



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Maria Fernanda Oliveira da Silva

**Metodologia para determinação da digestibilidade de nutrientes e energia em tilápia-do-
nilo (*Oreochromis niloticus*): manejo alimentar e composição da dieta referência**

Florianópolis

2023

Maria Fernanda Oliveira da Silva

**Metodologia para determinação da digestibilidade de nutrientes e energia em tilápia-do-
nilo (*Oreochromis niloticus*): manejo alimentar e composição da dieta referência**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura

Orientadora: Prof.(a) Dra. Débora Machado Fracalossi
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Peres Silva

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Silva, Maria Fernanda Oliveira

Metodologia para determinação da digestibilidade de nutrientes e energia em tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*): manejo alimentar e composição da dieta
referência / Maria Fernanda Oliveira da Silva ; orientador, Débora Machado Fracalossi, coorientador, Carlos Peres Silva, 2023.
65 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. tilapia. 3. metodologia. 4. digestibilidade. 5. aminoácidos. I. Fracalossi, Débora Machado. II. Silva, Carlos Peres. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Maria Fernanda Oliveira da Silva

**Metodologia para determinação da digestibilidade de nutrientes e energia em tilápia-do-
nilo (*Oreochromis niloticus*): manejo alimentar e composição da dieta referência**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 16 de fevereiro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Luiz Eduardo Lima de Freitas, Dr.
Instituição Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Prof. Luiz Vítor Oliveira Vidal, Dr.
Instituição Universidade Federal da Bahia - UFBA

Prof. Robson Andrade Rodrigues Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Aquicultura

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Celso e Maryvone, pelo amor, apoio incondicional e todas as oportunidades a mim proporcionadas.

À Professora Débora Machado Fracalossi pela orientação, confiança e parceria durante todos esses anos de trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Luiz Eduardo Lima de Freitas, Luiz Vítor Oliveira Vidal, Robson Andrade Rodrigues, Dariane Beatriz Schoffen Enke e Katharinne Ingrid Moraes de Carvalho por aceitarem o convite para participarem da banca de avaliação deste trabalho e contribuírem para minha Tese e formação.

Ao meu coorientador, Professor Carlos Peres Silva, pelo suporte metodológico na realização das análises no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos. À Cristina Rios, pelo apoio na realização das análises e interpretação dos resultados das análises enzimáticas.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI) e Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) pela ajuda e contribuição durante todo o meu doutorado.

Aos Professores e funcionários da Pós-Graduação em Aquicultura, que se dedicam à excelência do Programa, pelos ensinamentos compartilhados e apoio durante esta jornada.

À empresa Evonik pela confiança em nosso trabalho e financiamento da pesquisa.

RESUMO

A avaliação e o conhecimento preciso dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes é uma ferramenta importante para auxiliar na formulação de dietas tanto nutricionais como economicamente eficientes. A capacidade dos peixes em digerir e utilizar os nutrientes da dieta pode ser influenciada por vários fatores, como frequência alimentar, nível de alimentação e atividade das enzimas digestivas. Este trabalho avaliou o manejo alimentar e a composição da dieta referência e suas possíveis influências na digestibilidade dos nutrientes e energia em ingredientes e dietas para juvenis da tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). Foco especial foi dirigido à digestibilidade dos aminoácidos (AA), pois, juntamente com seu perfil, determina o valor biológico de uma proteína. No primeiro experimento, os CDA dos ingredientes práticos farelo de soja (FS) e farinha de vísceras de aves (FVA) foram avaliados, utilizando-se dietas referência formuladas com dois tipos de ingredientes: semipurificados (SP) ou práticos (P). Grupos de 20 juvenis ($65,05 \pm 12,37$ g) foram alimentados duas vezes ao dia, até a saciedade aparente, com cada uma das seguintes dietas experimentais: FS-SP, FS-P, FVA-SP, FVA-P, testadas em quadruplicata. Após a última alimentação e limpeza dos tanques, as fezes eram coletadas por sifonagem, armazenadas e posteriormente analisadas para o cálculo da digestibilidade da energia, matéria seca, proteína e aminoácidos. No segundo experimento, testou-se a influência da frequência alimentar (duas, quatro ou seis vezes ao dia) e nível de alimentação (restrito ou saciedade aparente) na digestibilidade da energia e nutrientes. Utilizou-se um arranjo fatorial, totalizando seis tratamentos, os quais foram testados em quadruplicata. Após o período de aclimação, grupos de 23 juvenis, com peso inicial médio de $63,75 \pm 12,60$ g, foram transferidos para as unidades experimentais (tanques circulares de 115 L), ligados a um sistema de recirculação de água, perfazendo uma biomassa de aproximadamente 1.500 g por unidade. As fezes foram coletadas por sifonagem, armazenadas, analisadas e os CDA da matéria seca, energia, proteína e aminoácidos foram calculados. A tilápia-do-nylo demonstrou alta capacidade de digerir tanto farelo de soja como farinha de vísceras de aves, sendo que a maioria dos CDA atingiu valores acima de 90%. O tipo de dieta referência afetou a digestibilidade da proteína e dos aminoácidos nos ingredientes teste, sendo que a dieta referência semipurificada originou CDA mais elevados, principalmente para o ingrediente farelo de soja. Os dados de digestibilidade gerados com a dieta referência prática demonstraram maior relevância prática do que aqueles gerados com a dieta referência semipurificada, sendo sua aplicação recomendada em estudos de digestibilidade com a tilápia-do-nylo. Tanto a frequência alimentar como o nível de alimentação não afetaram a digestibilidade da matéria seca e energia, mas houve interação entre a digestibilidade da proteína e a maioria dos aminoácidos. A atividade da tripsina não foi afetada pela frequência alimentar ou nível de alimentação, mas a atividade da quimotripsina foi influenciada pela frequência alimentar. Em peixes alimentados no regime restrito, o aumento da frequência alimentar para quatro e seis vezes ao dia teve efeito positivo na digestibilidade da proteína e aminoácidos. Já para os peixes alimentados até a saciedade aparente, o aumento da frequência alimentar não afetou a digestibilidade. Os resultados demonstram que um manejo alimentar adequado, em relação a frequência alimentar e nível de alimentação, pode beneficiar os CDA de alguns nutrientes, principalmente proteína e aminoácidos. Esta pesquisa confirma a importância de avaliar metodologias aplicadas em ensaios de digestibilidade. Tanto a escolha da composição de ingredientes da dieta referência quanto a frequência alimentar e nível de arraçamento adotados podem impactar os coeficientes de digestibilidade aparente de alguns nutrientes.

Palavras-chave: aquicultura, tilápia, metodologia, digestibilidade, aminoácidos.

ABSTRACT

The evaluation and accurate knowledge of the apparent digestibility coefficients (ADC) of nutrients is an important tool to assist in the formulation of nutritive and cost-effective diets. The ability of fish to digest and utilize dietary nutrients can be influenced by several factors such as feeding frequency, feeding level and digestive enzyme activity. This work evaluated the feeding management and composition of the reference diet and its possible influences on the digestibility of nutrients and energy in ingredients and diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Special focus was directed to the digestibility of amino acids, as, together with its profile, it determines the biological value of a protein. In the first experiment, the ADC of the practical ingredients soybean meal (SBM) and poultry by-product meal (PBM) were evaluated, using reference diets formulated with two types of ingredients: semi-purified (SP) or practical (P). Groups with 20 juveniles (65.05 ± 12.37 g) were fed to apparent satiation, twice a day, with each of the following experimental diets: SBM-SP, SBM-P, PBM-SP, PBM-P, tested in quadruplicate. After the last feeding and cleaning of the tanks, the feces were collected by siphoning, stored, and later analyzed to calculate the digestibility of energy, dry matter, protein, and amino acids. In the second experiment, we tested the influence of the feeding frequency (two, four or six times a day) or the feeding level (restricted or apparent satiety) on the digestibility of energy and nutrients. Experimental design was set in a factorial arrangement, totaling six treatments, tested in quadruplicate. After the acclimatization period, groups of 23 juveniles, with an average initial weight of 63.75 ± 12.60 g, were transferred to the experimental units (circular tanks with 115 L), connected to a water recirculation system, making up a biomass of approximately 1,500 g per unit. Feces were collected by siphoning, stored, analyzed and the ADC of dry matter, energy, protein, and amino acids were calculated. Nile tilapia showed a high capacity to digest both soybean meal and poultry by-product meal, with most ADC reaching values above 90%. The type of reference diet affected protein and amino acids digestibility in the test ingredients, with the semi-purified reference diet resulting in higher ADCs, mainly for the soybean meal ingredient. Digestibility data generated with the practical reference diet demonstrated higher practical relevance than those generated with the semi-purified reference diet, and its application is recommended in digestibility studies with Nile tilapia. Both feeding frequency and feeding level did not affect dry matter or energy digestibilities, but there was an interaction between feeding frequency and feeding level on the digestibility of protein and most amino acids. Trypsin activity was not affected by feeding frequency or feeding level, but chymotrypsin activity was influenced by feeding level. In restricted-fed fish, increasing feeding frequency to four and six times a day had a positive effect on protein and amino acids digestibility. As for fish fed to apparent satiation, the increase in feeding frequency did not affect digestibility. The results demonstrate that an adequate dietary management, in relation to feeding frequency and feeding level, can benefit the ADC of some nutrients, mainly protein and amino acids. This study confirms the importance of evaluating methodologies in digestibility trials. Both the choice of ingredients in the reference diet and the adopted feeding frequency and feeding level can impact the apparent digestibility coefficients of some nutrients

Keywords: aquaculture, tilapia, methodology, digestibility, amino acids.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	8
1.1	Aquicultura e tilápia-do-nilo.....	8
1.2	Proteína e aminoácidos.....	8
1.3	Ingredientes proteicos.....	10
1.4	Determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA).....	12
1.5	Enzimas digestivas.....	14
1.6	Manejo alimentar.....	14
1.7	OBJETIVOS.....	15
1.7.1	Objetivo geral.....	15
1.7.2	Objetivos específicos.....	15
2	ARTIGO 1 - IMPACT OF THE COMPOSITION OF THE REFERENCE DIET ON THE APPARENT DIGESTIBILITY COEFFICIENTS OF TWO PROTEIN-RICH INGREDIENTS IN NILE TILAPIA.....	17
2.1	Introduction.....	19
2.2	Materials and Methods.....	19
2.3	Results.....	26
2.4	Discussion.....	29
2.5	Conclusions.....	32
2.6	References.....	32
3	ARTIGO 2 - FREQUÊNCIA ALIMENTAR E NÍVEL DE ARRAÇOAMENTO AFETAM A DIGESTIBILIDADE DA PROTEÍNA E AMINOÁCIDOS PARA A TILÁPIA-DO-NILO.....	37
3.1	Introdução.....	40
3.2	Materiais e Métodos.....	41
3.3	Resultados.....	45
3.4	Discussão.....	49
3.5	Conclusões.....	53
3.6	Referências.....	53
4	CONCLUSOES GERAIS.....	59
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	61

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aquicultura e tilápia-do-nilo

A aquicultura é um dos segmentos da produção animal com maior ascensão no mundo e grande parte se deve ao desenvolvimento e crescimento da piscicultura. A produção aquícola alcançou 122,6 milhões de toneladas em 2020 e, deste total, 57,5 milhões correspondem à criação de peixes. A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é a terceira espécie de peixe mais produzida mundialmente, com 4,4 milhões de toneladas e o Brasil é o quarto maior produtor, ficando atrás somente de China, Indonésia e Egito (FAO, 2022a, b). No Brasil, a criação desta espécie desempenha papel importante na economia das regiões sul, sudeste e centro-oeste, com a produção de 534 mil toneladas, o que representa 63,5% produção aquícola nacional (PEIXE BR, 2022).

Os fatores que levaram ao sucesso da criação da tilápia-do-nilo e a tornaram uma espécie de grande potencial na aquicultura estão relacionados a sua rusticidade, capacidade de se adaptar a diversos sistemas, alta taxa de crescimento em alta densidade, resistência ao estresse ambiental e enfermidades, fácil reprodução e larvicultura (HE *et al.*, 2013; MICHELATO *et al.*, 2016; WATANABE *et al.*, 2002). Além disso, outro aspecto importante é sua boa aceitação de mercado, por ser um peixe de carne branca e sem a presença de espinhos intramusculares (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2010).

Classificada como uma espécie onívora, em ambiente natural a tilápia ingere uma ampla variedade de alimentos, destacando-se a ingestão de organismos bentônicos, invertebrados aquáticos, larvas de peixes, além de matéria orgânica em decomposição e detritos (EL-SAYED, 2006). Em sistemas de produção, a tilápia aceita o alimento inerte (ração) desde a fase larval (FURUYA *et al.*, 2013). Enquanto a criação de tilápia se expande, a indústria enfrenta desafios com o aumento do custo dos insumos e da ração. A formulação de rações comerciais visa produzir dietas que atendam às exigências nutricionais dos peixes, utilizando a combinação mais barata dos ingredientes disponíveis. Estas formulações podem ser particularmente econômicas para espécies onívoras, como a tilápia, que utilizam eficientemente os carboidratos como fonte de energia e se adaptam facilmente a uma ampla variedade de ingredientes.

1.2 Proteína e aminoácidos

A expansão da piscicultura está estritamente relacionada à melhoria da nutrição e bem-estar animal, além da adoção de boas práticas de criação. Em situação de confinamento, os peixes dependem majoritariamente do aporte de nutrientes fornecidos através da ração, que

deve estar adequada às exigências da espécie para um bom desempenho produtivo (PORTZ; FURUYA, 2013). A ração é a fonte principal de nutrientes necessários para a sustentação da estrutura e função dos peixes. Os nutrientes são classificados em macro e micronutrientes, de acordo com sua participação em quantidade na dieta. Os três macronutrientes são as proteínas, os carboidratos e os lipídios, enquanto os micronutrientes são as vitaminas e os minerais. Num empreendimento aquícola, a ração é o insumo que mais onera o custo de produção, principalmente devido aos seus elevados níveis de proteína, já que este é o macronutriente com maior custo (LOVELL, 1998, 2002).

A proteína e seus monômeros naturais, os aminoácidos, são considerados nutrientes cruciais para todos os organismos vivos, devido ao papel que desempenham na estrutura corporal e metabolismo. As proteínas são os constituintes orgânicos mais abundantes nos tecidos dos peixes (65 a 75%), com papel importante na formação dos músculos, cartilagens, colágeno e queratina, além de participar na regulação de vias metabólicas (enzimas e hormônios), atuar na defesa do organismo (anticorpos) e transportar oxigênio (hemoglobina) (PORTZ; FURUYA, 2013; NRC, 2011; WILSON, 2002). Os peixes, no entanto, não possuem exigência nutricional em proteína, mas sim em um adequado balanceamento de aminoácidos (WILSON, 2002; WU, 2014).

Os aminoácidos são indispensáveis para o bom crescimento e saúde dos animais. Alguns deles, por não serem sintetizados pelos organismos, são chamados aminoácidos essenciais ou indispensáveis e devem ser fornecidos por meio da dieta. Animais que se alimentam de dietas com proporções inadequadas de aminoácidos apresentam prejuízo na utilização da fração nitrogenada, afetando a síntese proteica, reduzindo o ganho de peso e o rendimento de carcaça (KAUSHIK; SEILIEZ, 2010). Diante disso, nos últimos anos, a pesquisa envolvendo a nutrição das principais espécies de interesse aquícola têm focado em estudos sobre exigências em aminoácidos, além da exigência proteica (**Tabela 1**).

Os aminoácidos possuem uma estrutura básica semelhante $H_2NCHRCOOH$, onde R é a cadeia lateral e pode variar de um simples átomo de hidrogênio até um grande grupo heterocíclico. As variações na estrutura dos grupos R influenciam nas propriedades, tamanho, formato e carga elétrica dos aminoácidos. As propriedades dos aminoácidos resultam das variações da estrutura dos grupos R, que influenciam no tamanho, formato e carga elétrica (NRC, 2011). As propriedades das cadeias laterais dos aminoácidos – sobretudo a afinidade pela água – são importantes para a conformação e função das proteínas.

Tabela 1. Estudos recentes sobre aminoácidos na dieta da tilápia-do-nilo.

Espécie	Tema	Referência
Tilápia-do-nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	Exigência em leucina	Gan <i>et al.</i> , 2015
	Exigência em treonina	Michelato <i>et al.</i> , 2016
	Exigência em lisina	Michelato <i>et al.</i> , 2016
	Suplementação de glutamina e arginina	Pereira; Rosa; Gatlin, 2017
	Exigência em valina	Xiao <i>et al.</i> , 2017
	Suplementação de metionina e taurina	Michelato; Furuya; Gatlin, 2018
	Exigência em aminoácidos essenciais	Nascimento <i>et al.</i> , 2020
	Balanço de aminoácidos	Nguyen <i>et al.</i> , 2020
	Redução de proteína na dieta e efeitos da suplementação de aminoácidos essenciais	Nguyen; Dinh; Davis, 2020
	Suplementação de aminoácidos essenciais e não essenciais	Nguyen; Salem; Davis, 2022

1.3 Ingredientes proteicos

Parte dos ingredientes utilizados em rações de peixes são subprodutos do processamento de alimentos para nutrição humana e normalmente estão disponíveis durante todo o ano, com preços variando de acordo com a oferta e demanda do mercado. Há também ingredientes que não são subprodutos e sim produzidos diretamente a partir de matérias-primas para uso na aquicultura, como por exemplo farinhas de peixe inteiro (anchova, menhaden) e grãos integrais moídos (HARDY; BARROWS, 2002). A escolha dos ingredientes que irão compor uma ração está relacionada principalmente a sua composição nutricional, disponibilidade, custo e propriedades físicas.

Ingredientes como farelos e farinhas de origem vegetal ou animal são conhecidos como ingredientes práticos, os quais são comumente utilizados em rações comerciais. Já ingredientes como caseína, gelatina, dextrina, são conhecidos como ingredientes semipurificados. Estes são refinados, normalmente fornecendo apenas um dos macronutrientes e apenas traços de vitaminas e/ou minerais. Possuem alta qualidade, composição bem definida e não possuem fatores antinutricionais, sendo utilizados principalmente na pesquisa em nutrição (GLENCROSS; BOTH; ALLAN, 2007; LOVELL, 1998). Entretanto, estes ingredientes possuem custo elevado e podem reduzir a palatabilidade e, conseqüentemente, o consumo de ração pelos peixes (HARDY; BARROWS, 2002; LOVELL, 1998; NRC, 2011).

Ingredientes considerados ricos em proteínas têm geralmente mais que 35% de proteína bruta em sua composição (NRC, 2011), sendo que os mais utilizados em rações na aquicultura estão representados na **Tabela 2**. O farelo de soja e a farinha de vísceras de aves são fontes proteicas amplamente empregadas em dietas comerciais para a tilápia-do-nylo. Atualmente, o farelo de soja é o principal ingrediente proteico utilizado em rações para peixes tropicais, atuando como uma fonte de proteína digestível de baixo custo. Além disso, é o ingrediente de origem vegetal que apresenta melhor perfil de aminoácidos, com todos os 10 aminoácidos essenciais presentes em quantidades próximas das fontes proteicas animais (GATLIN *et al.*, 2007; NGUYEN; DAVIS; SAOUD, 2009). A farinha de vísceras de aves, por sua vez, é considerada uma alternativa promissora para substituir a farinha de peixe devido ao seu elevado teor proteico, bom perfil de aminoácidos, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais. Este ingrediente apresenta boa palatabilidade para a maioria das espécies, alto volume de produção, boa disponibilidade, custo relativamente baixo e é, portanto, um dos ingredientes de origem animal mais utilizados na formulação de rações para as espécies aquícolas (CRUZ-SUÁREZ *et al.*, 2007; GUNBEN *et al.*, 2014; HARDY, 2010).

Tabela 2 - Composição proteica de ingredientes comumente utilizados na formulação de dietas para espécies aquícolas

<i>Tipo</i>	<i>Ingrediente</i>	<i>Proteína bruta (%)</i>
<i>Prático</i>	Farelo de soja	46,5 ² - 48,5 ¹
	Farinha de carne e ossos	47,5 ² - 50,9 ¹
	Farinha de peixe, resíduo	50,2 ²
	Glúten de milho	55,1 ² - 63,7 ¹
	Farinha de carne	55,6 ²
	Farinha de vísceras de aves	62,1 ¹ - 65,7 ²
	Concentrado proteico de soja	63,6 ¹ - 66,5 ²
	Farinha de peixe, salmão	66,5 ² - 70,3 ¹
	Farinha de penas	78,1 ² - 83,3 ¹
	Farinha de sangue	88,6 ¹ - 91,1 ²
<i>Semipurificado</i>	Albumina	71,4 ²
	Caseína	76,7 ² - 84,0 ¹
	Gelatina	85,9 ¹ - 93,7 ²

Fonte: ¹ NRC, ² Fracalossi e Cyrino (Nutriaqua)

1.4 Determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA)

Com o avanço e aumento da competitividade na piscicultura, o aperfeiçoamento das dietas e um adequado manejo alimentar se tornam fundamentais. As análises de composição e calorimetria fornecem informações sobre as composições químicas e os conteúdos energéticos brutos de ingredientes e rações, mas estudos de digestibilidade são necessários para elucidar a biodisponibilidade dos nutrientes contidos nestes alimentos para os peixes. Portanto, a avaliação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) é uma importante ferramenta para auxiliar na formulação de rações nutricionais, econômicas e ambientalmente eficientes (FRACALLOSSI; CYRINO, 2013; HARDY, 2010; LUPATSCH *et al.*, 1997; PEZZATO, BARROS; FURUYA, 2009).

A digestibilidade de um alimento refere-se à quantidade ou proporção de seus nutrientes passível de ser absorvida pelo organismo, pois exclui a perda destes por excreção, nas fezes (GLENCROSS, BOTH; ALLAN, 2007). Uma vez que apenas os nutrientes absorvidos estão disponíveis para as vias metabólicas, a formulação da ração com base na proteína e aminoácidos digestíveis ajuda a garantir o adequado desempenho dos peixes.

A determinação da digestibilidade pode ser feita através do método direto ou indireto, sendo que ambos envolvem ensaios alimentares e necessitam da coleta do material fecal (BELAL, 2005). O método direto estima a digestibilidade pela quantidade total de alimento ingerida e fezes produzidas (balanço de massas) e é mais aplicado em animais terrestres. Já o método indireto, amplamente utilizado na maioria das espécies de peixes e camarões, permite coleta parcial das fezes e não necessita da medida do consumo alimentar, mas implica a inclusão de um marcador inerte na dieta, o qual não é absorvido pelo animal, ao longo do processo de digestão (LOVELL, 1998).

O óxido de cromo (Cr_2O_3) é um marcador inerte tradicionalmente utilizado em estudos de digestibilidade da tilápia, embora outros marcadores como o óxido de ítrio (Y_2O_3) tenham sido cada vez mais usados nos últimos anos (GLENCROSS, BOTH; ALLAN, 2007). Estudos recentes utilizam o uso de óxido de ítrio, por apresentar vantagens como a menor inclusão nas dietas e detecção analítica mais simples para fornecer resultados precisos (WARD; CARTER; TOWNSEND, 2005). Ainda, entre as vantagens do método indireto, ressalta-se: 1) redução de agentes estressores aos peixes, oriundos de restrição de movimento ou excessivo manejo, 2) possibilidade de aumento na densidade de peixes por tanque e 3) alimentação de forma voluntária (NRC, 2011). A comparação da proporção da concentração do marcador na ração e nas fezes fornece a digestibilidade da matéria seca, que é então utilizada para determinar a digestibilidade dos demais nutrientes avaliados. Os resultados desses cálculos originam o

coeficiente de digestibilidade aparente (CDA), que não leva em conta as perdas endógenas de nitrogênio e de aminoácidos (HARDY; BARROWS, 2002; NRC, 2011). As principais fontes de perdas endógenas em animais são proteínas que são sintetizadas endogenamente e secretadas no trato digestivo, mas não são digeridas e reabsorvidas (NYACHOTI *et al.*, 1997).

Os valores nutricionais dos ingredientes são distintos por apresentarem perfis de aminoácidos com composição e digestibilidade variáveis, as quais devem ser conhecidas para a obtenção de uma ração balanceada nutricionalmente (WILSON, 1985). Quando se avalia a digestibilidade de nutrientes em ingredientes, os métodos de alimentação e protocolo de coleta permanecem semelhantes de quando se avalia a digestibilidade de nutrientes em rações. Entretanto, como os ingredientes não são consumidos de forma isolada, combina-se o ingrediente teste com uma dieta referência, normalmente na proporção de 70:30 (70% dieta referência e 30% ingrediente) como sugerido por Cho e Slinger (1979). A composição da dieta referência pode variar de acordo com o estudo: podem ser utilizados tanto ingredientes práticos como semipurificados para compor a dieta referência. Os ingredientes práticos apresentam algumas vantagens, já que promovem maior consumo de ração devido a melhor palatabilidade, permitem que a composição da ração experimental seja mais próxima daquela utilizada em rações comerciais, além de permitir maior produção de material fecal para as análises (NRC, 2011). Entretanto, ingredientes semipurificados como a caseína, gelatina e albumina, por serem ingredientes refinados e altamente digestíveis, também são utilizados na composição da dieta referência em estudos de digestibilidade. Atualmente, estes têm sido aplicados com menor frequência em estudos de digestibilidade.

A digestibilidade aparente dos nutrientes de uma dieta é calculada com base na concentração do marcador inerte no alimento, bem como nas fezes, utilizando-se a equação (CHO; SLINGER, 1979):

$$CDA \% = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ Marcador Dieta}}{\% \text{ Marcador fezes}} \times \frac{\text{Nutriente}_{\text{Fezes}}}{\text{Nutriente}_{\text{Dieta}}} \right) \right]$$

Já a digestibilidade aparente dos nutrientes de um determinado ingrediente é calculada através da equação (CHO; SLINGER, 1979):

$$CDA_{\text{ingrediente}} \% = CDA_{dt} + \left[(CDA_{dt} - CDA_{ref}) \times \left[\frac{0.7 \times \text{Nutriente}_{ref}}{0.3 \times \text{Nutriente}_{ing}} \right] \right]$$

Onde: dt = dieta teste, ref = dieta referência

1.5 Enzimas digestivas

A habilidade dos peixes em utilizar os nutrientes ingeridos está relacionada à presença de enzimas em porções adequadas no trato gastrintestinal. Geralmente, a distribuição e a intensidade de atividade destas enzimas variam em função do hábito alimentar e morfologia do sistema digestório (FAGBENRO *et al.*, 2000; MORAES; DE ALMEIDA, 2020; TENGJAROENKUL *et al.*, 2000). A capacidade digestiva dos peixes pode variar de acordo com a espécie, idade, disponibilidade de alimento, temperatura e processamento do alimento (GARCÍA-CARREÑO *et al.*, 2002).

Os peixes são capazes de adaptar e modular seu perfil digestivo diante de diferentes fontes, tipos e quantidades de nutrientes na dieta, sendo este um atributo adaptativo favorável às condições intensivas da piscicultura (DABROWSKI *et al.*, 1992; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; HONORATO *et al.*, 2010; LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; MORAES; BIDINOTTO, 2000). Esta habilidade varia entre as espécies, sendo que peixes onívoros exibem maior capacidade de modular sua fisiologia digestiva e absorptiva em comparação aos carnívoros, que parecem ter maior limitação para alterar sua função digestiva e de transporte de nutrientes, dependendo da composição da dieta (BUDDINGTON; KROGDHAL; BAKKE-MCKELLEP, 1997).

As enzimas digestivas são classificadas conforme sua função catalítica na digestão de proteínas, carboidratos e lipídios. A proteases alcalinas tripsina e a quimotripsina são as principais enzimas digestivas secretadas na porção anterior do intestino. A tripsina apresenta especificidade para hidrolisar ligações peptídicas nas quais a função carbonila é substituída por lisina e arginina. Já a quimiotripsina atua na hidrólise de peptídeos nos quais a função carbonila é substituída por resíduos de aminoácidos aromáticos, como tirosina, triptofano, e fenilalanina, além de atuar na hidrólise de amidas e ésteres destes aminoácidos aromáticos (RICK, 1965). Na comparação entre estas duas enzimas, a quimotripsina apresenta um espectro de atividade proteolítica maior do que a tripsina (LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004).

1.6 Manejo alimentar

O manejo alimentar na piscicultura é um aspecto importante para o sucesso da atividade, uma vez que a quantidade de alimento deve ser fornecida aos peixes a fim de potencializar seu crescimento, entretanto não deve gerar desperdícios. A ração não consumida, além de representar prejuízos financeiros, contribui para a deterioração da qualidade da água (NRC, 2011). Estratégias de manejo alimentar que combinam o nível de alimentação e uma frequência alimentar adequada, podem otimizar o desempenho zootécnico dos peixes (DWYER

et al., 2002) e refletir positivamente nos custos de produção (BARBOSA; NEVES; CERQUEIRA, 2011).

O nível de arraçoamento e a frequência alimentar compõem estratégias do manejo alimentar e, por estarem associados à disponibilidade dos nutrientes e promoverem estímulos no sistema digestório, podem influenciar a digestibilidade e aproveitamento dos nutrientes fornecidos através da dieta (RICHE *et al.*, 2004). O nível de arraçoamento ou quantidade de ração fornecida diariamente aos peixes pode ser restrita ou baseada na saciedade aparente destes. Quando restrita, a alimentação é calculada com base no peso vivo dos peixes, denominando-se taxa de arraçoamento (%), que deve ser ajustada periodicamente de acordo com o crescimento dos animais (LIM; WEBSTER, 2006). Já a alimentação até saciedade aparente consiste em fornecer a ração até que o peixe cesse a busca pelo alimento, ou seja, quando não há mais consumo.

A frequência alimentar é definida como o número de alimentações fornecidas ao dia para os peixes. Quando adequada, a frequência alimentar pode contribuir para o melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta, reduzir desperdícios, proporcionar melhoria nos parâmetros de qualidade da água e no crescimento mais homogêneo do lote (LEE; CHO; KIM, 2000; SANTOS *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2007).

Em ensaios de digestibilidade para tilápia, a frequência alimentar e o nível de arraçoamento não são padronizados e uma grande variedade destas estratégias são relatadas. Tendo em vista a importância econômica da tilápia, estudos de digestibilidade avaliando o manejo alimentar são importantes para permitir uma melhor escolha de ingredientes e formulações com base nos teores de nutrientes digestíveis, principalmente em relação ao perfil de aminoácidos.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do manejo alimentar e da composição da dieta referência em estudos de digestibilidade de nutrientes e energia com a tilápia-do-nilo.

1.7.2 Objetivos específicos

- Determinar e comparar os efeitos de diferentes composições de dietas referência nos CDA da matéria seca, proteína, aminoácidos e energia da farinha de vísceras de aves e do farelo de soja.

- Determinar e comparar os CDA da matéria seca, proteína, aminoácidos e energia em tilápias alimentadas com diferentes frequências alimentares e níveis de arraçoamento.
- Determinar e comparar a atividade enzimática (tripsina e quimotripsina) em tilápias alimentadas sob diferentes frequências alimentares e níveis de arraçoamento.

ARTIGOS DA TESE

- **ARTIGO 1 – Impact of the composition of the reference diet on the apparent digestibility coefficients of two protein-rich ingredients in Nile tilapia**, aceito para publicação na revista Scientia Agricola em 01 de dezembro de 2022.
- **ARTIGO 2 - Feeding frequency and feeding level affects protein and amino-acid digestibilities in Nile tilapia juveniles**, será submetido à revista Scientia Agricola.

2 ARTIGO 1 - Impact of the composition of the reference diet on the apparent digestibility coefficients of two protein-rich ingredients in Nile tilapia

Maria Fernanda Oliveira da Silva^a, Rafael de Souza Romaneli^a, Luis Felipe Mussoi^a, Karthik Masagounder^b, Débora Machado Fracalossi^{a*}

^aDepartamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

^b Evonik Operations GmbH, Hanau-Wolfgang, Germany

*Corresponding author: Débora M. Fracalossi, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346. CEP: 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. E-mail: debora.fracalossi@ufsc.br

Abstract

Protein quality is related to amino acid composition and digestibility. Accurate evaluation of apparent digestibility coefficients (ADCs) of nutrients in commonly used feedstuffs is paramount for the formulation of efficient aquafeed. ADCs of soybean meal (SBM) and poultry by-product meal (PBM) were evaluated using reference diets formulated with two types of ingredients (semi-purified [SP] and practical [P]) for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) of the GIFT strain. Groups of 20 juveniles (65.05 ± 12.37 g) were fed twice daily to apparent satiety with one of the four experimental diets (SBM-SP, SBM-P, PBM-SP, and PBM-P) in quadruplicate for 30 d. After the last feeding, feces were collected by siphoning at hourly intervals and the ADCs of dry matter, protein, and amino acids (AAs) were calculated. Nile tilapia exhibited a high ability to digest SBM and PBM, with most ADCs exceeding 90%. The type of reference diet affected the ADCs of protein and AAs on the test ingredients, with the SP reference diet providing the highest ADC, mainly in SBM. Digestibility data generated with a P-type reference diet demonstrated more practical relevance than those generated with an SP-type reference diet and can be well applied in digestibility studies for Nile tilapia.

Keywords: methodology, soybean meal, poultry by-product meal, *Oreochromis niloticus*

2.1 Introduction

Accurate elucidation of apparent digestibility coefficients (ADCs) of commonly used protein-rich nutrient sources is vital to formulating nutrient- and cost-effective diets for commercial species (Fracalossi and Cyrino, 2013; Hardy, 2010; Lupatsch et al., 1997). When evaluating feed ingredient digestibility, the test ingredient is paired with a reference diet, usually in the ratio 30:70 (NRC, 2011). High-quality semi-purified (SP) ingredients with well-defined composition and without anti-nutritional factors are still used in some digestibility trials to compose the reference diet (Glencross et al., 2007; Lovell, 1998). Such ingredients predominantly provide one macronutrient and only trace amounts of vitamins and minerals but can reduce palatability and consequently feed intake (Hardy and Barrows, 2002) besides not representing the reality of commercial diets. In contrast, despite presenting anti-nutritional factors, a reference diet composed of practical (P) ingredients has advantages such as similar composition to commercial feeds, high feed consumption because of high palatability, and production of more fecal material (NRC, 2011).

Soybean meal (SBM) and poultry by-product meal (PBM) were the test ingredients investigated in the present study because they are protein-rich sources widely used in commercial diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus). SBM is abundantly available and a cost-effective source of digestible plant protein and essential amino acids (EAAs) (Gatlin et al., 2007; Nguyen et al., 2009). PBM is an animal source of highly digestible protein and is a good alternative ingredient to fish meal because of its similar protein composition, high production volume, and relatively low cost (Cruz-Suárez et al., 2007; Hardy, 2010).

Nile tilapia belongs to the second most-produced fish group in aquaculture worldwide, contributing 4.4 million tonnes, with Brazil as the fourth largest producer (FAO, 2022a, b). Data on the nutrient digestibility of Nile tilapia are available but the methodology varies and lacks a standard regarding the reference diet composition (Borghesi et al., 2008; Cardoso et al., 2021; Davies et al., 2011; Maas et al., 2019). Therefore, we compared the use of different reference diet compositions (P or SP) in two important protein-rich feedstuffs to verify possible variation in the digestibility of protein and AAs by Nile tilapia.

2.2 Materials and Methods

Feed ingredients and diet preparation

Two reference diets were formulated (**Table 3**) with semi-purified (SP) or practical (P) ingredients to meet the nutritional requirements of Nile tilapia (Furuya, 2010) or *Oreochromis* sp. (NRC, 2011). Each reference diet was used to estimate the nutrient digestibility of two practical protein-rich ingredients (**Table 4**), PBM and SBM at a 30% level of inclusion. The proximate composition, AAs, and energy content of the feed ingredients (corn, fish meal, and soy protein concentrate) were determined before the experimental diet formulation. The two reference diets (SP and P) and the four test diets (SBM-SP, SBM-P, PBM-SP, and PBM-P) contained 0.1% of yttrium oxide as an inert marker.

Ingredients were ground using a hammer mill (1.0 mm screen mesh) and then manually sieved (0.6 mm), weighed, and homogenized in a horizontal mixer. The moisture of the ingredient mixture was adjusted to 25% using water. Diet extrusion was performed in a single-screw extruder (model MX-40; Inbramaq, Ribeirão Preto, Brazil). The extrusion parameters were as follows: temperature 100°C; thread speed 220 rpm; flow rate 20% of rated capacity; width to diameter ratio 2.3:1; thread diameter 92.5 mm; and cylinder length 210 mm. After extrusion, pellets (4 mm) were dried in a forced-air circulation oven at 55°C, and subsequently, they were each packaged and stored in air-tight containers at a constant temperature of 23°C. The proximate and AA compositions of the two reference diets and the four experimental diets are shown in **Tables 4** and **5**, respectively.

Table 3- Formulation of reference diets.

<i>Ingredients, g kg⁻¹ dry matter</i>	<i>Reference diets</i>	
	Semi-purified	Practical
<i>Corn starch</i> [†]	485.00	-
<i>Casein</i> [†]	283.00	-
<i>Gelatin</i> [†]	88.00	-
<i>Cellulose</i> [†]	43.00	-
<i>Corn</i> [‡]	-	450.00
<i>Fish meal</i> [‡]	-	350.00
<i>Soy protein concentrate</i> [§]	-	160.00
<i>Soybean oil</i> [¶]	49.00	18.00
<i>Dicalcium phosphate</i>	20.00	-
<i>Macromineral premix</i> ^{††}	20.00	-
<i>Micromineral and vitamin premix</i> ^{‡‡}	10.00	20.00
<i>Choline</i> ^{‡‡}	1.00	1.00
<i>Yttrium oxide</i> ^{§§}	1.00	1.00

[†] Produced by Rhoster (Araçoiaba da Serra, Brazil).

[‡] Corn (8% crude protein) and fish meal (58% crude protein) were provided by Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Brazil).

[§] Contained 62% crude protein and was produced by IMCOPA S.A. (Araucária, Brazil)

[¶] Produced by Bunge Alimentos S.A. (Gaspar, Brazil).

^{††} Composition per kg product: dicalcium phosphate 565 g, potassium chloride 60 g, sodium chloride 65 g, and magnesium sulphate 310 g.

^{‡‡} Choline bitartrate (1.0 g kg⁻¹) and vitamin-micromineral premix (produced by Cargill, São Paulo, Brazil), composition per kg: folic acid 420 mg, pantothenic acid 8333 mg, BHT 25,000 mg, biotin 134 mg, cobalt sulphate 27 mg, copper sulphate 1,833 mg, iron sulphate 8,000 mg, calcium iodate 92 mg, manganese sulphate 3,500 mg, niacin 8.333 mg, selenite 100 mg, vitamin (vit.) A 1,666,670 UI, vit. B₁ 2,083 mg, vit. B₁₂ 5,000 µg, vit. B₂ 4,166 mg vit. B₆ 3166 mg, ascorbic acid equivalent 66,670 mg, vit. D₃ 666,670 UI, vit. E 16,666 UI, vit. K₃ 833 mg, zinc sulphate 23,330 mg, inositol 50,000 mg, and calcium propionate 250,000 mg

^{§§} yttrium (III) oxide – 99,999% trace metal basis. Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).

Table 4- Analyzed nutritional composition of the reference diets and test ingredients.

<i>Composition, g kg⁻¹ dry matter</i>	<i>Reference diet</i>		<i>Test ingredients</i>	
	<i>Semi-purified</i>	<i>Practical</i>	<i>Soybean meal[†]</i>	<i>Poultry by-product meal[‡]</i>
<i>Dry matter</i>	877.40	904.10	882.70	963.40
<i>Crude protein</i>	385.23	352.28	544.60	671.10
<i>Ether extract</i>	68.30	65.40	22.60	171.20
<i>Neutral detergent fibre</i>	73.20	66.30	166.02	-
<i>Ash</i>	22.80	74.20	73.60	145.30
<i>Gross energy (kcal kg⁻¹)</i>	4858	4451	4863	5396
<i>Energy:Protein</i>	12.61	12.63	-	-
<i>Essential amino acids</i>				
<i>Arginine</i>	18.50	23.30	37.00	44.50
<i>Histidine</i>	8.80	8.23	13.10	12.60
<i>Isoleucine</i>	16.30	14.50	23.20	24.60
<i>Leucine</i>	29.60	27.10	38.60	44.60
<i>Lysine</i>	26.51	19.10	30.50	36.90
<i>Methionine</i>	9.10	7.40	6.80	12.70
<i>Phenylalanine</i>	16.81	16.60	25.50	24.80
<i>Threonine</i>	14.10	13.14	19.50	25.00
<i>Tryptophan</i>	3.72	3.82	6.80	6.30
<i>Valine</i>	20.77	16.00	24.10	30.30
<i>Non-essential amino acids</i>				
<i>Alanine</i>	17.71	18.95	21.90	41.70
<i>Aspartic acid</i>	26.54	34.96	57.90	53.50
<i>Cysteine</i>	1.34	4.11	7.40	7.10
<i>Glycine</i>	28.62	21.44	21.40	62.40
<i>Glutamic acid</i>	72.62	57.20	90.90	84.30
<i>Proline</i>	43.74	21.36	25.40	41.20
<i>Serine</i>	19.64	16.50	25.30	28.20

[†] Nicoluzzi Rações, Ltda (Penha, Brazil).

[‡] Kabsa S.A. (Porto Alegre, Brazil).

Table 5- Analyzed nutritional composition of the test diets.

<i>Composition, g kg⁻¹ dry matter</i>	<i>Soybean meal</i>		<i>Poultry by-product meal</i>	
	Semi-purified	Practical	Semi-purified	Practical
<i>Dry matter</i>	905.80	908.80	888.60	914.60
<i>Crude protein</i>	422.72	402.62	485.03	457.36
<i>Ether extract</i>	58.50	59.50	66.80	92.20
<i>Ash</i>	40.10	75.40	65.90	102.00
<i>Neutral detergent fibre</i>	116.10	118.40	51.30	57.60
<i>Gross energy (kcal g⁻¹)</i>	4864	4587	5019	4734
<i>Energy:Protein</i>	11.50	11.39	10.34	10.35
<i>Essential amino acids</i>				
<i> Arginine</i>	23.60	27.44	27.41	29.62
<i> Histidine</i>	10.00	9.70	10.62	9.90
<i> Isoleucine</i>	18.33	17.30	19.63	17.80
<i> Leucine</i>	32.23	30.72	35.40	32.54
<i> Lysine</i>	27.13	22.54	31.54	25.31
<i> Methionine</i>	8.00	7.71	10.65	7.73
<i> Phenylalanine</i>	19.70	19.72	20.03	19.00
<i> Threonine</i>	15.30	15.10	18.10	16.53
<i> Tryptophan</i>	4.70	4.72	4.80	4.65
<i> Valine</i>	21.90	18.60	24.40	20.63
<i>Non-essential amino acids</i>				
<i> Alanine</i>	18.73	19.90	26.30	26.40
<i> Aspartic acid</i>	35.50	41.90	36.30	40.80
<i> Cysteine</i>	2.90	4.90	2.52	4.52
<i> Glycine</i>	26.00	21.40	39.90	34.10
<i> Glutamic acid</i>	76.50	67.20	79.40	65.60
<i> Proline</i>	38.14	22.80	44.20	27.70
<i> Serine</i>	20.80	19.30	22.10	18.80

Fish and experimental conditions

The digestibility trial was performed in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil (27°43'45"S 48°30'31"W), following protocol 9377080618 approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA, UFSC). Nile tilapia juveniles of the GIFT strain, sexually inverted to male, were obtained from a commercial fish farm (Piscicultura Pomerode, Pomerode, Santa Catarina, Brazil). Before the digestibility trial, fish were acclimated to laboratory conditions for two weeks in three 1,000 L tanks connected to a recirculation system and equipped with biological and mechanical filtration, an air supply, and a heat exchanger. The temperature was set to 28°C, and the photoperiod was adjusted to 12 h.

Following this period, fish with an average initial weight of 65.05 g ± 12.37 and a total length of 14.75 cm ± 0.86 (mean ± standard deviation) were transferred to 24 experimental units (115 L circular tanks), making up biomass of approximately 1,500 g per unit (23 fish per unit). Tanks were connected to a closed freshwater recirculation system with aeration, mechanical and biological filtration, and temperature and photoperiod were adjusted to 28°C and 12 h of light, respectively. The experiment was conducted in a completely randomized design, using four replications for each experimental diet. Fish were fed twice daily (10h00 and 16h00) until apparent satiation and faecal collection only began seven days after changing the experimental diets to allow the excretion of all previously ingested feed. Feces were collected within each experimental unit by siphoning for 30 days. One hour after the last feeding, the tanks were cleaned, and the total water volume was renewed to avoid contamination of newly voided feces with uneaten feed and old feces. After cleaning, the water flow was interrupted for one hour and newly voided feces were collected by siphoning. The collected feces were lyophilized, homogenized, and stored at -20°C until analysis.

The water quality indicators were measured weekly, except for temperature, dissolved oxygen, and pH, which were monitored daily. The average values (± standard deviation) were as follows: temperature 27.96 ± 0.36°C; dissolved oxygen 5.69 ± 0.41 mg L⁻¹; pH 7.42 ± 0.24; salinity 1.97 ± 0.20 g L⁻¹; alkalinity 59.82 ± 8.30 CaCO₃ mg L⁻¹; total ammonia 0.55 ± 0.10 mg L⁻¹; and 0.01 mg L⁻¹ nitrite. All measured variables remained within the comfort range of Nile tilapia (Webster and Lim, 2006). The water inflow rate in each experimental unit was 25 mL s⁻¹.

Chemical analysis

The proximate analysis of the diet ingredients, diets, and feces followed procedures standardized by the “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1999): moisture

(dried at 105°C to a constant weight, method 950.01), total lipid (Soxhlet, method 920.39C), and ash (incineration at 550°C, method 942.05). Gross energy was determined using a calorimeter (PARR, model ASSY 6200) according to the manufacturer's instructions. Crude protein, the amino acid content, crude fibre and neutral detergent fibre of the diet ingredients (corn, fish meal, soy protein concentrate, poultry by-product, and soybean meal) were analysed using near-infrared spectroscopy (NIRs) at the Animal Nutrition Laboratory (Evonik, Guarulhos, Brazil).

Crude protein and amino acid analyses of feed and feces were performed by wet chemistry at the Evonik Laboratory (Hanau, Germany) using ion-exchange chromatography with post-column derivatisation with ninhydrin. Amino acids (AAs) were oxidised with performic acid and neutralised with sodium metabisulfite²⁵ (Commission Directive 1998). AAs were liberated from the protein by hydrolysis with 6N HCl for 24 h at 110°C and quantified using the internal standard method by measuring the absorption of reaction products with ninhydrin at 570 nm. The inert marker yttrium was measured using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) at the Atomic Spectrometry Laboratory (UFSC, Brazil). The samples were introduced using a pneumatic nebuliser.

Calculation of Apparent digestibility coefficient

Protein, AAs, and dry matter apparent digestibility coefficients (ADCs) were estimated using the following equations:

For the diets (NRC, 2011):

$$ADC_{nutr}\% = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ Marker}_{Diet}}{\% \text{ Marker}_{Feces}} \times \frac{\text{Nutrient}_{Feces}}{\text{Nutrient}_{Diet}} \right) \right]$$

For the test ingredients (Bureau et al., 1999):

$$ADC_{ing}\% = ADC_{td} + \left[(ADC_{td} - ADC_{ref}) \times \left[\frac{0.7 \times \text{Nutrient}_{ref}}{0.3 \times \text{Nutrient}_{ing}} \right] \right]$$

where nutr = nutrient, ing = ingredient, td = test diet, and ref = reference diet.

Statistical analysis

All data are reported as mean \pm standard deviation. To test differences between the two types of reference diets, ADC data were first tested for normality and homoscedasticity and then subjected to Student's *t*-test. The same procedures were applied to test the differences

between the ADCs of the tested ingredients (SBM and PBM) within each different reference diet (SP and P). Statistical analyses were performed using Statistica 10.0 software adopting a 5% confidence level.

2.3 Results

The ADCs of dry matter, protein, energy, and AAs in the reference diets used in this study are presented in **Table 6**. The ADCs of dry matter and crude protein of the P reference diet were higher than those of the SP reference diet. The ADCs of most AAs exceeded 90% and were similar between the reference diets. However, for the EAAs arginine and histidine and the non-essential amino acids (NEAA) aspartic acid and cysteine, the type of reference diet affected the ADC values, which were highest for the P reference diet. In turn, the ADC of leucine was higher in the SP reference diet. In both reference diets, the AAs arginine, lysine, and glutamic acid presented the highest ADC values (92.76–96.11%), whereas isoleucine presented the lowest (86.09–86.66%).

The ADCs of selected nutrients in SBM tested using the two types of reference diets are presented in **Table 7**. The type of ingredients used in the reference diets did not affect the ADCs of dry matter, while ADC of protein was higher in the SBM tested using the SP reference diet than the P reference diet. Similarly, the ADCs for all AAs were higher in SBM when tested using the SP versus the P-type reference diet, except for cysteine, though with no difference. The EAAs arginine, histidine, and lysine, and NEAAs aspartic acid and glutamic acid exhibited the highest ADC values (95.21–103.41%). In contrast, the EAA isoleucine exhibited the lowest ADC values (89.11 and 94.21%, respectively, for the P and SP diets).

The ADCs of the selected nutrients of PBM tested using two types of reference diets are presented in **Table 7**. The ADCs of dry matter, protein, and most AAs were not affected by the type of reference diet. However, the ADCs of histidine, glycine, and proline were higher in the PBM-SP diet, whereas only the ADC of cysteine was substantially higher in the PBM-P diet than in the PBM-SP diet. For the latter test ingredient, the EAAs arginine, histidine, and lysine, and the NEAAs alanine, glycine, and glutamic acid exhibited the highest values of ADC (93.28–98.84%), regardless of the type of reference diet.

Table 6- Apparent digestibility coefficients of dry matter, protein, energy, and amino acids of the two reference diets for Nile tilapia.

Nutrient	Reference diet		<i>p</i> value
	Semi-purified	Practical	
Dry matter	75.27 ± 2.64 ^b	80.14 ± 0.55 ^a	0.044
Crude protein	88.90 ± 0.25 ^b	90.40 ± 0.43 ^a	0.023
Energy	80.31 ± 0.38	82.08 ± 0.57	0.060
<i>Essential amino acids</i>			
Arginine	92.76 ± 0.97 ^b	96.11 ± 0.18 ^a	0.008
Histidine	90.05 ± 0.87 ^b	92.89 ± 0.21 ^a	0.010
Isoleucine	86.66 ± 1.21	86.09 ± 1.03	0.609
Leucine	90.32 ± 0.88 ^a	87.84 ± 0.58 ^b	0.029
Lysine	94.19 ± 0.79	94.79 ± 0.29	0.286
Methionine	92.48 ± 0.61	91.56 ± 0.34	0.111
Phenylalanine	89.25 ± 0.85	90.68 ± 0.26	0.061
Threonine	88.62 ± 1.08	87.84 ± 0.57	0.353
Valine	90.46 ± 0.81	89.87 ± 0.36	0.333
<i>Non-essential amino acids</i>			
Alanine	89.07 ± 1.04	90.34 ± 0.39	0.132
Aspartic acid	90.72 ± 1.05 ^b	93.71 ± 0.32 ^a	0.016
Cysteine	74.88 ± 2.25 ^b	89.56 ± 0.33 ^a	0.001
Glycine	89.52 ± 1.00	91.23 ± 0.59	0.088
Glutamic acid	93.15 ± 0.70	94.44 ± 0.19	0.050
Proline	91.88 ± 0.72	91.32 ± 0.36	0.318
Serine	92.63 ± 0.79	92.67 ± 0.21	0.936
<i>Mean ADC for all AAs</i>	89.81 ± 4.28	91.27 ± 2.63	

^{a, b} Values followed by different superscripts within the same row are significantly different ($p < 0.05$)

Table 7- Apparent digestibility coefficients of dry matter, protein, energy, and amino acids in soybean meal and poultry by-product meal for Nile tilapia.

Nutrient	Soybean meal		p value	Poultry by-product meal		p value
	Semi-purified	Practical		Semi-purified	Practical	
Dry matter	80.13 ±1.44	78.40 ±1.82	0.236	87.38 ±1.11	86.26 ±1.64	0.302
Crude protein	99.64 ±1.12 ^a	93.94 ±1.51 ^b	0.003	95.75 ±1.70	94.63 ±2.20	0.450
Energy	80.04 ±0.42	80.75 ±0.81	0.391	89.56 ±0.17	90.27 ±1.54	0.919
<i>Essential amino acids</i>						
Arginine	100.99 ±1.16 ^a	97.19 ±0.53 ^b	0.002	94.18 ±1.10	93.70 ±1.35	0.598
Histidine	101.92 ±0.85 ^a	95.21 ±1.12 ^b	0.000	97.07 ±1.90 ^A	93.29 ±2.31 ^B	0.045
Isoleucine	94.21 ±1.64 ^a	89.11 ±2.24 ^b	0.021	92.81 ±2.62	94.70 ±3.05	0.383
Leucine	97.11 ±1.54 ^a	92.00 ±1.32 ^b	0.005	92.93 ±2.20	94.85 ±2.90	0.333
Lysine	100.83 ±1.04 ^a	96.04 ±0.72 ^b	0.001	94.24 ±1.41	93.28 ±1.46	0.378
Methionine	103.35 ±1.82 ^a	93.62 ±1.61 ^b	0.001	94.16 ±2.00	92.35 ±1.90	0.236
Phenylalanine	99.44 ±0.88 ^a	93.49 ±1.52 ^b	0.002	94.71 ±2.11	92.96 ±2.72	0.348
Threonine	94.77 ±0.97 ^a	91.12 ±2.13 ^b	0.042	91.65 ±2.00	93.26 ±2.58	0.363
Valine	100.43 ±1.12 ^a	92.58 ±1.84 ^b	0.001	93.23 ±2.03	92.72 ±2.39	0.759
<i>Non-essential amino acids</i>						
Alanine	99.97 ±2.41 ^a	92.52 ±2.25 ^b	0.008	94.55 ±1.64	94.31 ±2.03	0.864
Aspartic acid	100.51 ±0.76 ^a	96.57 ±1.02 ^b	0.003	92.41 ±1.54	91.83 ±2.09	0.675
Cysteine	94.44 ±0.66	93.02 ±1.88	0.275	84.09 ±2.33 ^B	90.78 ±2.88 ^A	0.011
Glycine	104.71 ±5.62 ^a	90.32 ±2.94 ^b	0.007	98.84 ±1.37 ^A	95.35 ±1.56 ^B	0.015
Glutamic acid	103.41 ±0.72 ^a	97.51 ±0.93 ^b	0.000	96.40 ±1.85	93.39 ±1.85	0.061
Proline	107.52 ±2.60 ^a	93.87 ±1.81 ^b	0.000	103.90 ±1.78 ^A	96.11 ±1.72 ^B	0.001
Serine	100.70 ±0.97 ^a	94.65 ±1.40 ^b	0.001	92.94 ±2.14	93.49 ±2.17	0.731
<i>Mean ADC for all AAs</i>	100.19 ±3.87	93.66 ±2.74		94.10 ±4.23	93.43 ±2.36	

^a ^b For soybean meal: within the same row, values followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

^A ^B For poultry by-products, within the same row, values followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

2.4 Discussion

The correct assessment of nutrient utilization for a species of great economic importance such as Nile tilapia is essential for formulating efficient diets. Several strategies can be applied to assess the nutritional quality of ingredients; however, the choice of these strategies can affect data interpretation (Glencross, 2020). The composition of the reference diet varies greatly in digestibility studies for Nile tilapia, from those using only practical (Cardoso et al., 2021; Guimarães et al., 2008; Hernández et al., 2010; Köprücü and Özdemir, 2005; Magalhães et al., 2017; Schneider et al., 2004; Vidal et al., 2015, 2017) or SP type ingredients (Borghesi et al., 2008; Furuya et al., 2001; Rodrigues et al., 2012) to those using a mixture of both (Davies et al., 2011; Xavier et al., 2014). Nevertheless, data on the ADCs of nutrients within reference diets are difficult to interpret or discuss. Our findings showed that the type of ingredients in the reference diet could affect the ADCs of dry matter, protein, and selected AAs.

For both types of reference diets, the digestibility of protein and AAs was similar, with minor variations in ADCs, except for cysteine. Four AAs (arginine, histidine, aspartic acid, and cysteine) were more digestible in the P reference diet. Leucine was the only AA with a high ADC in the SP reference diet. Therefore, these differences suggested that the digestibility of a particular AA depends on the type of protein making up the P or SP reference diet and the ability of Nile tilapia to digest each particular AA, considering their chemical characteristics. Arginine and histidine are positively charged (basic) AAs, whereas aspartic acid is a negatively charged (acidic) AA under physiological conditions, with both types mostly exposed to the protein surface. These charged R-groups are more hydrophilic, facilitating enzyme-catalysed reactions by functioning as proton donors and acceptors (Nelson and Cox, 2017). Considering our results and that a reference diet with P ingredients is more palatable than the SP type (NRC, 2011), we speculated that the highest feed intake, promoted by the greatest diet palatability increases the activity of digestive enzymes (Moraes and De Almeida, 2020). Although our findings exhibited similarities between the protein ADC and the average AA coefficients, individual AA ADCs are variable and can be higher or lower than the coefficient value for protein digestibility (NRC, 2011; Storebakken et al., 2000), as also seen in our study.

SBM exhibited very high digestibility for protein (93.94% and 99.64%), with most AA ADCs exceeding 93%, regardless of the type of reference diet used. These findings were similar to those previously reported for Nile tilapia: 92.72% (Furuya et al., 2001), 91.56% (Pezzato et al., 2002), and 92.74% (Guimarães et al., 2008) but higher than that reported by Ribeiro et al. (2012) (86.01%), that used the dissection method for fecal collection. A comparison of the

ADCs of SBM using different reference diets showed that SBM-SP resulted in a higher ADC for dry matter (80.13%) and protein (99.64%) than SBM-P (78.40% and 93.94%, respectively). The AA digestibility values followed the same pattern, with mean ADCs of 100.19% and 93.66% for the SBM-SP and SBM-P diets, respectively. Guimarães et al. (2008) reported a similar result for the average AA ADC (92.30%), while a lower value (87.10%) was reported by Köprücü and Özdemir (2005), who used the same combination of SBM and a P-type reference diet.

The variation in our study regarding the protein and AA digestibility of SBM could be explained by the differences in diet palatability and subsequent feed intake, anti-nutritional factors, and endogenous nitrogen (N) losses. The lower palatability of the SP ingredients compared to the P ingredients could partially explain such discrepancies. Moreover, SBM contains anti-nutritional factors that negatively affect its palatability to fish compared to animal sources, such as fish meal or PBM (Gatlin, 2007; NRC, 2011). The combination of an SP reference diet and SBM resulted in reduced feed intake, as evident in our trial. Fish were fed twice a day to apparent satiation, and during daily feeding (although feed intake was not recorded), fish fed with the P diet combinations exhibited greater voracity.

Another important factor in nutrient utilization is the speed at which the feed passes through the digestive tract because transit time has been reported to affect nutrient utilization efficiency (Elesho et al., 2021; Henken et al., 1985; NRC, 2011; Riche et al., 2004). When fish consumes less feed, as evident from the SBM-SP diet, the transit time is lowered, and the feed is subjected to longer digestion exposure, resulting in increased absorption (Moraes and De Almeida, 2020). In addition to palatability, the absence of anti-nutritional factors in SP ingredients made them more digestible to fish, thereby reducing the need for high feed intake. Phytate, an anti-nutritional factor, present in plant feedstuffs such as soybean meal, cannot be digested by fish (Kumar et al., 2012; Oliva-Teles et al., 1998; Rodehutschord and Pfeffer, 1995). Besides, the deleterious effect of phytate on phosphorous availability, it also inhibits proteases, such as trypsin and pepsin (Liu et al., 2009), decreasing protein and AA digestibility (Lima et al., 2021; Spinelli et al., 1983). The presence of phytate in plant ingredients composing the P reference diet could explain the lower ADC of protein and AAs in the SMB-P diet compared to the SBPM-SP diet.

A possible reason for the higher ADC values in the SBM obtained when feeding the SP diet is the endogenous loss that occurs during the digestion process. The main sources of N endogenous AA losses in animals are proteins that are endogenously synthesised and secreted

in the digestive tract but are not digested and re-absorbed (Nyachoti et al., 1997). Endogenous losses can be induced by ingestion of a diet with a particular composition, such as protein level and fibre type (Cowieson and Ravindran, 2007; Stein et al., 1999). SP and P ingredients have distinct nutritional compositions and properties that directly affect the final characteristics of the experimental diets. Although the nutrient contents of the reference diets were similar, the protein type (casein and gelatin *versus* fish meal and soy protein concentrate) and the fibre type (cellulose *versus* corn) have distinct characteristics and can affect endogenous loss by changing the viscosity and ingesta transit speed, which in turn can affect the secretion of mucin and epithelial cell turnover (Parsons et al., 1983; Sauer et al., 1991). The highest ADC of AAs in the SBM-SP diet suggests that the ingredients used in the SP reference diet reduced endogenous AA losses. This may occur during the digestive process because of the absence of anti-nutritional factors in the SP ingredients and the interaction among dietary nutrients, such as fibre and protein.

Notably, regardless of the type of reference diet tested, the AAs arginine, histidine, lysine, aspartic acid, and glutamic acid presented the highest ADC values (> 95%) in SBM. This is probably because they are charged AAs, highly hydrophilic and more susceptible to enzyme reactions. Possible explanations for coefficients above 100% include analytical errors for nutrients and markers, sampling, improper diet mixing, or interactions among diet ingredients (Glencross et al., 2007). We suggest that the SP ingredients, in addition to not having anti-nutritional factors and reducing endogenous AA losses, may interact with the nutrients contained in the SBM leading to overestimations of the final ADC values of some AAs. The digestibility of all EAAs was high in both types of reference diet, confirming the applicability of this ingredient as a vegetable source of digestible EAAs in aquafeeds, as previously reported by Elesho et al. (2021) and Vidal et al. (2017).

The nutrient digestibility values for PBM revealed less influence from the reference diet composition. Data showed high digestibility of dry matter (86.26% and 87.38%), protein (94.63 and 95.75%), and most of the AAs (> 93%). The mean AA ADCs were 94.10% and 93.43% for PBM-SP and PBM-P, respectively, similar to the mean 91.20% reported by Guimarães et al. (2008). PBM is considered one of the most promising alternatives for replacing fish meal because of its high protein content and quality, AA profile, essential fatty acids, vitamins, minerals, and good palatability (Cruz-Suárez et al., 2007; Gunben et al., 2014). The nutrient ADC of PBM confirmed the applicability of this ingredient in aquafeeds for Nile tilapia and other omnivorous species, such as African catfish (*Clarias gariepinus*) and Pacific white shrimp

(*Litopenaeus vannamei*), as reported by Eleshio et al. (2021) and Cruz-Suárez et al. (2007), respectively. We did not observe a reduction in voracity in Nile tilapia when PBM was tested in an SP reference diet. The good palatability of animal protein sources could have minimised the effects of a non-attractive SP reference diet as registered with the plant ingredient SBM. Thus, the potential effects of an SP reference diet in increasing the ADC values, verified when testing SBM, were observed in minor proportions when testing PBM because only three of the 16 evaluated AAs presented higher ADCs.

2.5 Conclusions

As a typical omnivorous species, Nile tilapia exhibits a very high ability to digest different types of protein-rich ingredients (SBM and PBM), with most ADCs exceeding 90%. Our findings demonstrate that the type of ingredients used in the reference diet (SP or P) affects more significantly the plant protein source SBM compared to the animal protein source PBM. Thus, the use of practical ingredients in the reference diet has more relevance and can be well applied in digestibility studies for Nile tilapia considering the diet palatability, amount of feces collected, cost, and availability.

2.6 References

- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C., USA.
- Borghesi, R.; Portz, L.; Oetterer, M.; Cyrino, J. E. P. 2008. Apparent digestibility coefficient of protein and amino acids of acid, biological and enzymatic silage for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition* 14: 242–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00523.x>
- Bureau, D. P.; Harris, A. M.; Cho, C. Y. 1999. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout. *Aquaculture* 180: 345–358. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00210-0)
- Cardoso, M. S.; Godoy, A. C.; Oxford, J. H.; Rodrigues, R.; Cardoso, M. S.; Bittencourt, F.; Signor, A.; Boscolo, W. R.; Feiden, A. 2021. Apparent digestibility of protein hydrolysates from chicken and swine slaughter residues for Nile tilapia. *Aquaculture* 530: 735720. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735720>
- Cowieson, A. J.; Ravindran, V. 2007. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 98: 745–752. <https://doi.org/10.1017/s0007114507750894>

Cruz-Suárez, L. E.; Nieto-López, M.; Guajardo-Barbosa, C.; Tapia-Salazar, M.; Scholz, U.; Ricque-Marie, D. 2007. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture* 272: 466–476. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.084>

Davies, S. J.; Abdel-Warith, A. A.; Gouveia, A. 2011. Digestibility characteristics of selected feed ingredients for developing bespoke diets for Nile tilapia culture in Europe and North America. *Journal of the World Aquaculture Society* 42: 388–398. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00478.x>

Elesho, F. E.; Kröckel, S.; Sutter, D. A. H.; Nuraini, R.; Chen, I. J.; Verreth, J. A. J.; Schrama, J. W. 2021. Effect of feeding level on the digestibility of alternative protein-rich ingredients for African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 544: 737108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737108>

FAO. 2022a. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Towards Blue Transformation. Rome, IT. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

FAO. 2022b. FishStatJ: Universal software for fishery statistical time series: Aquaculture production 1950–2020. FAO, Rome, IT. Available at: <https://www.fao.org/fishery/en/statistics> [Accessed Sept 20, 2022]

Fracalossi, D. M.; Cyrino, J. E. P. 2013. Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 2ed. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. Florianópolis, SC, Brazil (in Portuguese).

Furuya, W. M. 2010. Tabelas Brasileiras para a Nutrição de Tilápias. 1ed. GFM, Toledo, PR, Brazil (in Portuguese).

Furuya, W. M.; Pezzato, L. E.; Pezzato, A. C.; Barros, M. M.; Miranda, E. C. 2001. Digestibility coefficients and digestible amino acids values of some ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 30: 1143–1149. (in Portuguese, with abstract in English). <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000500002>

Gatlin, 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.; Rust, M.; Sealey, W.; Skonberg, D.; Souza, E. J.; Stone, D.; Wilson, R.; Wurtele, E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. *Aquaculture Research* 38: 551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>

Glencross, B. D.; Booth, M.; Allan, G. L. 2007. A feed is only as good as its ingredients – a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition* 13: 17–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00450.x>

Glencross, B. D. 2020. A feed is still only as good as its ingredients: an update on the nutritional research strategies for the optimal evaluation of ingredients for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition* 26: 1871–1883. <https://doi.org/10.1111/anu.13138>

Guimarães, I. G.; Pezzato, L. E.; Barros, M. M. 2008. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition* 14: 396–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00540.x>

Gunben, E. M.; Senoo, S.; Yong, A. S. K.; Shapawi, R. 2014. High potential of poultry by-product meal as a main protein source in the formulated feeds for a commonly cultured grouper in Malaysia (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Sains Malaysiana* 43: 399–405.

Hardy, R. W. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41: 770–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x>

Hardy, W. R.; Barrows, F. T. 2002. *Fish Nutrition*. Academic Press, Elsevier Science. California, USA.

Henken, A. M.; Kleingeld, D. W.; & Tijssen, P. A. T. 1985. The effect of feeding level on apparent digestibility of dietary dry matter, crude protein and gross energy in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture* 5: 1–11. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90235-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90235-2)

Hernández, C.; Olvera-Novoa, M. A.; Hardy, R. W.; Hermosillo, A.; Reyes, C.; Gonzalez, B. 2010. Complete replacement of fish meal by porcine and poultry by-product meals in practical diets for fingerling Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: digestibility and growth performance. *Aquaculture Nutrition* 16: 54–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00639.x>

Köprücü, K.; Özdemir, Y. 2005. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 250: 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.003>

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: 335–364 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>

Lima, G. S.; Lima, M. R.; Gomes, G. A.; Cavalcante, D. T.; Guerra, R. R.; Silva, J. H. V.; Cardoso, A. S.; Kaneko, I. N.; Costa, F. G. P. 2021. Superdosing of bacterial phytase (EC 3.1.3.26) in broiler diets with reduced levels of digestible amino acids. *Livestock Science* 253: 104714. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104714>

Liu, N.; Ru, Y. J.; Li, F. D.; Wang, J.; Lei, X. 2009. Effect of dietary phytate and phytase on proteolytic digestion and growth regulation of broilers. *Archives of Animal Nutrition* 63: 292–303. <https://doi.org/10.1080/17450390903020422>

Lovell, T. 1998. *Nutrition and Feeding of Fish*. 2ed. Kluwer Academic Press. Boston, MS, USA.

Lupatsch, I.; Kissil, G. W. M.; Sklan, D.; Pfeffer, E. 1997. Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their predictability in compound diets for gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture Nutrition* 3: 81–89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1997.00076.x>

Maas, R. M.; Verdegem, M. C. J.; Schrama, J. W. 2019. Effect of non-starch polysaccharide composition and enzyme supplementation on growth performance and nutrient digestibility in

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition* 25(3): 622–632. <https://doi.org/10.1111/anu.12884>

Magalhães, S. C. Q.; Cabrita, A. R. J.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Rema, P.; Maia, M. R. G.; Valente, L. M. P.; Fonseca, A. J. M. 2017. Apparent digestibility coefficients of European grain legumes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition* 24: 332–340. <https://doi.org/10.1111/anu.12564>

Moraes, G.; De Almeida, L. C. 2020. Nutrition and functional aspects of digestion in fish. In: Baldisserotto, B., Cyrino, J. E. P., & Urbinati, E. C. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00011-7>

Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7ed. W.H. Freeman. New York, NY, USA.

Nguyen, T. N.; Davis, A. D.; Saoud, I. P. 2009. Evaluation of alternative protein sources to replace fish meal in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis* spp. *Journal of the World Aquaculture Society* 40: 113–121. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00230.x>

NRC – National Research Council. 2011. *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National Academic Press. Washington, D.C., USA.

Nyachoti, C. M.; de Lange, C. F. M.; McBride, B. W.; Schulze, H. 1997. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: A review. *Canadian Journal of Animal Science* 77: 149–163. <https://doi.org/10.4141/A96-044>

Oliva-Teles, A., Pereira, J. P., Gouveia, A., & Gomes, E. 1998. Utilization of diets supplemented with microbial phytase by sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Aquatic Living Resources* 11: 255–259 [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(98\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(98)80008-9)

Parsons, C. M.; Potter, L. M.; Brown, R. D. 1983. Effects of dietary carbohydrate and of intestinal microflora on excretion of endogenous amino acids by poultry. *Poultry Science* 62: 483–489. <https://doi.org/10.3382/ps.0620483>

Pezzato, L. E.; Miranda, E. C.; Barros, M. M.; Pinto, L. G. Q.; Furuya W. M.; Pezzato, A. C. 2002. Apparent Digestibility of Feedstuffs by Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31: 1595–1604. (in Portuguese, with abstract in English). <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000700001>

Ribeiro, F. B.; Lanna, E. A. T.; Bomfim, M. A. D.; Donzele, J. L.; Quadros, M.; Cunha, P. S. L. 2012. True and apparent digestibility of protein and amino acids of feed in Nile tilapia. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40: 939–946. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000500001>

Riche, M.; Haley, D. I.; Oetker, M.; Garbrecht, S. 2004. Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 234: 657–673. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.012>

Rodehutsord, M.; Pfeffer, E. 1995. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Water Science and Technology* 31: 143–147. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00433-N](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00433-N)

Rodrigues, A. P. O.; Gominho-Rosa, M. D. C.; Ferreira, C. E.; Francisco, A.; Fracalossi, D. M. 2012. Different utilization of plant sources by the omnivores jundia catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition* 18: 65–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00877.x>

Sauer, W. C.; Mosenthin, R.; Ahrens, F.; Den Hartog, L. A. 1991. The effect of source of fiber on ileal and fecal amino acid digestibility and bacterial nitrogen excretion in growing pigs. *Journal of Animal Science* 69: 4070–4077. <https://doi.org/10.2527/1991.69104070x>

Schneider, O.; Amirkolaie, A. K.; Vera-Cartas, J.; Eding, E. H.; Schrama, J. W.; Verreth, J. A. J. V. 2004. Digestibility, faeces recovery, and related carbon, nitrogen and phosphorus balances of five feed ingredients evaluated as fishmeal alternatives in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research* 35: 1370–1379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01179.x>

Spinelli, J.; Houle, C. R.; Wekell, J. C. 1983. The effect of phytates on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium. *Aquaculture* 30: 71–83. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(83\)90153-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(83)90153-9)

Stein, H. H.; Trottier, N. L.; Bellaver, C.; Easter, R. A. 1999. The effect of feeding level and physiological status on total flow and amino acid composition of endogenous protein at the distal ileum in swine. *Journal of Animal Science* 77: 1180–1187. <https://doi.org/10.2527/1999.7751180x>

Storebakken, T.; Shearer, K. D.; Baeverfjord, G.; Nielsen, B. G.; Asgard, T.; Scott, T.; De Laporteet, A. 2000. Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with wheat gluten. *Aquaculture* 184: 115–132. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00316-6)

Vidal, L. V. O.; Xavier, T. O.; Michelato, M.; Martins, E. N.; Prezzato, L. E.; Furuya, W. M. 2015. Apparent protein and energy digestibility and amino acid availability of corn and co-products in extruded diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 46: 183–190. <https://doi.org/10.1111/jwas.12184>

Vidal, L. V. O.; Xavier, T. O.; Moutra, L. B.; Graciano, T. S.; Martins, E. N.; Furuya, W. M. 2017. Apparent digestibility of soybean coproducts in extruded diet for Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition* 23: 228–235. <https://doi.org/10.1111/anu.12383>

Webster C. D.; Lim C. 2006. *Tilapia: Biology, Culture, and Nutrition*. CRC Press, Florida, USA.

Xavier, T. O.; Michelato, M.; Vidal, L. V. O.; Furuya, V. R. B.; Furuya, W. M. 2014. Apparent Protein and Energy Digestibility and Amino Acid Availability of Commercial Meat and Bone Meal for Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 45: 439–446. <https://doi.org/10.1111/jwas.12127>

3 ARTIGO 2 - Frequência alimentar e nível de arraçoamento afetam a digestibilidade da proteína e aminoácidos para a tilápia-do-nylo

Maria Fernanda Oliveira da Silva^a, Cristina Rios^b, Rafael de Souza Romaneli^a, Karthik Masagounder^c, Carlos Peres Silva^b, Débora Machado Fracalossi^{a*}

^aDepartamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

^cEvonik Operations GmbH, Hanau-Wolfgang, Germany

*Autor correspondente: Débora M. Fracalossi, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346. CEP: 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. E-mail: debora.fracalossi@ufsc.br

Resumo

A avaliação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes de uma dieta em diferentes estratégias de manejo alimentar são ferramentas importantes para auxiliar na formulação de rações eficientes tanto nos aspectos nutricionais, econômicos e ambientais. A capacidade dos peixes de digerir e utilizar os nutrientes em uma ração pode ser influenciada por fatores como a frequência alimentar (FA) e o nível de alimentação (NA). Foi realizado um ensaio de digestibilidade em um arranjo fatorial para testar FA (duas, quatro ou seis vezes ao dia) e NA (restrito ou saciedade aparente), testados em quadruplicata. Após o período de aclimação, juvenis de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT, peso inicial $63,75 \pm 12,60$ g foram transferidos para 24 unidades experimentais (115 L), perfazendo uma biomassa de aproximadamente 1.500 g por unidade. Os grupos de peixes foram alimentados de acordo com os respectivos tratamentos por quarenta dias e a coleta de fezes iniciou-se após o décimo dia de alimentação. A limpeza dos tanques foi realizada 1 h após a última alimentação, o volume total de água dos tanques foi renovado e a coleta de fezes foi realizada por sifonagem. Foram calculados os CDA da matéria seca, energia, proteína, aminoácidos essenciais (AEE) e não essenciais (AANE). Os dados foram submetidos à ANOVA bifatorial e, quando detectadas diferenças, ao teste de Tukey a um nível de significância de 5%. Houve interação entre os CDA da proteína ($p < 0,05$), sendo o menor valor encontrado para os peixes alimentados duas vezes ao dia no regime restrito (80,57%), enquanto os demais tratamentos apresentaram valores estatisticamente iguais, variando de 83,69-85,87%. Houve também interação entre FA e NA para os CDA dos AAE arginina, histidina, lisina, metionina, treonina e valina e para todos os AANE, com exceção do ácido glutâmico. Os menores coeficientes foram encontrados quando os peixes foram alimentados duas vezes ao dia no regime restrito e, os maiores, nos tratamentos com maior FA (quatro e seis) e em peixes alimentados até a saciedade aparente. Não foram encontradas diferenças ou interação entre FA e NA para os CDA de matéria seca e energia ($p > 0,05$). Para peixes alimentados sob regime restrito, o aumento da frequência alimentar para quatro e seis vezes ao dia foi positivo para a digestibilidade da proteína e maioria dos aminoácidos, enquanto para os peixes alimentados até a saciedade aparente, o aumento da frequência alimentar não afetou a digestibilidade.

Palavras-chave: metodologia, manejo alimentar, enzimas, *Oreochromis niloticus*

Abstract

The ability of fish to digest and utilize dietary nutrients can be influenced by several factors such as feeding frequency, feeding level, and digestive enzyme activity. Therefore, the evaluation of the apparent digestibility coefficients (ADC) of nutrients when using different feed management strategies is an important tool to help formulate nutritionally efficient diets. A digestibility trial was carried out with Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) of the GIFT strain in a factorial arrangement to test two factors: feeding frequency (FF: two, four, or six times a day) and feeding level (FL: restricted or apparent satiation), totaling six dietary treatments, tested in quadruplicate. After the acclimation period, juveniles with an average initial weight 63.75 ± 12.60 g were transferred to 24 experimental units (115 L circular tanks), connected to a water recirculating system, making up a biomass of approximately 1,500 g per unit (23 fish per unit). After the last daily feeding and cleaning of the tanks, feces were collected by siphoning at hourly intervals and the ADCs of dry matter, energy, protein, and amino acids (AA) were measured. No differences nor interaction between FF and FL were found for the ADC of dry matter and energy but there was interaction between the ADC of protein and most AA. Trypsin activity was not affected by FF nor FL, but chymotrypsin activity was influenced by FL. In fish fed under the restricted regime, increasing FF to four and six times a day had a positive effect on protein and AA digestibility, while in fish fed to apparent satiation, increasing FF did not affect digestibility. Results demonstrate that an adequate feeding management, regarding FF and FL, can benefit ADC of some nutrients, especially protein and AA.

Keywords: methodology, feed management, enzymes, *Oreochromis niloticus*

3.1 Introdução

O aperfeiçoamento das dietas e um adequado manejo alimentar são essenciais para o avanço da piscicultura. Nesse cenário, a avaliação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes de uma dieta em diferentes estratégias de manejo alimentar são ferramentas importantes para auxiliar na formulação de rações nutricionais, econômica e ambientalmente eficientes (Fracalossi, et al., 2013; Hardy, 2010; Lupatsch et al., 1997; Pezzato, Barros e Furuya, 2009).

A digestibilidade de um alimento refere-se à quantidade ou proporção de seus nutrientes que são absorvidos pelo organismo, pois exclui sua perda por excreção nas fezes (Glencross, Both, e Allan, 2007). A capacidade de um animal de digerir a ração está diretamente relacionada à atividade enzimática presente no trato digestório, uma vez que os processos de digestão e absorção de nutrientes dependem da ação de enzimas (Moraes e De Almeida, 2020). Os peixes tem capacidade de modular seu perfil digestivo diante de diferentes fontes, tipos e quantidades de nutrientes na dieta, o que é um atributo adaptativo favorável às condições de piscicultura intensiva (De Almeida et al., 2006; Lundstedt et al., 2004; Moraes e Bidinotto, 2000). A capacidade digestiva dos peixes pode variar de acordo com a espécie, idade, disponibilidade de alimento, temperatura e processamento dos alimentos (García-Carreño et al., 2002).

A frequência alimentar (FA) e o nível de alimentação (NA) são importantes estratégias de manejo e, por estarem associadas à disponibilidade de alimentos e estímulos no sistema digestório, também podem influenciar na digestibilidade de nutrientes e energia de uma dieta (Riche et al., 2004). Quando adequados, a FA e o NA podem beneficiar o uso da dieta, reduzir o desperdício, proporcionar melhoria na qualidade da água e crescimento mais homogêneo do lote de peixes (Lee, Cho e Kim, 2000; Santos et al., 2015; Wang et al., 2007).

A tilápia-do-nilo pertence ao segundo grupo de peixes mais produzidos na aquicultura mundial, com 4,4 milhões de toneladas em 2020. No Brasil, é a espécie de peixe mais cultivada, com 486 toneladas produzidas em 2020, tornando-se o quarto maior produtor mundial (FAO, 2022a, b). À medida que a importância comercial da espécie aumenta, é importante aprimorar os estudos, investigar a utilização dos nutrientes da dieta e a melhor forma de conduzir estudos de digestibilidade. Portanto, comparamos o efeito do uso de diferentes frequências alimentares e níveis de alimentação e suas possíveis interações na digestibilidade da matéria seca, proteína, aminoácidos (AA) e energia em juvenis de tilápia-do-nilo.

3.2 Materiais e Métodos

Preparação da dieta e ingredientes

Uma dieta experimental foi formulada com ingredientes práticos para atender as exigências nutricionais da Tilápia, *Oreochromis* spp. (NRC, 2011) (Tabela 8). Antes da formulação da dieta experimental, os ingredientes farelo de soja, milho, farinha de vísceras de aves e farinha de carne tiveram sua composição centesimal, perfil de aminoácidos e conteúdo energético determinados. Os ingredientes secos foram moídos individualmente em moinho de martelos (peneira de 1,0 mm), peneirados manualmente (0,6 mm), pesados e homogeneizados em misturador horizontal (Inbramaq, Riberão Preto, Brasil). O marcador inerte, óxido de ítrio, foi primeiramente incorporado aos micro-ingredientes (Premix, DL-Metionina, Colina e BHT) e, posteriormente, todos foram adicionados a mistura dos demais ingredientes. Após homogeneização dos ingredientes secos, o óleo foi incorporado e homogeneizado. A umidade foi ajustada para 23% com água destilada para extrusão em extrusora monorosca modelo MX40 (Inbramaq, Ribeirão Preto, Brasil). Os parâmetros de extrusão foram os seguintes: temperatura de 100°C, vazão a 20% da capacidade nominal, velocidade da rosca de 220 rpm, relação largura:diâmetro de 2,3:1, diâmetro da rosca de 92,5 mm e comprimento do cilindro de 210 mm. Após a extrusão, os pellets (2-3 mm) foram secos em estufa de circulação de ar a 50°C por 4h. Após secagem em estufa, a dieta experimental foi embalada e armazenada em recipientes hermeticamente fechados, protegidos da luz, a 4°C.

Tabela 8 – Formulação e composição centesimal da dieta experimental.

Ingredientes	g kg⁻¹ matéria seca
Farelo de soja ^a	504.0
Milho ^a	333.0
Farinha de vísceras de aves ^b	75.0
Farinha de carne ^a	64.0
Premix vitamínico-micromineral ^c	10.0
Óleo de soja ^d	5.00
DL-Metionina ^e	3.50
Colina ^c	1.00
BHT ^f	1.00
Óxido de ítrio ^g	1.00
Composição analisada	
Matéria seca	897.10
Proteína bruta	377.90

Extrato etéreo	64.80
Fibra em detergente neutro	91.81
Cinzas	61.40
Energia bruta, kcal kg ⁻¹	4,450
Energia:Proteína ^h	11.77

Aminoácidos essenciais

Arginina	25.60
Histidina	9.06
Isoleucina	15.74
Leucina	28.87
Lisina	21.00
Metionina	8.74
Metionina + cistina	13.86
Fenilalanina	17.94
Treonina	14.18
Valina	17.66

Aminoácidos não essenciais

Alanina	19.24
Ácido aspártico	37.43
Cistina	5.12
Ácido glutâmico	61.06
Glicina	21.26
Prolina	22.04
Serina	17.92

^a Milho (8% de proteína bruta), farelo de soja (46% de proteína bruta) e farinha de carne (49% de proteína bruta) foram fornecidos pela Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Brasil).

^b Farinha de vísceras de aves (65% de proteína bruta) produzida pela Kabsa S.A. (Porto Alegre, Brasil).

^c Bitartrato de colina (1,0gkg⁻¹) e premix vitamínico-micromineral (produzido por Cargill, São Paulo, Brasil), composição por kg: ácido fólico 420mg, ácido pantotênico 8333mg, BHT 25.000mg, biotina 134mg, sulfato de cobalto 27mg, sulfato de cobre 1833mg, sulfato de ferro 8000mg, iodato de cálcio 92mg, sulfato de manganês 3500mg, niacina 8,333mg, selenito 100mg, vitamina (vit.) A 1.666.670 UI, vit. B1 2083mg, vit. B12 5000 µg, vit. B2 4166mg vit. B63166mg, ácido ascórbico equivalente 66,670mg, vit. D3 666.670 UI, vit. E 16.666 UI, vit. K3 833 mg, sulfato de zinco 23.330 mg, inositol 50.000 mg e propionato de cálcio 250.000 mg.

^d Óleo de soja produzido pela Bunge Alimentos S.A. (Gaspar, Brasil).

^e DL-Metionina produzida pela Evonik Industries AG (Essen, Alemanha).

^f Hidroxitolueno butilado (BHT) (1,0gkg⁻¹) foi produzido pela Rhoster (Araçoiaba da Serra, Brasil)

^g Óxido de ítrio (III) – 99,999% base metal residual. Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

^h Ambos expressos como valores brutos (não digestíveis).

Peixes e condições experimentais

O ensaio de digestibilidade foi realizado em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (27°43'45"S 48°30'31"W), seguindo o protocolo 9377080618 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC). Juvenis de

tilápia-do-nilo da linhagem GIFT, sexualmente invertidos para machos, foram obtidos de uma piscicultura comercial (Piscicultura Pomerode, Pomerode, Santa Catarina, Brasil). Antes do ensaio de digestibilidade, os peixes foram aclimatados às condições de laboratório por duas semanas em três tanques de 1.000 L conectados a um sistema de recirculação equipado com filtração biológica e mecânica, suprimento de ar e trocador de calor. A temperatura e o fotoperíodo foram ajustados para 28°C e 12 horas de luz, respectivamente. Após o período de aclimação, peixes com peso inicial médio de 63,75 g \pm 10,60 foram transferidos para 24 unidades experimentais (tanques circulares de 115 L), perfazendo uma biomassa de aproximadamente 1.500 g por unidade (23 peixes por unidade).

O ensaio de digestibilidade foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial. Dois fatores foram testados: frequência alimentar (duas, quatro ou seis vezes ao dia) e nível de alimentação (saciedade restrita ou aparente), totalizando seis tratamentos. Os horários de alimentação foram: duas vezes ao dia, às 10h e às 17h30; quatro vezes ao dia: 10h00, 12h30, 15h00 e 17h30; seis vezes ao dia: 10h00, 11h30, 13h00, 14h30, 16h00 e 17h30. O nível de alimentação para o regime restrito foi fixado em 85% do consumo médio de ração dos peixes alimentados até a saciedade aparente duas vezes ao dia, correspondendo aproximadamente a 4% do peso vivo. Grupos de peixes foram alimentados em seus respectivos regimes de alimentação por dez dias antes do início da coleta de fezes. Após esse período, iniciou-se a coleta de fezes seguindo o seguinte protocolo: uma hora após a última alimentação, os tanques foram limpos e tiveram seu volume total de água renovado para evitar qualquer contaminação das fezes com restos de ração. Após a limpeza, o fluxo de água foi interrompido por 1 hora e as fezes recém-evacuadas foram coletadas por sifonagem. As fezes coletadas foram liofilizadas, homogeneizadas e armazenadas a -20°C até as análises.

Os parâmetros de qualidade da água foram medidos semanalmente, exceto temperatura, oxigênio dissolvido e pH, que foram monitorados diariamente. Os valores médios (\pm desvio padrão) foram: temperatura, 27,54 \pm 0,86°C; oxigênio dissolvido, 5,05 \pm 0,77 mg L⁻¹; pH 6,98 \pm 0,36; salinidade 1,48 \pm 0,22 g L⁻¹; alcalinidade 56,92 \pm 9,03 CaCO₃ mg L⁻¹; amônia total 0,55 \pm 0,10 mg L⁻¹ e nitrito 0,01 mg L⁻¹. Todas as variáveis medidas permaneceram dentro da faixa de conforto para a tilápia-do-nilo (Webster e Lim, 2006). A vazão de entrada de água em cada unidade experimental foi de 25 mL s⁻¹.

Análises químicas

As análises centesimais dos ingredientes das rações, dietas e fezes seguiram procedimentos padronizados pela “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC, 1999): umidade (seca a 105°C até peso constante, método 950.01), lipídeo total (Soxhlet, método 920.39C) e cinzas (incineração a 550°C, método 942.05). A energia bruta foi determinada usando um calorímetro (PARR, modelo ASSY 6200) de acordo com as instruções do fabricante. Proteína bruta, perfil de AA e fibra em detergente neutro dos ingredientes da ração foram analisados por espectroscopia de infravermelho (NIRs) no Laboratório de Nutrição Animal (Evonik, Guarulhos, Brasil).

Análises de proteína bruta e AA de rações e fezes foram realizadas por hidrólise ácida e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no Laboratório Evonik (Hanau, Alemanha). Os aminoácidos foram oxidados com ácido perbórmico e neutralizados com metabissulfito de sódio 25. Os aminoácidos foram liberados da proteína por hidrólise com HCl 6N por 24 h a 110°C e quantificados usando o método do padrão interno medindo a absorção dos produtos da reação com ninidrina a 570 nm. O marcador inerte óxido de ítrio foi medido por espectrometria de massa (ICP-MS) no Laboratório de Espectrometria Atômica (UFSC, Brasil). As amostras foram introduzidas usando um nebulizador pneumático.

Cálculo dos coeficientes de digestibilidade aparente

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDAs) da matéria seca, energia, proteína e AAs foram estimados usando a seguinte equação (NRC, 2011):

$$CDA\ nutriente\% = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ Marcador}_{Dieta}}{\% \text{ Marcador}_{Fezes}} \times \frac{Nutriente_{Fezes}}{Nutriente_{Dieta}} \right) \right]$$

Análises enzimáticas

As porções proximais dos intestinos de dois peixes por unidade experimental (n = 8 por tratamento) foram coletadas ao final do experimento. As amostras foram colocadas em tubos Falcon de 15 mL e armazenadas sob refrigeração a -20 °C até serem analisadas. As amostras de tecido foram processadas individualmente e homogeneizadas em 1 mL de água ultrapura. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 12.000 × g a 4 °C. O extrato enzimático bruto (sobrenadante) foi armazenado a -20 °C. Antes da realização das análises

enzimáticas, o extrato bruto foi descongelado e diluído em água ultrapura nas seguintes diluições: 200x para análise de tripsina e 1000x para quimotripsina. Todas as leituras foram feitas em leitor de microplacas TECAN (Infinite Pro., Califórnia, EUA), determinando-se a absorbância a 410 nm para tripsina e 550 nm para quimotripsina.

As atividades de tripsina e quimotripsina foram avaliadas usando os substratos, N- α -benzoil-DLarginina-4-pnitroanilida (bz-R-pNA) e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida (suc-AAPL-4 -pNA), respectivamente. Os substratos foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) a 2 mM e diluídos em tampão fosfato (pH 7,5) na proporção de 1:1 (v/v) para obter uma concentração final de 1 mM. As reações foram realizadas utilizando 50 μ L de extrato enzimático misturado com a mesma quantidade da solução de substrato (1:1, v/v). As leituras foram feitas a cada 15 minutos por 1 hora a 30 °C. Cada unidade enzimática (U) foi expressa como a conversão enzimática de 1 μ mol de substrato min⁻¹, determinada pela curva padrão da p-nitroanilina (p-A). As atividades específicas de tripsina e quimotripsina foram expressas como o número de unidades enzimáticas por concentração total de proteína do extrato enzimático (mg proteína⁻¹).

A concentração de proteínas solúveis no extrato enzimático bruto foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Análise estatística

Todos os dados foram primeiro analisados quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene). Os dados dos coeficientes de digestibilidade aparente foram submetidos à ANOVA bifatorial e o teste de Tukey foi realizado somente quando diferenças significativas foram detectadas. As análises estatísticas foram realizadas através do software Statistica 10.0 adotando-se nível de confiança de 5%.

3.3 Resultados

O CDA de matéria seca, energia e proteína em peixes alimentados com diferentes regimes de alimentação são apresentados na Tabela 9. Não foram encontradas diferenças e interação entre frequência alimentar e nível de alimentação para o CDA de matéria seca e energia. Entretanto, houve interação para o CDA da proteína e o menor valor foi encontrado nos peixes alimentados duas vezes ao dia no regime restrito (80,57%); outros valores de ADC de proteína, variando de 83,69 a 85,87%, não foram diferentes.

Tabela 9 – Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, energia e proteína em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com diferentes regimes alimentares

Nível de arraçoamento / Frequência alimentar		Matéria seca	Energia	Proteína
Restrito	2	69.78 ±2.89	76.27 ±2.17	80.57 ±1.86 ^y
	4	72.60 ±0.66	78.44 ±0.62	83.69 ±0.30 ^x
	6	73.45 ±1.50	78.78 ±0.70	85.26 ±0.69 ^x
	<i>Média</i>	<i>71.94 ±2.39</i>	<i>77.57 ±1.89</i>	<i>83.17 ±2.29</i>
Saciedade aparente	2	73.21 ±2.47	78.79 ±1.94	85.87 ±1.23 ^x
	4	73.05 ±1.60	79.18 ±1.41	85.83 ±0.67 ^x
	6	72.64 ±0.95	79.10 ±0.85	84.23 ±0.87 ^x
	<i>Média</i>	<i>72.97 ±1.63</i>	<i>79.02 ±1.34</i>	<i>85.31 ±1.17</i>
<i>valor de p, ANOVA bifatorial¹</i>				
	NA ²	0.189	0.076	<0.01
	FA ³	0.220	0.163	0.013
	NA x FA	0.088	0.344	<0.01

^{x,y} Letras minúsculas sobscritas indicam interação significativa entre o nível de alimentação e a frequência alimentar.

¹ Análise de variância.

² Nível de alimentação.

³ Frequência alimentar.

Houve interação entre a frequência alimentar e o nível de alimentação para os CDAs dos aminoácidos essenciais (AAE) arginina, histidina, lisina, metionina, treonina e valina (Tabela 10). Para tais AAE, o menor CDA foi encontrado quando os peixes foram alimentados duas vezes ao dia em regime restrito e para os demais tratamentos, os CDAs foram maiores e estatisticamente iguais. Os CDAs de leucina e fenilalanina foram afetados apenas pelo nível de alimentação, mas os CDAs de isoleucina não foram afetados nem pelo nível de alimentação nem pela frequência alimentar. Houve interação entre FA e NA nos CDAs de todos os aminoácidos não essenciais (AANE), exceto para o ácido glutâmico (Tabela 11). Para os AANE, detectamos o mesmo padrão de interação encontrado nos CDAs dos AAE.

Os coeficientes médios de digestibilidade dos AA (84,39%) foram semelhantes aos da proteína CDA (84,24%), mas os valores individuais de cada AA variaram entre eles. Os maiores valores foram encontrados para arginina (90,63%), histidina (86,35%), lisina (87,82%), ácido aspártico (90,20%), ácido glutâmico (90,02%) e serina (87,94%), enquanto os menores CDAs foram encontrados para fenilalanina (76,30%) e para os AAs ramificados isoleucina (75,59%), leucina (76,67%) e valina (76,85%).

Os resultados da atividade enzimática da tripsina e da quimotripsina estão resumidos na Tabela 12. A frequência e o nível de alimentação não afetaram a atividade da tripsina; no entanto, o nível de alimentação influenciou a atividade da quimotripsina, que foi maior nos peixes alimentados até a saciedade aparente.

Tabela 10 – Coeficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos essenciais em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com diferentes regimes alimentares

Nível de alimentação / Frequência alimentar	ARG	HIS	ISOL	LEU	LIS	MET	FEN	TRE	VAL
Restrito									
2	87.87 ±1.90 ^y	82.63 ±1.95 ^y	75.59 ±5.36	76.67 ±3.04	85.10 ±1.88 ^y	84.72 ±1.78 ^z	76.30 ±2.22	77.05 ±2.42 ^y	76.85 ±2.44 ^y
4	88.96 ±0.75 ^{xy}	84.31 ±0.19 ^{xy}	77.31 ±4.17	78.46 ±1.21	86.71 ±0.36 ^{xy}	86.06 ±0.44 ^{yz}	77.76 ±2.07	79.45 ±0.53 ^{xy}	79.22 ±0.47 ^{xy}
6	89.69 ±0.51 ^{xy}	85.70 ±0.58 ^x	79.07 ±3.77	80.31 ±0.99	87.57 ±0.57 ^x	87.75 ±0.58 ^{xy}	80.27 ±2.74	81.35 ±0.86 ^x	81.26 ±0.84 ^x
<i>Média</i>	88.84	84.21	77.32	78.48 ^b	86.46	86.18	78.11 ^b	79.28	79.11
Saciedade									
2	90.63 ±0.77 ^x	86.35 ±1.06 ^x	79.42 ±5.45	81.46 ±2.16	87.82 ±1.06 ^x	88.63 ±0.88 ^x	81.35 ±2.39	81.26 ±1.75 ^x	82.06 ±1.37 ^x
4	90.14 ±0.79 ^x	86.28 ±0.79 ^x	79.52 ±4.63	81.16 ±1.51	87.80 ±0.82 ^x	88.47 ±0.68 ^x	80.73 ±2.84	81.59 ±1.01 ^x	81.99 ±0.92 ^x
6	89.59 ±0.67 ^{xy}	86.02 ±0.82 ^x	78.92 ±5.48	80.80 ±2.11	87.52 ±0.76 ^x	88.26 ±0.84 ^x	80.48 ±2.17	81.21 ±1.12 ^x	81.73 ±1.08 ^x
<i>Média</i>	90.12	86.22	79.29	81.14 ^a	87.71	88.46	80.85 ^a	81.35	81.93
valor de <i>p</i> , ANOVA bifatorial ¹									
NA	<0.01	<0.01	0.335	<0.01	<0.01	<0.01	0.012	<0.01	<0.01
FA ³	0.723	0.054	0.827	0.336	0.121	0.042	0.435	0.025	0.023
NA x FA	0.035	0.015	0.716	0.112	0.046	<0.01	0.164	0.023	<0.01

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas indicam diferença significativa entre os níveis de alimentação (restrito vs. saciedade).

^{x,y,z} Letras minúsculas sobrescritas indicam uma interação significativa entre o nível de alimentação e a frequência alimentar.

¹ Análise de variância.

² Nível de alimentação.

³ Frequência alimentar.

Tabela 11 - Coeficientes de digestibilidade aparente dos aminoácidos não essenciais em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com diferentes regimes alimentares

Nível de alimentação / Frequência alimentar	ALA	ASP	CIS	GLI	GLU	PRO	SER
2	80.66 ± 2.95 ^y	87.85 ± 1.82 ^y	79.77 ± 1.88 ^y	81.66 ± 2.53 ^y	87.93 ± 2.23	82.93 ± 2.76 ^y	85.33 ± 2.14 ^y
4	83.54 ± 0.83 ^x	89.75 ± 0.36 ^{xy}	82.17 ± 0.73 ^{xy}	84.48 ± 0.28 ^{xy}	89.80 ± 0.73	85.19 ± 0.9 ^{xy}	87.39 ± 0.43 ^{xy}
6	83.69 ± 1.43 ^x	90.20 ± 0.72 ^x	83.93 ± 0.83 ^x	85.16 ± 0.97 ^x	90.02 ± 1.03	86.76 ± 1.21 ^x	87.94 ± 0.95 ^x
<i>Média</i>	<i>82.63</i>	<i>89.27</i>	<i>81.96</i>	<i>83.77</i>	<i>89.25</i>	<i>84.96</i>	<i>86.88</i>
2	83.57 ± 1.26 ^x	89.76 ± 0.77 ^{xy}	84.39 ± 1.37 ^x	84.21 ± 1.09 ^{xy}	89.82 ± 0.71	85.32 ± 1.16 ^{xy}	87.46 ± 0.94 ^{xy}
4	83.13 ± 0.32 ^x	89.89 ± 0.14 ^{xy}	84.66 ± 0.71 ^x	84.40 ± 0.30 ^{xy}	89.75 ± 0.34	86.61 ± 0.30 ^x	87.49 ± 0.29 ^{xy}
6	82.35 ± 1.20 ^x	89.39 ± 0.74 ^{xy}	84.28 ± 0.80 ^x	83.89 ± 0.99 ^{xy}	89.15 ± 0.84	85.57 ± 0.65 ^{xy}	86.88 ± 0.83 ^{xy}
<i>Média</i>	<i>83.02</i>	<i>89.68</i>	<i>84.45</i>	<i>84.17</i>	<i>89.57</i>	<i>85.83</i>	<i>87.28</i>
valor de <i>p</i> , ANOVA bifatorial ¹							
NA ²	0.554	0.286	<0.01	0.448	0.502	0.143	0.395
FA ³	0.293	0.067	<0.01	0.037	0.281	0.018	0.127
NA x FA	0.034	0.027	<0.01	0.022	0.072	0.052	0.030

^{xy} Letras minúsculas sobrescritas indicam interação significativa entre o nível de alimentação e a frequência alimentar.

¹ Análise de variância.

² Nível de alimentação.

³ Frequência alimentar.

Tabela 12 - Atividade específica da tripsina e quimotripsina no intestino proximal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com diferentes regimes alimentares.

Nível de alimentação / Frequência alimentar	Atividade enzimática, mg proteína ⁻¹		
	Tripsina	Quimotripsina	
Restrito	2	449.16 ±216.61	1080.4 ±805.98
	4	452.01 ±243.75	1866.2 ±402.91
	6	439.16 ±199.30	1854.5 ±473.19
	<i>Média</i>	<i>446.78</i>	<i>1600.36^b</i>
Saciedade aparente	2	594.09 ±307.91	2327.3 ±1047.51
	4	503.04 ±273.40	2503.7 ±1188.92
	6	556.60 ±256.47	2039.5 ± 1016.97
	<i>Média</i>	<i>551.24</i>	<i>2290.16^a</i>
valor de <i>p</i> , ANOVA bifatorial ¹			
	NA ²	0.217	0.023
	FA ³	0.982	0.406
	NA x FA	0.974	0.315

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas indicam diferença significativa entre os níveis de alimentação (restrito vs. saciedade).

¹ Análise de variância.

² Nível de alimentação.

³ Frequência alimentar.

3.4 Discussão

Aperfeiçoar o conhecimento sobre o manejo alimentar é importante para otimizar o crescimento e a composição corporal dos peixes, prevenir a deterioração da qualidade da água (Du et al., 2006; Ercan et al., 2015; Salama, 2008) e entender melhor o uso de nutrientes pelos animais. A determinação do CDA em estudos de digestibilidade é uma ferramenta essencial para a formulação de dietas eficientes com base nos teores de nutrientes digestíveis. Em ensaios de digestibilidade para tilápia, o manejo alimentar não é padronizado e uma grande variedade de frequência alimentar e nível de alimentação são relatados. Em estudos mais recentes, onde foi adotado o regime alimentar restrito, o nível de alimentação variou de 3 a 4% do peso vivo, e a frequência alimentar variou de duas a cinco refeições diárias (Cardoso et al., 2021; Davies et al., 2011; Dong et al., 2010; Köprücü e Özdemir, 2005; Rodrigues et al., 2012). Em estudos onde os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, a frequência alimentar variou de uma a oito vezes ao dia (Borghesi et al., 2008; Fontes et al., 2019; Furuya et al., 2001; Gominho-

Rosa et al., 2015; Guimarães et al 2008; Maas et al., 2019; Magalhães et al., 2019; Pezzato et al., 2002; Vidal et al, 2015, 2017; Xavier et al., 2014).

Tendo em vista a importância econômica da tilápia, estudos de digestibilidade são importantes para permitir uma melhor escolha de ingredientes e formulações com base nos teores de nutrientes digestíveis, em especial os aminoácidos. É difícil padronizar metodologias em estudos de digestibilidade em peixes principalmente devido ao grande número de espécies utilizadas na aquicultura. Embora a formulação baseada em nutrientes digestíveis seja um grande passo para rações para aquicultura, é uma prática comum nas indústrias mais avançadas de rações para aves e suínos (Rostagno et al., 2011).

O presente estudo de digestibilidade foi realizado após um experimento de alimentação que durou 51 dias com as mesmas dietas nos mesmos regimes de alimentação, cujos dados de crescimento foram relatados anteriormente (Cadorin et al., 2021). Nesse estudo, observou-se maior ganho de peso nas tilápias alimentadas até a saciedade aparente; no entanto, a frequência alimentar não afetou o ganho de peso (Cadorin et al., 2021). Os resultados do presente ensaio de digestibilidade demonstram que o manejo alimentar, mais especificamente a frequência e o nível de alimentação, afeta de fato o CDA de nutrientes como proteína e a maioria dos AA.

Apesar da escassez de estudos avaliando o efeito do manejo alimentar na digestibilidade da dieta, um estudo recente investigou o efeito do nível de alimentação na digestibilidade de nutrientes de vários ingredientes para o bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Elesho et al., 2021). O aumento no nível de alimentação afetou a digestibilidade dos nutrientes e os peixes alimentados até a saciedade aparente apresentaram maiores valores de CDA para matéria seca, energia, proteína e alguns AA, quando comparados aos peixes alimentados em regime restrito. No entanto, estudos anteriores concluíram que a digestibilidade dos nutrientes diminuiu com o aumento do nível de alimentação para espécies como a tilápia-do-nilo (Haidar et al., 2016; Schrama et al., 2012), bagre africano (Henken et al., 1985) e truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*) (Windell et al., 1978). Tais discrepâncias são provavelmente devidas às diferenças entre os estudos em relação às espécies-alvo e hábitos alimentares inerentes, composição da dieta e tamanho dos peixes.

Em tilápia-do-nilo, as diferenças na digestibilidade da proteína entre os peixes alimentados com diferentes níveis de alimentação (30% ou 80% de consumo de ração na saciedade aparente), embora significativas, foram muito pequenas, variando de 95,1% nos peixes alimentados até a saciedade a 96,0 % em peixes alimentados no regime restrito, independentemente do nível de restrição alimentar (Schrama et al., 2012). Considerando nosso

nível de restrição semelhante (85% de consumo de ração na saciedade aparente), especulamos que a digestibilidade da proteína foi maior naquele estudo se comparado ao nosso provavelmente devido aos diferentes alimentos ricos em proteína animal usados nas dietas experimentais de cada estudo: farinha de peixe (Schrama et al., 2012) versus farinha de subprodutos de aves e farinha de carne em nosso estudo.

Outro estudo com tilápia-do-nylo testou três níveis de alimentação: alto (saciedade aparente) e dois restritos (baixo e médio) que corresponderam a 45% e 80% de saciedade aparente de consumo de ração, respectivamente (Haidar et al., 2016). Uma diminuição na digestibilidade da proteína foi detectada apenas quando comparados os níveis de alimentação mais baixo e mais alto. Considerando o crescimento e os dados de conversão alimentar apresentados, podemos inferir que a digestibilidade da proteína foi maior nos peixes alimentados com o menor nível de alimentação, pois, dada a baixa oferta de ração, provavelmente os peixes utilizaram a proteína da dieta para suprir suas necessidades energéticas, o que levou ao comprometimento do crescimento (pior ganho de peso e conversão alimentar). Esses resultados sugerem que a digestibilidade da proteína pode ter valores aumentados quando a restrição alimentar é excessiva.

O efeito da frequência alimentar no crescimento e nos índices de utilização de ração da tilápia tem sido amplamente investigado (Daudpota et al., 2016; Huang et al., 2015; Silva et al., 2017; Thongprajukaew et al., 2017). Quando adequada, a frequência alimentar pode contribuir para um melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta e crescimento mais homogêneo dos peixes, minimizando o desperdício e evitando a deterioração da qualidade da água (Lee, Cho e Kim, 2000; Santos et al., 2015; Wang et al., 2007). Ainda assim, estudos avaliando o efeito da frequência alimentar na digestibilidade dos nutrientes são escassos. No presente trabalho, os menores valores de CDA foram encontrados em peixes alimentados em regime restrito, duas vezes ao dia. Foi detectada interação entre frequência alimentar e nível de alimentação para a digestibilidade da proteína e para 12 dos 16 AA avaliados. O aumento na frequência alimentar de duas para quatro ou seis vezes ao dia influenciou positivamente a digestibilidade dos nutrientes em peixes que tiveram um suprimento limitado de ração. No entanto, em peixes alimentados até a saciedade aparente, o aumento na frequência alimentar não afetou a digestibilidade dos nutrientes. Nossos achados em tilápia-do-nylo mostram que, quando alimentados até a saciedade aparente, a digestibilidade de proteína e AA não é beneficiada pelo aumento da frequência alimentar. No entanto, em situações de regime alimentar restrito, os

peixes conseguem digerir melhor esses nutrientes quando a ração é oferecida em porções maiores ao longo do dia.

Embora os resultados médios de digestibilidade de AA (84,39%) sejam semelhantes aos de digestibilidade de proteínas (84,24%), ao analisarmos os valores individuais de AA, percebemos que as digestibilidades de cada AA são bastante variáveis, sendo maiores ou menores que a digestibilidade da proteína, conforme relatado em outros estudos que avaliaram a digestibilidade da proteína e AA de diferentes ingredientes e dietas para tilápia (Dong et al., 2010; Guimarães et al., 2008; Köprücü e Özdemir, 2005; Vidal et al, 2015, 2017). Em diferentes alimentos, a qualidade da proteína da dieta muitas vezes está relacionada ao seu respectivo perfil de AA e digestibilidade (Glencross, 2020; Lovell, 2002), uma vez que os peixes não possuem uma exigência nutricional de proteína per se, mas para um balanço adequado de AAs (Wilson, 2002; Wu, 2014).

Os aminoácidos possuem uma estrutura básica como $H_2NCHRCOOH$, onde o grupo R é a cadeia lateral, e suas variações estruturais influenciam nas propriedades, tamanho, forma e carga elétrica do AA. De acordo com a polaridade do grupo R, o AA pode ser classificado em polar (grupo R hidrofílico) e apolar (grupo R hidrofóbico) (Nelson e Cox, 2017; NRC, 2011). Os maiores valores de CDA foram registrados para arginina (90,63%), histidina (86,35%), lisina (87,82%), ácido aspártico (90,20%), ácido glutâmico (90,02%) e serina (87,94%) que são classificados como polares AA. Esses AA possuem grupos nas cadeias laterais com cargas residuais que os permitem interagir com a água e geralmente são encontrados na superfície da molécula de proteína, atuando como doadores e receptores de prótons, facilitando reações catalisadas por enzimas (Nelson e Cox, 2017). Por outro lado, os menores valores de CDA foram encontrados para isoleucina (75,59%), leucina (76,67%), fenilalanina (76,30%) e valina (76,85%), que possuem grupos R apolares que não interagem com a água e são muitas vezes localizadas dentro da molécula de proteína, dificultando a ação das enzimas digestivas.

A velocidade com que o alimento passa pelo sistema digestório, denominado tempo de trânsito digestivo, é um fator importante no processo de aproveitamento dos nutrientes (Honorato et al., 2010). No regime restrito, o aumento da frequência alimentar e consequente redução da porção de ração oferecida por vez, proporcionou um melhor aproveitamento da proteína e da maior parte dos AA contidos na dieta. Tal melhora na digestibilidade pode estar relacionada à menor velocidade de passagem do bolo alimentar e consequente maior tempo de exposição dos nutrientes à ação das enzimas presentes no intestino.

A atividade da enzima tripsina não foi afetada pelo nível de alimentação nem frequência; no entanto, a quimotripsina, que possui maior espectro de atividade proteolítica quando comparada à tripsina (Lundstedt et al., 2004), apresentou maior atividade em peixes alimentados até a saciedade aparente quando comparada aos peixes alimentados no regime restrito. A capacidade digestiva dos peixes pode variar com diferentes fatores como espécie, idade, temperatura, além da disponibilidade de alimento (García-Carreño et al., 2002). A atividade da tripsina, apesar de não diferir entre os peixes alimentados nos diferentes regimes de alimentação, foi 20% menor nos peixes alimentados com restrição. O aumento no nível de alimentação proporcionou uma atividade enzimática da quimotripsina cerca de 40% maior nos peixes alimentados até a saciedade aparente. Esses resultados podem estar relacionados à modulação enzimática de acordo com a quantidade de ração oferecida. Quando o alimento foi oferecido até a saciedade aparente, as enzimas digestivas tripsina e quimotripsina apresentaram maior atividade. Ao contrário dos resultados de CDA para proteínas e AA, o aumento da frequência alimentar não afetou as atividades enzimáticas para tripsina e quimotripsina.

3.5 Conclusões

Houve interação entre frequência alimentar e nível de alimentação para a digestibilidade da proteína e da maioria dos AA. Nos peixes alimentados no regime restrito, o aumento da frequência alimentar para quatro e seis vezes ao dia melhorou a digestibilidade desses nutrientes, enquanto que para os peixes alimentados até a saciedade aparente, o aumento da frequência alimentar não afetou a digestibilidade. A atividade enzimática da tripsina não foi influenciada pelas frequências de alimentação ou nível de alimentação, enquanto a atividade da quimotripsina foi maior nos peixes alimentados até a saciedade aparente.

3.6 Referências

AOAC. 1999. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C., USA.

Borghesi, R.; Portz, L.; Oetterer, M.; Cyrino, J. E. P. 2008. Apparent digestibility coefficient of protein and amino acids of acid, biological and enzymatic silage for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture Nutrition 14: 242–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00523.x>

- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cadorin, D. I., da Silva, M. F. O., Masagounder, K., & Fracalossi, D. M. 2021. Interaction of feeding frequency and feeding rate on growth, nutrient utilization, and plasma metabolites of juvenile genetically improved farmed Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 53(2): 500– 515. <https://doi.org/10.1111/jwas.12833>
- Cardoso, M. S.; Godoy, A. C.; Oxford, J. H.; Rodrigues, R.; Cardoso, M. S.; Bittencourt, F.; Signor, A.; Boscolo, W. R.; Feiden, A. 2021. Apparent digestibility of protein hydrolysates from chicken and swine slaughter residues for Nile tilapia. *Aquaculture* 530: 735720. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735720>
- Daudpota, A.M.; Abbas, G.; Kalhoro, I. B.; Shah, S. A.; Kalhoro, H.; Hafeez-ur-Rehman, M.; Ghaffar, A. 2016. Effect of feeding frequency on growth performance, feed utilization and body composition of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) reared in low salinity water. *Pakistan Journal of Zoology* 48: 171-177.
- Davies, S. J.; Abdel-Warith, A. A.; Gouveia, A. 2011. Digestibility characteristics of selected feed ingredients for developing bespoke diets for Nile tilapia culture in Europe and North America. *Journal of the World Aquaculture Society* 42: 388–398. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00478.x>
- De Almeida, L.C.; Lundstedt, L.M.; Moraes, G. 2006. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. *Aquaculture Nutrition* 12: 443-450. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00446.x>
- Dong, X. H.; Guo, Y. X.; Ye, J. D.; Song, W. D.; Huang, X. H.; Wang, H. 2010. Apparent digestibility of selected feed ingredients in diets for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. *Aquaculture Research* 41: 1356–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02424.x>
- Du, Z. Y.; Liu, Y. J.; Tian, L. X.; He, J. G.; Cao, J. M.; Liang, G. Y., 2006. The influence of feeding rate on growth, feed efficiency and body composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture International* 14(3): 247-257. <https://doi.org/10.1007/s10499-005-9029-7>
- Elesho, F. E.; Kröckel, S.; Sutter, D. A. H.; Nuraini, R.; Chen, I. J.; Verreth, J. A. J.; Schrama, J. W. 2021. Effect of feeding level on the digestibility of alternative protein-rich ingredients for African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 544: 737108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737108>
- Ercan, E., Agrali, N.; Tarkan, A. S. 2015. The effects of salinity, temperature and feed ratio on growth performance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in the water obtained through reverse osmosis system and a natural river. *Pakistan Journal of Zoology* 47(3): 625-633.

FAO. 2022a. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Towards Blue Transformation. Rome, IT. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

FAO. 2022b. FishStatJ: Universal software for fishery statistical time series: Aquaculture production 1950–2020. FAO, Rome, IT. Available at: <https://www.fao.org/fishery/en/statistics> [Accessed December 12, 2022]

Fontes, T. V.; Oliveira, K. R. B.; Almeida, I. L. G.; Orlando, T. M.; Rodrigues, P. B.; Costa, D. V.; Rosa, P. V. 2019. Digestibility of Insect Meals for Nile Tilapia Fingerlings. *Animals* 9: 1–8. <https://doi.org/10.3390/ani9040181>

Fracalossi, D. M.; Cyrino, J. E. P. 2013. Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 2ed. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. Florianópolis, SC, Brazil (in Portuguese).

Furuya, W. M.; Pezzato, L. E.; Pezzato, A. C.; Barros, M. M.; Miranda, E. C. 2001. Digestibility coefficients and digestible amino acids values of some ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 30: 1143–1149. (in Portuguese, with abstract in English). <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000500002>

García-Carreño, F.L.; Albuquerque-Cavalcanti, C.; Navarrete del Toro, M. A.; Zaniboni-Filho, E. 2002. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 132(2): 343–352. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00038-6)

Glencross, B. D.; Booth, M.; Allan, G. L. 2007. A feed is only as good as its ingredients – a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition* 13: 17–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00450.x>

Glencross, B. D. 2020. A feed is still only as good as its ingredients: an update on the nutritional research strategies for the optimal evaluation of ingredients for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition* 26: 1871–1883. <https://doi.org/10.1111/anu.13138>

Gominho-Rosa, M. do C.; Rodrigues, A. P. O.; Mattioni, B.; De Francisco, A.; Moraes, G.; Fracalossi, D. M. 2015. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity and starch microstructure. *Aquaculture* 435: 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.035>

Guimarães, I. G.; Pezzato, L. E.; Barros, M. M. 2008. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition* 14: 396–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00540.x>

Haidar, M. N.; Petie, M.; Heinsbroek, L. T. N.; Verreth, J. A. J.; Schrama, J. W. 2016. The effect of type of carbohydrate (starch vs. nonstarch polysaccharides) on nutrients digestibility, energy retention and maintenance requirements in Nile tilapia. *Aquaculture* 463: 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.036>

Hardy, R. W. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41: 770–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x>

Henken, A. M.; Kleingeld, D. W.; & Tijssen, P. A. T. 1985. The effect of feeding level on apparent digestibility of dietary dry matter, crude protein and gross energy in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture* 5: 1–11. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90235-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90235-2)

Honorato, C.A.; Almeida, L.C.; Silva Nunes, C.; Carneiro, D.J.; Moraes, G., 2010. Effects of processing on physical characteristics of diets with distinct levels of carbohydrates and lipids: the outcomes on the growth of pacu. *Aquaculture Nutrition* 16: 91–99.

Huang, Q.; Huang, K.; Ma, Y.; Qin, X.; Wen, Y.; Sun, L.; Tang, L. 2015. Feeding Frequency and Rate Effects on Growth and Physiology of Juvenile Genetically Improved Farmed Nile Tilapia. *North American Journal of Aquaculture* 77(4): 503-512 <http://dx.doi.org/10.1080/15222055.2015.1066472>.

Köprücü, K.; Özdemir, Y. 2005. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 250: 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.003>

Lee, S.M.; Cho, S.H.; Kim, D.J. 2000. Effects of feeding frequency and dietary energy level on growth and body composition of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Aquaculture Research* 31: 917–921. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00505.x>

Lovell, T. 2002. Fish Nutrition. p. 703–754. In: Halver, J.E., & Hardy, R.W. Diet and Fish. Husbandry Academic Press. San Diego, CA, USA.

Lundstedt, L.M.; Melo, J.F.B.; Moares, G. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry Physiology* 137: 331-339. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.12.003>

Lupatsch, I.; Kissil, G. W. M.; Sklan, D.; Pfeffer, E. 1997. Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their predictability in compound diets for gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture Nutrition* 3: 81–89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1997.00076.x>

Maas, R. M.; Verdegem, M. C. J.; Schrama, J. W. 2019. Effect of non-starch polysaccharide composition and enzyme supplementation on growth performance and nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition* 25(3): 622–632. <https://doi.org/10.1111/anu.12884>

Magalhães, S. C. Q.; Cabrita, A. R. J.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Rema, P.; Maia, M. R. G.; Valente, L. M. P.; Fonseca, A. J. M. 2017. Apparent digestibility coefficients of European grain legumes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition* 24: 332–340. <https://doi.org/10.1111/anu.12564>

Moraes, G.; Bidinotto, P.M. 2000. Induced changes in the amylohydrolitic profile of the gut of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1885) fed different levels of soluble carbohydrates: its correlation with metabolic aspects. *Revista de Ictiologia* 8: 47-51.

Moraes, G.; De Almeida, L. C. 2020. Nutrition and functional aspects of digestion in fish. In: Baldisserotto, B., Cyrino, J. E. P., & Urbinati, E. C. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00011-7>

Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7ed. W.H. Freeman. New York, NY, USA.

NRC – National Research Council. 2011. *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National Academic Press. Washington, D.C., USA.

Pezzato, L. E.; Miranda, E. C.; Barros, M. M.; Pinto, L. G. Q.; Furuya W. M.; Pezzato, A. C. 2002. Apparent Digestibility of Feedstuffs by Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31: 1595–1604. (in Portuguese, with abstract in English). <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000700001>

Riche, M.; Haley, D. I.; Oetker, M.; Garbreth, S. 2004. Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 234: 657–673. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.012>

Rodrigues, A. P. O.; Gominho-Rosa, M. D. C.; Ferreira, C. E.; Francisco, A.; Fracalossi, D. M. 2012. Different utilization of plant sources by the omnivores jundia catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition* 18: 65–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00877.x>

Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Donzele, J.L., et al. *Brazilian Tables for Poultry and Pigs: Food Composition and Nutritional Requirements*. 3rd Edition, UFV, DZO, Viçosa, MG, 2011.
Salama, A.J., 2008. Effects of different feeding frequency on the growth, survival and feed conversion ratio of the Asian sea bass *Lates calcarifer* juveniles reared under hypersaline seawater of the Red Sea. *Aquaculture Research* 39(6): 561-567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01890.x>

Santos, M.M., Calumby, J. A.; Coelho Filho, P. A.; Soares, E. C.; Gentelin, A. L. 2015. Level and frequency of the feeding in the Nile tilapia fingerling development. *Boletim do Instituto de Pesca* 41(2): 387 – 395. (in Portuguese, with abstract in English).

Schrama, J. W.; Saravanan, S.; Geurden, I.; Heinsbroek, L. T.; Kaushik, S. J.; Verreth, J. A. 2012. Dietary nutrient composition affects digestible energy utilisation for growth: a study on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and a literature comparison across fish species. *The British Journal of Nutrition* 108(2): 277–289. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005654>

Silva, E. T. L. da; Pedreira, M. M.; Dias, M. L. F.; Tessitore, A. J. de A.; Ferreira, T. A. 2017. Larvae of Nile tilapia lines subject to feeding frequencies under low temperature. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 18(1) 193-203. (in Portuguese, with abstract in English). <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-99402017000100018>.

- Thongprajukaew, K.; Kovitvadhi, S.; Kovitvadhi, U.; Preprame, P. 2017. Effects of feeding frequency on growth performance and digestive enzyme activity of sex-reversed Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Agriculture And Natural Resources* 51(4): 292-298 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anres.2017.04.005>.
- Vidal, L. V. O.; Xavier, T. O.; Michelato, M.; Martins, E. N.; Prezzato, L. E.; Furuya, W. M. 2015. Apparent protein and energy digestibility and amino acid availability of corn and co-products in extruded diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 46: 183–190. <https://doi.org/10.1111/jwas.12184>
- Vidal, L. V. O.; Xavier, T. O.; Moutra, L. B.; Graciano, T. S.; Martins, E. N.; Furuya, W. M. 2017. Apparent digestibility of soybean coproducts in extruded diet for Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition* 23: 228–235. <https://doi.org/10.1111/anu.12383>
- Wang, Y.; Kong, L.J.; Li, K.; Bureau, D.P. 2007. Effects of feeding frequency and ration level on growth, feed utilization and nitrogen waste output of cuneate drum (*Nibea miichthioides*) reared in net pens. *Aquaculture* 271: 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.022>
- Webster C. D.; Lim C. 2006. *Tilapia: Biology, Culture, and Nutrition*. CRC Press, Florida, USA.
- Wilson, R.P. 2002. Amino acids and proteins. p. 144–179 In: Halver, J.E., Hardy, R.P. *Fish Nutrition*, third ed. Academic Press, an imprint of Elsevier, San Diego, CA.
- Windell, J.T.; Foltz, J.W.; Sarokon, J.A., 1978. Effect of fish size, temperature, and amount fed on nutrient digestibility of a pelleted diet by rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Transactions of the American Fisheries Society* 107(4): 613-616. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1978\)107<613:EOFSTA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1978)107<613:EOFSTA>2.0.CO;2)
- Wu, G. 2014. Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5(1): 34-45. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-34>
- Xavier, T. O.; Michelato, M.; Vidal, L. V. O.; Furuya, V. R. B.; Furuya, W. M. 2014. Apparent Protein and Energy Digestibility and Amino Acid Availability of Commercial Meat and Bone Meal for Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 45: 439–446. <https://doi.org/10.1111/jwas.12127>

4 CONCLUSOES GERAIS

Este trabalho confirma a importância de avaliar metodologias aplicadas em ensaios de digestibilidade para peixes. Tanto a escolha da composição de ingredientes da dieta referência quanto a frequência alimentar e nível de arraçamento adotados podem impactar os coeficientes de digestibilidade aparente de alguns dos nutrientes avaliados.

Os diferentes tipos de ingredientes (semipurificados ou práticos) utilizados na composição da dieta referência alteram parâmetros como a palatabilidade e consumo da ração. Dietas referência compostas por ingredientes semipurificados não possuem fatores antinutricionais, entretanto são menos palatáveis e reduzem o consumo quando comparadas a dietas referência compostas por ingredientes práticos.

Os resultados demonstram que a dieta referência semipurificada, quando associada ao ingrediente farelo de soja, acaba superestimando os resultados de CDA da maioria dos aminoácidos. Os altos valores de CDA dos aminoácidos do farelo de soja sugerem que a combinação com os ingredientes semipurificados reduziram a velocidade de trânsito do alimento, aumentando o tempo de exposição às enzimas, resultando em aumento da absorção dos aminoácidos. Além disso, os maiores valores de CDA podem estar relacionados à diminuição das perdas endógenas de nitrogênio, devido à ausência dos fatores antinutricionais nos ingredientes semipurificados e à interação entre os nutrientes da dieta, como aquela entre fibras e proteínas.

Para o ingrediente teste farinha de vísceras, os valores dos coeficientes de digestibilidade revelaram sofrer menor influência, quando avaliadas as diferentes composições da dieta referência. É possível que a boa palatabilidade desta fonte de proteína animal tenha minimizado os efeitos da baixa palatabilidade dos ingredientes semipurificados, não alterando o consumo alimentar. Sendo assim, os potenciais efeitos da dieta referência semipurificada em aumentar os valores dos coeficientes, verificados ao testar o farelo de soja, foram observados em menor proporção.

Os resultados demonstram que o tipo de ingrediente utilizado na dieta referência afeta mais significativamente a fonte de proteína vegetal em comparação com a fonte de proteína animal. Assim, o uso de ingredientes práticos na dieta referência tem mais relevância e pode ser bem aplicado em estudos de digestibilidade para tilápia-do-nylo considerando a palatabilidade da dieta, quantidade de fezes coletadas, custo e disponibilidade.

Em relação ao manejo alimentar, foi possível verificar que, na avaliação dos coeficientes de digestibilidade aparente, especialmente da proteína e maioria dos aminoácidos, houve interação entre os fatores frequência alimentar e o nível de alimentação, melhorando a digestibilidade aparente desses nutrientes. Nos peixes alimentados no regime restrito, o aumento da frequência alimentar de duas para quatro e seis vezes ao dia, e conseqüente redução da porção de ração oferecida por vez, proporcionou um melhor aproveitamento da proteína e da maior parte dos aminoácidos contidos na dieta e, conseqüentemente, maiores valores dos coeficientes foram encontrados. Tal melhora pode estar relacionada a menor velocidade de passagem do bolo alimentar e conseqüente maior tempo de exposição dos nutrientes à ação das enzimas presentes no intestino. Já para os peixes alimentados até a saciedade aparente, o aumento da frequência alimentar não foi significativo.

A frequência alimentar e o nível de alimentação não tiveram efeito significativo na atividade enzimática da tripsina, ainda que a atividade avaliada tenha sido 20% menor nos peixes alimentados em regime restrito, em comparação aos peixes alimentados até a saciedade aparente. O aumento no nível de alimentação proporcionou uma atividade enzimática da quimotripsina cerca de 40% maior nos peixes alimentados até a saciedade aparente. Esses resultados podem estar relacionados à modulação enzimática de acordo com a quantidade de ração oferecida. Ao contrário dos resultados dos coeficientes para proteínas e aminoácidos, o fator frequência alimentar não foi significativo para as atividades enzimáticas da tripsina e quimotripsina.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- BARBOSA, M. C.; NEVES, F. F.; CERQUEIRA, V. R. Taxa alimentar no desempenho de juvenis de robalo-peva em tanque-rede. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 33, n. 4, p. 369-372, 2011.
- BELAL, I. E. H. A review of some fish nutrition methodologies. **Bioresource Technology**, v. 96(4), p. 395-402, 2005.
- BUDDINGTON, R. K.; KROGDHAL, A.; BAKKE-MCKELLEP, A. M. The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. **Acta physiologica Scandinavica. Supplementum**. v. 138, p. 67–80, 1997.
- CHO, C.Y.; SLINGER, S.J. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. *In: Proceedings of World Symposium on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (Halver, J.E.; Tiews, K.). v. II: p. 239–247, Berlin, 1979.
- CRUZ-SUÁREZ, L. E. *et al.* Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. **Aquaculture** v. 272, p. 466–476, 2007.
- DABROWSKI, K.; KRUMSCHNABEL, G.; PAUKKU, M.; LABANOWSKI, J. Cyclic growth and activity of pancreatic enzymes of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) alevins. **Journal of Fish Biology**. v. 40, p. 511-521, 1992.
- DE ALMEIDA, L. C.; LUNDSTEDT, L. M.; MORAES, G. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, p. 443-450, 2006.
- DWYER, K.S. *et al.* Feeding frequency affects food consumption, feeding pattern and growth of juvenile Yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*). **Aquaculture**, v. 213, p. 279-292, 2002.
- EL-SAYED, A. M. **Tilapia culture**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2006.
- FAGBENRO, O.; ADEDIRE, C.O.; AYOTUNDE, E.O.; FAMINE, E.O. Haematological profile, food composition and digestive enzyme assay in the gut of the African bony-tongue fish *Heterotis (Clupisudis) niloticus* (Cuvier 1829) (Osteoglossidae). **Tropical Zoology**, v. 13, p. 1-9, 2000.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022**. Towards Blue Transformation. FAO, Rome, IT. 2022a
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FishStatJ: Universal software for fishery statistical time series: Aquaculture production 1950–2020**. FAO, Rome, IT. 2022b. Disponível em: <https://www.fao.org/fishery/en/statistics> Acesso em 26 dez. 2022.
- FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. **NUTRIAQUA: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. 2 ed. Florianópolis: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2013.

FURUYA, W.M. *et al.* Exigências Nutricionais e Alimentação da Tilápia. *In:* FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. **NUTRIAQUA: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2013. p. 255-268.

GAN, L. *et al.* Dietary leucine requirement of Juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 22(5), p. 1040-1046, 2015.

GARCÍA-CARREÑO, F.L. *et al.* Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 132(2), p. 343-352, 2002.

GATLIN, D. M. *et al.* Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. **Aquaculture Research** v. 38, p. 551–579, 2007.

GLENCROSS, B.D.; BOOTH, M.; ALLAN, G. L. A feed is only as good as its ingredients - a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, p. 17-34, 2007.

GUNBEN, E. M. *et al.* High potential of poultry by product meal as a main protein source in the formulated feeds for a commonly cultured grouper in Malaysia (*Epinephelus fuscoguttatus*). **Sains Malaysiana** v. 43, p. 399–405, 2014.

HARDY, R.W.; BARROWS, F. T. Diet formulation and manufacture *In:* HALVER, J. E.; HARDY, R. W. **Fish Nutrition**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 505-600.

HARDY, R. W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 5, p. 770-776, 2010.

HE, J. Y. *et al.* Methionine and lysine requirements for maintenance and efficiency of utilization for growth of two sizes of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 19, n. 4, p. 629-640, 2013.

HONORATO, C.A. *et al.* Effects of processing on physical characteristics of diets with distinct levels of carbohydrates and lipids: the outcomes on the growth of pacu. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, p. 91–99, 2010.

KAUSHIK, S.J.; SEILIEZ, I. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 3, p. 322-332, 2010.

LEE, S.M., CHO, S.H., KIM, D.J. Effects of feeding frequency and dietary energy level on growth and body composition of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel), **Aquaculture Research**, v. 31, p. 917–921, 2000.

LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Tilapia: biology, culture, and nutrition**. New York: Food product Press, 2006.

LOVELL, T. **Nutrition and Feeding of Fish**. Kluwer Academic Press, Boston, MS, USA. 1998.

- LOVELL, R.T. Diet and Fish Husbandry, *In*: HALVER, J.E., HARDY, R.W. **Fish Nutrition**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 703–754,
- LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 137, p. 331-339, 2004.
- LUPATSCH, I. *et al.* Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their predictability in compound diets for gilthead seabream, *Sparus aurata* L. **Aquaculture Nutrition**, v. 3, p. 81–89, 1997.
- MICHELATO, M. *et al.* Dietary threonine requirement to optimize protein retention and fillet production of fast-growing Nile tilapia. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 759-766, 2016.
- MICHELATO, M. *et al.* Dietary lysine requirement to enhance muscle development and fillet yield of finishing Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 457, p. 124-130, 2016.
- MICHELATO, M.; FURUYA, W.M.; GATLIN, D.M. Metabolic responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to methionine and taurine supplementation. **Aquaculture**, v. 485, p. 66-72, 2018.
- MORAES, G.; BIDINOTTO, P.M. Induced changes in the amylohydrolitic profile of the gut of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1885) fed different levels of soluble carbohydrates; its correlation with metabolic aspects. **Revista de Ictiologia**, v. 8, p. 47-51, 2000.
- MORAES, G.; DE ALMEIDA, L.C. Nutrition and functional aspects of digestion in fish. *In*: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**, Academic Press, 2020. p. 251-271.
- NASCIMENTO, T. M. T. *et al.* Determination of the optimum dietary essential amino acid profile for growing phase of Nile tilapia by deletion method. **Aquaculture**, v. 523, 735205, 2020.
- NGUYEN, T. N.; DAVIS, A. D.; SAOUD, I. P. Evaluation of alternative protein sources to replace fish meal in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis* spp. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, p. 113–121, 2009.
- NGUYEN, L.; SALEM, S. M. R.; DAVID, D. A. Efficacy of reduced protein diets and the effects of indispensable amino acid supplements for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 268, 114593, 2020.
- NGUYEN, L. *et al.* Optimizing amino acid balance in diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 515, 734566, 2020.
- NGUYEN, L.; SALEM, S. M. R.; DAVID, D. A. Indispensable and dispensable amino acid supplementation in diets offered to Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 290, 115361, 2022.

NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C.: National Academic Press, 2011.

NYACHOTI, C. M. *et al.* Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: A review. **Canadian Journal of Animal Science** v. 77, p. 149–163, 1997.

OLIVEIRA FILHO, P. R. C. *et al.* Quality of sausage elaborated using minced Nile Tilapia submitted to cold storage. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 2, p.183-190, 2010.

PEIXE BR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe BR 2022**. Associação Brasileira da Piscicultura, 2022.

PEREIRA, R.T.; ROSA, P.V. e GATLIN, D.M. Glutamine and arginine in diets for Nile tilapia: Effects on growth, innate immune responses, plasma amino acid profiles and whole-body composition. **Aquaculture**, v. 473, p. 135-144, 2017.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FURUYA, W. M. Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 43-51, 2009.

PORTZ, L.; FURUYA, W.M. Energia, proteína e aminoácidos. *In*: FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. **NUTRIAQUA: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2013. p. 65-77.

RICHE, M. *et al.* Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 234, p. 657–673, 2004.

RICK, W, Trypsin and Chymotrypsin. *In*: BERGMAYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. 1 ed. New York and London: Academic Press, 1965.

SANTOS, M. M. *et al.* Nível de arraçoamento e frequência alimentar no desempenho de alevinos de tilápia-do-nilo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41(2), p. 387-395, 2015.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B. J.; CACECI, T.; SMITH, S. A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, p. 317-327, 2000.

WANG, Y. *et al.* Effects of feeding frequency and ration level on growth, feed utilization and nitrogen waste output of cuneate drum (*Nibea miichthioides*) reared in net pens. **Aquaculture**, v. 271, p. 350–356, 2007.

WARD, D. A.; CARTER, C.G.; TOWNSEND, A.T. The use of yttrium oxide and the effect of faecal collection timing for determining the apparent digestibility of minerals and trace elements in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) feeds. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 49-59, 2005.

WATANABE, T. Strategies for further development of aquatic feeds. **Fisheries Science**, v. 68, p. 242-252. 2002.

WILSON, R.P. Amino acid and protein requirements of fish. *In: COWEY, C.B.; MACKIE A.M.; BELL, J.G. Nutrition and feeding in fish.* London: Academic Press, 1985. p. 1–16.

WILSON, R.P. Amino acids and proteins. *In: In: HALVER, J.E., HARDY, R.W. Fish Nutrition.* 3 ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 143-179

WU, G. Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 34-45, 2014.

XIAO, W. *et al.* Dietary valine requirement of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24(1), p. 315-323, 2017.