáticos, peixes, anfíbios, alguns répteis, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas, por exemplo (FAO, 2019). Dentre as atividades de produção de alimento, a aquicultura é o setor que mais cresce mundialmente, sendo o pescado a proteína de origem animal mais consumida no mundo (FAO, 2018). A produção aquícola pode ser dividida em dois seguimentos principais: sistemas de cultivo e captura extrativista. Historicamente o total produzido por meio da captura é superior à produção em sistemas de cultivo; entretanto, a pesca extrativista permanece com seu crescimento estagnado desde a década de 80, enquanto o cultivo de organismos aquáticos segue crescendo consideravelmente com projeções para ultrapassar a produção extrativista nos próximos anos (FAO, 2018).

O Brasil está entre os países de maior potencial hídrico para o desenvolvimento da aquicultura. Este possui cerca de 10 milhões de hectares de água doce, distribuídos entre rios, represas e lagos (RORIZ *et al.*, 2017) que possivelmente podem ser utilizados para a expansão sustentável desta atividade. De fato a aquicultura tem se expandido no Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2019) a produção piscícola nacional cresceu cerca de 10% nos últimos dois anos, sendo a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) a espécie de água doce mais produzida, principalmente em tanques-rede, correspondendo a 52.6% do total. Sistemas de produção em tanques-rede tem sido considerado um recurso importante para impulsionar o desenvolvimento da piscicultura no Brasil e aumentar a sua competitividade. O uso deste tipo de sistema produtivo tem crescido em diversos países, como Indonésia, China e Brasil, que possui alta taxa de crescimento para produção de tilápia, sendo considerado principal concorrente da China para a posição de maior produtor de tilápia-do-Nilo (FITZSIMMONS, 2006; SAMPAIO *et al.*, 2013). Considerando o alto potencial produtivo

desta atividade, a demanda por dietas adequadamente balanceadas, assim como outras medidas que promovam a expansão sustentável da aquicultura no Brasil é expressiva.

Um dos principais entraves para a expansão aquícola é o custo de produção e este é representado em sua maior parte por despesas para a produção ou compra de ração para os animais. Segundo o National Research Council (NRC) (2011) a dieta dos peixes cultivados em sistemas de produção intensivos representa cerca de 70% dos custos totais de produção, sendo a fonte proteica, de fósforo e óleo os ingredientes proporcionalmente mais onerosos. Assim, a ração deve ter ótimo valor biológico para aperfeiçoar o processo produtivo e minimizar a eutrofização do ambiente aquático, sendo esta causada primariamente por nutrientes não digeridos, resíduos do metabolismo e a dissolução de ração não consumida na água (KAWASAKI *et al.*, 2016; GONZÁLEZ *et al.*, 2008). Da mesma maneira que outros setores de produção de alimentos, a aquicultura é também responsável pela descarga de nutrientes em corpos d'água. A produção mundial de peixes e crustáceos em 2008 resultou na emissão de 1.7 e 0.46 milhões de toneladas de nitrogênio e fósforo, respectivamente (VERDEGEM, 2013). Já em 2010 o teor de nitrogênio e fósforo nos efluentes oriundos de sistemas de produção de peixes de água doce aumentou para 5 e 0.9 milhões de toneladas respectivamente (BOUWMAN *et al.*, 2013).

A adição controlada destes e outros nutrientes poderia beneficiar de certa maneira o ecossistema aquático. Entretanto, este tipo de sistema possui capacidade limitada para assimilar e reciclar nutrientes, que quando excedida gera eutrofização (WHITE; PHILLIPS; BEVERIDGE, 2013). A água com grande concentração de nitrogênio e fósforo, que são nutrientes limitantes, promove o aumento da população de bactérias, algas e outros organismos que diminuem o teor de oxigênio dissolvido, liberam toxinas e podem causar a morte massiva dos peixes (DIAZ; ROSENBERG, 2008; EDWARDS, 2015; PAERL, 1997). Adicionalmente, a eutrofização pode inviabilizar o uso de corpos d'água tanto para a atividade aquícola quanto

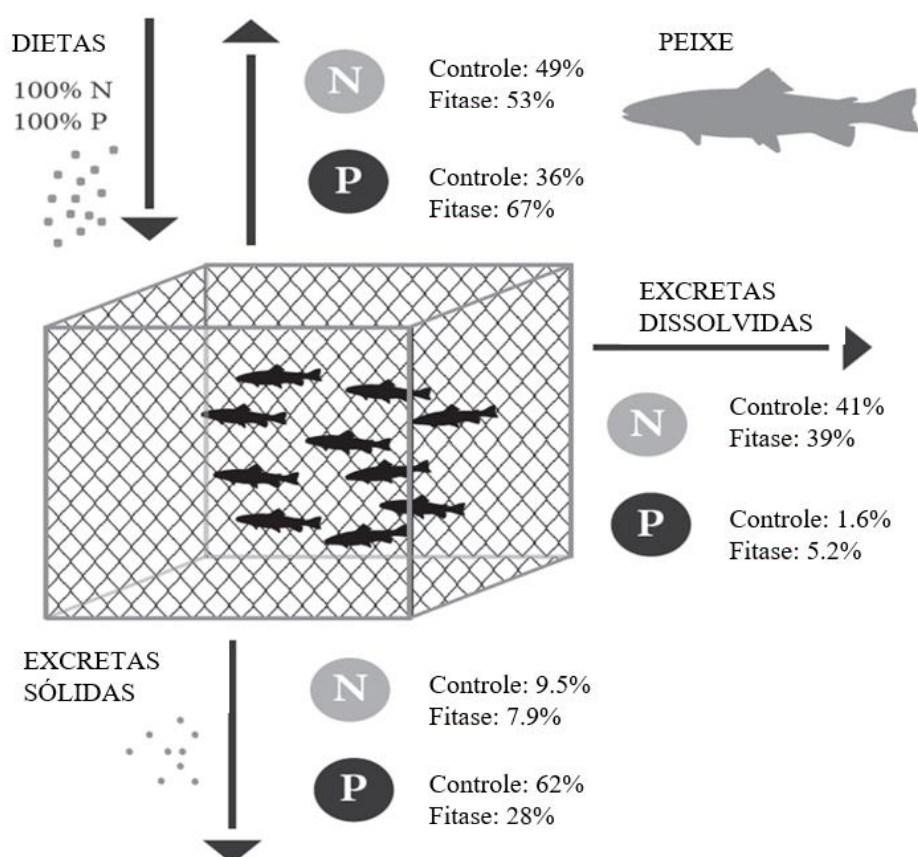
para o consumo humano e mesmo para atividades de recreação (CHISLOCK; DOSTER; ZITOMER; WILSON, 2013).

Por utilizar águas públicas de quaisquer origens, é eminente a necessidade de se adotar medidas visando a redução dos impactos ambientais causados pela implementação de sistemas de produção de peixe. No sentido de se diminuir o grau de eutrofização da água dos tanques destinados à piscicultura, recomenda-se a adoção de boas práticas de alimentação para reduzir o volume de fezes e de resíduos de alimentos no meio (SCHULZ; GELBRECHT; RENNERT, 2003). Dentre as boas práticas de alimentação, o uso de ingredientes com alto valor biológico e formulações com níveis adequados de alguns nutrientes também têm sido recomendadas, a fim de reduzir os impactos ambientais da aquicultura. De acordo com Bueno *et al.* (2012), a redução de 0.4% nos níveis de fósforo em dietas para tilápia-do-Nilo pode diminuir o teor deste nutriente em até 55% nos efluentes do tanque sem prejudicar o desempenho dos peixes. A utilização de menores níveis de fósforo na dieta pode, ainda, reduzir os custos com a formulação da ração sem prejudicar a qualidade final do produto (OSTI *et al.*, 2018). Adicionalmente, pode-se recomendar o uso de tanques de decantação para os sedimentos, o recolhimento de sobras após o arraçoamento, e tratamento biológico e/ou químico dos efluentes (DUMAS *et al.*, 1998; HUSSENOT; LEFEBVRE; BROSSARD, 1998; NAYLOR *et al.*, 2003). Entretanto, a demanda de alto investimento inicial e sua inviabilidade de uso em sistemas de tanque-rede, limita a adoção destas práticas.

Uma das formas mais adequadas para amenizar esse problema seria a adoção de arraçoamento racional assim como rações contendo fitase e outras enzimas como carboidrases e proteases, que possam aumentar a disponibilidade de minerais e outros nutrientes aos animais (BUREAU; HUA, 2010). Lemos e Tacon (2017) compilaram em uma revisão diferentes trabalhos que comprovam os benefícios da adição da enzima fitase na nutrição de peixes, promovendo melhorias na utilização de nutrientes e energia, e podendo reduzir o teor de

nutrientes nos efluentes do sistema produtivo. De fato, essa enzima pode reduzir os níveis de nutrientes excretados pelos peixes na água. Morales *et al.* (2016) comprovaram que a suplementação de 4000 unidades de fitase (FTU) kg^{-1} para *Oncorhynchus mykiss* reduziu em aproximadamente 50% e 13% a emissão de fósforo e nitrogênio respectivamente (Figura 1). Outros trabalhos demonstraram que a inclusão de 1500 FTU kg^{-1} em dietas para tilápia-do-Nilo, além de melhorar a utilização do fósforo fítico e outros nutrientes da dieta, determinou redução de 43% da emissão de fósforo para o ambiente aquático, minimizando os impactos gerados por este nutriente no ambiente de produção e entorno (BOCK *et al.*, 2006; BOCK *et al.*, 2007; GODA, 2007).

Figura 1: Suplementação de fitase em dietas baseadas em ingredientes vegetais para Trutra Arco-Íris sobre a emissão sólida ou dissolvida de Nitrogênio (N) e Fósforo (P)



Fonte: Adaptado de Morales et al. (2016)

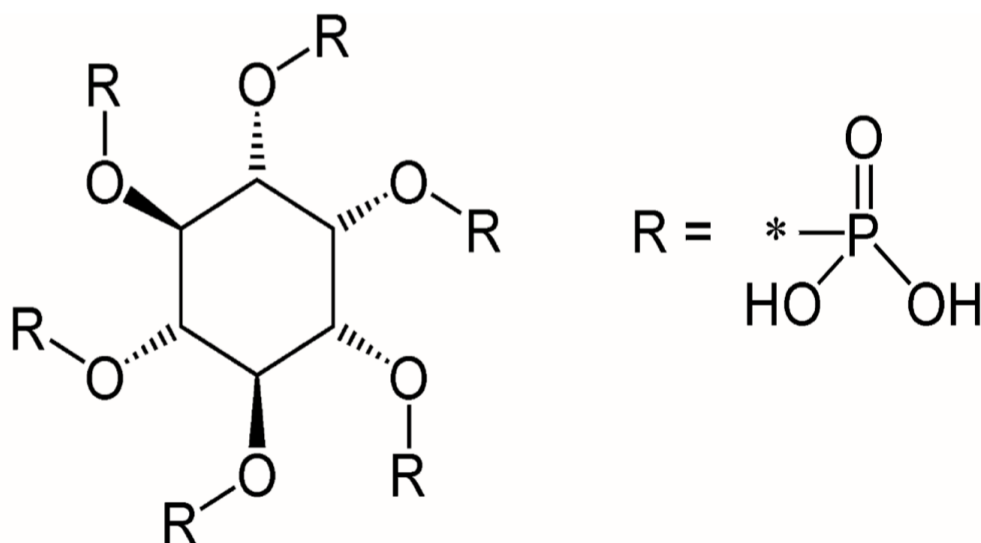
Assim, a adição de fitase pode ser considerada uma ferramenta para aumentar a sustentabilidade ecológica da aquicultura, por ser capaz de aumentar a utilização de alguns

nutrientes e reduzir a emissão de possíveis poluentes na água (CAO *et al.*, 2007). Entretanto, existem desafios para a sua incorporação em rações próprias para a piscicultura, uma vez que o processo de extrusão, por elevar a temperatura da ração a valores de até 150°C, pode diminuir a efetividade da fitase suplementada na dieta (AUTIN, 1997).

1.2. Fitato na alimentação de peixes

A rápida expansão da aquicultura elevou o custo das principais fontes proteicas de algumas rações, como a farinha de peixe. Dessa forma, ingredientes alternativos, como farelos vegetais, passaram a ser incluídos nas formulações de dietas para aumentar a economicidade da produção. A crescente utilização de fontes proteicas de origem vegetal em dietas para peixes foi impulsionada pelo aumento excessivo no preço da farinha de peixe, acarretando alguns desafios para a indústria aquícola (GATLIN *et al.*, 2007). Apesar de serem alternativas economicamente viáveis, farelos de origem vegetal podem conter diferentes substâncias antinutricionais, que reduzem a disponibilidade, a digestibilidade e o valor nutritivo de uma dieta (JOBILING, 2016). Para viabilizar o uso destes ingredientes, estratégias têm sido desenvolvidas objetivando a redução dos impactos causados pela presença de fatores antinutricionais em dietas que contenham alimentos vegetais.

Dentre tais substâncias pode-se citar o ácido fítico e seus sais, compostos encontrados em alimentos de origem vegetal, como milho, soja e trigo, comumente utilizados para produzir rações de peixes. O ácido fítico ($C_6H_{18}O_{24}P_6$; figura 2) ou mio-inositol 1,2,3,4,5,6 dihidrogênio hexafostato e seus sais mistos; conhecidos como fitato (Ip_6) e fitina, são as principais formas de reserva de cátions, grupos fosforilados altamente energéticos e de fósforo encontrados na maioria das sementes e tecidos vegetais (KUMAR *et al.*, 2012).

Figura 2. Estrutura química do Ácido fítico

Fonte: KUMAR *et al.*, 2010

Apesar de ser empregada de uma maneira geral, a palavra fitato refere-se ao sal de ácido fítico com um único tipo de mineral, fitato de sódio ou de potássio por exemplo; já o termo fitina se refere ao sal misto de ácido fítico com magnésio, potássio e cálcio (DERSJANT-LI *et al.*, 2015; SELLE; RAVINDRAN, 2007). Nas plantas o ácido fítico ocorre primariamente na forma de sal com cátions mono e bivalentes, como potássio-magnésio no arroz e cálcio-magnésio-potássio na soja, por exemplo (MORALES *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2014). Como diferentes formas do ácido fítico e seus sais podem ser identificadas em vegetais simultaneamente, muitos pesquisadores não fazem distinção entre eles (REDDY; SATHE, 2001); assim, o termo fitato será utilizado como referência para estes compostos.

A formação do fitato ocorre gradativamente durante o desenvolvimento de sementes de cereais e leguminosas, acumulando-se principalmente como IP₆ (90 – 95%) e em pequenas parcelas de outros ésteres como IP₅ e IP₄ e IP₃ (KUMAR *et al.*, 2010; PONTOPPIDAN; PETTERSSON; SANDBERG, 2007). A síntese deste composto (IP₆) acontece por meio da fosforilação sequencial do mio-inositol, de monofosfato (IP₁) para difosfato (IP₂), até o seu último passo, chegando a hexafosfato (IP₆) (LOEWUS, 2001).

A quantidade de fitato encontrado em produtos de origem vegetal pode variar significativamente, sendo influenciada por diferentes variáveis externas ou características intrínsecas do vegetal. Fatores genéticos, condições climáticas e suas variações, tipo de solo, grau de maturação da semente ou vegetal e uso de suplementos, como o P_2O_5 , podem modular a quantidade e o tipo de fitato presente no vegetal (OATWAY; VASANTHAN; HELM, 2001; REDDY *et al.*, 1989). Tal variação pode ser observada na tabela 1, em que o teor de fósforo total (P total) e fósforo fítico (P fítico) foram dispostos com base em matéria seca de diferentes ingredientes vegetais comumente utilizados na formulação de dietas para animais.

Tabela 1. Concentração de fósforo total e fítico em ingredientes vegetais

Alimento	P total (g/kg)	P fítico (g/kg)
Milho	2,50	1,70
Glúten de milho	5,00	4,20
Farelo de arroz	17,51	15,83
Arroz	1,20	0,80
Arroz quebrado	0,85	0,40
Farelo de trigo	10,96	8,36
Trigo	3,08	2,20
Sorgo	2,92	2,41
Cevada	2,73	1,86
Aveia	2,43	2,10
Farelo de girassol	9,05	7,48
Farelo de amendoim	6,00	4,60
Farelo de coco	4,30	2,40
Semente de algodão	6,05	4,25
Farelo de algodão	11,36	9,11
Farelo de girassol	9,05	7,48
Farelo de canola	8,76	6,69
Soja grão	6,66	4,53

Fonte: Adaptado por Pontes (2019)

A digestibilidade do fósforo proveniente de ingredientes vegetais para peixes é limitada. De fato, a biodisponibilidade média do fósforo de origem vegetal para estes animais é de aproximadamente 30%, dependendo da espécie e do ingrediente vegetal incluído na dieta (BORBA; SÁ; ABREU, 2016). Na tabela 2 pode-se observar a porcentagem, em matéria seca, de fósforo total (%Pt) e fósforo disponível (%Pdis) em alguns ingredientes proteicos e energéticos de origem vegetal para juvenis de tilápia-do-Nilo. Estes ingredientes têm sido utilizados na formulação de dietas de algumas espécies de peixe, como a supracitada.

Tabela 2. Disponibilidade de fósforo em ingredientes vegetais para tilápia-do-Nilo

Ingrediente	%Pt	%Pdis
Energéticos		
Milho	0,10	11,44
Milho extrudado	0,10	13,15
Farelo de trigo	0,74	53,11
Sorgo baixo tanino	0,17	24,09
Farelo de arroz	1,78	17,29
Proteicos		
Farelo de soja	0,40	22,31
Farelo de soja extrudado	0,58	26,27
Glúten de milho	0,40	22,17
Farelo de algodão	0,72	52,88
Farelo de girassol	0,59	26,42

Fonte: Adaptado de Gonçalves *et al.* (2007)

Como observado nas tabelas anteriores, em alguns vegetais, como a soja e outras leguminosas, cerca de 50 a 80% do fósforo total não é disponível para não ruminantes por estar na forma de fitato (RAVINDRAN, 2000). O fósforo fítico é indisponível ou parcialmente

utilizado pela maioria dos animais monogástricos, como os peixes, devido à ausência ou baixa produção de fitase endógena, enzima necessária para hidrolisar o fitato e tornar o fósforo disponível para ser absorvido no sistema gastrointestinal (KUMAR; SINHA; KAJBAF, 2019). Este fator contribui para o aumento dos níveis de fósforo e outros nutrientes lançados ao ambiente aquático, principalmente em dietas com alta inclusão de ingredientes de origem vegetal. Isto ocorre pois microrganismos presentes no ambiente aquático degradam o fitato, tornando o fósforo fítico disponível, contribuindo para o aumento da poluição, proliferação de algas em rios, lagos e geralmente resultando em eutrofização (DEBNATH *et al.*, 2005).

O que caracteriza o fitato como um fator antinutricional é a sua capacidade quelante, que pode ser medida pelo número de cargas iônicas de seus grupos fosfatos, que torna-o capaz de se complexar e indisponibilizar outros nutrientes (ROMANO; KUMAR, 2018). O fitato pode possuir o total de 12 cargas negativas, visto que em cada um dos seus 6 grupos fosfatos podem se localizar 2 cargas (QUIRRENBACH *et al.*, 2009). Portanto, o grau de fosforilação do IP_6 é diretamente proporcional ao número de cargas e a sua eficiência como agente quelante. Aliado ao grau de fosforilação, o pH do meio também influencia na quantidade de cargas negativas da molécula de IP_6 . De fato, o IP_6 pode se manter com todas as cargas negativas em diferentes faixas de pH observadas no trato gastrointestinal animal (MITTAL *et al.*, 2013) ou ainda ser protonado total ou parcialmente dependendo do pH do meio.

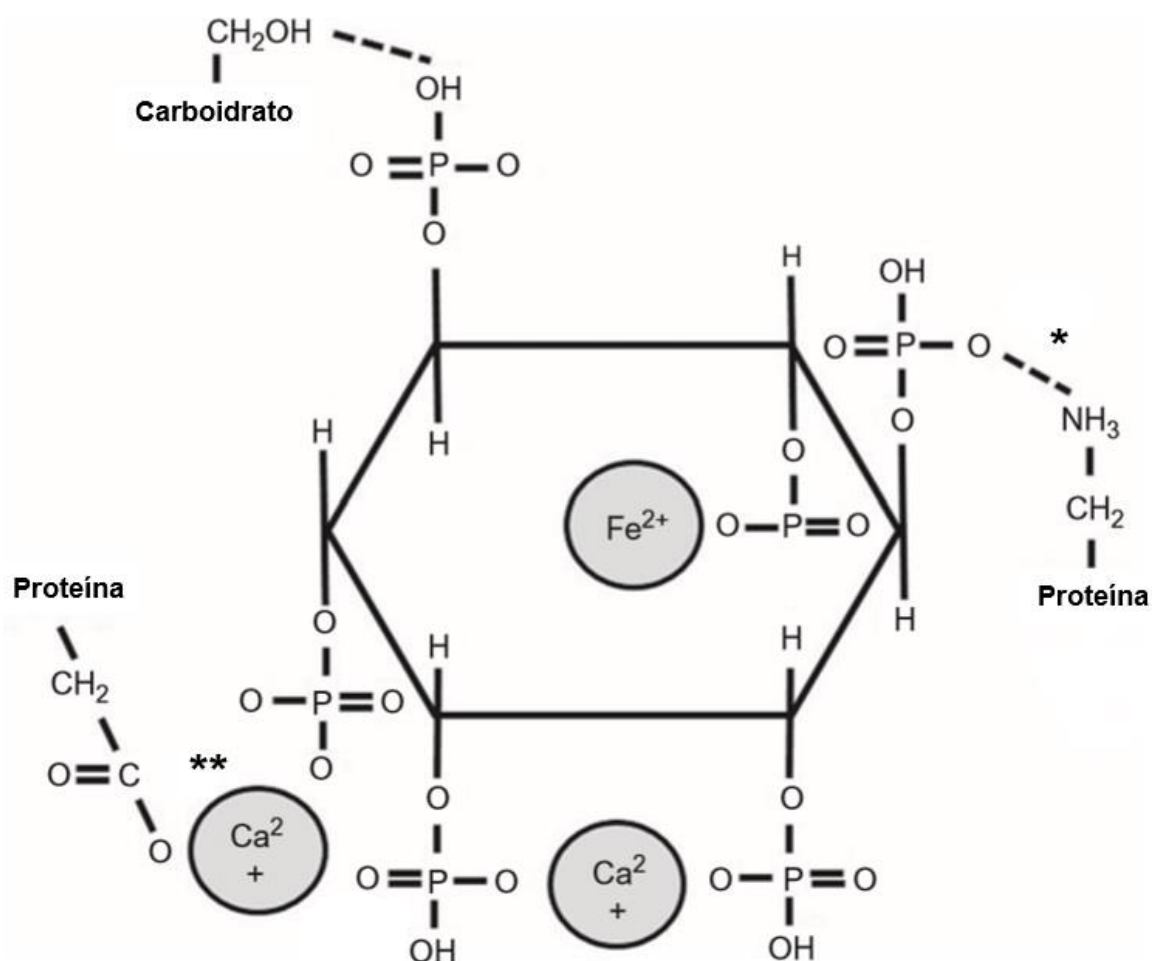
O fitato carregado negativamente tem afinidade por minerais de valência 2 e 3, como o cálcio, zinco, manganês, ferro e cobre, e ao ligar-se a eles forma complexos fíticos que dificultam ou até mesmo inviabilizam a sua absorção (CAO *et al.*, 2007), podendo influenciar negativamente o desempenho de peixes. A maioria dos complexos fitato-minerais, como o cálcio, ocorrem em regiões de pH intermediário a alcalino nas quais o fitato apresenta o maior número de cargas negativas, consequentemente, mais sítios disponíveis para se ligar a estes elementos (SIENER; HEYNCK; HESSE, 2001; WINDISCH, 2002). Adicionalmente, a

interação entre fitato e minerais também pode ser influenciada pelo conteúdo destes elementos na dieta. Por exemplo, dietas com quantidades elevadas de cálcio podem favorecer a formação do complexo cálcio-fitato, que possui alta afinidade ao zinco e, portanto, pode formar um coprecipitado com este mineral, reduzindo a sua disponibilidade de maneira indireta (KUMAR *et al.*, 2010). Apesar de ter uma influência menor que os teores de cálcio, a quantidade de Mg^{2+} também pode aumentar a precipitação de zinco por um mecanismo semelhante (WISE, 1983).

Além de indisponibilizar minerais, a molécula de fitato pode se ligar a cadeias laterais de algumas proteínas formando complexos insolúveis, dependendo do pH do meio. A ligação entre fitato e proteínas é dependente principalmente do pH do meio e pode acontecer de formas diferentes (JONGE; TESTERINK; JONGBLOED, 1997; KIES *et al.*, 2006). As duas principais formas de interação entre o IP_6 e proteínas dietéticas ocorre com a formação de complexos binários (proteína-fitato) ou ternários (proteína-mineral-fitato) (KIES *et al.*, 2006), como observado na figura 3. O complexo binário é formado em regiões de pH ácido, como o estômago da tilápia-do-Nilo (pH 1-2). Nestes locais o fitato é parcialmente protonado, permanecendo com a metade de seus grupos fosfatados negativamente carregados, o que favorece a sua ligação a grupos laterais positivamente carregados, como guanidina, imidazol e amino, dos aminoácidos arginina, histidina e lisina, respectivamente (KUMAR *et al.*, 2012). Em locais com pH intermediário (pH 5,0) a alcalino, como o intestino da tilápia-do-Nilo (pH 8,5 –8,8), o fitato e algumas proteínas com ponto isoelétrico menor que os valores de pH intestinais estão negativamente carregados; assim, a formação do complexo ternário é favorecido (RICHE *et al.*, 2001). A formação deste complexo ocorre por meio de uma ponte feita entre o fitato e a proteína por um cátion divalente, geralmente Ca^{2+} que está presente em grandes concentrações na digesta de peixes (MORALES *et al.*, 2016). Os dois complexos, binários ou ternários, tendem a formar aglomerados moleculares, se tornando resistentes à ação de proteases digestivas de peixes (RICHE; GARLING, 2004). Adicionalmente, o fitato pode interferir na digestibilidade

de proteínas contidas na dieta mesmo sem se complexar a elas. Isso acontece porque o IP₆ é capaz de reduzir a atividade de algumas proteases endógenas, como a pepsina e a tripsina (LIENER, 1994).

Figura 3. Fitato complexado a nutrientes, complexo binário (*), complexo ternário (**)



Fonte: Adaptado de Romano; Kumar (2018).

Além de reduzir a disponibilidade de minerais e proteínas, o fitato diminui a digestibilidade de carboidratos e outras fontes de energia, como os lipídeos. A redução da digestibilidade de carboidratos pode acontecer de maneiras distintas: complexação direta fitato-carboidrato, indireta por meio de proteínas de acoplamento (fitato-proteína-carboidrato) ou por inativação de carboidrases como a alfa-amilase e pela complexação com o Ca^{2+} cofator da referida enzima (KUMAR *et al.*, 2010; RAVINDRAN, 2000). Ao se complexar com o cálcio, a molécula de

fitato torna-se capaz de interagir com lipídeos, reduzindo a sua utilização. Isso ocorre pois o complexo Ca/Mg-fitato pode interagir com lipídeos dando origem a “lipofitinas”, que podem formar sabões metálicos no lúmen intestinal (LEESON, 1993). A formação de sabões metálicos reduz a biodisponibilidade de lipídeos como fontes energéticas para aves e peixes (KUMAR *et al.*, 2012; LEESON, 1993). Dessa forma, fica evidente a ação do fitato como um fator antinutricional para não ruminantes, impactando negativamente na disponibilidade de proteínas, minerais e energia para peixes e outros animais (CAO *et al.*, 2008; LEMOS; TACON, 2017).

1.3. Alternativas para inativar o fitato

Existem diferentes medidas para reduzir os efeitos negativos do fitato na produção animal. Técnicas de desfitinização, melhoramento genético para produção de cultivares com baixo nível de fitato e uso de grãos em diferentes estágios de maturação podem amenizar os efeitos prejudiciais e a quantidade de fitato presente em dietas de peixes (HAJRA *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2010; OLADOSU *et al.*, 2016). A desfitinização pode ser definida como um conjunto de técnicas de processamento que visam reduzir o conteúdo de fitato de amostras vegetais (KUMAR, *et al.*, 2012). Dentre tais técnicas, a trituração e a cocção de ingredientes vegetais foram testadas e apesar de reduzir o conteúdo de fitato, reduziram também, a quantidade de minerais e fibras (BOHN; MEYER; RASMUSSEN, 2008). A redução do conteúdo de IP₆ pode ser atribuída às condições do cozimento que favorecem a atividade da fitase natural contida em alguns ingredientes vegetais (GREINER; KONIETZNY, 1999), e não pela exposição a temperaturas elevadas isoladamente. Outros autores não detectaram redução significativa nos níveis de fitato em ingredientes de origem vegetal termicamente tratados, o que sustenta a tese que o fitato é uma molécula termicamente estável (MITTAL *et al.*, 2013; PONTOPPIDAN; PETTERSSON; SANDBERG, 2007).

Além da cocção e tratamento térmico, a malteação de grãos também foi avaliada como possível alternativa para a redução dos níveis de fitato. A malteação consiste na indução da germinação de uma semente e na sua interrupção, em determinado ponto, por meio de secagem ou torra. Entretanto, essa forma de processamento não foi capaz de reduzir os níveis de fitato em alguns cereais, sendo necessária a moagem e a reincubação dos grãos em condições favoráveis à atividade da fitase natural, para assim promover a inativação do fitato (LARSSON; SANDBERG, 1992). Outra alternativa para reduzir a quantidade de IP₆ é a germinação de grãos de cereais e legumes, como a soja, que pode reduzir o seu conteúdo de fitato em até 50% (MARERO *et al.*, 1991). Porém, assim como a malteação, a germinação visando a redução de IP₆ em grãos também não é uma alternativa eficiente e economicamente viável para a indústria de produção de alimentos, devido ao longo período de tratamento (MITTAL *et al.*, 2013).

A desfitinização de ingredientes vegetais também pode ser feita com o uso de fitases exógenas (KUMAR *et al.*, 2011). Essa técnica consiste no tratamento por incubação dos ingredientes moídos em solução aquosa contendo a enzima fitase à determinada temperatura e por um período de tempo estipulado. Após a incubação, os ingredientes tratados são secos em estufa, e em seguida incorporados aos demais ingredientes para a confecção da dieta. Os protocolos para este tipo de tratamento, níveis de enzima, tempo e temperatura de incubação, assim como seus efeitos podem variar (CAO *et al.*, 2008; CARTER; SAJJADI, 2011; NWANNA *et al.*, 2008; ROY *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2011). Apesar desta variação, os benefícios deste método geralmente estão relacionados ao aumento do ganho de peso, eficiência alimentar e digestibilidade de nutrientes como proteína, minerais e lipídeos (LEMO; TACON, 2017). O mecanismo de hidrólise do fitato pela enzima fitase será descrito posteriormente.

Adicionalmente às técnicas de desfitinização e à germinação, o desenvolvimento de cultivares que produzam grãos e sementes com níveis reduzidos de fitato também pode ser

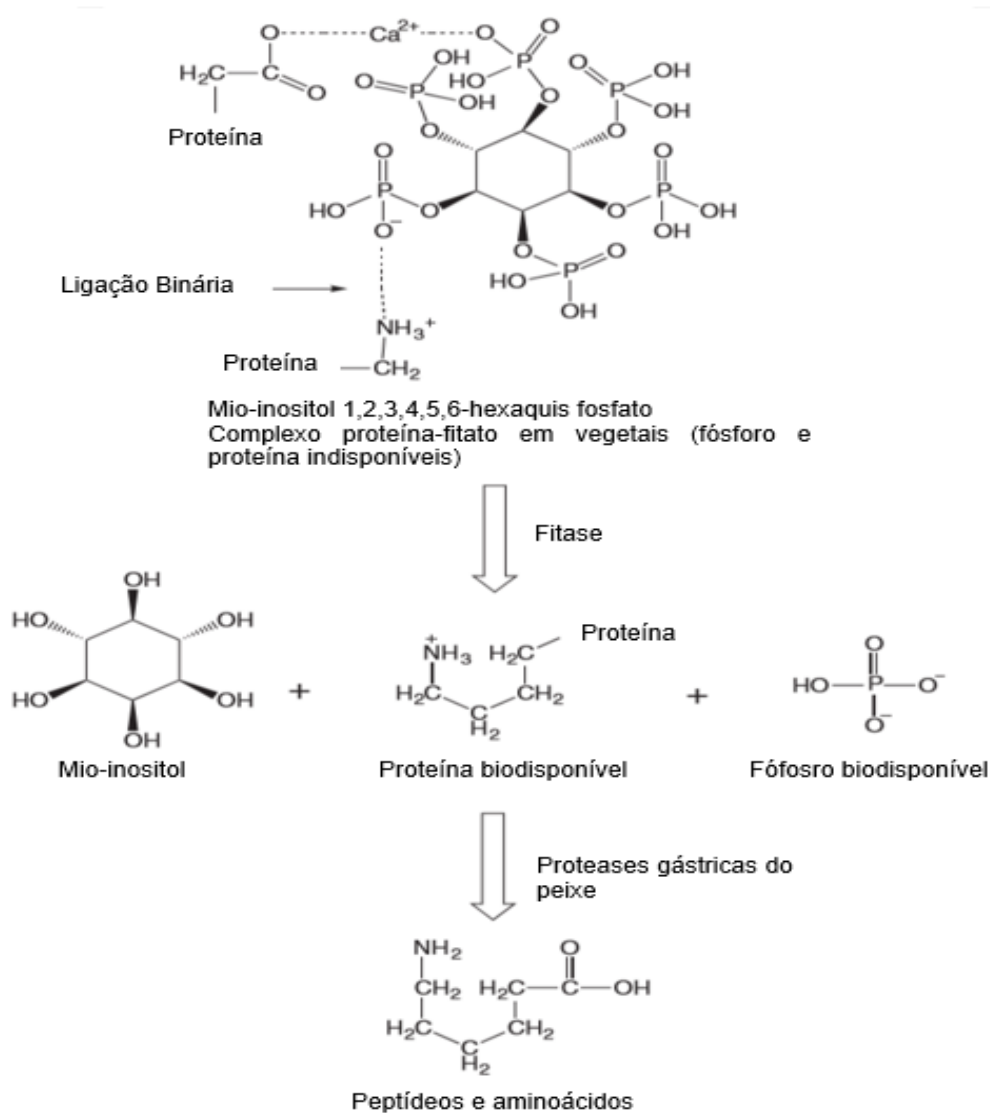
considerado uma alternativa para reduzir os impactos negativos deste fator antinutricional. De fato, estudos com mutações genéticas de vegetais, como a soja, têm sido realizados para identificar cultivares que produzam grãos com menores níveis de fitato e resultados promissores foram obtidos (LANDAU-ELLIS; PANTALONE, 2009; SUNDARAMOORTHY *et al.*, 2016; YUAN *et al.*, 2007). Linhas de cultivares de trigo e cevada, com baixo teor de fitato, foram testadas para carpas e benefícios relacionas à digestibilidade de fósforo e deposição de gordura na carcaça foram observados (MALÝ *et al.*, 2017). Apesar destes aspectos positivos, algumas mutações genéticas podem afetar negativamente a viabilidade e a quantidade de sementes produzidas por certas cultivares geneticamente modificadas (YUAN *et al.*, 2007). Mesmo com os efeitos positivos das diferentes técnicas de desfitinização, melhoramento genético e outras alternativas, a suplementação de fitase em dietas de peixe tem sido considerada a forma mais viável para reduzir os efeitos negativos do fitato (CASTILLO; GATLIN, 2015; KUMAR *et al.*, 2012; NRC, 2011).

1.4. Fitase

A fitase é uma fosfatase que catalisa a hidrólise do ácido fítico e de seus sais mistos, resultando em inositol e fósforo inorgânico livre (MULLANEY, EDWARD; DALY; ULLAH, 2000). A hidrólise do fitato, promovida pela fitase, ocorre por meio de reações sequenciais de desfosforilação, a partir do hexafosfato até monofostato de mio-inositol ($IP_6 \Rightarrow IP_5 \Rightarrow IP_4 \Rightarrow IP_3 \Rightarrow IP_2 \Rightarrow IP_1$), gerando ésteres de fosfato de mio-inositol menores e mio-inositol livre (GREINER; KONIETZNY, 2010). Desta forma o fósforo presente no ácido fítico e seus sais tornam-se disponíveis para o animal, o que possibilita a redução nos níveis de inclusão deste mineral às dietas (CAO *et al.*, 2007) ou pode dispensar a suplementação de fósforo na ração para as tilápias (PHROMKUNTHONG; GABAUDAN, 2006). A hidrólise desta molécula pode ser parcial e disponibilizar também outros nutrientes que estejam ligados ao fitato, como

minerais, aminoácidos, proteínas e outros (DERSJANT-LI *et al.*, 2015). Um diagrama hipotético para o mecanismo geral de ação da fitase em dietas de peixes pode ser observado na figura 4.

Figura 4. Mecanismo de ação da fitase em peixes.



Fonte: Adaptado de Kumar; Sinha; Kajbaf (2019)

A enzima fitase pode ser encontrada em grãos, diferentes microrganismos (fungos ou bactérias) e no trato gastrintestinal de alguns animais, produzida pela mucosa intestinal ou microbiota associada (KUMAR *et al.*, 2010). A primeira fitase comercial foi introduzida no mercado em 1991, sendo de origem fúngica (*Aspergillus niger*). Oito anos após este evento, a primeira fitase bacteriana (*Escherichia coli*) foi documentada e considerada mais eficiente que a fitase fúngica (RODRIGUEZ *et al.*, 1999; RODRIGUEZ; HAN; LEI, 1999). Isso está relacionado à elevada resistência a proteases endógenas e à alta afinidade ao fitato na forma de IP₆ e IP₅ de fitases bacterianas, em comparação a fitases de origem fúngica (DERSJANT-LI *et al.*, 2015; RODRIGUEZ *et al.*, 1999). Estas características impulsionaram estudos com fitases de origem fúngica e bacteriana, sendo amplamente utilizadas como aditivos na alimentação animal atualmente (MITTAL *et al.*, 2013).

Além das diferentes fontes, existem distintas formas de classificação para a fitase relacionadas ao local de início da desfosforilação e às propriedades catalíticas e estruturais da enzima. Com base no local de início das reações de desfosforilação, o Comitê de Nomenclatura de Enzimas da União Internacional de Bioquímica classificou as fitases em dois grupos: 3-fitase (EC 3.1.3.8) e 6-fitase (EC 3.1.3.26) (SELLE; RAVINDRAN, 2007). Segundo estes autores, o primeiro grupo dá início às reações no carbono 1 ou 3 do anel de mio-inositol, enquanto o segundo inicia as reações em regiões próximas ao carbono 5. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) reconhecem uma terceira classificação para esta enzima, 5-fitase (EC 3.1.3.72), que inicia a desfosforilação do fitato no carbono de posição 5, existindo apenas uma fitase que pertence a este grupo (KUMAR; SINHA; KAJBAF, 2019). A maior parte das fitases microbianas são do tipo 3, com exceção para as tipo 6 produzidas pela bactéria *E. coli*, enquanto fitases de origem vegetal são do tipo 6, exceto a da soja (tipo 3) (KUMAR; SINHA, 2018).

As fitases podem ser classificadas como ácidas ou básicas de acordo com o seu pH ideal. As chamadas fitases ácidas tem pH ótimo entre 2.5 e 6.0 e as alcalinas 6.0 e 8.0 (VIJAYARAGHAVAN; PRIMIYA; PRAKASH VINCENT, 2013; YIN; ZHENG; KANG, 2007). Em relação às propriedades estruturais e catalíticas das fitases, essas enzimas ainda podem ser enquadradas em diferentes classes: fitase β -hélice (FBA), fosfatases ácidas de histidina (HFA), fosfatase ácido “purple” (FAP) e fosfatase proteína tirosina (KUMAR; SINHA; KAJBAF, 2019; MULLANEY; ULLAH, 2007). Essa classificação é feita de acordo com especificidade de substrato, conformação estrutural, faixas de pH, mecanismos de ação e outras propriedades bioquímicas de cada enzima (MULLANEY; ULLAH, 2007).

Dentre as diferentes classes, fitases do grupo ácidas, HFA, de origem bacteriana ou fúngica (3 ou 6) são as mais estudadas e utilizadas na alimentação animal (KUMAR *et al.*, 2012). Algumas das principais fitases comerciais podem ser observadas na tabela 3. Fitases ácidas possuem ampla especificidade de substrato, sendo capazes de disponibilizar entre 5 e 6 moléculas de fósforo fítico (GREINER; CARLSSON; ALMINGER, 2000; HAYAKAWA *et al.*, 1990). Entretanto, fitases básicas possuem especificidade de substrato restrita, sendo incapazes de hidrolisar ésteres menores, como IP₃, IP₂ e IP₁; portanto, disponibilizam menos fósforo fítico que as fitases HFA (GREINER *et al.*, 2002; OH *et al.*, 2004).

Tabela 3. Características de algumas fitases comerciais

Tipo	Origem	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Nome comercial
3	<i>A. niger</i>	2.5 – 5.5	65	Natuphos®
3	<i>A. niger</i>	6.0	–	Allzyme® SSF
3	<i>A. niger</i>	2.5	–	Finase® P/L
6	<i>Escherichia coli</i>	4.5	55	Phyzyme® XP
6	<i>Escherichia coli</i>	4.5	–	Quantum®
6	<i>Escherichia coli</i>	–	–	Quantum Blue®
6	<i>Escherichia coli</i>	3.4 – 5.0	58	OptiPhos®
6	<i>Peniophora lycii</i>	4.0 – 4.5	50–55	Ronozyme®
6	<i>Citrobacter braakii</i>	–	–	Ronozyme Hiphos®
6	<i>Buttiauxella spp.</i>	3.5 – 4.5	60	Axtra® PHY

Fonte: Adaptado de Dersjant-li *et al.* (2015)

A atividade da fitase pode ser expressa em diferentes unidades, (FU, U, FYT, PU, FTU), (KUMAR; SINHA, 2018), sendo FTU a forma mais comum. Conceitualmente, 1 unidade de fitase (FTU) é a quantidade de enzima que disponibiliza 1 μ mol de fosfato inorgânico, por minuto de reação, a partir de 0.0051 molL⁻¹ do substrato fitato de sódio, a 37°C e pH 5.5 (ENGELN *et al.*, 1994). Como toda enzima, a fitase, pode ter a sua atividade afetada por diferentes fatores, relacionados à enzima ou ao animal. Entre os fatores inerentes à enzima pode-se citar: faixas ótimas de pH e temperatura, resistência à degradação de enzimas endógenas e desnaturação por calor (ROMANO; KUMAR, 2018). A maioria das fitases microbianas tem uma faixa de temperatura ótima que varia entre 40°C e 60°C, valores acima dos parâmetros fisiológicos normais da maioria dos animais (IGBASAN *et al.*, 2000). A eficiência dessas enzimas pode ser afetada negativamente em alguns animais, como peixes, que têm sua temperatura corporal próxima a do seu ambiente, variando de 20° até 30°C ou de 5° a 20°C para peixes tropicais e de água fria respectivamente, sendo necessária a suplementação de níveis mais elevados para peixes em comparação a outros animais (MORALES; MARQUEZ; *et al.*, 2016).

Como mencionado anteriormente, grande parte das fitases utilizadas na alimentação animal tem pH ótimo entre 3.5 e 8.0, compatível com valores observados ao longo do trato gastrointestinal de alguns animais. Entretanto, a solubilidade do fitato é dependente do pH do meio, sendo maior em regiões ácidas, e algumas espécies de peixes agástricas não conseguem acidificar a dieta para favorecer a atividade de fitases ácidas; portanto, o uso de fitases alcalinas é recomendado (LIU; SU; LUO, 2012). Mesmo com o uso de fitases alcalinas a sua eficácia pode ser comprometida devido à baixa solubilidade do fitato em regiões que o pH não seja suficientemente ácido, como o intestino de peixes agástricos (KUMAR; SINHA; KAJBAF, 2019). A resistência à digestão enzimática também é um fator que influencia consideravelmente a atividade da fitase. A atividade de enzimas endógenas como a tripsina e pepsina já foi

evidenciada em peixes, suínos e aves e estas podem degradar a fitase, reduzindo a sua atividade (DERSJANT-LI *et al.*, 2015). Estudos mais recentes, *in vitro* e *in vivo*, compararam a resistência de fitases bacterianas e fúngicas, de diferentes espécies, e as enzimas provenientes de bactérias *E. coli* foram mais resistentes à degradação de enzimas endógenas de peixes, aves e suínos (AUGSPURGER *et al.*, 2003; ELKHALIL *et al.*, 2007; MORALES; MOYANO; MARQUEZ, 2011; ONYANGO; BEDFORD; ADEOLA, 2005). Além da digestão proteica, a exposição da fitase a temperaturas comuns ao processamento de ração para animais pode afetar a sua atividade. Temperaturas superiores a 70°C podem reduzir consideravelmente a atividade da maioria das fitases comercializadas (MRUDULA *et al.*, 2019). Sabe-se que o processamento de dietas extrudadas pode atingir até 150°C e a peletização pode chegar até 95°C (AUTIN, 1997; MRUDULA *et al.*, 2019; RASMUSSEN, 2010), comprometendo a atividade da fitase adicionada junto à mistura de ingredientes.

Adicionalmente, o conteúdo da dieta e algumas características fisiológicas dos animais também podem afetar a atividade da fitase. Dentre os componentes da dieta, os níveis de cálcio e outros minerais podem alterar a eficácia da fitase. Isso acontece primariamente pela alta concentração de cálcio nas dietas, em relação aos outros minerais, assim como pela afinidade do fitato ao cálcio. Em dietas para não ruminantes os níveis de cálcio são mais elevados que outros minerais, por isso o fitato tende a se complexar com este mineral, formando precipitados em regiões de pH próximas à alcalinidade (CAO *et al.*, 2007; GRYNSPAN; CHERYAN, 1983). O cálcio pode ainda aumentar o pH da digesta, atuar como um inibidor de fitase por competição de sítios de ligação e altas relações Ca:P podem influenciar negativamente na atividade desta enzima, sendo recomendadas relações entre 1:1 e 1:4 a fim de otimizar a atividade de fitase em peixes (CAO *et al.*, 2007). A quantidade de outros minerais e os diferentes ingredientes vegetais contidos na ração também podem afetar a atividade da fitase. Esse tipo de influência é relacionada às interações mineral-fitato assim como pela quantidade e

tipo de fitato presente nos ingredientes que compõem a dieta do animal (DERSJANT-LI *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2007).

1.5. Fitase na nutrição de peixes

A suplementação de enzimas para peixes, como a fitase, pode aumentar a disponibilidade de diferentes nutrientes, contribuindo para a sustentabilidade da aquicultura. De fato, estudos comprovaram que a suplementação desta enzima melhora principalmente a disponibilidade de minerais, como o fósforo, em dietas para peixes. Cao *et al.* (2008) verificaram, com a tilápia-do-Nilo, que a inclusão de 1000 FTU kg⁻¹ aumentou a disponibilidade de fósforo e o coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da dieta. Estas constatações corroboram com a pesquisa de Bock *et al.* (2006), em que níveis de 1500 e 2000 FTU kg⁻¹ de ração melhoraram o aproveitamento do fósforo das dietas possibilitando a redução da suplementação de fósforo proveniente de fontes não renováveis sem prejudicar o desempenho dos animais, aumentando, assim, a sustentabilidade da atividade aquícola.

Outros trabalhos verificaram a correlação dose-resposta positiva para níveis de suplementação de fitase e biodisponibilidade de nutrientes e energia para tilápia-do-Nilo em diferentes fases. Com níveis de inclusão de 1000 FTU kg⁻¹ em dietas formuladas exclusivamente com ingredientes de origem vegetal a enzima foi capaz de promover aumentos expressivos para ganho de peso (9%), biodisponibilidade de proteína (3%), extrato etéreo (26%), energia bruta (4%) e fósforo (27%) em relação às dietas sem suplementação de fitase (GODA, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2007). A inclusão de níveis mais elevados de fitase, entre 2000 e 3000 FTU kg⁻¹, para a mesma espécie, determinaram um aumento de 8%, 3%, 41% e 16% no coeficiente de digestibilidade para energia e proteína bruta, fósforo e matéria mineral, respectivamente (NWANNA; BELLO, 2014; PONTES *et al.*, 2019). Adicionalmente, estudos demonstram que a disponibilidade de micro minerais também é positivamente afetada pela

inclusão de diferentes níveis de fitase em dietas baseadas em alimentos de origem vegetal para espécies de água doce (GONÇALVES *et al.*, 2005; VERLHAC-TRICHET *et al.*, 2014).

Apesar da identificação da atividade desta enzima em algumas espécies de peixes, a quantidade de fitase presente no trato gastrointestinal da maioria dos teleósteos não é suficiente para melhorar significativamente a hidrólise do ácido fítico (ELLESTAD *et al.*, 2003). Logo, o uso de fitase exógena em dietas para peixes possui papel importante para aumentar a sustentabilidade da atividade e reduzir seus impactos ambientais, como descargas de fósforo e nitrogênio que podem induzir à proliferação de organismos que venham a diminuir o oxigênio dissolvido na água e poluir o ambiente (DEBNATH *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2012).

Além dos benefícios relacionados à biodisponibilidade de nutrientes, energia e redução na emissão de poluentes provenientes da aquicultura, a fitase pode, ainda, reduzir o uso de fontes não renováveis de fósforo. Uma vez que essa enzima propicia a utilização do fósforo fítico contido nos farelos vegetais, a necessidade da suplementação de fósforo inorgânico vindo em sua maioria da rocha fosfatada, pode ser reduzida nas dietas baseadas em ingredientes de origem vegetal (MULLANEY; DALY; ULLAH, 2000).

Mesmo com os benefícios ambientais e nutricionais promovidos pela inclusão de fitase em dietas para peixes, a sua incorporação pré-processamento de dietas, principalmente extrudadas, permanece um desafio. Isso se deve à instabilidade térmica da enzima. A maioria das fitases comerciais já produzidas tem a sua atividade consideravelmente reduzida ao serem expostas a temperaturas superiores a 70°C (MRUDULA *et al.*, 2019). Uma vez que o processo de extrusão pode atingir temperaturas de até 150°C, a inclusão desta enzima pré-processamento torna-se inviável. Portanto, o uso comercial de fitase em dietas comerciais para peixes é limitado e significativamente menor quando comparado à adição em dietas para suínos e aves (MORALES; MARQUEZ; *et al.*, 2016).

Devido às particularidades relacionadas à estabilidade térmica da fitase, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas com o intuito de reduzir impactos em sua atividade durante o processamento de dietas extrudadas para peixes. Uma dessas estratégias é a desfitinização prévia dos ingredientes de origem vegetal com o uso de fitase. Nwanna *et al.* (2008) testaram diferentes métodos de suplementação de fitase em dietas peletizadas para carpa comum e concluíram que a desfitinização pré-processamento foi o método mais eficiente quando comparado com os outros métodos. Outros trabalhos foram conduzidos e comprovaram a eficácia da desfitinização de ingredientes vegetais, promovendo melhoras no conteúdo nutricional e na utilização de minerais (Zn, Ca, P, Mn, Fe, Cu), proteína e lipídeos para peixes; porém a variação no tempo de incubação e outras condições químicas do processo faz com que mais estudos sejam necessários para a utilização segura deste método (LEMOS; TACON, 2017).

A adição de fitase em sua forma líquida, pós processamento da dieta, também foi uma alternativa considerada e testada em diferentes trabalhos. Este método de inclusão promove benefícios nutricionais para peixes e foi considerado o meio mais utilizado para evitar perda de atividade enzimática por exposição à temperaturas elevadas durante o processamento de dietas (VERLHAC; VIELMA; GABAUDAN, 2007), porém uma série de fatores podem inviabilizar a sua utilização em escala industrial. Apesar de evitar reduções na atividade da enzima promovidas pela exposição a altas temperaturas, o tempo despendido, maquinário específico para cada tamanho de pélete, a desuniformidade na distribuição da enzima e reduzido tempo de prateleira são fatores que podem reduzir o uso desta estratégia (MRUDULA *et al.*, 2019).

Outra técnica amplamente utilizada para a incorporação de fitase em dietas para animais é conhecida por revestimento. Essa tecnologia confere proteção térmica à enzima durante o processo de peletização e é a estratégia mais utilizada para a suplementação de fitase em dietas animais (GILBERT; COONEY, 2010; MRUDULA *et al.*, 2019). Entretanto, alguns

componentes utilizados para promover o aumento da estabilidade térmica da fitase podem também reduzir a sua ação no trato gastrintestinal animal. Essa redução foi observada nos trabalhos de Vandenberg *et al.* (2011) que testaram a suplementação de fitase em microcápsulas de alginato-quitosano para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), e observaram menor disponibilização de fósforo quando compararam este método à inclusão de fitase nas dietas em sua forma livre. Outras formas de estabilização da fitase como revestimento com alofano sintético e óxido de ferro, nano partículas de ouro, nanofibras de casca de arroz e até mesmo o encapsulamento em leveduras foram desenvolvidas e aumentaram consideravelmente a resistência térmica e proteolítica da enzima, porém sua eficácia em organismos animais não foi comprovada (ISAKOVA *et al.*, 2018; MENEZES-BLACKBURN *et al.*, 2011; RATHNAYAKE *et al.*, 2018; SHANKAR *et al.*, 2015).

A busca por microrganismos desconhecidos e técnicas de recombinação de proteínas para a produção de fitases com termorresistência elevada também têm sido tema de pesquisa. Estudos têm sido realizados com micro-organismos que vivem em diferentes temperaturas, como termófilos (22 a 75°C) e mesófilos (20 a 46°C), por meio de técnicas de recombinação genéticas avançadas ou de *screening* convencionais para identificar novas fontes de fitases naturalmente termoestáveis (USHASREE *et al.*, 2017). Porém, a produção de enzimas termorresistentes à partir destes micro-organismos e das técnicas supracitadas ocorrem apenas para fins acadêmicos e novos trabalhos são necessários para viabilizar sua implementação em nível industrial (DREJER *et al.*, 2018).

1.6. A digestibilidade dos alimentos

O Coeficiente de Digestibilidade Aparente (CDA) informa o teor de nutrientes que o peixe digere e absorve, em relação à quantidade contida em determinado alimento ingerido (OGUNJI *et al.*, 2009). Pesquisas com a tilápia-do-Nilo sobre esta temática são realizadas desde meados

dos anos 80, podendo-se destacar Hanley (1987) que determinou o CDA para a proteína e a energia bruta de diferentes alimentos para essa espécie e Pezzato *et al.* (2002) quando determinaram com a tilápia-do-Nilo os CDA da matéria seca e do extrato etéreo de 17 alimentos. Segundo o NRC (2011), a obtenção de uma ração balanceada, que atenda às reais exigências nutricionais para determinada espécie de peixe, somente é possível a partir do conhecimento do CDA dos alimentos a serem utilizados em sua formulação.

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para se determinar o CDA de alimentos e nutrientes das dietas dos peixes. Dentre elas pode-se observar o método de coleta por sucção anal (WINDEL; FOLZTZ; SAROKON, 1978), extrusão por pressão manual abdominal (HAJEN *et al.*, 1993), coleta em aquários com recipiente para concentração de fezes por decantação (CHO; SLINGER, 1979), dissecação intestinal (AUSTRENG, 1978) e contenção metabólica (SMITH *et al.*, 1971). Entretanto, o método indireto de coleta em aquários é mais confiável que outros métodos diretos, como a dissecação intestinal (PEZZATO *et al.*, 2002). Os métodos diretos consistem na mensuração da quantidade total de alimento ingerido e de fezes excretadas pelo animal. Já na metodologia indireta, um marcador inerte é utilizado no sentido de conhecer quanto do nutriente ingerido foi realmente digerido. Este segundo método é o mais indicado, uma vez que o marcador permite que a determinação de um CDA seja realizado apenas com uma fração das fezes colhidas no ambiente aquático e não exige a quantificação do alimento fornecido ao animal (CHOUBERT, 1999; MORALES *et al.*, 1999). Cada metodologia possui as suas particularidades e a escolha de um método de coleta de fezes para estudos de digestibilidade deve ser guiada por conhecimentos nutricionais e fisiológicos. O conteúdo da dieta, a frequência alimentar, o tempo e intervalo entre cada coleta, o formato das fezes, entre outros fatores podem influenciar diretamente na determinação de coeficientes de digestibilidade (ABIMORAD; CARNEIRO, 2004; BELAL, 2005; DIEMER *et al.*, 2011; PEZZATO *et al.*, 2002).

Para obtenção dos valores digestíveis de determinado nutriente recomenda-se cuidado especial objetivando minimizar a lixiviação dos nutrientes da ração e das fezes, tanto durante a alimentação, quanto no momento da coleta das excretas. Nestes estudos recomenda-se o emprego do sistema proposto por Cho (1987) e Cho, Cowey e Watanabe (1985) conhecido como “Sistema Guelph”. No Brasil utiliza-se o sistema apresentado por Cho (1987) com algumas adaptações. Este sistema é composto por um aquário com base inclinada onde as fezes se depositam por decantação para posterior coleta. O sistema adaptado por Pezzato et al. (2002) é composto por aquários de fibra de vidro com fundo cônico aliado a outro sistema, chamado de “aquários de alimentação” onde os animais ficam alojados em gaiolas. Neste sistema os peixes são alimentados durante o dia e transferidos à noite para o aquário de coleta evitando que a ração seja somada às fezes.

1.7. Polímeros de óleos vegetais e aplicações

O desenvolvimento de polímeros de óleos vegetais se deu pela necessidade de se criar materiais termoplásticos utilizados rotineiramente, mas que fossem originados de fontes renováveis para substituição dos materiais de origem fóssil (ALARCON *et al.*, 2017). Desta forma, pesquisas relacionadas às técnicas de polimerização de óleos vegetais, como o óleo de soja, e sobre as características físicas dos polímeros têm se tornado cada vez mais frequentes. Os óleos naturais e a sua composição têm sido tema de pesquisas para a criação de polímeros, tintas, vernizes e resinas de revestimento à base de água, além de polímeros altamente ramificados, que não agredam o meio ambiente e que reduzam, ou não contenham, o uso de solventes orgânicos voláteis em sua produção (LLIGADAS *et al.*, 2013; SHARMA; KUNDU, 2006).

Adicionalmente às aplicações industriais, polímeros de origem vegetal têm sido amplamente utilizados na biomedicina. Selantes e colas cirúrgicas, adesivos farmacológicos e carreadores de fármacos, dentre outros produtos, são produzidos a partir de polímeros de óleos

vegetais (LLIGADAS et al., 2013). Além de agirem como carreadores, polímeros feitos com base em óleo de rícino (ácido sebácico e ricinoleico) também são utilizados para a administração lenta de fármacos a base de peptídeos e sulfato de gentamicina, contendo substâncias anestésicas locais (KRASKO *et al.*, 2007; KRASKO; KUMAR; DOMB, 2006; SHIKANOV; DOMB; WEINIGER, 2007).

Polímeros obtidos a partir de óleos vegetais podem ser metabolizados por animais, uma vez que o óleo vegetal é a matéria prima principal. Segundo Shit e Shah (2014), polímeros classificados como comestíveis podem ser facilmente digeridos por humanos e outras espécies animais, sem prejuízos à saúde. Pesquisadores do Departamento de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Bauru-SP, desenvolveram um polímero de óleo de soja que se enquadra nessa classificação.

Além de comestível, o referido polímero foi produzido seguindo os princípios da “Química Verde” (DE ALMEIDA; ALARCON; BANNACH, 2016). A química verde surgiu à partir de especulações iniciadas em meados de 1960 sobre possíveis soluções para a redução e tratamento adequado de resíduos químicos industriais, para promover o desenvolvimento sustentável deste setor (LANCASTER, 2016; LENARDÃO; DABDOUB; BATISTA, 2003). A partir disso e de conferências internacionais, surgiu o conceito de química verde, que é o desenvolvimento e a aplicação de tecnologias para reduzir ou eliminar o uso e a produção de substâncias que agredam o ambiente e ameacem saúde humana (LANCASTER, M., 2002). Essa prática ganhou reconhecimento após a publicação de seus doze princípios básicos (tabela 4), que devem necessariamente ser seguidos, para a sua implementação em um processo produtivo ou outras atividades (ANASTAS; WARNER, 1998). Este conceito é relacionado à tecnologia limpa, reutilização de resíduos e tem sido implementado em indústrias e instituições de ensino e pesquisa, afim de promover o avanço sustentável de diferentes atividades (SHELDON, 2016).

Além de se tratar de produto metabolizável por animais e sustentável do ponto de vista ambiental, o polímero em questão possui outras características que podem favorecer o seu uso na alimentação animal. Por ser um material com maior porosidade que outros polímeros à base de óleo vegetal (DE ALMEIDA; ALARCON; BANNACH, 2016) e ter baixa condutibilidade de calor, pode funcionar como carreador de alguns componentes nutricionais, além de ser um potencial termoprotetor. Devido à sua porosidade, este polímero é capaz de adsorver diferentes materiais, como o verde de malaquita e corantes, entre outras substâncias testadas laboratorialmente. Recentemente, o polímero de soja foi submetido ao contato com uma solução de fitase no laboratório de análise térmica e polímeros (UNESP-Bauru), sendo capaz de adsorvê-la com um coeficiente de adsorção de 0,66% (34,8 FTU/g de polímero).

Alguns polímeros à base de óleo vegetal, como o polímero utilizado neste estudo, apresentam baixa condutividade térmica. Isso pode ser observado devido à relação inversamente proporcional existente entre a resistência térmica do material e a sua capacidade de condução térmica (LEE *et al.*, 2006). Como o polímero utilizado nesta pesquisa possui boa resistência térmica, com estabilidade física até 160°C (DE ALMEIDA; ALARCON; BANNACH, 2016), ele conseqüentemente apresenta baixa capacidade de condução térmica. Tais características evidenciam que este produto pode ser um veículo termoprotetor em potencial para a enzima fitase, que poderia ser submetida a altas temperaturas durante o processo de extrusão na confecção da ração. Aliado à sua resistência a temperaturas elevadas, o polímero ainda é consideravelmente resistente ao pH ácido, água e outros solventes. Sabendo-se que o pH estomacal da tilápia-do-Nilo varia de 1,4 a 1,9 (MORIARTY, 1973), o complexo “polímero-fitase” pode passar pelo estômago sem sofrer degradação. Assim, o polímero pode evitar que a fitase sofra redução em sua atividade por ação de enzimas digestivas e do pH estomacal, atingindo o intestino do animal com maior atividade.

Outra característica que favorece o uso do óleo polimerizado como protetor para a fitase é a faixa de pH em que o mesmo é hidrolisado. O polímero sofre hidrólise em contato com soluções alcalinas (DE ALMEIDA; ALARCON; BANNACH, 2016) liberando gradativamente a enzima durante o processo de degradação, como ocorre com outros polímeros de origem vegetal (ICKOWICZ *et al.*, 2016). Considerando que o pH intestinal das tilápias tende a alcalinidade, variando de 5,5 a 8,5 (MORIARTY, 1973; PAYNE, 1978), parte-se do pressuposto que a liberação da enzima ocorrerá gradativamente promovida pela hidrólise lenta do complexo “polímero-enzima” ao atingir esta região. Portanto, além de termoprotetor, o material possui características que podem diminuir ou evitar a redução da atividade da enzima ao entrar em contato com os ácidos estomacais da tilápia, uma vez que a fitase possui pH padrão ótimo de ação no valor de 5,5 (AOAC, 2000). Adicionalmente, o polímero pode proteger a enzima contra a hidrólise promovida pela pepsina, protease encontrada no estômago da tilápia. Por se tratar de molécula proteica, a fitase pode ser hidrolisada por proteases endógenas do trato digestório dos animais não ruminantes (DERSJANT-LI *et al.*, 2015). Assim, o polímero de óleo de soja tende a proteger a fitase da hidrólise proteica, podendo melhorar a eficiência enzimática da fitase na porção inicial do intestino de tilápias-do-Nilo.

Tabela 4. Os doze princípios da Química verde.

1. Prevenção Evitar a produção do resíduo é melhor do que tratá-lo ou “limpá-lo” após sua geração. 2. Economia de Átomos Deve-se procurar desenhar metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final. 3. Síntese de Produtos Menos Perigosos Sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente. 4. Desenho de Produtos Seguros Os produtos químicos devem ser desenhados de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos. 5. Solventes e Auxiliares mais seguros O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas.

Tabela 4. (continua)

6. Busca pela Eficiência de Energia

A utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes.

7. Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima

Sempre que técnica- e economicamente viável, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida em detrimento de fontes não renováveis.

8. Evitar a Formação de Derivados

A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos.

9. Catálise

Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos.

10. Desenho para a Degradação

Os produtos químicos precisam ser desenhados de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente.

11. Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição

Será necessário o desenvolvimento futuro de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas.

12. Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes

As substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Métodos de Coleta de Fezes e Determinação dos Coeficientes de Digestibilidade da Fração Protéica e da Energia de Alimentos para o Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Revista Brasileira de Zootecnia, 2004, v.33, n.5, p.1101-1109, 2004.

ALARCON, R.T., VINÍCIUS DE ALMEIDA, M.; RINALDO, D.; BANNACH, G. Synthesis and thermal study of polymers from soybean, sunflower, and grape seed maleinated oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 119, n. 10, p. 1–6, 2017.

ANASTAS, P. T; WARNER, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford: Oxford University Press, 1998.

AOAC - Official Methods of Analysis. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists, 17th ed, 2000.

AUGSPURGER, N.R.; WEBEL, D.M.; LEI, X.G.; BAKER, D.H. Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. *Journal of Animal Science*, v. 81, n. 2, p. 474–483, 2003.

AUTIN, M. Commercial aquafeed manufacture and production. *Cahiers Options Mediterraneennes*, v. 22, p. 79–104, 1997.

BELAL, I. E. A review of some fish nutrition methodologies. *Bioresource technology*, v. 96, n. 4, p. 395–402, 2005.

BOCK, C.L; PEZZATO, L.E.; CANTELMO, O.Â.; 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.

BOCK, C.L; PEZZATO, L.E.; CANTELMO, O.Â.; BARROS, M.M. Phytase in diets for Nile tilapia in the growth period. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 5 suppl, p. 1455–1461, 2007.

BOHN, L.; MEYER, A.S.; RASMUSSEN, S.K. Phytate: Impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University: Science B*, v. 9, n. 3, p. 165–191, 2008.

BORBA, M. R.; SÁ, M. V. C.; ABREU, J. S. Vitaminas e minerais. In: CYRINO, J. E. P.; FRACALOSS, D. M. *Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. 1. ed. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2016. p. 121–166.

BOUWMAN, A.F.; BEUSEN, A.H.W.; OVERBEEK, C.C.; BUREAU; D.P.; PAWLOWSKI, M.; GLIBERT, P.M. Hindcasts and future projections of global inland and coastal nitrogen and phosphorus loads due to finfish aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, v. 21, n. 2, p. 112–156, 2013.

BUENO, G.W.; FEIDEN, A.; NEU, D.H.; LUI, T.A.; WÄCHTER, N.; BOSCOLO, W.R. Digestibilidade do fósforo em dietas como estratégia nutricional para redução de efluentes da tilapicultura. *Arq. bras. med. vet. zootec*, p. 183–191, 2012.

BUREAU, D.P.; HUA, K. Towards effective nutritional management of waste outputs in

aquaculture, with particular reference to salmonid aquaculture operations. *Aquaculture Research*, v. 41, n. 5, p. 777–792, 2010.

CAO, L.; YANG, Y.; WANG, W.M.; YAKUPITIYAGE, A.; YUAN, D.R.; DIANA, J.S. Effects of pretreatment with microbial phytase on phosphorous utilization and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, v. 14, n. 2, p. 99–109, 2008.

CAO, L.; WANG, W.; YANG, C.; YANG, Y.; DIANA, J.; YAKUPITIYAGE, A.; LUO, Z.; LI, D. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 4, p. 497–507, 2007.

CARTER, C.G.; SAJJADI, M. Low fishmeal diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using soy protein concentrate treated with graded levels of phytase. *Aquaculture International*, v. 19, n. 3, p. 431–444, 2011.

CASTILLO, S.; GATLIN, D.M. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture*, v. 435, p. 286–292, 2015.

CHISLOCK, M. F.; DOSTER, E.; ZITOMER, R. A.; WILSON, A. E. Eutrophication: Causes, Consequences, and Controls in Aquatic Ecosystems. *Nature Education Knowledge*, v. 4, p. 10, 2013.

CHO, C. Y. La energía en la nutrición de los peces. *Nutrición en acuicultura*, v. 2, p. 197–243, 1987.

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

CHOUBERT, G. Nutrient digestibility in fish: Methodological aspects. *Cybium*, v. 1, p. 112–125, 1999.

CHO, S.Y.; SLINGER, S.J. Apparent digestibility measurements in feedstuffs for rainbow trout. *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*. Halver, J.E. and Tiews, K. (Eds.). Heenemann, Berlin, p. 234–247, 1979.

DE ALMEIDA, M.V.; ALARCON, R.T.; BANNACH, G. Synthesis and thermal studies of new soybean and grape seed oil-based polymers: Clean and efficient pathway using green

Chemistry principles. *Brazilian Journal of Thermal Analysis*, v. 5, n. 1, p. 16–20, 2016.

DEBNATH, D.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; JAIN, K.K.; YENGKOKPAM, S.; MUKHERJEE, S.C. Mineral status of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings in relation to supplemental phytase: absorption, whole-body and bone mineral content. *Aquaculture Research*, v. 36, n. 4, p. 326–335, 2005.

DERSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; SCHULZE, H.; PARTRIDGE, G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, n. 5, p. 878–896, 2015.

DIAZ, Robert J.; ROSENBERG, Rutger. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 926–929, 2008.

DIEMER, O.; BOSCOLO, W.R.; SIGNOR, A.A. SARY, C.; NEU, D. H.; FEIDEN, A. Níveis de fósforo total na alimentação de juvenis de jundiá criados em tanquesrede. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.41, n.4, p.559-563, 2011.

DREJER, E.; HAKVÅG, S.; IRLA, M.; BRAUTASET, T. Genetic Tools and Techniques for Recombinant Expression in Thermophilic Bacillaceae. *Microorganisms*, v. 6, n. 2, p. 42, 2018.

DUMAS, A.; LALIBERTE, G.; LESSARD, P.; DE LA NOÛE, J. Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Aquacultural Engineering*, v. 17, n. 1, p. 57–68, 1998.

EDWARDS, P. Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends. *Aquaculture*, v. 447, p. 2–14, 2015.

ELKHALIL, E.A.I.; MÄNNER, K.; BORRISS, R.; SIMON, O. *In vitro* and *in vivo* characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. *British Poultry Science*, v. 48, n. 1, p. 64–70, 2007.

ELLESTAD, L.E.; DAHL, G.; ANGEL, R.; SOARES JR, J.H. The effect of exogenously administered recombinant bovine somatotropin on intestinal phytase activity and *in vivo* phytate hydrolysis in hybrid striped bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. *Aquaculture Nutrition*, v. 9, n. 5, p. 327–336, 2003.

ENGELLEN, A.J.; RANDSDORP, P.H.; SMIT, E.L. Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International*, v. 77, n. 3, p. 760–764, 1994.

FAO. *Fishery commodities classification | Coordinating Working Party on Fishery Statistics (CWP) | Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Disponível em: <<http://www.fao.org/cwp-on-fishery-statistics/handbook/aquaculture-statistics/en/>>. Acesso em: 13 dez. 2019.

FAO. *WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE*. Rome, 2018. Disponível em: <www.fao.org/publications>. Acesso em: 5 dez. 2019.

FITZSIMMONS, K. Prospect and potential for global production. *Tilapia: Biology, Culture and Nutrition*. New York, USA: Food Products Press, 2006. p. 51–72.

GATLIN III, D.M.; BARROWS, F.T.; BROWN, P.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, T.G.; HARDY, R.W.; HERMAN, E.; HU, G.; KROGDAHL, Å.; NELSON, R.; OVERTURF, K. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. *Aquaculture Research*, v. 38, n. 6, p. 551–579, 2007.

GILBERT, C.; COONEY, G. Thermostability of feed enzymes and their practical application in the feed mill. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Org.). *ENZYMES IN FARM ANIMAL NUTRITION*. 2nd. ed. CABI, Oxfordshire, UK, 2010. p. 249–259.

GODA, A.M.A.S. Effect of Dietary Soybean Meal and Phytase Levels on Growth, Feed Utilization and Phosphorus Discharge for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, v. 2, n. 4, p. 248–263, 2007.

GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; PADILHA, P.D.M.; BARROS, M.M. Apparent phosphorus availability in vegetable feedstuffs and supplementation of phytase enzyme for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 5, 2007.

GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; KLEEMAN, G.K.; ROCHA, D.F. 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. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 6, p. 2155–2163, 2005.

GREINER, R; KONIETZNY, U. Phytases: biochemistry, enzymology and characteristics

relevant to animal feed use. *Enzymes in farm animal nutrition*, 2010. p. 96–128.

GREINER, R.; FAROUK, A.; ALMINGER, M.L.; CARLSSON, N.G. The pathway of dephosphorylation of *myo* -inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 11, p. 986–994, 2002.

GREINER, R; CARLSSON, N.G.; ALMINGER, M.L. Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 84, n. 1, p. 53–62, 17, 2000.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Improving enzymatic reduction of *myo*-inositol phosphates with inhibitory effects on mineral absorption in black beans (*Phaseolus vulgaris* var. preto). *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 23, n. 3, p. 249–261, 1999.

GRYNSPAN, F.; CHERYAN, M. Calcium phytate: Effect of pH and molar ratio on in vitro solubility. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 60, n. 10, p. 1761–1764, 1983.

HAJEN, W.E.; BEAMES, R.M.; HIGGS, D.A.; DOSANJH, B.S. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water. 1. Validation of technique. *Aquaculture*, v. 112, n. 4, p.321-332, 1993.

HAJRA, A.; MAZUMDER, A.; VERMA, A.; GANGULY, D.P.; MOHANTY, B.P.; SHARMA, A.P. Antinutritional Factors in Plant Origin Fish Feed Ingredients: The Problems and Probable Remedies. *Advances in Fish Research*, p. 193–202, 2013.

HANLEY, F. The digestibility of foodstuffs and the effects of feeding selectivity on digestibility determinations in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). *Aquaculture*, v. 66, n. 2, p. 163–179, 1, 1987.

HAYAKAWA, T.; SUZUKI, K.; MIURA, H.; OHNO, T.; IGAUE, I. *Myo*-inositol polyphosphate intermediates in the dephosphorylation of phytic acid by acid phosphatase with phytase activity from rice bran. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 54, n. 2, p. 249–286, 1990.

HUSSENOT, J.; LEFEBVRE, S.; BROSSARD, N. Open-air treatment of wastewater from land-based marine fish farms in extensive and intensive systems: Current technology and future perspectives. ESME - Gauthier-Villars, 1998. p. 297–304.

IBGE. *Produtos de origem animal, por tipo de produto*. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>>. Acesso em: 5 dez. 2019.

ICKOWICZ, D.E.; ABTEW, E.; KHAN, W.; GOLOVANEVSKI, L.; STEINMAN, N.; WEINIGER, C.F.; DOMB, A.J. Poly (ester-anhydride) for controlled delivery of hydrophilic drugs. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 31, n. 2, p. 127–139, 2016.

IGBASAN, F.A.; MÄNNER, K.; MIKSCH, G.; BORRISS, R.; FAROUK, A.; SIMON, O. Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. *Archives of Animal Nutrition*, v. 53, n. 4, p. 353–373, 2000.

ISAKOVA, E.P.; SERDYUK, E.G.; GESSLER, N.N.; TRUBNIKOVA, E.V.; BIRYUKOVA, Y.K.; EPOVA, E.Y.; DERYABINA, Y.I.; NIKOLAEV, A.V. A New Recombinant Strain of *Yarrowia lipolytica* Producing Encapsulated Phytase from *Obesumbacterium proteus*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, v. 481, n. 1, p. 201–204, 2018.

JOBLING, M. Fish nutrition research: past, present and future. *Aquaculture International*, v. 24, n. 3, p. 767–786, 2016.

JONGE, L.H. De; TESTERINK, J.; JONGBLOED, A.W. *Interactions between protein, phytate and microbial phytase (Natuphos) : Phase 1: an in vitro approach*, 1997.

KAWASAKI, Nobuyuki *et al.* Release of Nitrogen and Phosphorus from Aquaculture Farms to Selangor River, Malaysia. *International Journal of Environmental Science and Development*, v. 7, n. 2, p. 113–116, 2016.

KIES, A.K.; DE JONGE, L.H.; KEMME, P.A.; JONGBLOED, A.W. Interaction between Protein, Phytate, and Microbial Phytase. In Vitro Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 5, p. 1753–1758, 2006.

KRASKO, M.Y.; GOLENSER, J.; NYSKA, A.; NYSKA, M.; BRIN, Y.S.; DOMB, A.J. Gentamicin extended release from an injectable polymeric implant. *Journal of Controlled Release*, v. 117, n. 1, p. 90–96, 2007.

KRASKO, M.Y.; KUMAR, N.; DOMB, A.J. Protein and Peptide Release from in Situ Gelling Polymer Introduction Over the past decade, developments in the field of biotechnology have led to the cloning, characterization, and commercial availability of many clinically useful

proteins and pepti. v. 930, p. 2461–2463, 2006.

KUMAR, V.; SINHA, A.K.; MAKKAR, H.P.; DE BOECK, G.; BECKER, K. Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 96, n. 3, p. 335–364, 2012.

KUMAR, V.; SINHA, A. K. General Aspects of Phytases. *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*, 2018. p. 53–67.

KUMAR, V.; SINHA, A.K.; KAJBAF, K. Phytic Acid and Phytase Enzyme. *Whole Grains and their Bioactives*. Wiley, 2019. p. 467–483.

KUMAR, V.; SINHA, A.K.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, v. 120, n. 4, p.945-959, 2010.

KUMAR, V.; MAKKAR, H.P.; DEVAPPA, R.K; BECKER, K. Isolation of phytate from *Jatropha curcas* kernel meal and effects of isolated phytate on growth, digestive physiology and metabolic changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 9, p. 2144–2156, 2011.

LANCASTER, M. Principles and Concepts of Green Chemistry. *GREEN CHEMISTRY: An Introductory Text*. Royal Society of Chemistry, 2002. p. 1–20.

LANCASTER, M. Principles and concepts of Green Chemistry. *Green Chemistry 3rd Edition: An Introductory Text*. Royal Society of Chemistry, 2016. p. 1–23.

LANDAU-ELLIS, D; PANTALONE, V. R. Marker-assisted backcrossing to incorporate two low phytate alleles into the Tennessee soybean cultivar 5601T. Induced plant mutations in the genomics era. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2009, p. 316–318.

LARSSON, M.; SANDBERG, A.S. Phytate Reduction in Oats during Malting. *Journal of Food Science*, v. 57, n. 4, p. 994–997, 1992.

LEE, G.W.; PARK, M.; KIM, J.; LEE, J.I.; YOON, H.G. Enhanced thermal conductivity of polymer composites filled with hybrid filler. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, v. 37, n. 5, p. 727–734, 2006.

LEESON, S. Recent advances in fat utilization by poultry. Recent advances in animal nutrition in Australia, p. 170–181, 1993.

LEMOS, D.; TACON, A.G.J. Use of phytases in fish and shrimp feeds: a review. *Reviews in Aquaculture*, v. 9, n. 3, p. 266–282, 2017.

LENARDÃO, E.J.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, C.F. “Green Chemistry” – os 12 princípios da Química Verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

LIENER, I.E. Implications Of Antinutritional Components In Soybean Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 34, n. 1, p. 31–67, 1994.

LIU, L.W.; SU, J.; LUO, Y. Effect of partial replacement of dietary monocalcium phosphate with neutral phytase on growth performance and phosphorus digestibility in gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch). *Aquaculture Research*, v. 43, n. 9, p. 1404–1413, 2012.

LLIGADAS, G.; RONDA, J.C.; GALIA, M.; CADIZ, V. Renewable polymeric materials from vegetable oils: A perspective. *Materials Today*, v. 16, n. 9, p. 337–343, 2013.

LOEWUS, F.A. Biosynthesis of phytate in food grains and seeds. *Food Phytates*, p. 53–61, 2001.

MALÝ, O.; MAREŠ, J.; ZUGÁRKOVÁ, I.; MAREŠ, L. The Effect of Using Low-Phytate Cereal Varieties on Phosphorus Digestibility and Selected Production Indices. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65(5), pp.1567-1577, 2017.

MARERO, L.M.; PAYUMO, E.M.; AGUINALDO, A.R.; MATSUMOTO, I.; HOMMA, S. Antinutritional factors in weaning foods prepared from germinated cereals and legumes. *Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie = Food science + technology*, 1991.

MENEZES-BLACKBURN, D.; JORQUERA, M.; GIANFREDA, L.; RAO, M.; GREINER, R.; GARRIDO, E.; DE LA LUZ MORA, M. Activity stabilization of *Aspergillus niger* and *Escherichia coli* phytases immobilized on allophanic synthetic compounds and montmorillonite nanoclays. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 20, p. 9360–9367, 2011.

MITTAL, A.; GUPTA, V.; SINGH, G.; YADAV, A.; AGGARWAL, N.K. Phytase: A Boom in Food Industry. *Octa Journal of Biosciences Octa Journal of Biosciences Octa. J. Biosci*, v.

1, n. 2, p. 158–169, 2013.

MORALES, G.A.; DENSTADLI, V.; COLLINS, S.A.; MYDLAND, L.T.; MOYANO, F.J.; ØVERLAND, M. Phytase and sodium diformate supplementation in a plant-based diet improves protein and mineral utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, v. 22, n. 6, p. 1301–1311, 2016.

MORALES, G. A.; MARQUEZ, L.; HERNÁNDEZ, A.J.; MOYANO, F.J. Phytase effects on protein and phosphorus bioavailability in fish diets. *Phytate Destruction - Consequences for Precision Animal Nutrition*. Wageningen Academic Publishers, 2016. p. 129–165.

MORALES, G.A.; MOYANO, F.J.; MARQUEZ, L. In vitro assessment of the effects of phytate and phytase on nitrogen and phosphorus bioaccessibility within fish digestive tract. *Animal Feed Science and Technology*, v. 170, n. 3–4, p. 209–221, 2011.

MORALES, A. E.; CARDENETE, G.; SANZ, A.; DE LA HIGUERA, M. Re-evaluation of crude fibre and acid-insoluble ash as inert markers, alternative to chromic oxide, in digestibility studies with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v. 179, n. 1-4, p. 71-79, 1999.

MORIARTY, D. J.W. The physiology of digestion of blue-green algae in the cichlid fish, *Tilapia nilotica*. *Journal of Zoology*, v. 171, n. 1, p. 25–39, 6, 1973.

MRUDULA, U.V.; JAISWAL, A.K.; KRISHNA, S.; PANDEY, A. Thermostable phytase in feed and fuel industries. *Bioresource Technology*, v. 278, n.1, p. 400–407, 2019.

MULLANEY, E. J.; ULLAH, A.H.J. Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications. *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*, 2007. p. 97–110.

MULLANEY, E.J.; DALY, C.B.; ULLAH, A.H.J. *Advances in phytase research. Advances in Applied Microbiology*. Academic Press Inc, 2000.

NAYLOR, S.; BRISSON, J.; LABELLE, M.A.; DRIZO, A.; COMEAU, Y. Treatment of freshwater fish farm effluent using constructed wetlands: The role of plants and substrate. *Water Science and Technology*, v. 48, n. 5, p. 215–222, 2003.

NRC. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press, 2011.

NWANNA, L.C.; KOLAHSA, M.; EISENREICH, R.; SCHWARZ, F.J. Pre-treatment of

dietary plant feedstuffs with phytase and its effect on growth and mineral concentration in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 92, n. 6, p. 677–682, 2008.

NWANNA, L. C.; BELLO, O. S. Effect of Supplemental Phytase on Phosphorus Digestibility and Mineral Composition in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Aquaculture*, v. 4, n. 15, p. 89–95, 2014.

OATWAY, L.; VASANTHAN, T.; HELM, J.H. Phytic acid. *Food Reviews International*, v. 17, n. 4, p. 419–431, 2001.

OGUNJI, J.; PAGEL, T.; SCHULZ, C.; KLOAS, W. Apparent digestibility coefficient of housefly maggot meal (magma) for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and carp (*Cyprinus carpio*). *Asian Fisheries Science*, v. 22, n. 4, p. 1095–1105, 2009.

OH, B.C.; CHOI, W.C.; PARK, S.; KIM, Y.O.; OH, T.K. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004

OLADOSU, Y.; RAFII, M.Y.; ABDULLAH, N.; HUSSIN, G.; RAMLI, A.; RAHIM, H.A.; MIAH, G.; USMAN, M. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 30, n. 1, p. 1–16, 2016.

ONYANGO, E.M.; BEDFORD, M.R.; ADEOLA, O. Efficacy of an evolved *Escherichia coli* phytase in diets of broiler chicks. *Poultry Science*, v. 84, n. 2, p. 248–255, 2005.

OSTI, J.A.S.; MORAES, M.A.B.; CARMO, C.F.; MERCANTE, C.T.J. Fluxo de nitrogênio e fósforo na produção de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) a partir da aplicação de indicadores ambientais. *Brazilian Journal of Biology*, v. 78, n. 1, p. 25–31, 2018.

PAERL, H.W. Coastal eutrophication and harmful algal blooms: Importance of atmospheric deposition and groundwater as “new” nitrogen and other nutrient sources. *Limnology and Oceanography*, v. 42, n. 5, p. 1154–1165, 1997.

PAYNE, A. I. Gut pH and digestive strategies in estuarine grey mullet (*Mugilidae*) and tilapia (*Cichlidae*). *Journal of Fish Biology*, v. 13, n. 5, p. 627–629, 1978.

PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; PINTO, L.G.Q.; FURUYA, W.M.; BARROS, M.M.;

ROSA, G.J.M.; LANNA, E.A.T. Avaliação de dois métodos de determinação do coeficiente de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 24, p. 965, 2002.

PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M.; PINTO, L.G.Q.; FURUYA, W.M.; PEZZATO, A.C. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 4, p. 1595–1604, 2002.

PHROMKUNTHONG, W.; GABAUDAN, J. Used of microbial phytase to replace inorganic phosphorus in sex-reversed red tilapia: 1 dose response. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 28, n. 4, p. 731–743, 2006.

PONTES, T.C.; FRANÇA, W.G.; DUTRA, F.M.; PORTZ, L.; BALLESTER, E.L.C. Evaluation of the Phytase Enzyme in granulated and liquid forms for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archivos de Zootecnia*, v. 68, n. 261, p. 158–163, 2019.

PONTES, T.C. Nova geração de fitase líquida em dietas para tilápias do nilo. 2019.

PONTOPPIDAN, K.; PETTERSSON, D.; SANDBERG, A-S. Peniophora lycii phytase is stabile and degrades phytate and solubilises minerals in vitro during simulation of gastrointestinal digestion in the pig. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 87, n. 14, p. 2700–2708, 2007.

QUIRRENBACH, H.R.; KANUMFRE, F.; ROSSO, N.D.; CARVALHO FILHO, M.A. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe (II) e Fe (III) Behaviour of phytic acid in the presence of iron (II) and iron (III). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 1, p. 24–32, 2009.

RASMUSSEN, D. K. Difference in heat stability of phytase and xylanase products in pig feed. Variation, 2010.

RATHNAYAKE, U.A.; SENAPATHI, T.; SANDARUWAN, C.; GUNAWARDENE, S.; KARUNARATNE, V.; KOTTEGODA, N. Rice bran nanofiber composites for stabilization of phytase. *Chemistry Central Journal*, v. 12, n. 1, p. 28, 2018.

RAVINDRAN, V. Effect of natuphos phytase on the bioavailability of protein and amino acids—A review. *Keeping Current*, v. 6, 2000.

REDDY, N.R.; PIERSON, M.D.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Phytates in Cereals and Legumes. CRC Press, 1989.

REDDY, N. R; SATHE, S. K. Indoduction. *Food phytates*. CRC Press, 2001. p. 1–4.

RICHE, M.; GARLING, D. L. Effect of phytic acid on growth and nitrogen retention in tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Nutrition*, v. 10, n. 6, p. 389–400, 2004.

RICHE, M.; TROTTIER, N.L.; KU, P.K.; GARLING, D.L. Apparent digestibility of crude protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 25, n. 3, p. 181, 2001.

RODRIGUEZ, E; PORRES, J.M.; HAN, Y.; LEI, X.G. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 365, n. 2, p. 262–267, 1999.

RODRIGUEZ, E.; HAN, Y.; LEI, X.G. Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 257, n. 1, p. 117–123, 1999.

ROMANO, N.; KUMAR, V. Phytase in animal feed. *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*. Elsevier Inc, 2018. p. 73–88.

RORIZ, G.D.; DELPHINO, M.K.D.V.C.; GARDNER, I.A.; GONÇALVES, V.S.P. Characterization of tilapia farming in net cages at a tropical reservoir in Brazil. *Aquaculture Reports*, v. 6, p. 43–48, 2017.

ROY, T.; BANERJEE, G.; DAN, S.K.; GHOSH, P.; RAY, A.K. Improvement of nutritive value of sesame oilseed meal in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings after fermentation with two phytase-producing bacterial strains isolated from fish gut. *Aquaculture International*, v. 22, n. 2, p. 633–652, 2014.

SAMPAIO, F.G.; LOSEKANN, M.E.; LUIZ, A.J.B.; NEVES, M.C.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; RODRIGUES, G.S. Monitoramento e gestão ambiental da piscicultura em tanques-rede em reservatórios. *Informe Agropecuário*, v. 34, p. 1–11, 2013.

SCHULZ, C.; GELBRECHT, J.; RENNERT, B. Treatment of rainbow trout farm effluents in constructed wetland with emergent plants and subsurface horizontal water flow. *Aquaculture*, v. 217, n. 1–4, p. 207–221, 2003.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v. 135, n. 1-2, p. 1-41, 2007.

SHANKAR, S.; SONI, S. K.; DAIMA, H. K.; SELVAKANNAN, P. R.; KHIRE, J. M.; BHARGAVA, S. K.; BANSAL, V. Charge-switchable gold nanoparticles for enhanced enzymatic thermostability. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 17, n. 33, p. 21517–21524, 2015.

SHARMA, V.; KUNDU, P. P. Addition polymers from natural oils-A review. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 31, n. 11, p. 983–1008, 2006.

SHELDON, R. A. Green chemistry and resource efficiency: Towards a green economy. *Green Chemistry*, v.18, n. 11, p. 3180-3, 2016

SHIKANOV, A.; DOMB, A. J.; WEINIGER, C. F. Long acting local anesthetic-polymer formulation to prolong the effect of analgesia. *Journal of Controlled Release*, v. 117, n. 1, p. 97–103, 2007.

SHIT, S. C.; SHAH, P. M. Edible Polymers: Challenges and Opportunities. *Journal of Polymers*, v. 2014, p. 1–13, 2014.

SIENER, R.; HEYNCK, H.; HESSE, A. Calcium-Binding Capacities of Different Brans under Simulated Gastrointestinal pH Conditions. In Vitro Study with ⁴⁵Ca. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 9, p. 4397–4401, 2001.

SMITH, M.H.; BLESSING, R.; CHELTON, J.G.; GENTRY, J.B.; GOLLEY, F.B.; MCGINNIS, J.T. Determining density for small mammal populations using a grid and assessment lines. *Acta theriol*, v.16, p.105-125, 1971.

SUNDARAMOORTHY, J.; SEO, Y.J.; PARK, G.T.; LEE, J.D.; PARK, S.K.; SEO, H.S.; SONG, J.T. Isolation of soybean mutants with high and low inorganic phosphorus. *Journal of Applied Biological Chemistry*, v. 59, n. 3, p. 261–264, 2016.

GONZÁLEZ, T. F. U.; HERRERA-SILVEIRA, J. A.; AGUIRRE-MACEDO, M. L. Water

quality variability and eutrophic trends in karstic tropical coastal lagoons of the Yucatán Peninsula. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 76, n. 2, p. 418–430, 2008.

USHASREE, M.V.; SHYAM, K.; VIDYA, J.; PANDEY, A. Microbial phytase: Impact of advances in genetic engineering in revolutionizing its properties and applications. *Bioresource Technology*, v. 245, p. 1790–1799, 2017.

VANDENBERG, G.W.; SCOTT, S.L.; SARKER, P.K.; DALLAIRE, V.; DE LA NOÛE, J. Encapsulation of microbial phytase: Effects on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology*, v. 169, n. 3–4, p. 230–243, 2011.

VERDEGEM, M.C.J. Nutrient discharge from aquaculture operations in function of system design and production environment. *Reviews in Aquaculture*, v. 5, n. 3, p. 158–171, 2013.

VERLHAC-TRICHET, V.; VIELMA, J.; DIAS, J.; REMA, P.; SANTIGOSA, E.; WAHLI, T.; VOGEL, K. The Efficacy of a Novel Microbial 6-Phytase Expressed in *Aspergillus oryzae* on the Performance and Phosphorus Utilization of Cold- and Warm-Water Fish: Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, and Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 45, n. 4, p. 367–379, 2014.

VERLHAC, V.; VIELMA, J.; GABAUDAN, J. The use of phytase in aquatic feeds. *Aquafeed Horizons*, Victam, 2007.

VIJAYARAGHAVAN, P.; PRIMIYA, R.R.; PRAKASH VINCENT, S.G. Thermostable Alkaline Phytase from *Alcaligenes* sp. in Improving Bioavailability of Phosphorus in Animal Feed: In Vitro Analysis. *ISRN Biotechnology*, v. 2013, p. 1–6, 2013.

WANG, F.; YANG, Y.H.; HAN, Z.Z.; DONG, H.W.; YANG, C.H.; ZOU, Z.Y. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase-sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture International*, v. 17, n. 2, p. 143–157, 2009.

WHITE, P.; PHILLIPS, M.; BEVERIDGE, M. Review of Environmental Impact, Site Selection and Carrying Capacity Estimation for Small-scale Aquaculture in Asia. *Site Selection and Carrying Capacities for Inland and Coastal Aquaculture*, p. 231–251, 2013.

WINDELL, J.T.; FOLTZ, J.W.; SAROKON J.A. Methods of fecal collection and nutrient leaching in digestibility studies. *The Progressive fish-culturist*, v. 40, n 2, p 51-55, 1978

WINDISCH, W.; Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of essential trace elements. 2002, v. 372, n. 3, 2002. p. 421–425.

WISE, A. Dietary factors determining the biological activities of phytate. In *Nutrition Abstracts and Reviews (series A)*, v. 53, 1983. p. 791–806.

YANG, Y.H.; WANG, Y.Y.; LU, Y.; LI, Q.Z. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus excretion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, v. 19, n. 3, p. 405–419, 2011.

YIN, Q. Q.; ZHENG, Q. H.; KANG, X. T. Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. *Animal Feed Science and Technology*, v. 132, n. 3–4, p. 341–350, 2007.

YUAN, F.J.; ZHAO, H.J.; REN, X.L.; ZHU, S.L.; FU, X.J.; SHU, Q.Y. Generation and characterization of two novel low phytate mutations in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 115, n. 7, p. 945–957, 2007.

ZHAO, F.J.; MOORE, K.L.; LOMBI, E.; ZHU, Y.G. Imaging element distribution and speciation in plant cells. *Trends in Plant Science*, v. 19, n. 3, p. 183–192, 2014.

Capítulo II

“A plant-based polymer as a potential thermoresistant carrier to phytase in Nile tilapia diets”

ABSTRACT

A soybean oil-based polymer, produced following the “Green Chemistry” principles, was assessed as a thermoresistant vehicle to phytase aiming to improve enzyme stability during fish diet processing. A digestibility assay was designed in a factorial model (3x2) with three phytase inclusion methods: coating post processing (CPP), polymer-associated to enzyme (PAE) and no enzyme inclusion (NE); and two feed processing methods: extrusion or pelletizing. Phytase was supplemented at 1500 phytase units kg⁻¹. There was a significant positive interaction for apparent digestibility coefficient (ADC) values of phosphorus (P), calcium (Ca), mineral matter (MM) and crude fat (CF) ($p < 0.05$). Coating determined higher ADC values for P, Ca and MM, followed by PAE in extruded diets ($p < 0.05$). For pelletized diets, PAE determined higher ADC values for P, Ca, and CF, followed by coating ($p < 0.05$). These results suggest that the polymer may be a potential protective carrier for phytase and other thermo labile additives.

Key words: Enzyme carrier, aquafeed processing, phytase stabilization, digestibility, *Oreochromis niloticus*.

1. Introduction

Aquaculture is one of the most promising industrial activities worldwide, expanding faster than other main food production sectors (FAO, 2018). In Brazil, fish farming grew about 10% in the past two years and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most cultivated species, representing 52.6% of the total amount produced (IBGE, 2019). Being such a fast-growing activity that uses public water resources, efforts are needed to avoid the negative impacts on water quality of water bodies promoted by intensive fish farming in cage systems. Indeed, the most pressing issues related to this activity are water pollution as well as eutrophication (Roriz, Delphino, Gardner & Gonçalves, 2017). The amount of phosphorus, nitrogen and other nutrients discharged by fish farming activities can promote algae blooms and water eutrophication, releasing toxins and reducing dissolved oxygen in the water, which

leads to massive fish death and restrain human consumption (Chislock, Doster, Zitomer, & Wilson, 2013; Huang et al., 2015) Indeed, this issue may be aggravated by the increasingly use of plant ingredients in aquafeeds. Plant feedstuffs have become an economically viable alternative, replacing fish meal in aquafeeds, however those ingredients contain indigestible forms of phosphorus and several anti-nutritional factors that can reduce nutrient bioavailability to fish and directly contribute to water eutrophication (Lemos & Tacon, 2017; Morales, Marquez, Hernández & Moyano, 2016).

One possible solution to reduce the impacts of fish waste on the environment is supplementing phytase. Phytase is a phosphatase that produces free inorganic phosphorus from phytate molecules and its benefic application in fish nutrition has been widely reported (Cheng, Chen, Lei, Feng & Wang, 2016; Li, Zhang, Chowdhury, Zhang & Leng, 2019). Phytate is an antinutritional factor found in plant feedstuffs that can reduce the bioavailability of energy and several nutrients; alternatively, it can also be a phosphorus source when hydrolyzed by phytase, reducing the use of non-renewable sources of phosphorus (Hassaan, Soltan, Agouz & Badr, 2013; Kumar, Sinha, Makkar, De Boeck & Becker, 2012). Several studies have shown the benefits of adding phytase in fish plant-based diets minimizing the nitrogen and phosphorus discharge in the environment. By supplementing 1500 FTU Kg⁻¹ in diets for Nile tilapia, Goda (2007), quantified a 43% reduction of P-discharge in the water. Moreover, the supplementation of 4000 FTU Kg⁻¹ in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reduced both phosphorus and nitrogen discharge to aquatic environment in 50 and 13%, respectively (Morales et al., 2016).

Despite its potential positive effects, phytase supplementation in commercial fish diets is still limited by its thermolability, once the extrusion process can reach up to 150°C (Autin, 1997). Nearly all microbial phytases have its activity considerably reduced when exposed to temperatures higher than 70°C, and the most resistant product available in the market

(Phyzyme[®] XP TPT, Danisco Animal Nutrition, Marlborough, Wilts, UK) claims to keep high activity rates when exposed up to 95°C (Mrudula, Jaiswal, Krishna & Pandey, 2019). Thus, several approaches have been developed aiming to enhance phytase thermo stability and protease resistance, including post-processing inclusion (coating), thermostability engineering, as well as phytase immobilization and stabilization in nanofibers and polymers. However, most of these approaches are costly and elaborate or could impair phytase activity by altering its structure (Mrudula et al., 2019).

Among the different approaches, edible polymers have drawn attention in the past few years, and may be a viable alternative to improve phytase heat-resistance. These polymers are produced from renewable sources and were primarily developed to replace synthetic materials used as food package. Apart from replacing plastic, these polymers have been used for different purposes such as drug, antioxidant and antimicrobial carriers and can be consumed by animals without any harm (Shit & Shah, 2014). The polymer investigated in this trial is produced from soybean oil and glycerol by an efficient and fast pathway, meeting all the requirements of the Green chemistry. Besides being environmentally friendly, the polymer is resistant to temperatures up to 160° C without suffering any physical alterations. Another important characteristic of this compound is its ability to resist acidic, but not an alkaline pH (De Almeida, Turra Alarcon & Bannach, 2016); which could be interesting during the transit of a dietary additive through the gastrointestinal tract of most teleosts. Considering these positive aspects, this soybean oil-based polymer was chosen to be tested as a potential thermoresistant vehicle to phytase in Nile tilapia diets.

2. Material and Methods

2.1. Experimental diets and phytase incorporation

Six practical, iso nutrient and isoenergetic plant-based diets were formulated (Table 1) meeting Nile tilapia requirements (Furuya, 2010; NRC, 2011). The ingredients were ground and mixed with water (25% of dry weigh for extruded diets and 45% for the pelletized ones). Following that, the diets were processed in a single-screw laboratory extruder (Exteec, Ribeirão Preto, SP, Brazil) or in a pelletizing machine (Ação Científica, Piracicaba, SP, Brasil) and then oven dried (45° C, 24 h). The extrusion and pelletizing methods were chosen in order to expose the polymer to different processing temperatures (120°C and 72°C, respectively). Fish and diets were randomly distributed to each tank following a factorial design (3x2) with three phytase inclusion methods (coating post processing (CPP), polymer-associated (PAE), no enzyme inclusion (NE)) and two feed processing methods (extrusion or pelletizing).

The enzyme supplementation level was 1500 phytase units kg^{-1} (FTU kg^{-1}) based on a previous study (Bock, Pezzato, Cantelmo & Barros, 2006). This commercial phytase (microbial and granulated) contains 5000 FTU g^{-1} , and maintain a considerable activity (approximately 69,30%) when exposed to temperatures up to 85°C and pH from 2.5 to 6.5. FTU is the quantity of enzyme that liberates 3.3% of inorganic orthophosphate per minute from 30.6 μmol sodium phytate at pH 5.5 and a temperature of 37 °C (Engelen, van der Heeft, Randsdorp & Smit, 1994). All the diets were coated with carboxymethylcellulose. For the coating method with phytase, the enzyme was dissolved in water at 42°C, mixed with a solution of carboxymethylcellulose and then gradually spread over the diet, post processing, and mixed in an industrial blender for ten minutes. After that, all experimental diets were oven dried again (45°C, 3 hours). The polymer synthesis is divided in two steps. First, a reaction between maleic anhydride and glycerol is proceeded. Following that, soybean oil is added to the reaction system under agitation and heat, accordingly to the patent BR 10 2016 01805-6 (Alarcon, Almeida & Bannach, 2016). The enzyme was incorporated and quantified in the polymer: 1g of polymer contained 34.8 FTU.

2.2. Digestibility assessment

Juvenile Nile tilapia (140 ± 4.3 g) were kept in twelve tubular plastic net cages (120 L; 15 fish per unit), housed in a recirculating water system composed by twelve 250 L circular feeding tanks. For sampling the feces, a modified Guelph system containing six 300 L cylindrical, conical-bottomed tanks were used following the methodology described by Pezzato et al. (2002). The water temperature ($26.3 \pm 0.6^\circ\text{C}$), dissolved oxygen ($6.2 \pm 0.15\%$), pH (6.5 ± 0.19), total ammonia ($0.02 \pm 0.41\text{ppm}$) in both systems were controlled and measured weekly using a YSI 556® multiprobe system (YSI Environmental, Yellow Springs, OH) and a commercial test kit for total ammonia (Alcon®, Camboriú, SC, Brazil). Fish were fed the basal diet during an adaptation period of ten days. After that, fish were fed the experimental diets four times a day (8:00 am, 11:00 am, 2:00 pm, 5:00 pm) until apparent satiation. At 6 pm six cages were transferred to the feces collecting system and were kept overnight. At 7:00 am in the next day, the fecal samples were collected from plastic vails attached to the bottom of the collecting tanks. The collected samples were oven-dried (50°C , 24 h), ground and stored at -20°C . Sampling was conducted for 20 days.

2.3. Chemical Analysis

The chemical composition of both feces and diets was analyzed following the standard procedures of A.O.A.C. (2000). Dry matter (DM) was determined via oven-drying at 105°C for 24 h. The Kjeldahl methodology was used in order to quantify the nitrogen content, and crude protein (CP) was then calculated as $\%N \times 6.25$. Crude fat (CF) concentration was assessed by Soxhlet extraction with petroleum ether. Mineral matter (MM) content was determined by burning samples at 550°C for 24 h, and gross energy (GE) was assessed using an adiabatic bomb calorimeter (C200, IKA, Staufen, BW, Germany). Phosphorus, calcium and Cr_2O_3 concentration of diets and feces were determined by Inductively Coupled Plasma Optical

Emission Spectrometry after nitroperchloric digestion using PerkinElmer Optima 8300 spectrometer, using the experimental conditions described in the manufacturer manual.

The dry matter (ADC_{DM}), gross energy (ADC_{GE}), crude protein (ADC_{CP}), crude fat (ADC_{CF}), phosphorus (ADC_P), calcium (ADC_{Ca}) digestibility values were calculated according to Cho & Slinger (1979): $ADC_{(N)} = 100 - \left[100 \left(\frac{\%Cr_2O_{3D}}{\%Cr_2O_{3F}} \right) \times \left(\frac{\%N_F}{\%N_D} \right) \right]$, in which ADC_n = apparent digestibility coefficients of a nutrient, $\%Cr_2O_{3d}$ = % chromic oxide in diet, $\%Cr_2O_{3f}$ = % chromic oxide in feces, $\%N_f$ = % of nutrients (or kJ g⁻¹ gross energy) in feces and $\%N_d$ = % of nutrients (or kJ g⁻¹ gross energy) in the diet.

2.4. Statistical Analysis

The statistical analysis was conducted using AgroEstat software (Barbosa & Júnior, 2009). The data were subject to two-way analysis of variance and Tukey's test ($p < 0.05$).

2.5. Simultaneous Thermogravimetry-Differential Thermal Analysis (TG-DTA)

The polymer, phytase and polymer-associated phytase TG-DTA curves were obtained employing the equipment STA 499 F3 (Netzsch), using a 200 µL α-alumina open crucible with 30 mg of sample. The equipment was set at a heating rate of 10.0 °C min⁻¹, using a dry air atmosphere with a flow rate of 50 mL min⁻¹ and a temperature range of 30.0–800.0 °C.

2.6. Ethics statement

The study was approved by the Animal Ethics Committee of Veterinary and Animal Science College, São Paulo State University (protocol 0198/2018 – CEUA).

3. Results and Discussion

There was a significant interaction between ADC_{MM} values ($p < 0.05$). As to extruded diets, coating achieved higher ADC values, followed by the PAE method, whereas in pelletized diets the different inclusion methods had no statistical difference from each other, but

determined higher ADC values than the NE (Table 3). It is well known that phytase supplementation increases the availability of several minerals in plant-based diets such as, P, and several trace minerals (Kumar et al., 2012). The mineral matter results represent the ADC of all mineral content combined. Similarly to this study, several authors observed benefits promoted by supplementing similar levels of phytase in plant-based diets for different fish species (Liebert & Portz, 2005; Verlhac-Trichet et al., 2014).

There was a significant interaction for ADC_P and ADC_{Ca} ($p < 0.05$). As to extruded diets, the higher ADC_P value were determined by CPP ($p < 0.05$), followed by PAE and NE (Table 2). Accordingly, ADC_{Ca} value was also enhanced by CPP, but PAE and NE results did not statistically differ ($p < 0.05$). By evaluating those results, it can be seen that the polymer protected the enzyme from heat denaturation to some extent. The temperatures during extrusion may reach up to 150°C compromising most of commercial phytase activity, including the one used in this trial (Autin, 1997; Mrudula et al., 2019). In the present study, the experimental extruder was set to heat the ingredient mixture up to 120°C and the outlet pellets temperature had an average temperature of 100°C. If the enzyme were added to the diets prior extrusion without being associated to the polymer its benefits would probably not be noticed. In fact, Pontes, França, Dutra, Portz & Ballester (2019) added 1500 FTU kg⁻¹ to a plant-based diet prior extrusion and found no positive effects regarding ADC_P values when comparing these results to those obtained from the control diet. The lack of positive effects was linked to heat denaturation during extrusion. The ADC_P results for coating obtained in this study corroborate to those found by the former authors who also tested a liquid phytase (1500 FTU kg⁻¹) incorporated by spray-coating after extrusion.

The findings of pelletized diets may demonstrate another characteristic of the polymer: protection from endogenous proteases attack. The PAE method promoted the highest values of ADC_P and ADC_{Ca} ($p > 0.05$, Table 2), which suggests that the polymer could have mitigated

phytase degradation by endogenous proteases in fish stomach, such as pepsin (Dersjant-Li, Awati, Schulze, & Partridge, 2015; Hepher, 1993). Indeed, it seems that the polymer released the enzyme in an intestinal region with more favorable chemical conditions, which could have optimized phytase activity and promoted better results in comparison to the other treatments. Compared to other phytase inclusion carriers in fish pelletized diets, the polymer determined superior ADC_P and ADC_{Ca} values. Vandenberg, Scott, Sarker, Dallaire and de la Noüe (2011), evaluating the efficacy of alginate phytase encapsulation in pelletized diets for rainbow trout observed that this method determined lower ADC_P and ADC_{Ca} values than the unencapsulated one. Nevertheless, further studies are necessary for investigating both the site and degree of enzyme release of the polymer, as well as its effects on nutrient availability.

Several authors also reported benefits in phosphorus and other minerals availability when the same level of phytase was added to Nile tilapia plant-based diets prior to pelletization (Bock et al., 2006; Bock, Pezzato, Cantelmo, & Barros, 2007). Although positive results were found by those authors, the ADC_P and ADC_{Ca} values found in the present study were considerable higher, which may be attributed to the protective effects provided by the PAE method.

The ADC_{CP} and ADC_{DM} were not affected ($p < 0.05$) by neither the inclusion nor processing methods (Table 3). Considering ADC_{CP} values, the lack of beneficial effects of phytase supplementation may not be related to enzyme denaturation by heat. Alternatively, these findings could be associated to the amino acid profile of the main protein source of the diet: soybean meal (SBM). The protein subunits of SBM have intermediate amounts of basic amino acids residues and an increment in protein solubility promoted by phytase is detected only at acidic pH (Morales, Rodríguez, Márquez, Díaz & Moyano, 2013). Some plant protein-sources with higher contents of basic amino acids (lysine, arginine and histidine), such as peas and broad bean meal, may have its nitrogen content reduced due to phytate high affinity to bind

to those amino acids, forming binary complexes mainly on acidic pH conditions, such as fish stomach (Anderson, 1985; Morales et al., 2013). Considering that, it seems that phytase is prone to be more effective in increasing protein bioavailability of diets containing ingredients with higher proportion of basic amino acids, which could partially explain the absence of effects in ADC_{CP} values found in this study along to the polymer releasing site of phytase.

Indeed, results regarding phytase effects on protein and energy ADC values of fish diets are controversial (Kumar et al., 2012). Despite that, there are evidences that phytate is prone to reduce the activity of proteases and amylase in the intestine of some fish species, consequently reducing the bioavailability of protein and energy (Khan & Ghosh, 2013). Several studies report benefits of phytase supplementation on energy availability while others did not find any benefits, depending on phytase level, species and diet content (Goda, 2007; Hassaan et al., 2013; Portz & Liebert, 2004; Vandenberg et al., 2011).

In the present study, there was no positive interaction for ADC_{CE} values ($p < 0.05$). This parameter was affected only by the processing methods, in which extrusion determined significantly higher ADC values than pelletizing (Table 3). Although there was no statistical difference, it can be noted that the PAE method determined higher values for ADC_{CE} . From that, it may be inferred that the effect of PAE method could also be positive in a growth performance trial, leading to higher weight gain and feed efficiency rates, as observed in other studies using the same phytase supplementation level (Bock et al., 2007), or even lower enzyme inclusion levels in plant-based diets for Nile Tilapia (Goda, 2007; Liebert & Portz, 2005; De Casto Silva, Furuya, Dos Santos, Fujii, Michelato & Iwamoto, 2008), however further studies are needed to evaluate the latter notions.

As to the ADC_{CF} values, no significant difference for inclusion methods was found ($p > 0.05$), only for the processing methods ($p < 0.05$, Table 3). The extruded diets resulted in lower values than the pelletized ones, except for diets containing phytase associated with the

polymer, which had no statistical difference ($p>0.05$). Although the enzyme inclusion methods results showed no statistical difference ($p>0.05$), when numerically compared a considerable difference can be observed, which could positively impact in a growth trial, as observed in a study supplementing similar levels of phytase for Nile tilapia (Goda, 2007). The PAE method determined higher ADC_{CF} values than CPP for extruded diets. It suggests, to some extent, that the polymer was able to protect the enzyme from proteases attack in the stomach and initial portion of intestine. Furthermore, the phytase supplemented using PAE method could have prevented the formation of lipophytins, a compound resulted from the interaction between phytate and lipids that may interact with other nutrients and seems to be involved in the formation of metallic soaps in fish and poultry intestinal lumen, which could have reduced the availability of energy from lipid sources (Kumar et al., 2012; Leeson, 1993).

Lastly, the TG/DTG-DTA (Figure S1) results provided important data about thermal stability for phytase, polymer and polymer-phytase association. The phytase and the polymer presented no structural degradation when exposed to temperatures of 240.5°C and 278.6°C, respectively, this degradation is related to mass loss and not to enzyme denaturation. Although, a difference between the curve of those two samples was identified, the polymer-phytase association TG curve (276.4°C) presented a similar pattern to the polymer curve, suggesting that phytase mass loss could have been prevented during fish feed processing.

4. Conclusion

Although the polymer did not fully protected phytase from heat denaturation, the results suggest that this new soybean oil polymer may be a potential thermo resistant carrier to phytase. Therefore, this product could increase phytase use, reducing the necessity of supplementing phosphorus through non-renewable sources and also decreasing the impacts of nutrient discharge in the aquatic environment. Even though these results are promising to the aquafeed industry, further studies are necessary to determine the extension of its protective properties, as well as

the enzyme level that would be necessary to associate to the polymer in order to achieve the same benefits as the coating method.

5. Acknowledgments

The authors are thankful to CAPES (grants. 024/2012 Pro-equipment), POSMAT/UNESP, FAPESP (grants 2017/08820-8, 2018/03460-6), and CNPq (grants. 301857/2018-0).

Conflict of interest statement

The are no conflicts of interest regarding the submission of this manuscript.

Table 1. Ingredient composition and proximate analysis of the diets

Ingredients	% (m/m)
Soybean meal	57.81
Corn	28.07
Wheat meal	6.10
DL-Methionine	0.36
L-tryptophan	0.02
L-Threonine	0.35
Dicalcium phosphate	2.05
BHT ^a	0.02
NaCl	0.10
Vitamin C ^b	0.09
Vit/Min premix ^c	0.63
Polymer^d	4.31
Chromic oxide ^e	0.10
Total	100
<i>Proximate Analysis</i>	
Crude Protein	31.06
Ether extract	1.28
Mineral Matter	5.58
Gross Energy	4328
Phosphorus	1.17
Calcium	0.87

a) Butylated hydroxytoluene - Antioxidant, b) Vitamin C Rovimix® Stay-35, DSBM, Heerlen, The Netherlands, c) Vitamin and mineral premix (kg of product): vitamin A, 1200000 UI; vitamin D3, 200000 UI; vitamin E, 12000 mg; vitamin K3, 2400 mg; vitamin B1, 4800 mg; vitamin B2, 4800 mg; vitamin B6, 4000 mg; vitamin B12, 4800 mcg; folic acid, 1200 mg; D-calcium pantothenate, 12000 mg; ascorbic acid, 48000 mg; biotin, 48 mg; choline, 65000 mg; nicotinic acid, 24000 mg; iron, 10000 mg; copper sulphate, 600 mg; manganese sulphate, 4000 mg; zinc sulphate, 6000 mg; potassium iodide, 20 mg; cobalt, 2 mg; selenium, 20 mg, d) 4.31% of polymer contains 1500 FTU, e) Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brazil.

Table 2. Apparent digestibility coefficient (ADC) values of phosphorus and calcium for Nile tilapia fed phytase-supplemented diets subjected to different processing and incorporation methods

Processing method	Inclusion method	ADc P %	ADc Ca%
Extrusion	NE ²	68.57 c B (± 1.02)	32.31 b B (± 7.43)
	PAE ³	75.29 b B (± 1.74)	41.42 b B (± 6.47)
	CPP ⁴	82.13 a B (± 1.39)	56.07 a B (± 5.36)
Pelletization	NE ²	82.02 c A (± 0.53)	61.04 b A (± 4.62)
	PAE ³	93.13 a A (± 0.23)	75.03 a A (± 8.08)
	CPP ⁴	86.27 b A (± 0.85)	69.78 b A (± 9.80)
SEM	-	0.6297	3.5163
CV	-	1.3425	10.8865
P-value			
Inclusion method	-	0.0001	0.0017
Processing method	-	0.0001	0.0001
PM vs IM	-	0.0001	0.0379

1.Small letters compare phytase inclusion methods (within the same processing method). Capital letters compare different processing methods (within the same phytase inclusion method). Means regarding phosphorus (P), calcium (Ca) followed by the same letter did not statistically differ at 5% of significance by Tukey's test ($p < 0.05$).

²No enzyme, ³Polymer associated to enzyme, ⁴Coating post processing.

Table 3. Apparent digestibility coefficient (ADC) values of CP, CE, CF, DM, MM for Nile tilapia fed phytase-supplemented diets subjected to different processing and incorporation methods

Processing method	Inclusion method	ADc CP(%)	ADc CE(%)	ADc CF(%)	ADc DM(%)	ADc MM(%)
Extrusion	NE ²	93.32 (± 0.62)	85.71 (± 0.50)	70.38 a B (± 3.90)	83.61 (± 0.52)	62.05 c A (± 1.10)
	PAE ³	93.46 (± 0.71)	86.49 (± 1.25)	77.51 a A (± 1.12)	83.96 (± 1.29)	67.43 b B (± 2.00)
	CPP ⁴	93.81 (± 0.06)	85.49 (± 0.94)	73.37 a B (± 1.41)	83.84 (± 0.72)	71.94 a A (± 1.06)
	NE ²	92.69 (± 0.41)	84.87 (± 0.91)	87.97 a A (± 5.59)	83.08 (± 0.87)	65.08 b A (± 3.28)
	PAE ³	93.64 (± 0.60)	85.24 (± 0.64)	81.12 a A (± 3.18)	83.94 (± 0.79)	75.87 a A (± 1.34)
	CPP ⁴	93.18 (± 0.33)	84.33 (± 1.09)	84.35 a A (± 2.65)	83.51 (± 0.27)	74.11 a A (± 0.94)
SEM	-	0.2938	0.5371	1.9298	0.4694	1.0492
CV	-	0.5451	1.0899	4.2248	0.9718	2.6180
P-value	-					
Inclusion Method	-	0.1684	0.2425	0.9711	0.4568	0.0001
Processing Method	-	0.1581	0.0295	0.0001	0.4605	0.0002
PM vs IW	-	0.3196	0.9215	0.0119	0.8639	0.0230

1. Small letters compare phytase inclusion methods within the same processing method. Capital letters compare different processing methods within the same phytase inclusion method. Means regarding crude protein (CP), crude energy (CE), crude fat (CF), dry matter (DM), mineral matter (MM), followed by the same letter did not statistically differ at 5% of significance by Tukey's test ($p < 0.05$). ²No enzyme, ³Polymer associated to enzyme, ⁴Coating post processing.

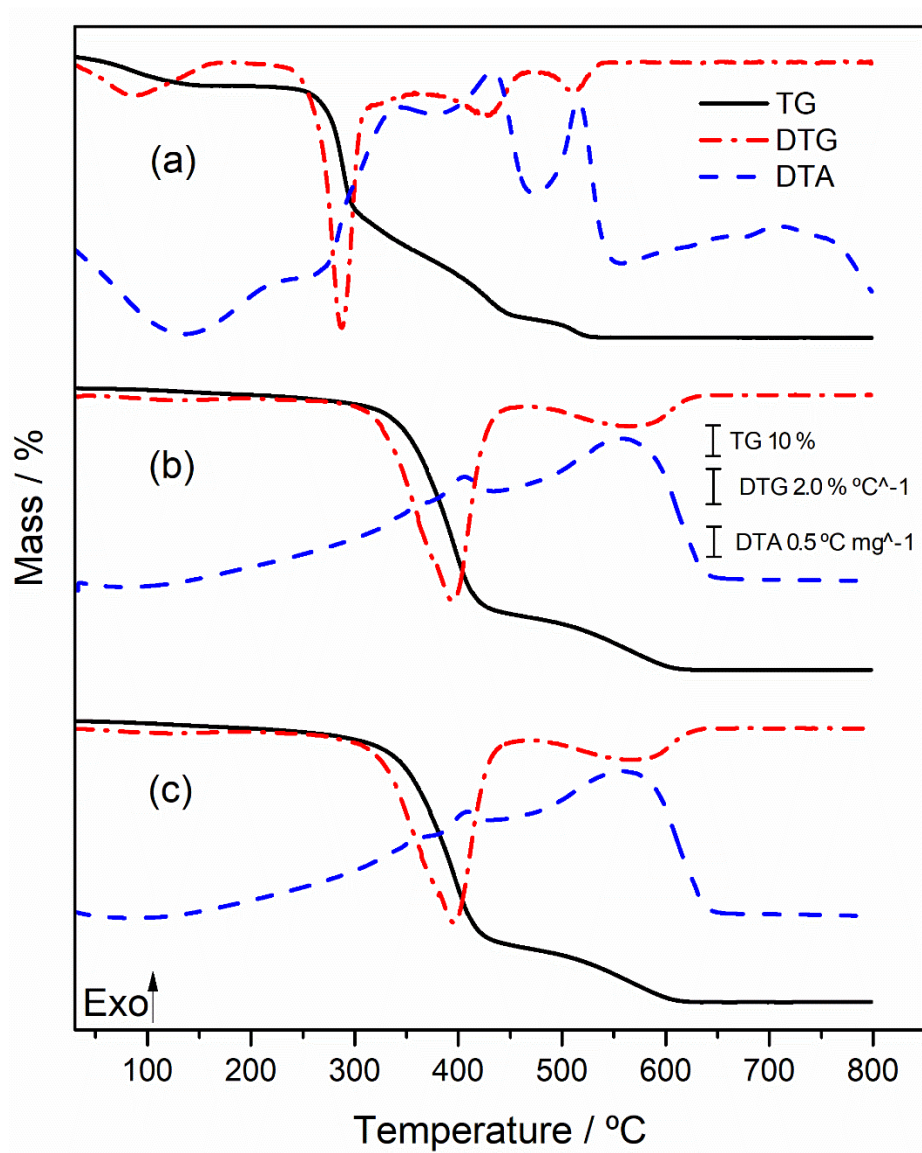


Figure S1. TG/DTG-DTA curves for phytase (a), polymer (b), and polymer-associated phytase (c)

References

- Alarcon, R. T., Holanda, B. B. C., Oliveira, A. R., Magdalena, A. G., & Bannach, G. (2016). Produção e Caracterização de um Novo Polímero Termoplástico a partir do Óleo de Linhaça e Glicerol Seguindo os Princípios da Química Verde. *Revista Virtual de Química*, 9, 163-175.
- Anderson, P. A. (1985). Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. *Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds*, 31-45.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis. 16th ed. Method 972.15. 2000. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Autin, M. (1997). Commercial aquafeed manufacture and production. *Cahiers Options Mediterraneennes*, 22, 79-104.
- Barbosa, J. C., & Maldonado Júnior, W. (2010). AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. *Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp*.
- Bock, C. L., Pezzato, L. E., Cantelmo, O. Â., & Barros, M. M. (2006). Fitase e digestibilidade aparente de nutrientes de rações por tilápias-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2197-2202.
- Bock, C. L., Pezzato, L. E., Cantelmo, O. A., & Barros, M. M. (2007). Fitase em rações para tilápia-do-nilo na fase de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 1455-1461.
- Boyd, C. E., & Tucker, C. S. (2012). *Pond aquaculture water quality management*. Springer Science & Business Media.
- CAO, L. et al. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, n.4, p.497-507, 2007.
- Chislock, M. F., Doster, E., Zitomer, R. A., & Wilson, A. E. (2013). Eutrophication: causes, consequences, and controls in aquatic ecosystems. *Nature Education Knowledge*, 4(4), 10.
- Costenaro-Ferreira, C., & Della Flora, M. A. L. (2017). Challenges for efficient use of phytase in fish nutrition. *Revista Agrarian*, 10(35), 95-104.
- Cho, C. Y. (1979). Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. In *Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology Vol. II* (pp. 239-247).
- Cheng, N., Chen, P., Lei, W., Feng, M., & Wang, C. (2016). The sparing effect of phytase in plant-protein-based diets with decreasing supplementation of dietary NaH₂PO₄ for juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture research*, 47(12), 3952-3963.
- De Castro Silva, T. S., Furuya, W. M., dos Santos, L. D., Fujii, K. M., Michelato, M., & Iwamoto, B. S. (2007). Fitase líquida em dieta extrusada para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 29(4), 449-455.

- Engelen, A. J., Randsdorp, P. H., & Smit, E. L. (1994). Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International*, 77(3), 760-764.
- FAO - Fisheries Department. (2016). *The state of world fisheries and aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Furuya, W. M. F. (Ed.). (2010). *Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias*.
- Gatlin III, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W.,... & Overturf, K. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture research*, 38(6), 551-579.
- Goda, A. M. (2007). Effect of Dietary Soybean Meal and Phytase Levels on Growth, Feed Utilization and Phosphorus Discharge for Nile tilapia. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 2(4), 248-263.
- Gomes, E., Guez, M. A. U., Martin, N., & Silva, R. D. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química nova*, 136-145.
- Hassaan, M. S., Soltan, M. A., Agouz, H. M., & Badr, A. M. (2013). Influences of calcium/phosphorus ratio on supplemental microbial phytase efficiency for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39(3), 205-213.
- Hepher, B. (1993). *Nutrición de peces comerciales en estanques* (No. Sirsi) i9789681845230).
- Huang, J., Xu, Q., Xi, B., Wang, X., Li, W., Gao, G., ... & Liu, H. (2015). Impacts of hydrodynamic disturbance on sediment resuspension, phosphorus and phosphatase release, and cyanobacterial growth in Lake Tai. *Environmental earth sciences*, 74(5), 3945-3954.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa da pecuária municipal, 2018. URL <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>. Acesso em: 15/08/2018.
- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., De Boeck, G., & Becker, K. (2012). Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96(3), 335-364.
- Li, X. Q., Zhang, X. Q., Kabir Chowdhury, M. A., Zhang, Y., & Leng, X. J. (2019). Dietary phytase and protease improved growth and nutrient utilization in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) fed low phosphorus and fishmeal-free diets. *Aquaculture nutrition*, 25(1), 46-55.
- Liebert, F., & Portz, L. (2005). Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture*, 248(1-4), 111-119.
- Leeson, S. T. E. V. E. (1993). Recent advances in fat utilization by poultry. *Recent advances in animal nutrition in Australia*, 170-181.

- Lemos, D., & Tacon, A. G. (2017). Use of phytases in fish and shrimp feeds: a review. *Reviews in Aquaculture*, 9(3), 266-282.
- Morales, G. A., de Rodrigañez, M. S., Marquez, L., Díaz, M., & Moyano, F. J. (2013). Solubilisation of protein fractions induced by *Escherichia coli* phytase and its effects on in vitro fish digestion of plant proteins. *Animal feed science and technology*, 181(1-4), 54-64.
- Morales, G. A., Marquez, L., Hernández, A. J., & Moyano, F. J. (2016). Chapter 9 Phytase effects on protein and phosphorus bioavailability in fish diets. In *Phytate destruction-consequences for precision animal nutrition* (pp. 1-8). Wageningen Academic Publishers.
- Mrudula, U. V., Jaiswal, A. K., Krishna, S., & Pandey, A. (2019). Thermostable phytase in feed and fuel industries. *Bioresource technology*.
- Nwanna, L. C., & Olusola, S. E. (2014). Effect of supplemental phytase on phosphorus digestibility and mineral composition in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Aquaculture*, 4.
- Pezzato, L. E., MIRANDA, E. D., Pinto, L. G. Q., Furuya, W. M., Barros, M. M., Rosa, G. J. M., & Lanna, E. A. T. (2002). Avaliação de dois métodos de determinação do coeficiente de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 24, 965-971.
- Pontes, T. C., França, W. G., Dutra, F. M., Portz, L., & Ballester, E. L. C. (2018). Evaluation of the Phytase Enzyme in Granulated and Liquid Forms for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archivos de zootechnia*, 68(261).
- Portz, L., & Liebert, F. (2004). Growth, nutrient utilization and parameters of mineral metabolism in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed plant-based diets with graded levels of microbial phytase. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 88(9-10), 311-320.
- Roriz, G. D., Delphino, M. K. D. V. C., Gardner, I. A., & Gonçalves, V. S. P. (2017). Characterization of tilapia farming in net cages at a tropical reservoir in Brazil. *Aquaculture Reports*, 6, 43-48.
- Shit, S. C., & Shah, P. M. (2014). Edible polymers: Challenges and opportunities. *Journal of Polymers*, 2014.
- Vandenberg, G. W., Scott, S. L., Sarker, P. K., Dallaire, V., & De la Noüe, J. (2011). Encapsulation of microbial phytase: Effects on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal feed science and technology*, 169(3-4), 230-243.
- Vandenberg, G. W., Scott, S. L., & De La Noüe, J. (2012). Factors affecting nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant protein-based diet supplemented with microbial phytase. *Aquaculture nutrition*, 18(4), 369-379.

Verlhac-Trichet, V., Vielma, J., Dias, J., Rema, P., Santigosa, E., Wahli, T., & Vogel, K. (2014). The Efficacy of a Novel Microbial 6-Phytase Expressed in *Aspergillus oryzae* on the Performance and Phosphorus Utilization of Cold-and Warm-Water Fish: Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, and Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(4), 367-379.

Capítulo III

Implicações

A farinha de peixe foi amplamente utilizada como fonte proteica em rações para peixes, devido a suas características organolépticas e nutricionais. Porém, a sua produção caiu enquanto a demanda foi mantida, levando a um aumento expressivo em seu custo. Este fator inviabilizou o uso de farinha de peixe em formulações de dietas para a indústria aquícola. Por se tratarem de fontes proteicas com preços economicamente viáveis, ingredientes de origem vegetal têm sido utilizados como substituídos à farinha de peixe. Entretanto, o uso destes apresenta alguns entraves, como a baixa biodisponibilidade de fósforo e a presença de fatores antinutricionais que podem indisponibilizar outros nutrientes que serão lançados no ambiente aquático promovendo a eutrofização.

Assim, estratégias para otimizar o uso de ingredientes vegetais em dietas de peixes são necessárias para dar continuidade no crescimento sustentável da aquicultura. Como discutido no presente estudo, uma das formas de reduzir os impactos dessa atividade se dá pela suplementação de enzimas, como a fitase. Diferentes estudos comprovaram os efeitos benéficos da fitase relacionados ao aumento da biodisponibilidade de fósforo e outros nutrientes, assim como a redução da emissão de poluentes para o ambiente, além da quebra de fatores antinutricionais presentes em farinhas vegetais, como o fitato. Como a suplementação desta enzima em dietas comerciais para peixes ainda é consideravelmente pequena devido a sua estabilidade térmica, os resultados deste trabalho podem contribuir para a viabilização do uso de fitase e outros aditivos em dietas comerciais para peixes.

Uma vez que o polímero testado foi capaz de proteger parcialmente a fitase durante o processamento das dietas e significativamente da degradação proteica no organismo animal, a associação entre fitase e polímero pode ser uma alternativa sustentável para a indústria aquícola. Entretanto, existem alguns pontos como a elevada quantidade de polímero na matriz nutricional, custo do produto, método de inclusão do mesmo na mistura e adequação de um método para

avaliar a atividade da enzima adsorvida ao polímero pós incorporação nas dietas. Portanto, mesmo com os benefícios promovidos por essa associação, mais estudos são necessários para determinar com precisão o grau de proteção térmica que este produto pode oferecer à fitase e outros aditivos durante o processamento de dietas que requerem altas temperaturas.