



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

NAIANE CRISTINA DE LIMA SILVA

PROTEASE PRECIZYON PRO 50 MELHORA A EFICIÊNCIA PRODUTIVA DE TILÁPIAS
(Oreochromis niloticus)

MOSSORÓ-RN

2026

NAIANE CRISTINA DE LIMA SILVA

**PROTEASE PRECIZYON PRO 50 MELHORA A EFICIÊNCIA PRODUTIVA DE TILÁPIAS
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Campus Mossoró-RN, como requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Produção e Conservação Animal no Semi-Árido

Orientador: Prof. Dr. Matheus Ramalho de Lima

MOSSORÓ-RN

2026

NAIANE CRISTINA DE LIMA SILVA

**PROTEASE PRECIZYON PRO 50 MELHORA A EFICIÊNCIA PRODUTIVA DE TILÁPIAS
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Campus Mossoró-RN, como requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Defendida e aprovada em: 20 / 02 / 2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Matheus Ramalho de Lima

Prof^a. Dra. Cibele dos Santos Borges

Prof. Dr. Fenando Guilherme Perazzo Costa

Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo

Naiane Cristina de Lima Silva (Discente)

Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

S586p Silva, Naiane Cristina de Lima.
PROTEASE PRECIZYON PRO 50 MELHORA A EFICIÊNCIA
PRODUTIVA DE TILÁPIAS (Oreochromis niloticus)/ Naiane
Cristina de Lima Silva. - 2026.
66 f. : il.

Orientador: Matheus Ramalho de Lima . Dissertação
(Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência
Animal, 2026.

1. Aquicultura. 2. Suplementação. 3.
Digestibilidade. 4. Dieta. 5. Desempenho Zootécnico. I. Lima , Matheus
Ramalho de , orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

Dedico este trabalho ao meu filho, **João Vicente de Lima Oliveira**, razão maior do meu esforço e da minha perseverança, fonte diária de amor, inspiração e força para seguir adiante.

Ao meu marido, **João Batista da Silva Oliveira**, pelo companheirismo, pelo apoio incondicional, pela paciência e pelo incentivo constante ao longo de toda esta caminhada.

Vocês são o meu alicerce, meu motivo e minha maior conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, força, sabedoria e perseverança para concluir esta etapa tão importante da minha vida.

Ao meu filho João Vicente de Lima Oliveira, minha maior motivação e razão de todo esforço.

Ao meu marido, João Batista da Silva Oliveira, pelo amor, paciência, companheirismo e apoio incondicional durante toda essa caminhada.

À minha família, base de tudo: à minha mãe Maria Magneide de Lima Silva, pelo amor incondicional e apoio constante; ao meu pai Antônio de Assis Lobo da Silva, pelo incentivo e exemplo; à minha irmã Niali Raquel de Lima Silva, pela presença e carinho; à minha sobrinha Maria Isis de Lima Sena, por ser fonte de alegria; e ao meu cunhado Eugênio Hérculos Sena de Lima, pelo apoio e consideração.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Matheus Ramalho de Lima, pela orientação, disponibilidade, paciência, confiança e valiosas contribuições científicas, fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas do grupo de pesquisa Inovação Tecnológica e Produção Animal de Precisão, Mario Augusto Monteiro Silva, Maria Érica da Silva Oliveira, Joice Teixeira Souza, Ana Cecília Araújo Lopes, Vanessa Maria Freitas da Silva, Marcos Aurélio Victor de Assunção, Rômulo de Carvalho Cabral e Natanael Silva Félix, pela convivência, troca de conhecimentos e apoio ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas de Mestrado e Doutorado, em especial à Maria Érica da Silva Oliveira, por todo o apoio, incentivo e auxílio desde o início do mestrado; ao Marcos Aurélio Victor de Assunção, por ter sido meu braço direito durante todo esse processo; ao Natanael Silva Félix, sempre disponível para ajudar nas coletas e nas análises histológicas; e à Tábatta Arrivabene Neves, pela disponibilidade, apoio constante e incentivo para que eu permanecesse firme durante toda a trajetória.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), pela contribuição essencial para minha formação acadêmica e científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Morfofisiologia Animal (LABMorfo – UFERSA) e ao Prof. Dr. Moacir Franco, pelo acesso às instalações, pela disponibilidade de equipamentos e reagentes,

Pelo acompanhamento nas coletas de material e pela orientação fundamental na realização das análises histológicas.

Ao Laboratório de Análises Instrumentais e Sensoriais (LANIS – UFERSA), à Profa. Dra. Patrícia Lima e ao técnico Luís Odonil, pelo apoio indispensável na execução das análises instrumentais e sensoriais.

À QUIMTIA Brasil, pelo suporte com os aditivos avaliados nos experimentos.

À banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas valiosas contribuições para seu aprimoramento.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho, deixo aqui a minha sincera gratidão.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito de diferentes doses e formulações de uma protease Precizyon PRO 50 na dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), observando o desempenho zootécnico, digestibilidade e qualidade do filé. Foi avaliado o efeito da protease em diferentes concentrações, comparando os resultados das diferentes doses na dieta e suas contribuições para melhoramento do desempenho zootécnico, digestibilidade e qualidade do filé e as alterações histológicas como intestino, fígado e baço, visando chegar às melhores doses da protease Precizyon PRO 50 na suplementação. Aplicou-se dois estudos experimentais observando o seguinte referencial teórico: o potencial e crescimento da aquicultura no Brasil, com base em estudos de Rocha (2013), Jena et al. (2017) e Associação Brasileira de Aquicultura (2021), destacando-se as características da produção da **tilápia-do-Nilo** (*Oreochromis niloticus*) que é significativa no país; digestão e fisiologia enzimática da espécie estudada, destacando estudos de Moreira et al. (2021), Solovyev et al. (2017) e Marcelino (2021); uso de enzimas na alimentação de peixes e seus resultados, sendo referência os estudos de Azaza et al. (2023), Sgnaulim (2019), Shadieva et al. (2020); evidências recentes e lacunas de pesquisa com base nos seguintes estudos: Gomes (2018), Marcelino (2022), Schneider (2022; 2024), Silva (2024), Rosseto (2024) e Souza (2025). Nos dois experimentos procurou-se destacar aspectos que pudessem reforçar as evidências já estudadas sobre o uso da protease Precizyon PRO 50 na dieta da tilápia do Nilo, os resultados e as lacunas, a fim de superá-las. Sendo assim, no primeiro determinou-se a dose ideal realizando experimentos comparativos em seis tratamentos, cada um com seis repetições, e 25 peixes por unidade experimental. Os tratamentos foram realizados em doses crescentes de 0, 25, 50, 75, 100 e 125 g/t de protease. No segundo, validou-se as doses da protease na suplementação para uso na dieta das tilápias, seguindo observações na sequência dos tratamentos feitos no primeiro experimento: (1) Controle Positivo (CP), atendendo a todas as exigências nutricionais; (2) Controle Negativo 50 (CN50), com redução de 50% com base na matriz Precizyon PRO 50; (3) Controle Negativo 100 (CN100), com redução de 100%; (4) Controle Negativo 150 (CN150), com redução de 150%; (5) CN150 suplementado com 50 g/t de Precizyon PRO 50 e (6) CN150 suplementado com 75 g/t de Precizyon PRO 50. Os resultados apontam que a adição de Precizyon PRO 50 às dietas de tilápia do Nilo melhorou significativamente a digestibilidade dos nutrientes, o crescimento, a estrutura intestinal e a qualidade do filé. Os níveis ótimos de Precizyon PRO 50 foram encontrados entre 71 e 77 g/t. A suplementação das dietas com 50–75 g/t de Precizyon PRO 50 mitigou efetivamente os déficits de desempenho causados pela redução dos níveis de aminoácidos, melhorando assim o crescimento, o rendimento de filé e a saúde geral. Concluiu-se que a dose adequada para um desempenho nesse nível otimizado é de Precizyon PRO 50 exógeno, para ser utilizada na suplementação da dieta de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a qual atinge bons desempenhos nos parâmetros zootécnicos, na digestibilidade e na melhoria da qualidade do filé.

Palavras-chave: Aquicultura. Suplementação. Digestibilidade. Dieta. Desempenho Zootécnico.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of different doses and formulations of the protease Precizyon PRO 50 in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), observing zootechnical performance, digestibility, and fillet quality. The effect of the protease at different concentrations was evaluated, comparing the results of different doses in the diet and their contributions to improving zootechnical performance, digestibility, and fillet quality, as well as histological alterations such as intestine, liver, and spleen, aiming to arrive at the best doses of the protease Precizyon PRO 50 for supplementation. Two experimental studies were applied, observing the following theoretical framework: the potential and growth of aquaculture in Brazil, based on studies by Rocha (2013), Jena et al. (2017), and the Brazilian Aquaculture Association (2021), highlighting the characteristics of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production, which is significant in the country; This study examined the digestion and enzymatic physiology of the studied species, highlighting studies by Moreira et al. (2021), Solovyev et al. (2017), and Marcelino (2021); the use of enzymes in fish feed and their results, referencing studies by Azaza et al. (2023), Sgnaulim (2019), and Shadieva et al. (2020); and recent evidence and research gaps based on the following studies: Gomes (2018), Marcelino (2022), Schneider (2022; 2024), Silva (2024), Rosseto (2024), and Souza (2025). Both experiments aimed to highlight aspects that could reinforce the evidence already studied regarding the use of the protease Precizyon PRO 50 in the diet of Nile tilapia, as well as the results and gaps, in order to overcome them. Thus, in the first experiment, the ideal dose was determined by conducting comparative experiments in six treatments, each with six replicates, and 25 fish per experimental unit. The treatments were carried out at increasing doses of 0, 25, 50, 75, 100, and 125 g/t of protease. In the second experiment, the protease doses for supplementation in tilapia diets were validated, following observations in the sequence of treatments performed in the first experiment: (1) Positive Control (PC), meeting all nutritional requirements; (2) Negative Control 50 (NC50), with a 50% reduction based on the Precizyon PRO 50 matrix; (3) Negative Control 100 (NC100), with a 100% reduction; (4) Negative Control 150 (NC150), with a 150% reduction; (5) NC150 supplemented with 50 g/t of Precizyon PRO 50 and (6) NC150 supplemented with 75 g/t of Precizyon PRO 50. The results indicate that the addition of Precizyon PRO 50 to Nile tilapia diets significantly improved nutrient digestibility, growth, intestinal structure, and fillet quality. Optimal levels of Precizyon PRO 50 were found to be between 71 and 77 g/t. Supplementation of the diets with 50–75 g/t of Precizyon PRO 50 effectively mitigated the performance deficits caused by reduced amino acid levels, thus improving growth, fillet yield, and overall health. It was concluded that the appropriate dose for optimal performance is exogenous Precizyon PRO 50, to be used in the dietary supplementation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), which achieves good performance in zootechnical parameters, digestibility, and improved fillet quality.

Keywords: Aquaculture. Supplementation. Digestibility. Diet. Zootechnical Performance.

LISTA E FIGURAS

CAPÍTULO 2 – OPTIMIZING EXOGENOUS PROTEASE SUPPLEMENTATION IN NILE TILAPIA DIETS: IMPACTS ON PERFORMANCE, FILLET QUALITY AND INTESTINAL MORPHOLOGY.....

Figura 1 – Representative images of intestine slides from tilapia fed with increasing doses of Precizyon PRO.....	43
Figura 2 – Principal component analysis of performance data of fish fed diets with nutritional reduction and supplementation of Precizyon PRO 50 at dosages of 50 and 75 g/t.....	44
Figura 3 – Principal component analysis of the apparent digestibility coefficient data of fish fed diets with nutritional reduction and supplementation of exogenous Precizyon PRO 50 at dosages of 50 and 75 g/t.....	49
Figura 4 – Representative intestinal histophotographs of the experimental treatments. Blue border: proximal or anterior intestine. Green border: medial intestine. Red border: distal or posterior intestine.....	51
Figura 5 – Positive Control, PC. The image of the tilapia liver shows hepatocytes with cytoplasmic vacuolization, suggesting hepatic steatosis (fat accumulation).....	52
Figura 6 – Negative Control, CN50.....	52
Figura 7 – Negative Control, CN100.....	52
Figura 8 – Negative Control, CN150.....	53
Figura 9 – Negative Control 150 + 50 g/t of Precizyon PRO 50.....	53
Figura 10 – Negative Control 150 + 75 g/t of Precizyon PRO 50.....	53
Figura 11 – Histological image of the tilapia spleen showing dense areas with lymphocytes characteristic of the white pulp and an accumulation of melanomacrophages, visible as dark pigment, likely related to cellular degradation processes.....	54
Figura 12 – The histological image of the tilapia spleen shows a cellular arrangement with more clear spaces, indicating areas likely belonging to the red pulp, with wide sinusoids and less compact organization compared to the white pulp. An accumulation of melanomacrophages (dark pigment), like that observed previously, is also visible, indicating the presence of cells involved in the degradation and storage of cellular debris.....	54

- Figura 13 – In the CN100 image, similar features to those in CN50 are observed, including a high density of lymphocytes and the presence of melanomacrophages (dark pigments), which appear more frequent and slightly larger.....54
- Figura 14 – In the CN150 image, the splenic architecture shows aggregates of haematopoietic cells and the presence of sinusoids.....55
- Figura 15 – In the CN150 + 50 g/t Precizyon PRO 50 treatment image, large aggregates of melanomacrophages are observed, evidenced by the presence of cells with dark brown pigment, indicating phagocytic function and the storage of cellular debris and pigments.....55
- Figura 16 – In the CN150 + 75 g/t Precizyon PRO 50 treatment image, the splenic tissue appears homogeneous with haematopoietic cells and partially visible sinusoids...55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – OPTIMIZING EXOGENOUS PROTEASE SUPPLEMENTATION IN NILE TILAPIA DIETS: IMPACTS ON PERFORMANCE, FILLET QUALITY AND INTESTINAL MORPHOLOGY.....32

Tabela 1 – Feed and chemical composition of basal experimental diet.....	35
Tabela 2 – Average composition of the basal diet (Experiment 1— optimal level determination).....	36
Tabela 3 – Feed and chemical composition of basal experimental diet.....	38
Tabela 4 – Composition of experimental diets (Experiment 2—optimal level validation).....	40
Tabela 5 – Initial body weight (IBW, g/fish), final body weight at 135 days (FBW, g/fish) and cumulative data on feed intake (FI, g/fish), weight gain (WG, g/fish), feed conversion ratio (FCR, g/g) and survival rate (SURV, %) of tilapia fed diets supplemented with increasing doses of exogenous Precizyon PRO 50 over 135 days.....	42
Tabela 6 – Fillet yield with skin (SFillet, %), fillet without skin (Fillet, %), eviscerated fish weight (EF, %), hepatosomatic index (HSI, %), visceral fat index (VFI, %) and viscerosomatic index (VSI, %) of tilapia fed diets supplemented with increasing doses of exogenous Precizyon PRO 50 over 135 days.....	42
Tabela 7 – Hydrogen ion concentration (pH), luminosity (<i>L</i>), redness (<i>a</i>), yellowness (<i>b</i>), water holding capacity (WHC, %), cooking loss (CL, %) and shear force (SF, kgf/cm ²) of skinless tilapia fillets fed diets supplemented with increasing doses of Precizyon PRO 50 over 135 days.....	42
Tabela 8 – Villi length (Villi, µm), villi width (Width, µm), lamina propria (Lamina, µm) and the villi length:Width ratio (L:W, µm/µm) of the proximal and medial intestines of tilapia fed diets supplemented with increasing doses of Precizyon PRO 50 for 135 days.....	44
Tabela 9 – Effect of diets without and with nutritional reduction and of Precizyon PRO 50 supplementation at 50 and 75 g/t in the CN150 diet on body weight (FBW, g/fish), body weight gain (BWG, g/fish) and daily weight gain (DWG, g/d/fish), feed intake (FI, g/fish) and feed conversion ratio (FCR, g/g/fish) of Nile ...	46
Tabela 10 – Effect of diets without and with nutritional reduction (Red. Nutri., %), and supplementation of Precizyon PRO 50 in the CN150 diet at 50 and 75 g/t on the viscerosomatic index (VSI, %), hepatosomatic index (HSI, %), relative	

spleen weight (Spleen, %), visceral fat index (VFI, %), yields of fillet + skin (Fillet + Skin, %) and skinless fillet (Fillet, %)	47
Tabela 11 – Coefficients of apparent digestibility of dry matter (DM, %), crude protein (CP, %), energy (Energy, %), and amino acids methionine (Met, %), lysine (Lys, %), threonine (Thr, %), valine (Val, %), tryptophan (Trp, %), isoleucine (Ile, %) and arginine (Arg, %) in tilapia, fed diets without and with nutritional reduction and supplementation of Precizyon PRO 50 in the CN150 diet at 50 and 75 g/t	48
Tabela 12 – Meat quality, based on pH, L^* (lightness), a^* (redness), b^* (yellowness), WHC (water holding capacity, %), CP (cooking loss, %) and SF (shear force, N) of tilapia fed diets without and with nutritional reduction and supplementation of Precizyon PRO 50 in the CN150 diet at 50 and 75 g/t	56
Tabela 13 – Histomorphometric data of the anterior, medial, and posterior intestines of tilapia fed diets without and with nutritional reduction and supplementation of Precizyon PRO 50 in the CN150 diet at 50 and 75 g/t, including villi height (μm), villi width (μm), lamina (μm) and height:width ratio	58

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

ANOVA	Variance analysis
BGW	Weight gain
BH	Body height
BW	Live weight
°C	Grau Celsius
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior
CEUA	Committee for Ethicis In Animal Use
Cm	Centimentros
CN	Controle Negativo
<i>a</i>	Redness
<i>b</i>	Yellowness
EF	Eviscerated fish
FI	feed intake
Fillet Fillet	without skin
FBW	Final body weight
FCR	Feed conversion ratio
HSI	Hepatosomatic index
pH	Hydrogen ion concentration
SURV	Survival
SFillet	Fillet yield with skin
VFI	Visceral fat index
VSI	Viscerosomatic index
WG	Weight gain
<i>L</i>	Luminosity
WHC	Water holding capacity
CL	Cooking loss
SF	Shear force
L:W	Length:Width

BWG Weight gain
DWG Daily weight gain
VSI Viscerosomatic index
DM Digestibility matter
CP Crude protein
Met Methionine
Lys Lysine
Thr threonine
Val valine
Trp tryptophan
Ile isoleucine

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
3 JUSTIFICATIVA.....	18
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	20
5 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
5.1 CRESCIMENTO E POTENCIAL DA AQUICULTURA NO BRASIL.....	21
5.2 CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS DA TILÁPIA DO NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>).....	22
5.3 DIGESTÃO E FISIOLOGIA ENZIMÁTICA DA TILÁPIA DO NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>).....	22
5.4 USO DE ENZIMAS EXÓGENAS NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES.....	23
5.5 PROTEASES E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO.....	26
5.6 EVIDÊNCIAS RECENTES E LACUNAS DE PESQUISA.....	26
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 2 – OPTIMIZING EXOGENOUS PROTEASE SUPPLEMENTATION IN NILE TILAPIA DIETS: IMPACTS ON PERFORMANCE, FILLET QUALITY AND INTESTINAL MORPHOLOGY.....	32
1 INTRODUCTION.....	33
2 MATERIALS AND METHODS.....	34
3 RESULTS.....	40
4 DISCUSSION.....	58
5 CONCLUSION.....	60
REFERÊNCIAS.....	60
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
ANEXOS.....	63

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura surgiu como resposta à crescente demanda por pescado e à necessidade de reduzir a pressão sobre os estoques naturais, muitos dos quais vêm sendo explorados de forma excessiva. Além de suprir a demanda alimentar, essa atividade tem como objetivo contribuir para o restabelecimento das populações pesqueiras. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (Fao, 2018), restaurá-las é essencial, sendo algo alcançável 2030, se houver apoio internacional, especialmente às nações em desenvolvimento, para que ampliem seu potencial de produção aquícola e pesqueira.

A aquicultura é crescente em todo o mundo, superando a pesca extrativista em alguns segmentos e consolidando-se como uma das atividades agropecuárias mais dinâmicas. E o Brasil é potencialmente propício para a atividade aquícola, por suas condições naturais favoráveis, como clima propício, extensa faixa litorânea e abundância de água doce (Rocha, 2013; Nascimento et al., 2023).

E nesse contexto propenso à aquicultura se encontra a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) ocupando posição de destaque, sendo superada apenas pelas carpas em ambientes de água doce. Estima-se que, em poucas décadas, essa espécie assumirá a liderança global devido ao aumento contínuo de sua produção, especialmente nos países asiáticos, que concentram mais de 80% da piscicultura mundial, com a China responsável por cerca de 40% da produção de tilápia (Fao, 2014; MPA, 2016; Cao et al., 2015).

A produção de tilápia no Brasil é o segmento mais consolidado da aquicultura nacional, destacando-se pela adaptabilidade da espécie e pela boa aceitação de mercado. Entretanto, a expansão dessa cadeia produtiva enfrenta desafios, especialmente relacionados à nutrição e à formulação de dietas. Ingredientes amplamente utilizados, como o farelo de soja, podem apresentar fatores antinutricionais que reduzem a digestibilidade, impactando a eficiência alimentar e o desempenho dos peixes.

Esses desafios se relacionam justamente com as singularidades do ambiente digestivo da tilápia, que é um peixe omnívoro com tendência herbívora. Seu estômago é funcional e altamente ácido, o intestino é longo, com interior alcalino, com presença de várias enzimas digestivas. Elas variam de acordo com atividade ou dependendo da dieta e do estágio de vida (Okuthe; Bhomela, 2020). Tudo isso torna o pH variável o longo do trato digestivo (Solovyev et al., 2017).

Essas condições desafiadoras impulsionam a problemática abordada neste trabalho, uma vez que, percebe-se a relevância de investigar alternativas nutricionais capazes de otimizar o aproveitamento dos nutrientes, auxiliando na superação desses desafios. Uma das soluções pode ser a suplementação com enzimas exógenas, como a protease, uma estratégia que tem se mostrado promissora, pois favorece a quebra de proteínas e a redução de fatores antinutricionais, melhorando a digestibilidade e, consequentemente, a conversão alimentar (Caipang & Lazado, 2015). O investimento em estudos avaliativos desse tipo de aditivo pode ser o caminho para o avanço científico no sentido de solucionar problemas relacionados à questão nutricional do Tilápia do Nilo, fornecendo bases práticas para melhorar a produtividade e a sustentabilidade da tilapicultura no Brasil.

Um estudo realizado por Souza (2025) avaliou eficácia da protease na nutrição de camarões e Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), visando validar a suplementação de 250 g/t do blend enzimático como uma estratégia para melhorar a eficiência produtiva na aquicultura e concluiu que ambas as espécies aumentaram a absorção e a espessura da parede muscular do intestino proximal quando suplementados, o que demonstra a eficácia do blend na digestibilidade e na absorção de nutrientes. Schneider (2024) também fez avaliação semelhante, observando o desempenho nutricional da espécie e concluiu que houve um melhor equilíbrio nutricional e fisiológico com a inclusão de protease, além do aumento de farelo de soja (SM) sem afetar negativamente o crescimento da tilápia do Nilo. Schneider (2022) já havia estudado sobre a suplementação com protease na nutrição de peixes, porém, com a tilápia do Nilo somente no primeiro estudo de sua autoria.

Com base nos resultados desses estudos, evidencia-se a necessidade de aprofundar as discussões e ampliar as investigações, explorando diferentes concentrações de protease incluídas na dieta, a fim de compreender seus distintos efeitos sobre a nutrição de tilápias (*Oreochromis niloticus*). Nesse contexto, o presente estudo tem como problema de pesquisa a seguinte questão: qual é o efeito da inclusão de diferentes doses e formulações da protease Precizyon PRO 50 na dieta da tilápia do Nilo, considerando o desempenho zootécnico, a digestibilidade dos nutrientes, a qualidade do filé e as alterações histológicas em órgãos-chave, como intestino, fígado e baço? Além da avaliação produtiva e nutricional, busca-se investigar possíveis modificações morfológicas no intestino — especialmente na integridade da mucosa e das microvilosidades — bem como alterações estruturais no fígado e no baço, órgãos diretamente relacionados ao metabolismo e à resposta imunológica dos peixes. A partir dessa problemática, as respostas foram estruturadas com base nos objetivos delineados a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinar o efeito de diferentes doses da protease Precizyon PRO 50 na dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o desempenho zootécnico, a digestibilidade dos nutrientes, a qualidade do filé e as características histológicas do intestino, fígado e baço.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da protease Precizyon PRO 50, em diferentes concentrações, na dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*);
- Comparar os efeitos das diferentes doses da protease Precizyon PRO 50 sobre o desempenho zootécnico, a digestibilidade dos nutrientes, a qualidade do filé e os parâmetros histológicos do intestino, fígado e baço;
- Analisar as alterações morfológicas do intestino, com ênfase na integridade da mucosa e das microvilosidades, bem como possíveis modificações estruturais no fígado e no baço;
- Determinar as doses mais eficientes da protease Precizyon PRO 50, com base nos parâmetros zootécnicos, digestivos e histológicos avaliados.

3 JUSTIFICATIVA

O uso de enzimas exógenas na nutrição animal é amplamente estudado em sistemas de produção de aves e suínos, nos quais sua aplicação tem demonstrado efeitos positivos sobre a digestibilidade dos nutrientes, o desempenho zootécnico e a eficiência alimentar. Em contrapartida, ainda são relativamente escassos os estudos que avaliam de forma sistemática a utilização dessas enzimas em espécies de interesse comercial na aquicultura, especialmente no que se refere à validação de seus efeitos sob diferentes condições de cultivo e formulações dietéticas. Essa lacuna torna-se particularmente relevante diante da crescente importância da aquicultura como fornecedora de proteína animal e da necessidade de tornar os sistemas produtivos mais eficientes e sustentáveis.

Observou-se que referente à nutrição de peixes, encontrou-se apenas o estudo de Schneider (2022); já havia estudado sobre a suplementação com protease na nutrição de peixes, porém, com a tilápia do Nilo somente no primeiro estudo de sua autoria.

No caso de estudos incluindo contribuições à dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), espécie amplamente cultivada no Brasil e no mundo, são também muito escassos, visto que neste trabalho relatou-se apenas dois, os quais podem ser ponto de partida para este: o primeiro realizado por Schneider (2024), que observou o desempenho nutricional da espécie, a partir da avaliação da protease; o segundo realizado por Souza (2025) que avaliou eficácia da protease na nutrição de camarões e Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), porém, sem a determinação da dose mais adequada dentro dos parâmetros zootécnicos, da digestibilidade e qualidade do filé.

Vale ressaltar que a digestão de ingredientes vegetais presentes nas rações comerciais para a tilápia do Nilo pode ser limitada por fatores fisiológicos e pela presença de compostos antinutricionais. Essa limitação compromete o aproveitamento dos nutrientes, eleva os custos de produção e aumenta a excreção de resíduos no ambiente, justamente pela variabilidade do ambiente digestivo da espécie. Nesse contexto, a suplementação com proteases exógenas, especialmente proteases ácidas, surge como uma estratégia promissora para potencializar a degradação das proteínas da dieta, aumentar a disponibilidade de aminoácidos e melhorar a eficiência digestiva dos peixes.

A melhoria na digestibilidade e o aproveitamento dos nutrientes têm implicações diretas sobre o desempenho zootécnico, como é o caso do ganho de peso, conversão alimentar e crescimento. Além disso, pode contribuir para a redução do desperdício de ração e da carga orgânica lançada nos sistemas de cultivo. Assim, o uso de proteases pode não apenas otimizar

os resultados produtivos, mas também favorecer práticas de manejo mais sustentáveis, alinhadas às exigências ambientais e às demandas do mercado por sistemas de produção mais responsáveis.

Existem ainda, a possibilidade de efeitos sobre o desempenho, isto é, a eficiência alimentar proporcionada pelas proteases exógenas, que podem influenciar positivamente a qualidade da carne, tanto em termos de composição nutricional quanto de atributos sensoriais, como textura e suculência. Dessa forma, o uso adequado dessas enzimas pode ser benéfico para a obtenção de um produto final com maior valor agregado, atendendo às expectativas dos consumidores e fortalecendo a competitividade da cadeia produtiva da tilapicultura.

Diante dessas considerações, o presente estudo justifica-se pela necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os efeitos da suplementação de protease ácida (Precizyon PRO 50) na dieta de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), avaliando seus impactos sobre a digestibilidade dos nutrientes, o desempenho zootécnico, a qualidade do produto final e as possíveis alterações histológicas em órgãos estratégicos, como intestino, fígado e baço. A análise histológica permitirá verificar modificações morfológicas associadas à integridade da mucosa intestinal e das microvilosidades, bem como possíveis alterações estruturais hepáticas e esplênicas relacionadas ao metabolismo e à resposta fisiológica dos peixes. Os resultados esperados poderão fornecer subsídios científicos para a formulação de dietas mais eficientes, contribuir para a redução dos custos de produção e apoiar o desenvolvimento de uma aquicultura mais sustentável, tecnicamente embasada e economicamente viável.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

I – A inclusão da protease ácida Precizyon PRO 50 na dieta de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) aumenta significativamente ($p < 0,05$) a digestibilidade aparente da proteína bruta, melhora o aproveitamento dos nutrientes, reduz a taxa de conversão alimentar e promove maior ganho de peso, sem causar alterações histopatológicas degenerativas no intestino, fígado e baço. Adicionalmente, promove aumento significativo da altura das vilosidades intestinais, melhor relação vilosidade:cripta, manutenção da integridade da mucosa intestinal, ausência de vacuolização hepática acentuada e preservação da arquitetura do tecido linfoide esplênico.

II – A suplementação com diferentes doses da protease Precizyon PRO 50 na dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta efeito dose-dependente significativo ($p < 0,05$) sobre o desempenho zootécnico, a digestibilidade dos nutrientes, a qualidade do filé e os parâmetros histológicos intestinais, hepáticos e esplênicos, possibilitando a determinação da dose ótima que maximize os índices produtivos e digestivos, sem induzir alterações morfológicas adversas nos órgãos avaliados.

5 REVISÃO DE LITERATURA

5.1 CRESCIMENTO E POTENCIAL DA AQUICULTURA NO BRASIL

A aquicultura, definida como o cultivo de organismos aquáticos, destaca-se pelo seu expressivo potencial na produção de alimentos e na geração de renda. No Brasil, esse setor apresenta perspectivas de crescimento substancial nos próximos anos, favorecido por condições naturais privilegiadas, ampla disponibilidade de recursos hídricos e matriz energética diversificada. Além disso, o aumento constante do consumo interno de pescado reforça a importância estratégica dessa atividade, criando um cenário propício para seu desenvolvimento e consolidação como parte relevante da economia nacional (Rocha, 2013).

Inserida nesse contexto, a piscicultura ramo da aquicultura voltado à criação de peixes desempenha papel essencial na segurança alimentar global, figurando como um dos segmentos de agronegócio de maior expansão. Em 2020, o setor conseguiu sustentar a produção de acordo com a demanda de mercado, assegurando o abastecimento interno e impulsionando as exportações a patamares recordes (Associação Brasileira de Piscicultura – PEIXE BR, 2021). Esse desempenho reforça a relevância da piscicultura não apenas como atividade econômica, mas também como componente estratégico para o equilíbrio entre produção e consumo mundial de proteína animal.

No entanto, o avanço da aquicultura não deve se limitar ao crescimento quantitativo. É fundamental que a expansão do setor esteja associada a práticas de manejo sustentáveis e a processos produtivos que considerem a preservação dos recursos naturais. Nesse sentido, a adoção de uma abordagem agroecológica se apresenta como estratégia promissora, uma vez que busca maximizar o uso eficiente de recursos e resíduos disponíveis na propriedade, ao mesmo tempo em que promove o manejo responsável dos ecossistemas (Jena et al., 2017).

Ao integrar princípios ecológicos na aquicultura, fortalece-se a sustentabilidade ambiental e amplia-se a resiliência dos sistemas produtivos frente a desafios como as mudanças climáticas e a escassez de recursos. Tal integração não apenas assegura um desenvolvimento mais equilibrado e duradouro, mas também amplia o potencial competitivo do setor aquícola brasileiro, servindo de referência para outras regiões com condições e desafios semelhantes.

5.2 CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS DA TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Entre as espécies utilizadas nos sistemas comerciais de aquicultura, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) ocupa posição de destaque devido a um conjunto de características zootécnicas e econômicas vantajosas. Essas características se associam às especificidades encontradas, tanto na facilidade da produção quanto da distribuição comercial. Elas se definem em aspectos contextuais bastante singulares.

Trata-se de uma espécie rústica, com boas taxas de crescimento e ganho de peso em diferentes sistemas de produção, hábito alimentar onívoro, capacidade de reprodução em cativeiro, tolerância a altas densidades de estocagem, resistência relativa a doenças e elevada aceitação no mercado consumidor, atribuída ao sabor e à textura da carne (El-Sayed, 2006). Essas qualidades explicam sua ampla adoção no Brasil e no mundo, tornando-a uma das principais espécies de piscicultura em águas interiores.

A dieta onívora da tilápia garante flexibilidade alimentar, permitindo sua criação em sistemas que vão desde os semi-intensivos, baseados parcialmente na produção natural de alimento no viveiro, até modelos intensivos, como raceways e tanques-rede, nos quais há maior controle e fornecimento de rações balanceadas. Essa adaptabilidade foi determinante para que a espécie se tornasse o primeiro peixe cultivado em águas interiores a ser processado e comercializado na forma de filés resfriados e congelados (Madrid, 2000).

Outro ponto relevante é sua rápida fase de engorda, que varia de quatro a cinco meses até o peso de abate, superando o desempenho de diversas outras espécies cultivadas (Turra et al., 2010). Essa combinação de fatores rusticidade, rápido crescimento, eficiência alimentar, aceitação de mercado e versatilidade nos sistemas de cultivo consolida a tilápia-do-Nilo como espécie-chave para a expansão da aquicultura, especialmente em países com elevado potencial produtivo como o Brasil.

5.3 DIGESTÃO E FISIOLOGIA ENZIMÁTICA DA TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

Do ponto de vista morfológico, a tilápia apresenta os primeiros raios das barbatanas dorsal, pélvica e anal modificados em espinhos, que atuam como mecanismo de defesa. É um peixe típico de águas calmas, reconhecido por sua alta taxa de reprodução, resistência a baixos níveis de oxigênio e crescimento acelerado. As fêmeas atingem a maturidade sexual

precocemente, por volta de 250 g de peso vivo, o que, embora favoreça a manutenção da espécie, pode causar superpopulação em cultivos mistos. Essa condição leva à redução da taxa de crescimento e da eficiência produtiva. Por isso, recomenda-se a engorda exclusiva de machos, que apresentam ganho de peso mais rápido e melhor aproveitamento da ração, atendendo de forma mais eficiente às demandas do mercado (Moreira et al., 2021).

A referida espécie tem um estômago funcional e altamente ácido. Seu intestino é longo, internamente alcalino e várias enzimas digestivas presentes, as quais têm sua variabilidade exercida conforme a dieta, estágio de vida e ambiente de vivência (Okuthe; Bhomela, 2020). As indicações, conforme essas características, é que o pH do ambiente digestivo também seja bastante variável, ao longo do trato digestivo (Solovyev et al., 2017).

O primeiro ponto a se destacar na digestão e fisiologia enzimática da tilápia do Nilo é que se trata de uma espécie onívora, seu sistema digestório é adaptado a uma dieta variada, sendo que, sua fisiologia enzimática produz uma diversidade de enzimas, entre as quais estão as proteases, amilases e lipases. Todas elas associadas, respectivamente à digestão de proteínas, carboidratos e lipídios (Marcelino, 2022).

Importante ainda ressaltar que a tilápia do Nilo apresenta um sistema digestório com capacidade exemplar e de nível elevado no que diz respeito à eficiência digestiva dos carboidratos da dieta, quando a espécie é comparada a outras que também são amplamente cultivadas (Campos, 2020).

Sendo uma espécie de cultivo muito comum em cativeiro, sua alimentação é fundamentalmente constituída de fitoplânctófaga, porém, sem perder a tendência onívora, pois também se alimenta de insetos, microcrustáceos, algas e matérias orgânicas. Mas, diversos estudos demonstram que as enzimas se comportam também em conformidade com as influências recebidas da dieta, como também dos fatores relacionados ao ambiente. Por isso, o uso de enzimas na constituição de suplementação alimentar é uma atividade válida para a nutrição dos peixes dessa espécie (Marcelino, 2022).

5.4 USO DE ENZIMAS EXÓGENAS NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES

Nos sistemas tradicionais de criação de peixes, a alimentação representa de 50% a 60% dos custos totais de produção (Azaza et al., 2023). Assim, a formulação de dietas equilibradas exerce impacto direto na viabilidade econômica, pois a absorção eficiente dos nutrientes reduz o desperdício, diminui a excreção de resíduos e contribui para a melhoria da qualidade da água nos sistemas de cultivo. Para que essa eficiência seja alcançada, é indispensável compreender

os hábitos alimentares da espécie, sua fisiologia digestiva e suas necessidades nutricionais específicas. Entre esses requisitos, a proporção adequada de energia e proteína na dieta é um fator central, pois influencia diretamente o crescimento, a conversão alimentar e a composição corporal dos peixes (Sgnaulin, 2019).

A otimização do uso de nutrientes é uma das estratégias mais eficazes para potencializar a produtividade e a sustentabilidade da aquicultura. Isso pode ser obtido por meio do aprimoramento da qualidade dos ingredientes utilizados, do aumento da digestibilidade das dietas, da adoção de manejos alimentares mais eficientes e do aproveitamento dos nutrientes perdidos no próprio sistema de cultivo. O desperdício de nutrientes, geralmente resultante de sobras de ração e de processos digestivos e metabólicos incompletos, pode ser mitigado quando esses resíduos são reaproveitados por organismos de níveis tróficos inferiores. Nesse contexto, os microrganismos desempenham papel crucial, pois participam dos ciclos biogeoquímicos e facilitam a reintegração desses nutrientes na cadeia produtiva (Emerenciano et al., 2017).

A elaboração de planos alimentares adequados para espécies aquáticas exige uma combinação precisa de ingredientes que forneçam aminoácidos essenciais, ácidos graxos e demais nutrientes na proporção correta. Dietas balanceadas não apenas favorecem o crescimento e a conversão alimentar, mas também fortalecem a imunidade, melhoram a reprodução, aumentam a taxa de sobrevivência e otimizam a eficiência produtiva (Turchini et al., 2018). Nesse sentido, proteínas e aminoácidos se destacam como nutrientes-chave, diretamente relacionados ao desenvolvimento saudável e ao desempenho fisiológico dos peixes. Embora representem o componente mais oneroso da ração, seu fornecimento adequado é indispensável para resultados zootécnicos satisfatórios (Abdel-Tawwab et al., 2010).

Porém, para que esses benefícios sejam efetivos, é preciso considerar também o equilíbrio energético das dietas (Furuya et al., 2005). O fornecimento inadequado de energia pode comprometer o crescimento, prejudicar a eficiência alimentar e provocar acúmulo excessivo de gordura (Sgnaulin, 2019). Assim, identificar as exigências nutricionais específicas de cada espécie e ajustá-las de acordo com o sistema de produção utilizado torna-se essencial para maximizar a absorção de nutrientes, reduzir desperdícios e, consequentemente, diminuir os custos de produção (Abdel-Tawwab; Ahmad, 2009). É com essa compreensão que as enzimas podem ser usadas na dieta de peixes.

As enzimas proteases, também conhecidas como peptidases ou proteinases, constituem um grupo de enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações peptídicas em proteínas, liberando peptídeos menores e aminoácidos livres, os quais podem ser prontamente absorvidos e utilizados pelo organismo (Deng et al., 2020). No contexto da nutrição aquícola, essas enzimas

desempenham papel estratégico, pois atuam diretamente na eficiência de aproveitamento das proteínas da dieta um dos nutrientes mais onerosos na produção, impactando positivamente o crescimento, a conversão alimentar e a saúde dos peixes.

A eficácia das proteases está intimamente ligada às condições do meio onde atuam, como temperatura e pH. Em peixes, essas condições variam ao longo do trato gastrointestinal e conforme a idade ou o estágio de desenvolvimento da espécie. Em alguns casos, especialmente em espécies que não apresentam estômago plenamente funcional seja em estágios larvais ou mesmo na fase adulta, a capacidade de digestão proteica pode ser naturalmente limitada (Liang et al., 2022). Nesses cenários, a suplementação com proteases específicas pode compensar deficiências fisiológicas, favorecendo a degradação de proteínas complexas e ampliando a disponibilidade de aminoácidos essenciais.

A protease ácida se destaca nesse contexto por apresentar alta atividade catalítica em faixas de pH mais baixas, típicas do estômago ou regiões ácidas do trato digestivo. Sua ação consiste em romper ligações peptídicas resistentes presentes em proteínas de origem animal e vegetal, aumentando a solubilização e posterior absorção dos nutrientes. Essa característica é especialmente vantajosa em rações formuladas com ingredientes vegetais, que frequentemente apresentam estruturas proteicas menos suscetíveis à digestão natural dos peixes.

Estudos, como o de Drew et al. (2005), já demonstraram que a inclusão de endopeptidases na dieta pode melhorar a digestibilidade proteica e reduzir a taxa de conversão alimentar, o que, por consequência, diminui custos de produção. No entanto, muitos aditivos de protease disponíveis comercialmente apresentam limitações quanto à avaliação de sua atividade real no trato gastrointestinal. Frequentemente, a medição é baseada na liberação de tirosina a partir da caseína, um substrato que não reflete a complexidade das proteínas presentes nas formulações comerciais.

Portanto, a avaliação da eficácia de uma protease deve ir além das unidades enzimáticas declaradas, incorporando análises que considerem sua ação sobre múltiplas fontes proteicas da dieta, em condições similares às do sistema digestivo do peixe. Essa abordagem garante que o uso de protease ácida seja direcionado não apenas para potencializar o aproveitamento das proteínas, mas também para otimizar o desempenho zootécnico e a sustentabilidade econômica da produção aquícola.

5.5 PROTEASES E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO

A nutrição animal exerce influência direta sobre a qualidade da carne produzida, afetando atributos essenciais como valor nutricional, perfil lipídico, sabor, coloração e textura. Dietas adequadamente formuladas podem elevar o teor proteico, otimizar a composição de ácidos graxos e conferir características sensoriais mais atrativas ao produto final, sem, contudo, elevar de forma significativa os custos de produção (Santos et al., 2000; Shadieva et al., 2020).

No contexto da qualidade da carne, as enzimas proteolíticas desempenham papel fundamental, uma vez que modulam atributos como maciez, suculência, textura e palatabilidade. Durante o processo de maturação, proteases endógenas presentes no tecido muscular, como calpaínas e catepsinas, promovem a hidrólise parcial de proteínas miofibrilares. Essa degradação controlada contribui para a desestruturação das fibras musculares, favorecendo a maciez e proporcionando uma experiência sensorial mais satisfatória ao consumidor. (Chouljenko et al., 2017).

Na indústria de carnes, a aplicação de proteases de origem vegetal, como papaína, bromelina e ficina, constitui uma prática amplamente empregada com o objetivo de melhorar a maciez de cortes considerados de maior rigidez. Essas enzimas atuam por meio da hidrólise de proteínas miofibrilares e do colágeno, promovendo a degradação parcial das estruturas musculares. Esse processo resulta na modificação da textura, tornando a carne mais macia e sensorialmente mais aceitável para o consumo.

Ao mesmo tempo, colocar proteases na alimentação dos animais pode alterar a composição dos aminoácidos e o perfil de ácidos graxos da carne, o que ajuda a melhorar tanto o sabor quanto o valor nutricional do produto. Além disso, pesquisas mostram que dietas com enzimas extras podem aumentar a quantidade de aminoácidos essenciais e equilibrar os ácidos graxos, resultando em uma carne mais saborosa e mais suculenta (Wang et al., 2018).

5.6 EVIDÊNCIAS RECENTES E LACUNAS DE PESQUISA

As evidências mais recentes encontradas e as lacunas abertas acerca do uso de protease enzimática na dieta de tilápias do Nilo reúnem alguns estudos, desenvolvidos entre os anos de 2018 e 2025. A primeira evidência positiva foi verificada por Gomes (2018), quando propôs avaliar a influência de aditivos enzimáticos com alfa-amilase, protease e fitase no desempenho, qualidade de carcaça, taxa de excreção de amônia e curva glicêmica de tilápias do Nilo. Os

resultados, com relação à dieta com suplementação enzimática indicaram a eficiência dos nutrientes, pois supriu o déficit de até 2,64% em PB e ED na dieta das tilápias, sem diferenças entre os parâmetros de peso, conversão alimentar, altura e largura do corpo dos peixes. A diferença que deixa lacuna com relação a este estudo, é que a qualidade do filé não foi avaliada, nem as doses determinadas, além de terem sido usados aditivos enzimáticos e não a protease ácida.

Marcelino (2022), realizou estudo a fim de “determinar o pico e local de maior atividade das enzimas lipase e amilase em cada uma das três porções do intestino de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), variando o tempo pós alimentação”. Obteve que diferenças significativas em vários parâmetros, porém, sem incluir as questões de qualidade do filé, apenas as atividades enzimáticas digestivas específicas em diferentes porções intestinais.

Temos também o estudo de Schneider (2022), que avaliou a suplementação com protease como benefício para a nutrição de peixes em geral, sem especificar o caso da tilápia do Nilo. Mais adiante, Schneider (2024) observou o desempenho nutricional da espécie e concluiu que houve um melhor equilíbrio nutricional e fisiológico com a inclusão de protease, mas não destacou os parâmetros zootécnicos de forma completa, deixando a lacuna da dosagem adequada e da melhoria de aspectos, como o do filé.

Silva (2024) objetivou avaliar os efeitos da suplementação de doses crescentes de uma protease ácida na ração de tilápias do Nilo. Obteve resultados significativos sobre aumento de peso, conversão alimentar, rendimento do filé e redução do índice de gordura, mas, sem determinar as doses utilizadas na suplementação.

Rosseto (2024) estudou a inclusão de diferentes níveis de blend de protease ácida e alcalina em dietas para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), para observar o desempenho produtivo, rendimento de filé e respostas histológicas e enzimáticas. Concluiu que a protease influenciou na conversão alimentar, na taxa de eficiência proteica e nas fibras musculares. Não avaliou questões que determinassem as doses adequadas ainda teve parâmetros avaliados não que não demonstraram efeito do blend de protease.

Por fim, o estudo mais recente realizado por Souza (2025), que avaliou eficácia da protease na nutrição de camarões e Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), visando validar a suplementação de 250 g/t do blend enzimático como uma estratégia para melhorar a eficiência produtiva na aquicultura, observou que houve resultado positivo na absorção e espessura da parede muscular do intestino proximal, o que demonstra eficácia do suplemento, e na qualidade do filé.

Portanto, dos estudos citados, apenas o de Silva (2024) e Rosseto (2024) têm objetivos aproximados com os de determinar efeitos de uma protease na dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o desempenho zootécnico, digestibilidade e qualidade do filé. Porém, há algumas diferenças no que se refere às doses a serem observadas: o primeiro se prende em observar doses crescentes de blends de protease; já o segundo observa os diferentes níveis. A lacuna que se pretende preencher se refere exatamente à determinação de diferentes doses, sem importar se são crescentes ou decrescentes, mas com a finalidade de recomendar uma dose adequada para a nutrição da espécie.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA - PEIXE BR, 2021. **Anuário Peixe BR da Piscicultura**. 71. Disponível em: < <https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/> > Acesso em: 16 de jun de 2024.
- AZAZA, M.S.; PERES, H.; TURKMEN, S. Nutritional physiology of aquacultured species. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1130143, 2023.
- CAIPANG, C. M. A.; LAZADO, C. C. Nutritional impacts on fish mucosa: immunostimulants, pre-and probiotics. In: Mucosal health in aquaculture. **Academic Press**, 2015. p. 211-272.
- CAMPOS, D. W. J. **Utilização de perifiton na produção intensiva de juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em viveiros escavados**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2020.
- CAO, L.; NAYLOR, R.; HENRIKSSON, P.; LEADBITTER, D.; METIAN, M.; TROELL, M.; ZHANG, W. China's aquaculture and the world's wild fisheries. **Science**, v.347, p.133-135, 2015.da moderna aquicultura. Canoas: **ULBRA**, p.91-121. 2001.
- CHOULJENKO, A. et al. Effects of vacuum tumbling with chitosan nanoparticles on the quality characteristics of cryogenically frozen shrimp. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]**, v. 75, p. 114–123, 2017.
- DENG, J. et al. Recombinant neutral protease rNpI as fish feed additive to improve protein digestion and growth. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 1, p. 273-281, 2021.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges**. Rome, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/publications/sofia/2016/en/>>. Acesso em 16 jun. 2024.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges**. Rome, 2014. Disponível em: Acesso em 10 jun. d 2024.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges**. Rome, 2014. Disponível em: Acesso em 10 jun. d 2024.
- GOMES, V.D.S. **Aditivos enzimáticos na dieta de tilápias do Nilo e peixe ornamental**. Tese de Doutorado (Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia). Areia: Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 2018.
- JENA, A. K.; BISWAS, P.; SAHA, H. Advanced farming systems in aquaculture: strategies to enhance the production. **Innovative Farming**, v. 1, n. 1, p. 84-89, 2017.
- LIANG, Q. et al. Application of enzymes as a feed additive in aquaculture. **Marine Life Science & Technology**, v. 4, n. 2, p. 208-221, 2022.
- MADRID, R. M. Avança Brasil: Programa de Desenvolvimento da Aquicultura. In: SEMINÁRIO E WORKSHOP “TECNOLOGIA PARA APROVEITAMENTO INTEGRAL DO PESCADO”, 2000, Campinas. Resumos... Campinas: **ITAL**, p.1-4, 2000.

MARCELINO, R. A. **Atividade de enzimas digestivas de tilápias do Nilo em diferentes porções intestinais e horas pós prandiais**. Monografia (Curso de Zootecnia). Lavras/MG: Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2022.

MOREIRA, E. et al. Peixes exóticos invasores de água doce no Brasil: ocorrência, distribuição e identificação. 2021.

MPA - MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Plano Safra da Pesca e Aquicultura 2015/2016**, Brasília. Disponível em: Acesso em 10 jun. 2024.

MPA - MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Primeiro Anuário de Pesca e Aquicultura 2014**, Brasília. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/240-lancado-1-anuario-brasileiro-de-pesca-e-aquicultura>. Acesso em 10 jun. 2024.

NASCIMENTO, K.K.F. et al. Visão geral da piscicultura no Brasil: bem-estar, aspectos produtivos e impactos na saúde pública. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, ano 08, ed. 01, vol. 02, pp. 186-206, março de 2023.

OKUTHE, G.E.; BHOMELA, B. Morphology, histology and histochemistry of the digestive tract of the Banded tilapia, *Tilapia sparrmanii* (Perciformes: Cichlidae). **ZOOLOGIA** 37: e51043 <<https://doi.org/10.3897/zoologia.37.e51043>>. Dez. n. 23, 2020

QIAO, Z. et al. Freezing and storage on aquatic food: underlying mechanisms and implications on quality deterioration. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022.

ROCHA, C. M. C. da et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 48, n. 8, p. iv-vi, aug, 2013.

ROSSETO, J.F. **Blends de proteases em dietas para tilápias (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca. Toledo/PR: Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UEOP), 2024.

SANTOS, A. B. et al. Composição química e rendimento do filé da Traíra (*Hoplias malabaricus*). **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Veterinária e Agronomia**, p. v. 7, n. 1, páginas 33–39, 2000.

SCHNEIDER, T.L. S.; LAZZARI, R. Implicações nutricionais de proteases exógenas na alimentação de peixes. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 70–93, 2022. DOI: 10.36812/pag.202228170-93. Disponível em: <https://revistapag.agricultura.rs.gov.br/ojs/index.php/revistapag/article/view/731>. Acesso em: 7 jan. 2026.

SCHNEIDER, T.L.S.; LAZZARI, R. **Protease exógena em dietas para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Santa Maria/RS: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2024.

SHADIEVA, L. A. et al. Effect of feed composition on the nutritional value of meat of African catfish. **BIO web of conferences**, v. 27, p. 00134, 2020.

SGNAULIN, T. Nutrição de tilápias (linhagem gift) em sistemas de bioflocos: é possível otimizar os níveis proteicos e energéticos na fase de berçário? 2019. **Tese de doutorado**. Universidade do estado de santa catarina. 2019.

SILVA, M.A.M **Avaliação da eficácia de doses crescentes de protease na dieta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Zootecnia). Mossoró/RN: Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), 2024.

SOLOVYEV, M.M. Dependence of pH values in the digestive tract of freshwater fishes on some abiotic and biotic factors. **Hydrobiologia**. Publicação online, set. 2017. DOI 10.1007/s10750-017-3383-0.

SOUZA, J. T. **Eficácia de um blend de proteases exógenas na nutrição de camarões e tilápias: impacto no desempenho zootécnico, qualidade de carne e histologia intestinal**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal). Mossoró/RN, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), 2025.

TURCHINI, G.M.; HERMON, K.M.; FRANCIS, D.S. Fatty acids and beyond: Fillet nutritional characterisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different dietary oil sources. **Aquaculture**, v. 491, p. 391-397, 2018.

TURRA, E. M. et al. Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p. 29-36. 2010.

WANG, J. et al. Kinetics of quality changes of shrimp (*Litopenaeus setiferus*) during pasteurization. **Food and bioprocess technology**, v. 11, n. 5, p. 1027–1038, 2018.

CAPÍTULO 2 – OPTIMIZING EXOGENOUS PROTEASE SUPPLEMENTATION IN NILE TILAPIA DIETS: IMPACTS ON PERFORMANCE, FILLET QUALITY AND INTESTINAL MORPHOLOGY

Artigo experimental: *Optimizing Exogenous Protease Supplementation in Nile Tilapia Diets: Impacts on Performance, Fillet Quality and Intestinal Morphology*

Periódico de submissão: *Aquaculture, Fish and Fisheries*

Fator de impacto 1,9

Data de submissão: 26 de agosto de 2025

ARTICLE

Optimizing Exogenous Protease Supplementation in Nile Tilapia Diets: Impacts on Performance, Fillet Quality and Intestinal Morphology

Naiane Cristina de Lima Silva¹, Mario Augusto Monteiro Silva¹, Maria Érica da Silva Oliveira¹, Joice Teixeira Souza¹, Ana Célia Araújo Lopes¹, Vanessa Maria Freitas da Silva¹, Marcelo Aurelio Victor de Assunção¹, Rômulo de Carvalho Cabral¹, Natanael Silva Félix¹, Moacir Franco de Oliveira¹, Jjuliana Forgiarini², Matheus Ramalho de Lima¹

¹ Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil ² Pesquisa & Desenvolvimento, QUIMTIA Brasil, Colombo, Paraná, Brazil

Correspondence: Matheus Ramalho de Lima

(mrlmatheus@ufersa.edu.br)

ABSTRACT

This study aimed to determine the optimal inclusion level of a protease in the diets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to enhance growth performance, nutrient utilization and fillet quality. Two experiments were made, one to determine the optimal level and a second experiment to validate these levels of supplementation in diets of tilapias. The first experiment consisted of six treatments, each with six replicates, and 25 fish per experimental unit. The treatments were as follows: crescent levels from 0, 25, 50, 75, 100 and 125 g/t of protease. In the second experiment, the treatments were as follows: (1) Positive Control (PC), meeting all nutritional requirements; (2) Negative Control 50 (CN50), with a 50% reduction based on the Precizyon PRO 50 matrix; (3) Negative Control 100 (CN100), with a 100% reduction; (4) Negative Control 150 (CN150), with a 150% reduction; (5) CN150 supplemented with 50 g/t of Precizyon PRO 50 and (6) CN150 supplemented with 75 g/t of Precizyon PRO 50. After analysing the results, it was observed that the addition of Precizyon PRO 50 to Nile tilapia diets significantly enhanced nutrient digestibility, growth, intestinal structure and fillet quality. Optimal levels of Precizyon PRO 50 were found to be between 71 and 77 g/t. Supplementing diets with 50–75 g/t of Precizyon PRO 50 effectively mitigated performance deficits caused by reduced amino acid levels, thereby improving growth, fillet yields and overall health.

1 INTRODUCTION

Aquaculture has emerged as one of the most rapidly expanding sectors of food production in recent years, with Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) recognized as one of the most extensively cultivated species worldwide. Among the various factors influencing the success of fish farming, nutrition remains a pivotal element, prompting numerous investigations aimed at developing cost-effective strategies to enhance feed quality. In this context, the application of exogenous enzymes, particularly proteases, has garnered considerable attention as a promising method for improving feed digestibility and nutrient absorption in fish. The incorporation of microbial-derived proteases in aquafeeds has been shown to enhance the digestibility of protein and calcium, as well as to

stimulate intestinal enzymatic activity in Nile tilapia (Santos et al. 2020). Moreover, a recent study assessed the effects of supplementing diets with a commercial protease across varying protein levels, reporting significant improvements in protein and amino acid digestibility, alongside enhancements in growth performance and feed efficiency (Lima et al. 2021).

Although dietary protease supplementation has exhibited beneficial effects on protein digestibility in Nile tilapia, it may also facilitate improvements in growth performance and feed conversion efficiency. However, alterations in fillet yield appear to be more variable and may depend upon dietary composition and other management practices. For instance, Batista et al.

(2019) examined the effects of adding a commercial protease to the diets of Nile tilapia, reporting significant increases in weight gain (WG) and feed efficiency in the treated group, yet observing no significant differences in fillet yield when compared to the control group. Conversely, a more recent investigation by Feitosa et al. (2021) indicated that protease supplementation in the diets of juvenile Nile tilapia not only enhanced growth performance but also resulted in a substantial improvement in fillet yield, suggesting that the inclusion of protease may positively impact both productivity and fillet quality.

Considering these findings, the present study aims to determine the optimal dosage of an exogenous protease in the diet of Nile tilapia to enhance nutrient digestibility and production performance. Specifically, this study seeks to identify the most effective level of enzyme inclusion utilizing a standardized diet.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Local and Ethics Statement

The study is being conducted at the Department of Animal Sciences of the Federal Rural University of the Semi-Arid Region (UFERSA), located in Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. The water used for fish cultivation is sourced from an artesian well and is characterized by low salinity levels, specifically 3 parts per thousand (ppt).

The experimental procedures involving Nile tilapia were reviewed and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals at UFERSA (CEUA/UFERSA), in accordance with current legislation, under protocol numbers 09/2023 (first experiment) and 05/2024 (second experiment).

2.2 Experimental Design

This manuscript presents the results of two experiments: the first aimed to determine the optimal supplementation level of an exogenous protease in Nile tilapia diets, and the second focused on validating the effectiveness of protease supplementation under a scenario of nutritional reduction.

2.3 Optimal Level Determination

The first experiment was designed to determine the optimal inclusion level of an exogenous protease. It was arranged in a completely randomized design, comprising increasing doses of the commercial exogenous protease, which were added to a control diet using an on-top post-coating application method.

The exogenous protease used in this study was produced through the fermentation of *Aspergillus niger*—ACCC 30557 and is derived from acid protease (400,000 u/g). The product used was Precizyon PRO

0, a commercial acid protease supplied by Quimtia S.A. (Colombo, Parana, Brazil).

The experiment consisted of six treatments, each with six replicates, and 25 fish per experimental unit. The treatments were as follows: crescent levels from 0, 25, 50, 75, 100 and 125 g/t of Precizyon PRO 50. The control diet was formulated according to the nutritional requirements of Nile tilapia, using ingredients of animal origin. All diets were extruded and dried using a hot air circulation system. Fines were removed using a vibratory screening system, and feeds were stored following best practices. Pellet size and diameter were adjusted according to the growth phase of the fish. The composition of the experimental diets is presented in Table 1.

2.4 Optimal Level Validation

The experiment was arranged in a completely randomized design, consisting of a Positive Control (PC) diet formulated to meet all nutritional requirements and three levels of nutritional reduction in the amino acids methionine + cystine, lysine, threonine, tryptophan and valine, corresponding to 50% (CN50), 100% (CN100) and 150% (CN150) of the nutrient matrix values attributed to Precizyon PRO 50. Additionally, the CN150 diet was supplemented with Precizyon PRO 50 at two inclusion levels: 50 and 75 g/t, applied using a post-coating method. In total, six treatments were tested, each replicated six times. The treatments were as follows: (1) PC, meeting all nutritional requirements; (2) Negative Control 50 (CN50), with a 50% reduction based on the Precizyon PRO 50 matrix; (3) Negative Control 100 (CN100), with a 100% reduction; (4) Negative Control 150 (CN150), with a 150% reduction; (5) CN150 supplemented with 50 g/t of Precizyon PRO 50 and (6) CN150 supplemented with 75 g/t of Precizyon PRO 50. The composition of the experimental diets is presented in Table 3.

The experimental diets, comprising a control group and three additional formulations with nutritional reductions of 50, 100 and 150 g/t (designated as CN50, CN100 and CN150, respectively), were meticulously designed to maintain isonitrogenous and isoenergetic properties. The nutritional composition of all raw materials and final diets was rigorously analysed to verify their actual nutrient content, utilizing the same batch of each ingredient throughout the trial to ensure consistency. Results are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) in Table 4.

2.5 Diet Composition

In both experiments, the analysed composition of the experimental diets closely matched the formulated values, confirming treatment uniformity. In Experiment 1 (optimal level determination), the basal diet showed proximate composition, amino acid and mineral levels consistent with the formulation (Table 2).

In Experiment 2 (optimal level validation), amino		expected ranges (Table 3).		
Item	g/100g	Nutrient	Unit	Value
Soybean meal	41.6080	Moisture	%	10.4608
Corn	21.6921	Dry matter	%	89.5392
Wheat bran	8.0000	Ash	%	12.7829
Soybean oil	7.0000	Digestible energy	kcal/kg	3036.00
Dicalcium phosphate	5.0780	Digestible protein	%	26.8100
Fish meal 53%	7.2504	Crude fibre	%	4.4455
Vitamin and Mineral Premix	3.0000	ADF	%	6.4842
Limestone	2.4667	NDF	%	12.6171
Salt	1.0993	Starch	%	22.00
Meat meal	0.6134	Methionine	%	0.5473
L-Threonine	0.2566	Met + Cis	%	0.9200
L-Lysine	1.3200	Lysine	%	1.5300
dl-Methionine	0.5430	Threonine	%	1.1800
Vitamin C	0.0500	Tryptophan	%	0.3035
BHT	0.0100	Arginine	%	1.6734
Inert	0.0125	Isoleucine	%	1.0272
Total	100.00	Leucine	%	1.8811
		Valine	%	1.1491
		Fat	%	9.2613
		Linoleic acid	%	4.6427
		Linolenic acid	%	0.6139
		Arachidonic acid	%	0.2260
		Calcium	%	2.5000
		Phosphorus	%	1.5000
		Sodium	%	0.5000
		Potassium	%	1.0446
		Chlorine	%	0.7877

acid levels decreased proportionally to the targeted reductions in CN50, CN100 and CN150 diets, while mineral and energy contents remained within the

TABLE 1 – Feed and chemical composition of basal experimental diet.

2.6 Growth Performance and Yields

For the assessment of productive performance, the following parameters will be evaluated: final mean length (FML, cm); final mean weight (FMW, g); WG (g), calculated as the difference between final and initial mean body weights; apparent feed conversion ratio (AFCR), calculated as feed intake (FI) divided by WG, and survival rate (SR, %).

At the end of the experimental period, five fish from each experimental unit were euthanized using a eugenol and benzocaine solution (200 mg/L) to allow for final sample collection from the coelomic cavity. The following indices were measured: eviscerated weight (EW, g); hepatosomatic index (HSI, %), calculated as liver weight $\times$ 100/final body weight; visceral fat index (VFI, %), calculated as visceral fat weight $\times$ 100/final body weight, and viscerosomatic index (VSI, %), calculated as viscera weight $\times$ 100/final body weight.

FI was calculated by subtracting feed leftovers from the total feed offered per experimental unit. The AFCR was determined using the WG and FI data from each unit. After final weighing and counting, 10 fish per treatment were individually measured and weighed for morphometric analysis and yield of body parts. Based on the mean final weight, the biomass production per square metre (kg/m²) was also estimated.

2.7 Tissue e Histology Liver and Intestine

For light microscopy analysis, tissue samples were collected from 15 fish per treatment and processed following routine histological procedures at the Applied Animal Morphophysiology Laboratory of UFRSA, with adaptations when necessary.

Fragments approximately 0.5 cm in size were fixed in 4% paraformaldehyde buffered with 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4) at 4°C. After fixation, tissues were washed in running water to remove excess fixative and subjected to a dehydration process through graded ethanol solutions (70%, 80%, 90%, 95% and 100%), with each step lasting 60 min.

Following dehydration, the samples were cleared (diaphanized) in two 60-min xylene baths to remove alcohol and ensure transparency. The inclusion process involved immersing the tissues in molten histological paraffin (Synt, granular, melting point 58°C– 62°C). Samples were immersed overnight in the first paraffin bath at 60°C, followed by 1 h in a second bath to ensure complete infiltration, and then embedded and labelled.

Histological sections were cut at 5–7 μ m thickness using a microtome (LEICA RM 2125 RT), mounted on glass slides and incubated in an oven at 60°C for up to 6 h. Deparaffinization was performed in two 10-min xylene baths, followed by rehydration in descending ethanol concentrations (100%, 95%, 70%) and running water, each for 3 min. The slides were stained using Haematoxylin–Eosin (HE) and Gomori's Trichrome staining techniques.

Stained sections were examined under a light microscope (LEICA DM 500 HD) equipped with a digital camera (LEICA ICC50W), and the most representative images were captured for further histological evaluation.

2.8 Physicochemical and Instrumental Analyses of the Fish

The physicochemical and instrumental analyses of the fish included moisture, total protein, total lipids, ash and carbohydrates. Moisture was determined by gravimetry, drying the material in an oven at 105 $\pm$ 2°C, following the methodology proposed by AOAC (2011), method 950.46. Total protein content was determined using the Kjeldahl method, in accordance with AOAC (2011), method 940.25, applying a conversion factor of 6.25 to calculate crude protein. Lipid content was measured using the gravimetric method for total fat as recommended by AOAC (2011), method 964.12. Ash content was determined by carbonizing the samples until smoke emission ceased and then incinerating them in a muffle furnace at 550°C until constant weight, according to the AOAC method 938.08 (2011). The percentage of total carbohydrates was estimated by difference, subtracting the percentages of moisture, protein, lipids and ash from 100%.

The pH was measured using a benchtop pH meter. Ten grams of muscle tissue were weighed and homogenized in 50 mL of distilled water at room temperature. The pH was determined using a previously calibrated device, and the analysis was performed in triplicate.

TABLE 2 - Average composition of the basal diet (Experiment 1 optimal level determination).

Parameter	Mean $\pm$ SD
Dry matter (%)	89.10 $\pm$ 1.00
Digestible protein (%)	26.75 $\pm$ 0.90
Ash (%)	12.84 $\pm$ 0.60
Crude fibre (%)	4.39 $\pm$ 0.30
Ether extract (%)	9.31 $\pm$ 0.50
Calcium (%)	2.47 $\pm$ 0.15
Phosphorus (%)	1.52 $\pm$ 0.10
Sodium (%)	0.48 $\pm$ 0.04
Lysine (%)	1.56 $\pm$ 0.08
Methionine + cystine (%)	0.94 $\pm$ 0.05
Methionine (%)	0.52 $\pm$ 0.03
Digestible energy (kcal/kg)	3042 $\pm$ 60

Water holding capacity (WHC) was determined based on the methodology of Hamm (1960). Two grams of the sample were placed between two sheets of qualitative filter paper and pressed between two acrylic plates using a 10 kgf weight for 5 min. The amount of free water in the sample was calculated from the difference between the initial and final weights.

Cooking loss (CL) was determined by weighing the samples before and after cooking on a grill, where the internal temperature of the muscle reached approximately 75°C. After cooking, the samples were removed from the grill, cooled and weighed again. The result was expressed as the percentage of water lost during the heating process (Osório et al. 1998).

Shear force (SF) was measured using a TA-XT-125 texture analyser coupled with the Warner-Bratzler device, with results expressed in kgf/cm², as described by Hamm (1960).

2.9 Water Parameters, Experiment 1—Optimal Level Determination

Water quality parameters were routinely monitored throughout the 135-day experiment. The average values recorded were as follows: pH 6.783 ± 0.404 , conductivity 4.453 ± 0.154 S/cm, salinity 2.453 ± 0.103 mg/L, temperature 28.738 ± 0.973 °C, dissolved oxygen 7.463 ± 0.244 mg/L, total dissolved solids 2.240 ± 0.088 mg/L, ammonia ranged from 0.350 ± 0.050 mg/L in the control group to 0.240 ± 0.040 mg/L at the highest protease inclusion level and nitrite from 0.005 ± 0.001 mg/L to 0.0035 ± 0.001 mg/L, respectively. These data were obtained using Alfakit test kits and AK88 multiparameter probes from Akso. Partial water exchanges were routinely performed in the tanks.

2.10 Water Parameters, Experiment 2—Optimal Level Validation

Water quality parameters were also monitored throughout this trial, with values remaining within the optimal range for Nile tilapia culture. The average values recorded were as follows: pH 6.780 ± 0.402 , conductivity 4.460 ± 0.150 S/cm, salinity 2.450 ± 0.100 mg/L, temperature 28.740 ± 0.970 °C, dissolved oxygen 7.470 ± 0.240 mg/L, total dissolved solids 2.230 ± 0.085 mg/L, ammonia ranged from 0.460 ± 0.060 mg/L in the most nutrient-restricted diet without protease to 0.350 ± 0.050 mg/L when supplemented with 75 g/t protease and nitrite from 0.0058 ± 0.001 mg/L to 0.0046 ± 0.001 mg/L, respectively. Measurements were obtained using the same equipment as in Experiment 1, and partial water exchanges were routinely carried out in all experimental units.

TABLE 3 - Feed and chemical composition of basal experimental diet.

		Diets			CN150 + Precizyon PRO 50		
Item	PC	CN50 0 g/t	CN100 0 g/t	CN150 0 g/t	50 g/t	75 g/t	
Corn	48.018	48.018	48.018	48.018	48.018	48.018	
Soybean meal	26.848	26.848	26.848	26.848	26.848	26.848	
Fish meal	14.325	14.325	14.325	14.325	14.325	14.325	
Wheat bran	4.933	4.933	4.933	4.933	4.933	4.933	
Soybean oil	2.095	2.095	2.095	2.095	2.095	2.095	
Salt	0.718	0.718	0.718	0.718	0.718	0.718	
Limestone	0.197	0.197	0.197	0.197	0.197	0.197	
Vitamin C	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	
Vitamin and mineral premix	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
L-Lysine HCL	0.543	0.521	0.499	0.477	0.477	0.477	
DL-Methionine	0.414	0.396	0.378	0.360	0.360	0.360	
L-Threonine	0.593	0.573	0.552	0.532	0.532	0.532	
L-Valine	0.086	0.065	0.044	0.023	0.023	0.023	
L-Tryptophan	0.168	0.165	0.162	0.158	0.158	0.158	
Precizyon PRO 50					0.0050	0.0075	
Inert	0.010	0.095	0.180	0.265	0.260	0.257	
Total	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	
		Diets			CN150 + Precizyon Pro		
Nutrient	Unit	PC	CN50	CN100	CN150	50 g/t	75 g/t
Moisture	%	11.085	11.085	11.085	11.085	11.085	11.085
Dry matter	%	88.939	88.939	88.939	88.939	88.939	88.939
Ash	%	10.858	10.858	10.858	10.858	10.858	10.858
Fat	%	6.328	6.328	6.328	6.328	6.328	6.328
Starch	%	30.813	30.813	30.813	30.813	30.813	30.813
Crude fibre	%	4.862	4.862	4.862	4.862	4.862	4.862
NDF	%	6.148	6.148	6.148	6.148	6.148	6.148
ADF	%	3.055	3.055	3.055	3.055	3.055	3.055

TABLE 3 – (Continued)

Item		PC	Diets			CN150 + Precizyon PRO 50	
			CN50 0 g/t	CN100 0 g/t	CN150 0 g/t	50 g/t	75 g/t
Digestible energy	kcal/kg	3045.000	3045.000	3045.000	3045.000	3045.000	3045.000
Crude energy	kcal/kg	3500.000	3500.000	3500.000	3500.000	3500.000	3500.000
Crude protein	%	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000	28.000
Methionine	%	0.702	0.695	0.688	0.681	0.681	0.681
Met + Cis	%	0.920	0.902	0.884	0.866	0.866	0.866
Lysine	%	1.530	1.513	1.496	1.478	1.478	1.478
Threonine	%	1.180	1.160	1.140	1.120	1.120	1.120
Valine	%	0.850	0.830	0.810	0.789	0.789	0.789
Tryptophan	%	0.300	0.297	0.294	0.290	0.290	0.290
Isoleucine	%	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930	0.930
Arginine	%	1.260	1.260	1.260	1.260	1.260	1.260
Calcium	%	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500	2.500
Phosphorus	%	1.370	1.384	1.384	1.384	1.384	1.384
Sodium	%	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
Potassium	%	0.851	0.950	0.950	0.950	0.950	0.950
Chlorine	%	0.815	0.671	0.671	0.671	0.671	0.671

TABLE 4 - Composition of experimental diets (Experiment 2—optimal level validation).

Parameter	PC	CN50	CN100	CN150
Dry matter (%)	89.76 ± 0.54	89.11 ± 0.58	88.79 ± 0.60	89.03 ± 0.59
Ash (%)	10.91 ± 0.25	10.88 ± 0.24	10.93 ± 0.27	10.80 ± 0.26
Ether extract (%)	6.45 ± 0.22	6.30 ± 0.21	6.40 ± 0.23	6.28 ± 0.22
Crude fibre (%)	4.78 ± 0.20	4.86 ± 0.21	4.74 ± 0.19	4.89 ± 0.20
Digestible energy (kcal/kg)	3032 ± 38	3050 ± 39	3040 ± 42	3028 ± 41
Gross energy (kcal/kg)	3486 ± 51	3511 ± 54	3504 ± 53	3489 ± 50
Crude protein (%)	28.14 ± 0.46	27.86 ± 0.48	28.08 ± 0.47	27.92 ± 0.45
Methionine (%)	0.71 ± 0.02	0.69 ± 0.02	0.68 ± 0.02	0.66 ± 0.02
Methionine + cystine (%)	0.95 ± 0.03	0.91 ± 0.03	0.89 ± 0.03	0.87 ± 0.03
Lysine (%)	1.56 ± 0.04	1.51 ± 0.05	1.49 ± 0.04	1.47 ± 0.04
Threonine (%)	1.21 ± 0.03	1.17 ± 0.03	1.15 ± 0.03	1.13 ± 0.03
Valine (%)	0.87 ± 0.03	0.84 ± 0.03	0.82 ± 0.03	0.80 ± 0.03
Tryptophan (%)	0.31 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.01
Calcium (%)	2.48 ± 0.06	2.52 ± 0.07	2.47 ± 0.06	2.49 ± 0.07
Phosphorus (%)	1.34 ± 0.04	1.36 ± 0.05	1.35 ± 0.04	1.33 ± 0.04
Sodium (%)	0.51 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.48 ± 0.01

2.11 Digestibility Trials

The fish were transferred from the net cages to 500-L polypropylene tanks. The tanks were washed to avoid contamination. The fish underwent a 3-day adaptation period, during which they were fed the experimental diets. Faeces collection began the following day at 8:00 AM and continued for 4 days, totalling 7 days of trial (3 days of adaptation and 4 days of collection). The samples were stored in 500 mL plastic containers, labelled and subsequently frozen at -23°C . Later, the samples were thawed, centrifuged, dried in a forced-air oven at 55°C and ground. After analysis, the digestibility coefficients of dry matter (DM), crude protein (CP), energy and amino acids were calculated.

2.12 Statistical Analysis

In the first experiment, to evaluate the optimal dose of protease to be used in the diets of tilapia, a quantitative statistical analysis will be conducted using polynomial regression. Initially, data normality will be tested using the Shapiro–Wilk test. Polynomial regression will then be used to model the relationship between protease dose and the response variables. The most appropriate polynomial order will be determined based on analysis of variance (ANOVA) and the coefficient of determination (R^2). Subsequently, an analysis of the regression model's inflection point will be carried out to determine the optimal protease dose.

In the second experiment, data normality will be assessed using the Shapiro–Wilk test, and transformations will be applied if necessary, considering the variability within the replicates. The

data will be subjected to appropriate statistical tests, including an ANOVA and polynomial regression analyses of the first and second degree among the diets CP, CN, CN50 and CN150, with the objective of evaluating the effect of nutritional reduction. To validate the enzyme matrix of the Precizyon PRO 50, the treatments CN150 + 50 and CN150 + 75 g/t will be compared with each other and, in duplicate, with the other treatments (CN, CN50, CN150 and CP) using the *t*-test.

3 RESULTS

3.1 Optimal Level

The performance data revealed a significant quadratic effect, indicating optimal protease inclusion levels of 71.15 g/t for final body weight ($p < 0.001$; $\text{FBW} = -0.0211x^2 + 3.0025x + 356.78$; $R^2 = 0.75$), 71.26 g/t for WG ($p < 0.001$; $\text{WG} = -0.0212x^2 + 3.0125x + 341.83$; $R^2 = 0.75$) and 77.00 g/t for feed conversion ratio ($p < 0.001$; $\text{FCR} = 0.00005x^2 - 0.0077x + 1.4626$; $R^2 = 0.84$). These optimal values suggest a practical application range between 50 and 100 g/t of Precizyon PRO 50, depending on the production scenario. The results are presented in Table 5, along with the regression equations based on the mean values observed for each supplemented Precizyon PRO 50 level.

The supplementation of Precizyon PRO 50 in the diet influenced fillet yield ($\text{Fillet} = -0.0008 \times 2 + 0.1096x + 28.013$; $R^2 = 0.8375$), eviscerated fish weight ($\text{EF} =$

$-0.0003 \times 2 + 0.057x + 88.381$; $R^2 = 0.72$) and VFI ($VFI = -0.0002 \times 2 - 0.0293x + 2.0089$; $R^2 = 0.90$), as shown in Table 6. In these data, the doses with positive results indicate supplementation levels of 68.50, 95 and 73.25 g/t of Precizyon PRO 50, respectively. This result suggests that the use of Precizyon PRO 50 improves the efficiency of converting non-fatty protein tissue in tilapia.

The supplementation of Precizyon PRO 50 showed a significant linear decreasing effect on pH ($p = 0.0057$) and cooking loss ($p = 0.0194$) of skinless tilapia fillets, as shown in Table 7. No effects were observed on the other parameters.

The supplementation of Precizyon PRO 50 significantly influenced the height ($p < 0.001$), width ($p < 0.001$), and the height:width ratio ($p < 0.001$) of villi in the proximal intestine of tilapia after 135 days of exposure to the experimental diets. The lamina propria was not affected ($p = 0.0724$). Similar results were observed in the medial and distal intestines of tilapia, except for the lamina propria ($p = 0.451$) and the height:width ratio of villi ($p = 0.0615$) in the distal intestine, as shown in Table 8. No structural or pathological alterations were observed in the fish digestive tract, such as inflammation, necrosis, tumours, fibrosis or other conditions that might affect the health and survival of the animals (Figure 1).

In the proximal intestine, a significant quadratic effect was identified in villi height, with the peak value recorded at 66.41 g/t ($p = 0.023$; $Y = -0.0104x^2 + 1.3813x + 162.5$; $R^2 = 0.3263$). Enhanced villi heights were observed at Precizyon PRO 50 doses of 25 and 100 g/t, while the lowest values were noted at the extremes of 0 and 125 g/t. Conversely, villi exhibited greater width at Precizyon PRO 50 doses of 25 and 125 g/t, with the height:width ratio being significantly higher at the 100 g/t Precizyon PRO 50 diet in comparison to the other treatments.

In the medial intestine, villi height also demonstrated a significant quadratic effect, with the maximum value occurring at 63.23 g/t ($p < 0.001$; $Y = -0.0198x^2 + 2.504x + 177.88$; $R^2 = 0.8915$). The villi were wider at 75 and 100 g/t ($p < 0.001$) compared to the other doses, especially at 50 g/t, which showed the lowest width. The height:width ratio was higher at 62 g/t Precizyon PRO 50, as per the equation ($p < 0.001$; $Y = -0.0005x^2 + 0.0621x + 5.4017$; $R^2 = 0.5099$).

In the posterior intestine, the highest villi height was observed at a Precizyon PRO 50 dose of 60.55 g/t ($p < 0.001$; $Y = -0.0077x^2 + 0.9325x + 128.97$; $R^2 = 0.8028$). The width showed a proportional increase with the Precizyon PRO 50 dose ($p < 0.001$; $Y = 0.1451x + 34.269$; $R^2 = 0.328$). The lamina propria was influenced by Precizyon PRO 50, but no linear or quadratic effect was observed, with the control dose showing the lowest thickness of this villi structure

(8.488 μm ; $p = 0.0451$), and the highest value for this variable was observed at the highest Precizyon PRO 50 dose.

TABLE 5 - Initial body weight (IBW, g/fish), final body weight at 135 days (FBW, g/fish) and cumulative data on feed intake (FI, g/fish), weight gain (WG, g/fish), feed conversion ratio (FCR, g/g) and survival rate (SURV, %) of tilapia fed diets supplemented with increasing doses of exogenous Precizyon PRO 50 over 135 days.

Treat	Precizyon PRO 50, g/t	IBW	FBW	WG	FI	FCR	SURV
1	0	14.987	373.661	358.674	507.822	1.426	84.720
2	25	14.607	394.851	380.244	517.075	1.362	82.833
3	50	14.031	433.309	419.277	520.710	1.246	89.040
4	75	14.091	500.386	486.295	541.532	1.130	88.016
5	100	14.590	446.214	431.624	530.233	1.236	89.200
6	125	14.143	394.046	379.904	520.866	1.375	84.368
<i>p</i> -value		0.3337	< 0.001	< 0.001	0.6814	< 0.001	0.0823
Linear		0.157	0.002	0.002	0.314	0.092	0.298
Quadratic		0.222	< 0.001	< 0.001	0.264	< 0.001	0.048
C.V.(%)		2.8	6.65	6.87	6.84	9.73	5.23

TABLE 6 - Fillet yield with skin (SFillet, %), fillet without skin (Fillet, %), eviscerated fish weight (EF, %), hepatosomatic index (HSI, %), visceral fat index (VFI, %) and viscerosomatic index (VSI, %) of tilapia fed diets supplemented with increasing doses of exogenous Precizyon PRO 50 over 135 days.

Treat	Precizyon PRO 50, g/t	SFillet	Fillet	EF	HSI	VFI	VSI
1	0	28.092	21.478	87.831	2.313	2.081	7.973
2	25	30.219	21.601	90.535	1.711	1.244	7.871
3	50	31.049	23.354	90.551	1.875	1.161	7.076
4	75	32.963	23.442	90.322	1.783	0.829	7.136
5	100	30.490	22.961	90.436	2.100	1.253	7.152
6	125	29.867	23.197	90.778	2.186	1.424	7.400
<i>p</i> -value		< 0.001	0.6017	0.0091	0.2661	0.0355	0.6947
Linear		0.026	0.149	0.006	0.803	0.102	0.247
Quadratic		< 0.001	0.385	0.042	0.039	0.004	0.287
C.V.(%)		6.28	14.55	2.1	33.09	61.27	21.55

TABLE 7 - Hydrogen ion concentration (pH), luminosity (*L*), redness (*a*), yellowness (*b*), water holding capacity (WHC, %), cooking loss (CL, %) and shear force (SF, kgf/cm²) of skinless tilapia fillets fed diets supplemented with increasing doses of Precizyon PRO 50 over 135 days.

Treat	Precizyon PRO 50, g/t	pH	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	WHC	CL	SF
1	0	6.230	41.940	5.517	7.993	70.507	80.691	0.322
2	25	5.900	47.077	5.663	7.253	71.331	79.284	0.578
3	50	6.147	38.863	7.500	6.933	70.037	75.650	0.695
4	75	5.867	43.150	6.557	8.207	68.791	75.727	0.605
5	100	5.963	41.900	7.710	8.130	68.085	77.024	0.447
6	125	5.900	44.793	5.773	5.960	66.087	75.652	0.680
<i>p</i> -value		0.0057	0.4613	0.8873	0.8824	0.6953	0.0194	0.1206
Linear		0.006	0.9	0.654	0.63	0.13	0.083	0.134
Quadratic		0.222	0.531	0.412	0.665	0.608	0.298	0.197
C.V.(%)		1.79	11.34	45.28	35.43	6.1	3.45	30.38

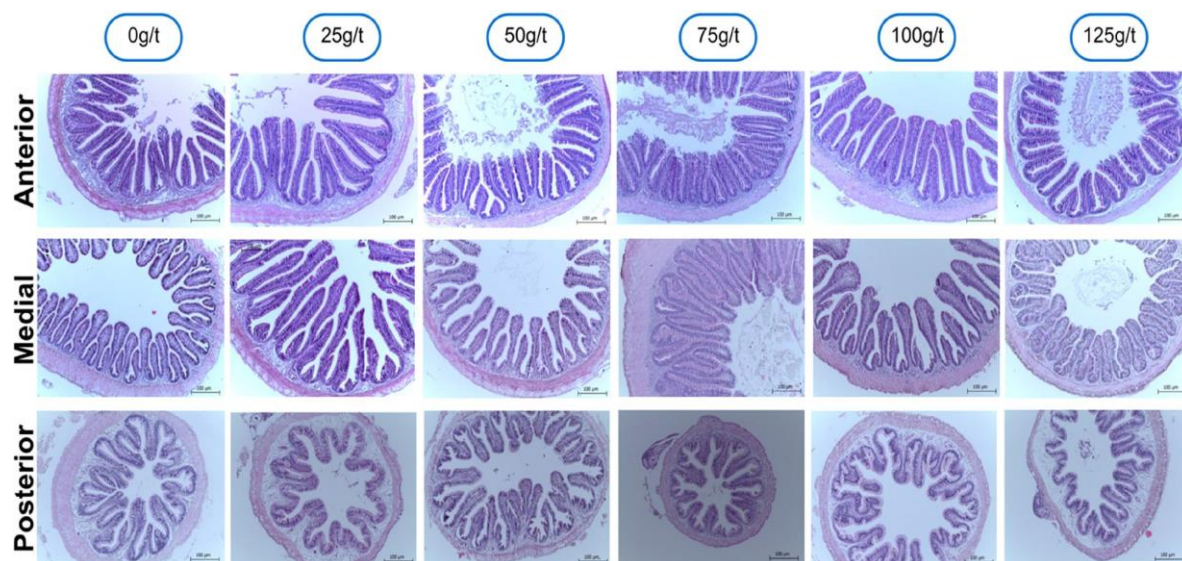


FIGURE 1 - Representative images of intestine slides from tilapia fed with increasing doses of Precizyon PR

3.2 Optimal Level Validation

At the end of the 123-day period on the experimental diets, the effect of nutritional reduction was observed, resulting in a linear decrease in final body weight ($p = 0.006$), cumulative WG ($p = 0.006$) and daily WG ($p = 0.006$) of the fish. FI was quadratically affected ($p = 0.001$), while feed conversion ratio increased linearly ($p = 0.049$), as shown in Table 9.

Precizyon PRO 50 supplementation in the diet with the greatest nutritional reduction enabled a recovery in performance metrics like those observed in the CP and CN50 diets, demonstrating the effectiveness of the enzymatic action, as illustrated in Figure 2.

There was no significant effect of dietary nutritional reduction on the relative spleen weight of the fish ($p = 0.8448$), as shown in Table 10. However, fish fed diets supplemented with Precizyon PRO 50 had lower spleen weights compared to those fed the CN50 ($p = 0.032$) and CN100 ($p = 0.019$) diets when supplemented with 50 g/t, and lower than CN50 ($p = 0.021$) when supplemented with 75 g/t of Precizyon PRO 50. The VFI was lower

in the diet containing 75 g/t of Precizyon PRO 50 compared to the other treatments, except CN150 ($p = 0.067$).

TABLE 8 - Villi length (Villi, μm), villi width (Width, μm), lamina propria (Lamina, μm) and the villi length:Width ratio (L:W, $\mu\text{m}/\mu\text{m}$) of the proximal and medial intestines of tilapia fed diets supplemented with increasing doses of Precizyon PRO 50 for 135 days.

Intestine	Precizyon PRO 50	Villi	Width	Lamina	L:W
Proximal	0	150.154b	36.174b	9.172	4.498b
	25	223.988a	45.582a	11.491	5.183b
	50	188.955ab	40.512ab	8.523	4.733b
	75	180.800ab	40.398ab	10.228	4.759b
	100	229.113a	31.716b	9.989	8.154a
	125	163.723b	55.900a	11.291	3.047c
	<i>p</i> -value	< 0.001	< 0.001	0.072	< 0.001
	Linear	0.192	0.061	0.249	0.141
	Quadratic	0.023	0.163	0.430	0.613
	C.V.(%)	16.130	22.490	35.530	35.190
Medial	0	173.575	39.243b	11.353	4.862
	25	243.931	36.102b	9.966	7.177
	50	234.411	29.155c	10.581	7.453
	75	260.126	47.270a	12.457	5.647
	100	234.859	40.382a	12.601	6.129
	125	179.337	36.213b	11.055	5.266
	<i>p</i> -value	< 0.001	< 0.001	0.425	< 0.001
	Linear	0.479	0.376	0.343	0.393
	Quadratic	< 0.001	0.802	0.779	< 0.001
	C.V.(%)	18.140	24.980	41.070	30.040
Distal	0	134.789	31.379	8.488c	4.436
	25	135.422	50.308	14.663b	2.790
	50	160.293	34.774	10.684b	4.961
	75	157.788	43.736	10.716b	3.694
	100	148.021	36.681	10.027b	4.386
	125	122.455	63.162	17.500a	2.292
	<i>p</i> -value	0.02	< 0.001	0.451	0.061
	Linear	0.668	< 0.001	0.2124	0.142
	Quadratic	< 0.001	0.175	0.111	0.071
	C.V.(%)	22.88	33.46	49.62	34.13

Note: The means labeled with different letters (a, b, etc.) are significantly different from each other according to the Tukey's multiple comparison test. Means that share the same letter are not significantly different.

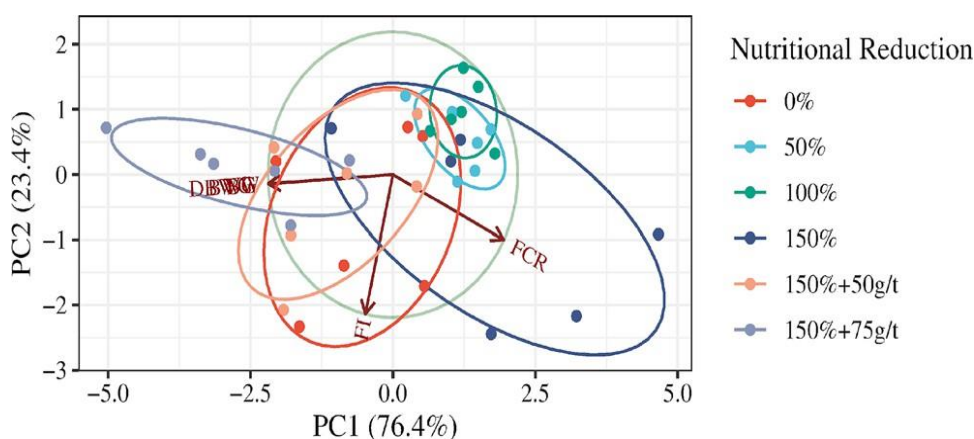


FIGURE 2 - Principal component analysis of performance data of fish fed diets with nutritional reduction and supplementation of Precizyon PRO 50 at dosages of 50 and 75 g/t.

Fillet yield with skin was higher with Precizyon PRO 50 supplementation, especially in diets with higher levels of nutritional reduction (CN100 and CN150). For skinless fillet yield, no significant effect was observed with nutritional reduction; however, pairwise comparisons revealed a superiority in fillet yield when 50 or 75 g/t of Precizyon PRO 50 was included in the diet.

In terms of digestibility, higher coefficients were observed in the diets with Precizyon PRO 50 supplementation, as shown in Table 11. This shows the effectiveness in terms of greater nutrient availability to the fish, especially amino acids such as methionine, lysine, threonine, valine, tryptophan and isoleucine. The digestibility of arginine was improved with both levels of supplementation compared to the PC.

TABLE 9 – Effect of diets without and with nutritional reduction and of Precizyon PRO 50 supplementation at 50 and 75 g/t in the CN150 diet on body weight (FBW, g/fish), body weight gain (BWG, g/fish) and daily weight gain (DWG, g/d/fish), feed intake (FI, g/fish) and feed conversion ratio (FCR, g/g/fish) of Nile tilapia.

Diets	Nutritional reduction	IBW	FBW	BWG	DBWG	FI	FCR
CP	0	48.00	517.80b	469.80b	4.05b	578.37a	1.23abc
CN50	50	48.67	483.09c	434.42c	3.74c	548.02ab	1.26ab
CN100	100	48.83	481.13c	432.30c	3.73c	539.04b	1.25ab
CN150	150	48.00	474.45c	426.45c	3.68c	571.55ab	1.35a
	Precizyon PRO 50, 50 g/t	48.44	525.66ab	477.21ab	4.11ab	571.96ab	1.20bc
	Precizyon PRO 50, 75 g/t	48.17	559.09a	510.92a	4.40a	566.54ab	1.11c
Nutrition	<i>p</i> -value	0.8533	0.0208	0.0204	0.204	0.0107	0.1294
	Linear	0.895	0.006	0.006	0.006	0.448	0.049
	Quadratic	0.391	0.161	0.142	0.142	0.001	0.318
Precizyon PRO 50, 50 g/t*	CP	0.57	0.6	0.6	0.69	0.33	
	CN50	0.0045	0.0055	0.0055	0.065	0.032	
	CN100	0.0039	0.0047	0.0047	0.02	0.061	
	CN150	0.016	0.0017	0.017	0.98	0.0045	
Precizyon PRO 50, 75 g/t**	CP	0.023	0.023	0.023	0.38	0.011	
	CN50	0.00091	0.00087	0.00088	0.0083	0.0021	
	CN100	0.00093	0.00089	0.00089	0.00059	0.004	
	CN150	0.0012	0.0012	0.0012	0.67	0.00046	
	<i>p</i> -value	0.9696	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.0121	0.0003
	SEM	0.8404	9.3625	9.4785	0.0817	8.2116	0.03491
	C.V.(%)	4.26	4.81	5.42	5.42	3.58	6.47

TABLE 10 - Effect of diets without and with nutritional reduction (Red. Nutri., %), and supplementation of Precizyon PRO 50 in the CN150 diet at 50 and 75 g/t on the viscerosomatic index (VSI, %), hepatosomatic index (HSI, %), relative spleen weight (Spleen, %), visceral fat index (VFI, %), yields of fillet + skin (Fillet + Skin, %) and skinless fillet (Fillet, %).

Diets	Nutritional reduction	VSI	HSI	Spleen	VFI	Fillet + Skin	Fillet
CP	0	8.238	2.889	0.196	1.992	38.759ab	30.947
CN50	50	8.674	2.862	0.190	2.019	38.378abc	29.872
CN100	100	8.238	2.812	0.191	1.724	36.045c	28.941
CN150	150	8.388	2.570	0.181	1.652	36.722bc	29.188
	Precizyon PRO 50, 50 g/t	8.355	3.024	0.174	1.837	39.711a	31.108
	Precizyon PRO 50, 75 g/t	8.186	2.913	0.174	1.261	39.033ab	31.740
Nutri.	<i>p</i> -value	0.6325	0.2883	0.8448	0.648	0.0078	0.0383
Reduct	Linear	0.991	0.086	0.419	0.246	0.004	0.026
	Quadratic	0.6	0.404	0.894	0.844	0.388	0.276
Precizyon PRO 50, 50 g/t*	CP	0.77	0.56	0.66	0.70	0.27	0.85
	CN50	0.29	0.51	0.032	0.68	0.06	0.10
	CN100	0.73	0.41	0.019	0.81	0.00017	0.0073
	CN150	0.93	0.11	0.29	0.67	0.0009	0.032
Precizyon PRO 50, 75 g/t**	CP	0.90	0.90	0.72	0.0047	0.75	0.31
	CN50	0.12	0.81	0.021	0.022	0.35	0.011
	CN100	0.89	0.66	0.20	0.021	0.0012	0.00049
	CN150	0.61	0.19	0.29	0.67	0.007	0.0046
	<i>p</i> -value	0.7887	0.4468	0.5266	0.337	0.0001	0.0025
	SEM	0.2566	0.1549	0.01002	0.258	0.5582	0.5486
	C.V.(%)	9.72	17.22	17.19	46.61	4.63	5.73

Note: The means labeled with different letters (a, b, etc.) are significantly different from each other according to the Tukey's multiple comparison test. Means that share the same letter are not significantly different.

**p*-value of the comparisons of the CN150 + 50 g/t diet with the others without supplementation.

***p*-value of the comparisons of the CN150 + 75 g/t diet with the others without supplementation.

TABLE 11 - Coefficients of apparent digestibility of dry matter (DM, %), crude protein (CP, %), energy (Energy, %), and amino acids methionine (Met, %), lysine (Lys, %), threonine (Thr, %), valine (Val, %), tryptophan (Trp, %), isoleucine (Ile, %) and arginine (Arg, %) in tilapia, fed diets without and with nutritional reduction and supplementation of Precizyon PRO 50 in the CN150 diet at 50 and 75 g/t.

		DM	CP	Energy	Met	Lys	Thr	Val	Trp	Ile	Arg
Nutrition	Control	87.52ab	81.40c	78.40b	78.20b	83.94b	81.91a	76.62a	82.10ab	77.09bc	74.78
	50%	87.30b	81.81c	78.80ab	78.00b	84.26ab	81.76a	75.79ab	80.19ab	76.43c	75.50
	100%	87.49ab	82.90bc	78.41b	77.50b	84.42ab	80.92ab	75.05ab	78.70b	76.96bc	75.47
	150%	87.68ab	83.76ab	78.64ab	77.87b	84.16ab	79.74b	74.31b	79.21b	78.19b	75.81
	150% + 50 g/t	88.42a	85.02a	79.29a	79.79a	85.24a	81.21a	76.51a	84.71a	80.17a	78.62
	150% + 75 g/t	87.68ab	83.96ab	78.98ab	80.17a	85.18a	81.89a	76.56a	85.30a	80.18a	78.61
	<i>p</i> -value	0.7135	0.0123	0.1741	0.1333	0.6211	0.0032	0.0377	0.3525	0.0223	0.9801
	Linear	0.535	0.002	0.598	0.108	0.494	0.001	0.006	0.128	0.025	0.717
	Quadratic	0.389	0.587	0.56	0.169	0.289	0.123	0.925	0.393	0.016	0.919
Precizyon PRO 50 50 g/t	CP	0.011	0.016	0.037	0.0028	0.056	0.23	0.78	0.41	0.00075	0.0038
	CN50	0.053	0.0016	0.014	0.0047	0.039	0.35	0.22	0.018	0.00054	0.36
	CN100	0.0099	0.034	0.038	0.0018	0.053	0.62	0.045	0.006	0.0014	0.17
	CN150	0.094	0.087	0.092	0.0046	0.037	0.057	0.086	0.0088	0.04	0.27
Precizyon PRO 50 75 g/t	CP	0.57	0.032	0.016	0.0031	0.079	0.93	0.84	0.33	0.0025	0.0023
	CN50	0.39	0.004	0.024	0.0059	0.00075	0.71	0.16	0.0018	< 0.0001	0.37
	CN100	0.49	0.13	0.016	0.0011	0.054	0.092	0.032	0.0043	0.0042	0.18
	CN150	0.99	0.68	0.22	0.0024	0.054	0.018	0.087	0.00081	0.049	0.27
<i>p</i> -value		0.0424	< 0.001	0.0064	< 0.001	0.065	0.002	0.0092	0.0054	< 0.001	0.3356
SEM		0.2139	0.333	0.144	0.19	0.2302	0.3026	0.4179	1.1557	0.2671	0.1505
C.V.(%)		0.42	0.69	0.32	0.42	0.47	0.65	0.95	2.45	0.59	3.41

Note: The means labeled with different letters (a, b, etc.) are significantly different from each other according to the Tukey's multiple comparison test. Means that share the same letter are not significantly different.

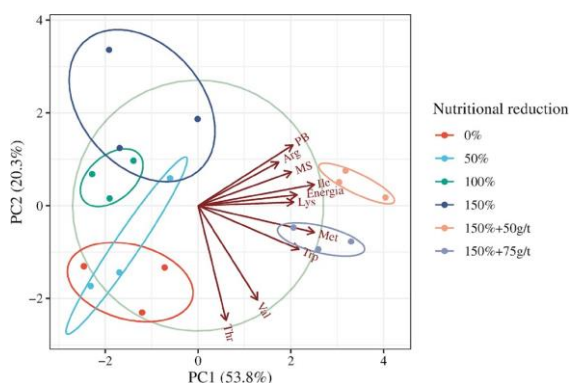


FIGURE 3 - Principal component analysis of the apparent digestibility coefficient data of fish fed diets with nutritional reduction and supplementation of exogenous Precizyon PRO 50 at dosages of 50 and 75 g/t.

By observing Figure 3, with the principal component analysis, one can better understand the relationships between the different diets and their effects on the digestibility coefficients. The analysis helps identify patterns and groupings in the data, highlighting how diets with Precizyon PRO 50 supplementation (at dosages of 50 and 75 g/t) positively influence nutrient digestibility, especially when compared to diets with nutritional reduction. Additionally, PCA helps visualize the variations in the digestibility of amino acids and other nutrients, making it easier to identify which factors (such as supplementation or nutritional reduction) have the most significant impact on the results.

The results indicate that the supplementation of Precizyon PRO

50 in tilapia diets, both at 50 and 75 g/t dosages, did not significantly affect the pH of the meat, but changes were observed in colour characteristics and meat quality, Table 12. Lightness (L^*) was altered, reflecting differences in visual appearance, while the colour factors (a^* and b^*) also showed variations, indicating changes in the meat's hue. Additionally, WHC was improved, which may contribute to juicier meat, while CL was lower in the supplemented diets. SF, an indicator of tenderness, showed similar values in the supplemented diets.

The results from Table 13 show that the supplementation of Precizyon PRO 50 in tilapia diets, both at 50 and 75 g/t, positively influenced the histomorphometric parameters of the intestines. The villi height and width in the anterior, medial and posterior intestines were generally higher in the supplemented diets compared to the control. Additionally, the lamina thickness also showed improvements, suggesting enhanced intestinal development. The height:width ratio was more favourable in the supplemented diets, indicating better intestinal structure and potential improvements in nutrient absorption efficiency (Figure 4).

When comparing the liver images of the tilapia, a pattern of cytoplasmic vacuolization in hepatocytes

was observed across all treatments, suggesting the presence of hepatic steatosis (accumulation of lipids or glycogen) (Figures 5-11). The PC exhibited more evident signs of hepatic stress, such as pronounced vacuolization, eosinophilic material in vascular structures and possible congestion or haemorrhage, indicating metabolic or inflammatory overload. In the Negative Controls 50, 100 and 150, vacuolization was also present, but with variations in intensity.

The CN100 treatment showed extensive vacuolization and signs of vascular congestion, suggesting possible heightened metabolic stress, likely associated with nutrient reduction. On the other hand, the Negative Control 150 showed vacuolated hepatocytes but without evidence of inflammation or congestion, indicating that the liver burden may be lower in this condition.

In the CN150 treatments supplemented with 50 and 75 g/t of Precizyon PRO 50, hepatic vacuolization was observed, along with the presence of well-defined portal areas, but without signs of inflammation or necrosis. This suggests that Precizyon PRO 50 supplementation may have helped in nutrient digestion and absorption, minimizing hepatic stress.

The nutritional reduction in the treatments Negative Control 50, 100 and 150 without Precizyon PRO 50 supplementation seems to increase hepatic stress, as evidenced by pronounced vacuolization and signs of congestion in some samples, indicating metabolic overload. However, in the groups supplemented with Precizyon PRO 50 (50 and 75 g/t), hepatocyte vacuolization is present but without signs of inflammation or vascular congestion, suggesting that the Precizyon PRO 50 helps compensate for nutritional restriction. This indicates that the addition of Precizyon PRO 50 improves nutrient digestion and absorption, reducing the negative impact of the restricted diet on the tilapia liver and potentially promoting more efficient and healthier hepatic metabolism. Thus, Precizyon PRO 50 appears to mitigate the effects of metabolic overload observed in the negative controls without the enzyme, possibly compensating for nutritional restrictions by improving digestive efficiency.

The histological analysis of the spleen in tilapia subjected to different nutritional levels (CP, CN50, CN100, CN150) suggests that supplementation with exogenous Precizyon PRO 50 in the CN150 diets, at doses of 50 and 75 g/t, modulated the splenic response, possibly influencing the fish's immune system. In the images corresponding to the diets with nutritional reduction without supplementation (CP, Figure 11; CN50, Figure 12; CN100, Figure 13; CN150, Figure 14), a significant amount of scattered melanomacrophages is observed, which may indicate a response to immune and oxidative stress due to nutrient deficiency. These melanomacrophages reflect

intense phagocytic activity, possibly in response to the accumulation of cellular debris resulting from compromised metabolism.

In Figure 15, showing the diet supplemented with 50 g/t of Precizyon PRO 50, an increased concentration of melanomacrophages is observed, suggesting that this initial enzyme dose was not sufficient to compensate for the low nutritional quality, possibly creating a higher need for immune response and accumulation of debris in the spleen. In contrast, in Figure 16, showing the effect of the diet supplemented with 75 g/t of Precizyon PRO 50, a reduction in the number of melanomacrophages is observed, which may indicate an improvement in protein digestion and, consequently, a lower load of waste for the spleen to process. This effect suggests that the higher Precizyon PRO 50 dose contributed to more efficient digestion, reducing immune and oxidative stress in the splenic tissue. Thus, supplementation with 75 g/t of Precizyon PRO 50 seems to have a beneficial effect by minimizing the demand for phagocytosis, indicating a more favourable metabolic adaptation for tilapia under nutritional restriction.

The histological evaluation of the liver and spleen revealed significant effects of dietary restriction and exogenous Precizyon PRO 50 supplementation on the metabolic and immune responses of Nile tilapia. In the negative control treatments (CN50, CN100, CN150) without enzyme supplementation, extensive hepatocellular vacuolization and, in some cases, vascular congestion were observed, indicating hepatic stress and potential metabolic overload. These findings align with previous reports associating dietary nutrient deficiencies with liver steatosis and impaired hepatic function in fish. The accumulation of intracellular vacuoles in hepatocytes may reflect lipid or glycogen deposition due to altered energy metabolism under restricted dietary conditions.

In contrast, the Precizyon PRO 50-supplemented groups (CN150 + 50 and CN150 + 75 g/t) exhibited vacuolization without signs of inflammation or congestion, suggesting a hepatoprotective effect of the enzyme. The improved histological profile in these groups likely results from enhanced protein digestion and nutrient absorption, as Precizyon PRO 50s facilitate the breakdown of dietary proteins into absorbable peptides and amino acids. This enzymatic support appears to reduce the physiological burden on the liver, promoting a more efficient and stable hepatic metabolism even under conditions of nutritional restriction.

Complementary findings in the spleen further support this interpretation. Fish fed reduced-nutrient diets without Precizyon PRO 50 supplementation exhibited increased numbers of melanomacrophages—pigment-rich cells associated with phagocytic and detoxifying activities—indicating elevated immune

and oxidative stress. This was particularly evident in the CN100 and CN150 groups, where cellular debris accumulation likely resulted from the metabolic challenges posed by nutrient limitation.

Interestingly, the CN150 + 50 g/t Precizyon PRO 50 group showed a continued high presence of melanomacrophages, suggesting that this enzyme level was insufficient to fully mitigate stress. However, in the CN150 + 75 g/t group, the number and distribution of melanomacrophages were substantially reduced, indicating a decreased need for phagocytic response. This may reflect a systemic benefit of enhanced protein utilization, leading to less residual waste and a reduced immunological load on the spleen.

Together, these observations highlight the potential of exogenous Precizyon PRO 50 supplementation—especially at 75 g/t—to mitigate the adverse effects of dietary restriction in tilapia. The enzyme not only improved liver morphology by reducing metabolic overload but also contributed to a more balanced immune status, as reflected by the spleen histology. These findings underscore the role of digestive enzymes in supporting fish health under suboptimal feeding strategies, offering valuable insights for sustainable aquaculture nutrition.

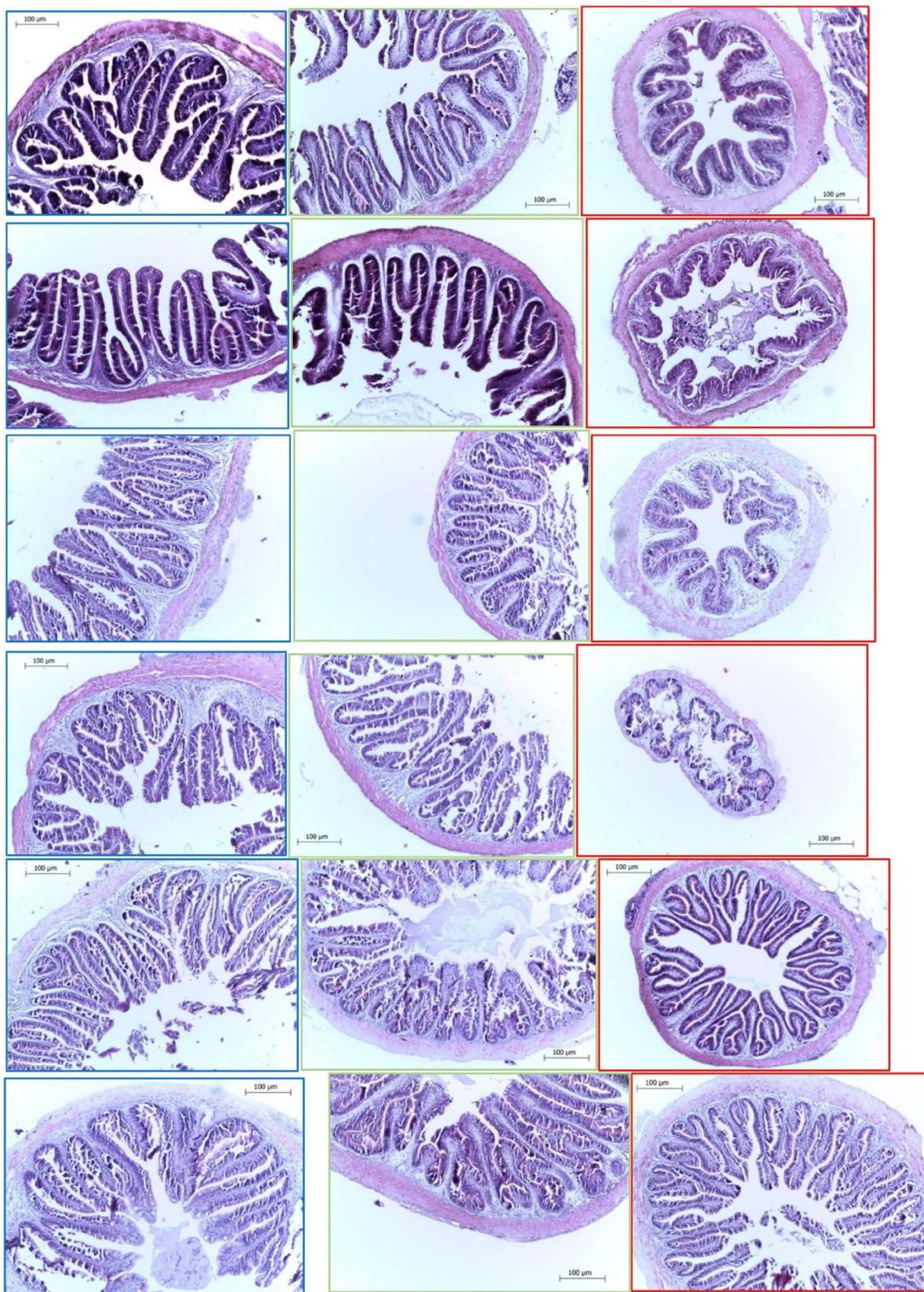


FIGURE 4 - Representative intestinal histophotographs of the experimental treatments. Blue border: proximal or anterior intestine. Green border: medial intestine. Red border: distal or posterior intestine. The treatments are presented in order from top to bottom: Positive Control, Negative Control 50 (NC50), Negative Control 100 (NC100), Negative Control 150 (NC150), Negative Control + 50 g/t of protease (NC50 + 50 g/t) and Negative Control + 75 g/t of protease (NC150 + 75 g/t).

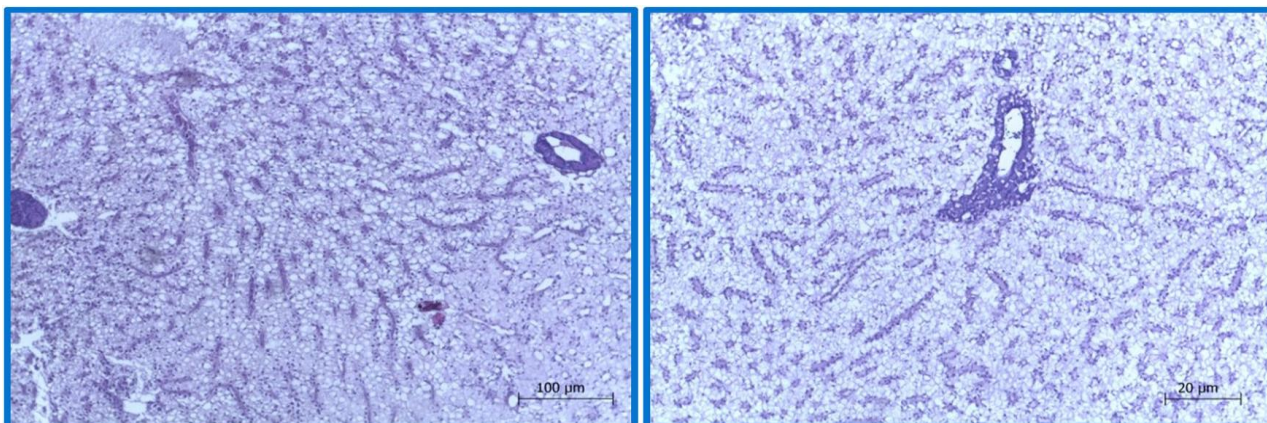


FIGURE 5 - Positive Control, PC. The image of the tilapia liver shows hepatocytes with cytoplasmic vacuolization, suggesting hepatic steatosis (fat accumulation). Vascular structures with eosinophilic material are also visible, and there are small points of possible congestion or haemorrhage. These findings indicate hepatic stress or metabolic overload, possibly related to environmental or dietary factors.

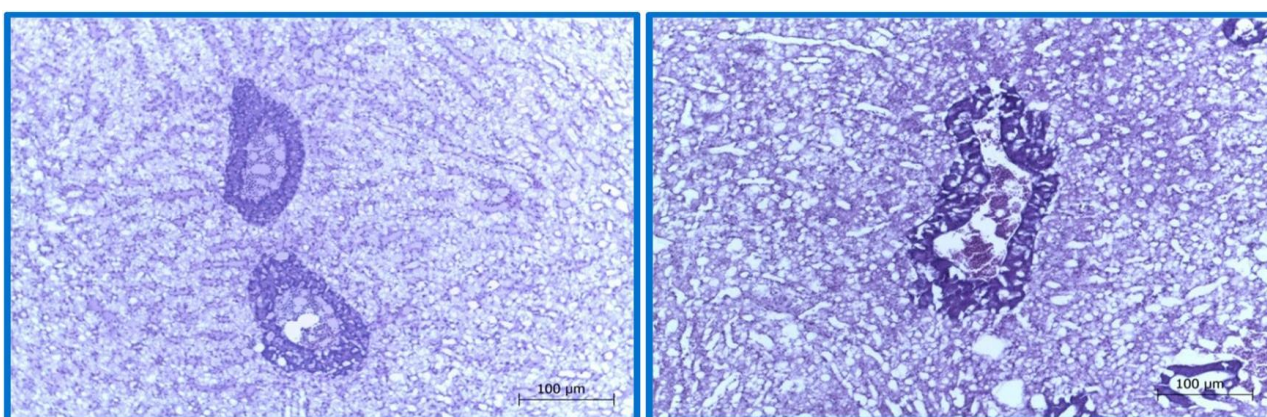


FIGURE 6 - Negative Control, CN50. In this histological section of the tilapia liver, stained with haematoxylin and eosin, areas of cytoplasmic vacuolization in the hepatocytes are observed, again suggesting hepatic steatosis. There is also the presence of oval-shaped structures with eosinophilic tissue and dense organization, which may represent globules or aggregates of immune cells. These alterations indicate a possible inflammatory response or a metabolic stress process in the liver. The presence of these structures and the degree of vacuolization further support the hypothesis that the organ is under some type of overload.

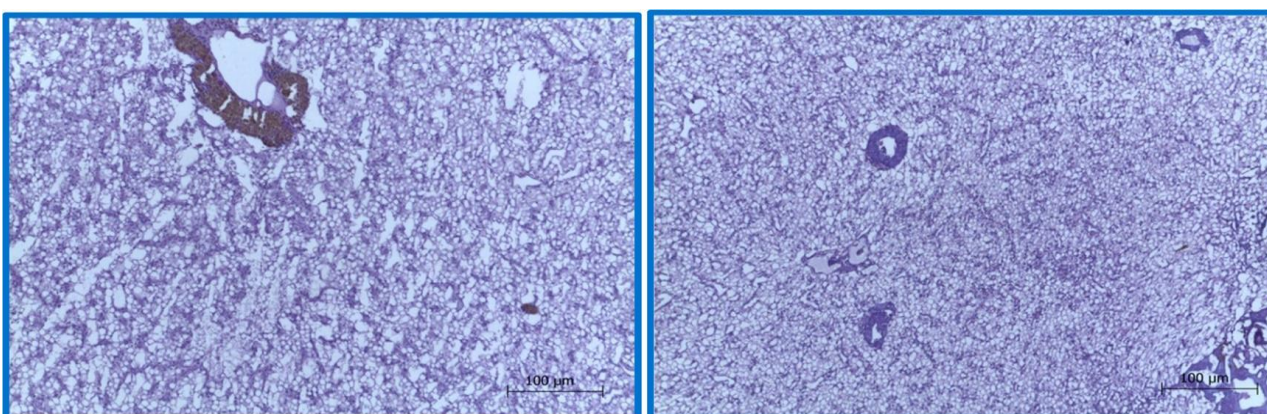


FIGURE 7 - Negative Control, CN100. In this histological section of the tilapia liver, also stained with haematoxylin and eosin, extensive vacuolization in the cytoplasm of the hepatocytes is observed, suggesting a case of hepatic steatosis. The vacuoles occupy a large portion of the tissue, leaving the hepatic parenchyma with a spongy and fragmented appearance. Additionally, a blood vessel with concentrated erythrocytes inside is visible, indicating congestion or venous stasis. This appearance may be associated with a response to stress or a pathology that impairs hepatic blood flow. These characteristics may reflect a metabolic or inflammatory condition, or simply a condition of intensive production.

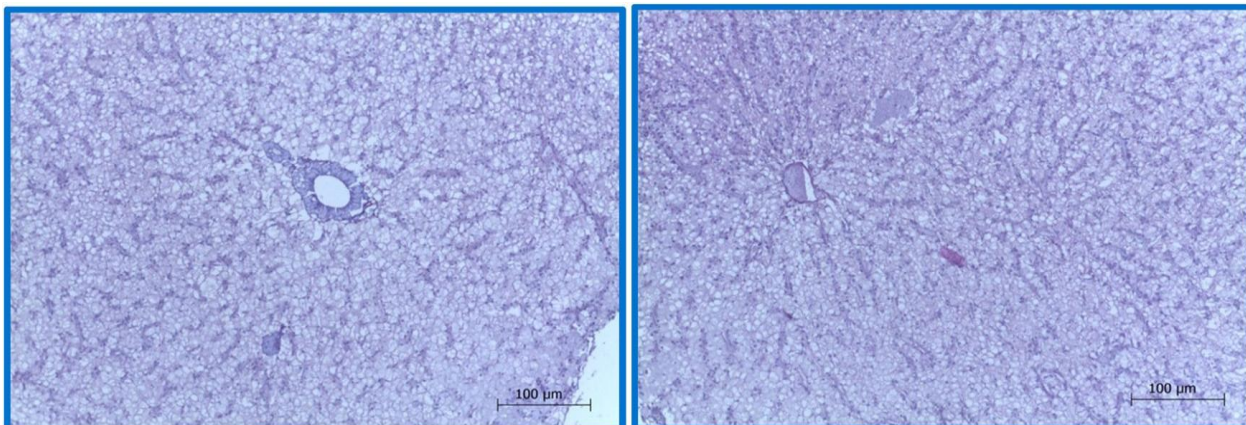


FIGURE 8 - Negative Control, CN150. In the image, the tilapia liver shows hepatocytes arranged in cords with clear and vacuolated cytoplasm, suggesting the accumulation of lipids or glycogen. Between them, well-distributed sinusoids (vascular spaces) are observed. At the centre, a circular structure may be a bile duct or blood vessel, surrounded by denser cells, indicating a portal area. There are no evident signs of inflammation, necrosis or congestion, and the HE staining clearly highlights the nuclei and cytoplasm.

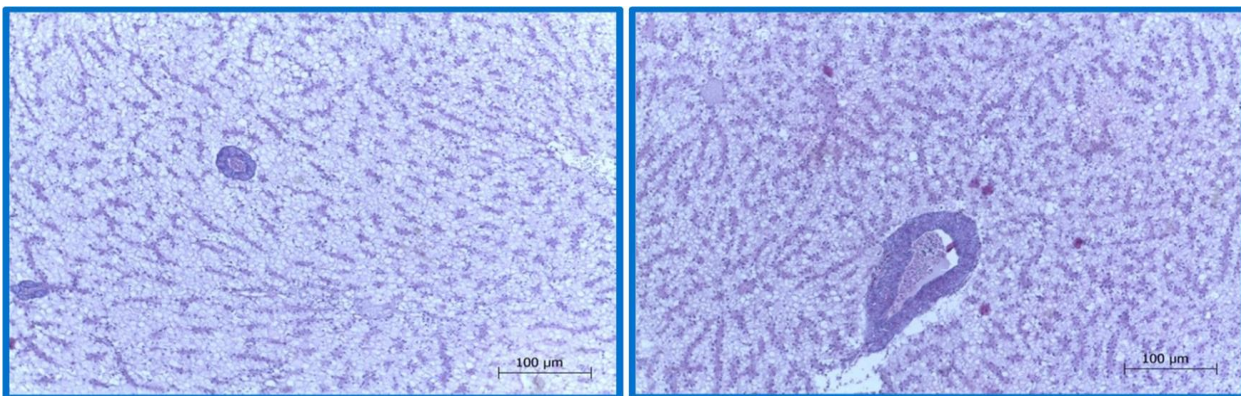


FIGURE 9 - Negative Control 150 + 50 g/t of Precizyon PRO 50. The image shows the liver of a tilapia with vacuolated hepatocytes, suggesting the accumulation of lipids or glycogen, and well-distributed sinusoids between the cellular cords. A circular structure in the image indicates the presence of a bile duct or blood vessel, possibly in a portal area. The haematoxylin and eosin staining clearly highlights the nuclei and cytoplasm, with no evidence of inflammation or necrosis.

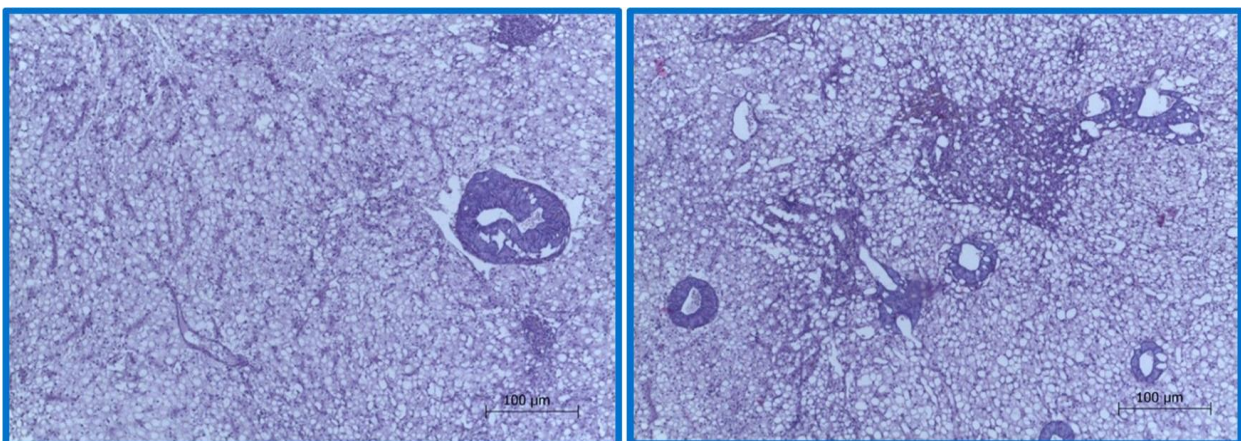


FIGURE 10 - Negative Control 150 + 75 g/t of Precizyon PRO 50. In this image of tilapia liver stained with haematoxylin and eosin, vacuolated hepatocytes are observed, possibly indicating the accumulation of lipids or glycogen. The sinusoids are visible between the cellular cords, and a larger vascular structure, possibly a blood vessel or bile duct, is observed with a well-defined wall. There are no evident signs of inflammation or necrosis, and the staining clearly highlights the nuclei and cytoplasm.

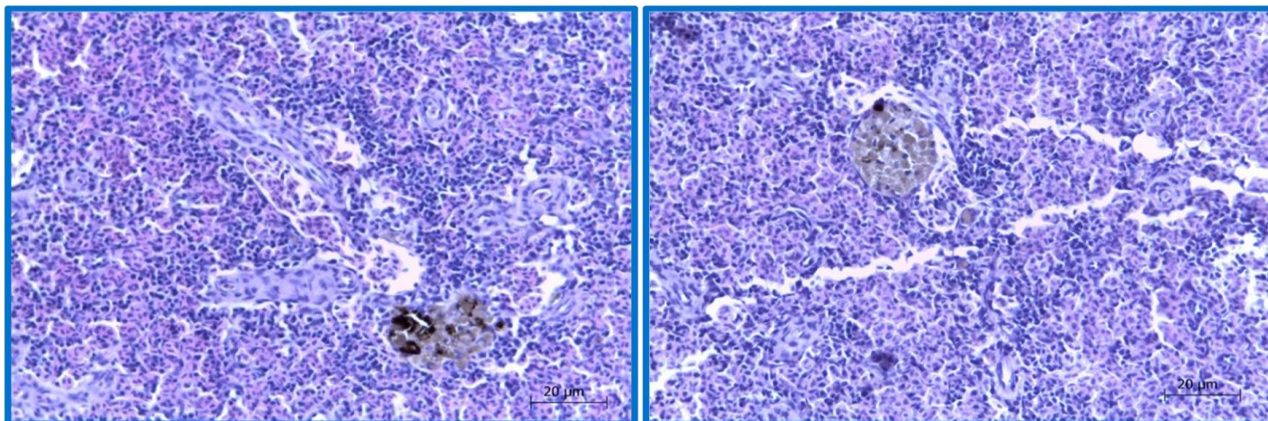


FIGURE 11 - Histological image of the tilapia spleen showing dense areas with lymphocytes characteristic of the white pulp and an accumulation of melanomacrophages, visible as dark pigment, likely related to cellular degradation processes. The separation between the white pulp and red pulp is not clearly defined.

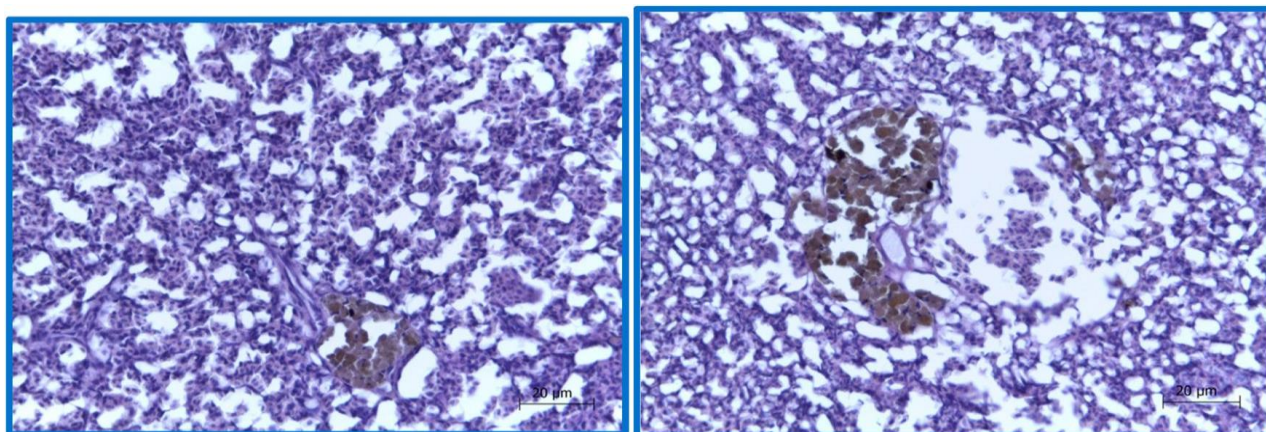


FIGURE 12 - The histological image of the tilapia spleen shows a cellular arrangement with more clear spaces, indicating areas likely belonging to the red pulp, with wide sinusoids and less compact organization compared to the white pulp. An accumulation of melanomacrophages (dark pigment), like that observed previously, is also visible, indicating the presence of cells involved in the degradation and storage of cellular debris. The separation between red and white pulp is still not evident, a common feature in fish spleens.

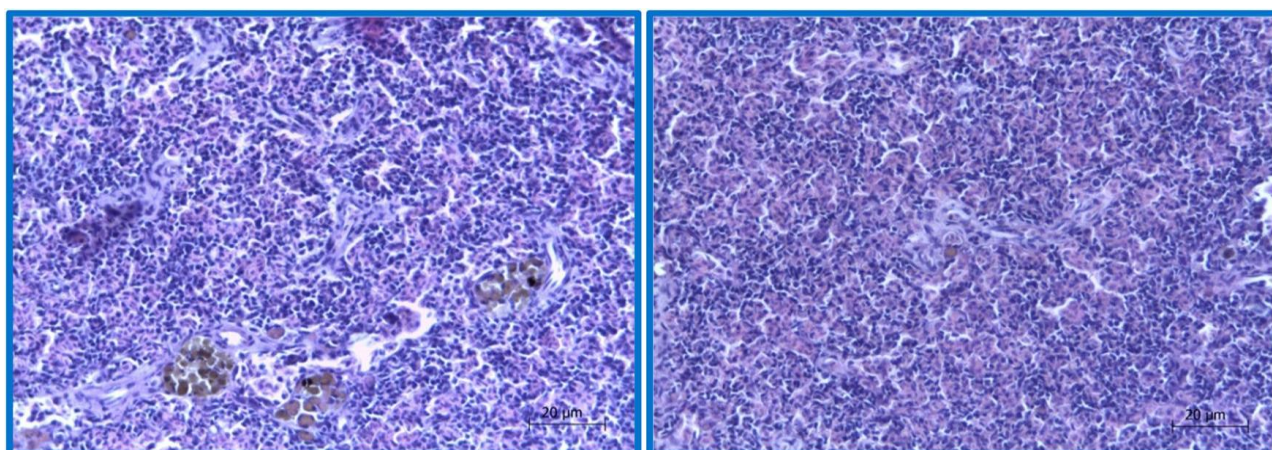


FIGURE 13 - In the CN100 image, similar features to those in CN50 are observed, including a high density of lymphocytes and the presence of melanomacrophages (dark pigments), which appear more frequent and slightly larger. This may indicate increased cellular degradation activity and immune response, possibly as a reaction to the stress caused by the more restricted nutritional diet. The separation between white pulp and red pulp areas remains unclear, which is a common characteristic in fish spleens. These changes suggest that the more nutritionally restricted diet impacts the spleen's histological structure, potentially stimulating melanomacrophage activity.

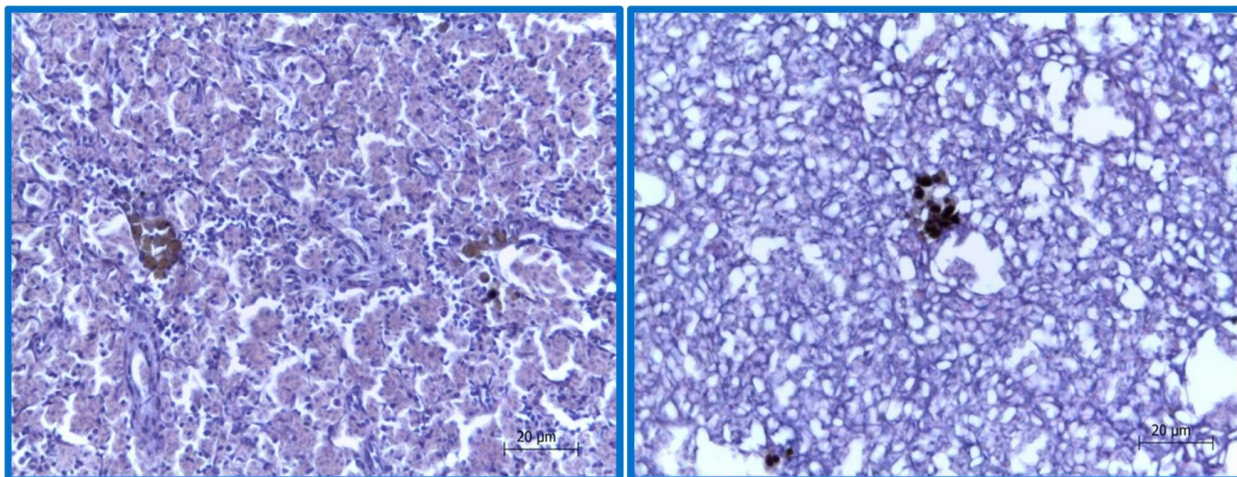


FIGURE 14 - In the CN150 image, the splenic architecture shows aggregates of haematopoietic cells and the presence of sinusoids. Dispersed melanomacrophages are identifiable, characterized by dark brown pigment deposits, indicating phagocytic activity and the immunological role of splenic tissue in fish.

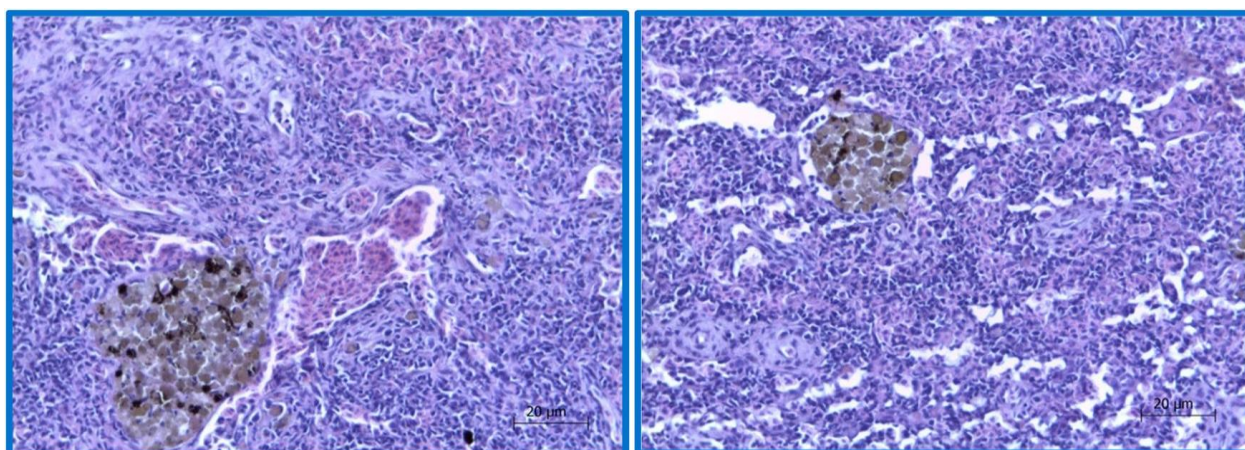


FIGURE 15 - In the CN150 + 50 g/t Precizyon PRO 50 treatment image, large aggregates of melanomacrophages are observed, evidenced by the presence of cells with dark brown pigment, indicating phagocytic function and the storage of cellular debris and pigments. The splenic architecture includes areas of haematopoietic tissue and sinusoids, reflecting the spleen's immunological role.

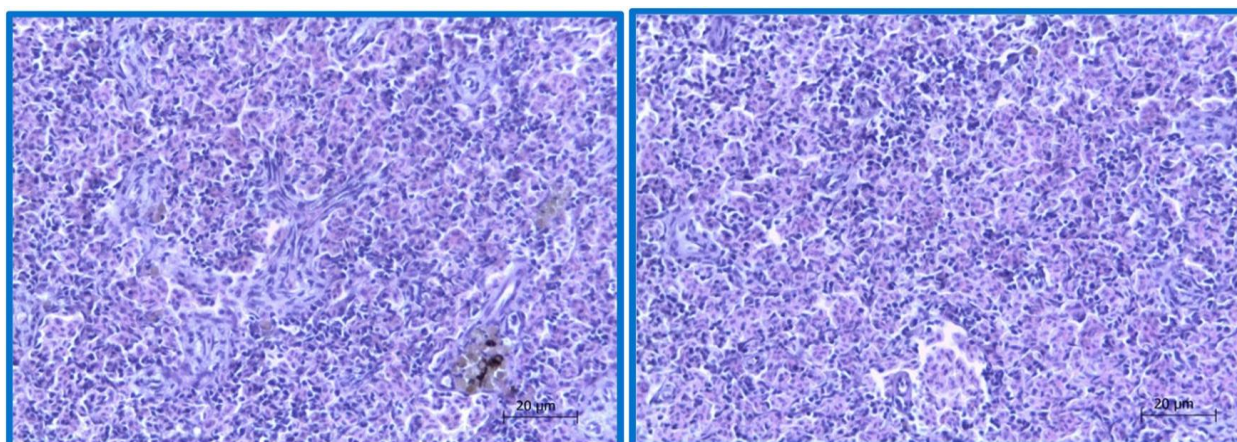


FIGURE 16 - In the CN150 + 75 g/t Precizyon PRO 50 treatment image, the splenic tissue appears homogeneous with haematopoietic cells and partially visible sinusoids. A discreet presence of melanomacrophages is observed, indicated by small, scattered dark brown pigment spots, reflecting phagocytic function and waste storage in the splenic tissue. The distribution of melanomacrophages is less concentrated in this image compared to the other treatments.

TABLE 12 - Meat quality, based on pH, L^* (lightness), a^* (redness), b^* (yellowness), WHC (water holding capacity, %), CP (cooking loss, %) and SF (shear force, N) of tilapia fed diets without and with nutritional reduction and supplementation of Precizyon PRO 50 in the CN150 diet at 50 and 75 g/t.

Diets	Nutritional reduction	pH	L^*	a^*	b^*	WHC	CP	SF
CP	0	5.957	39.632ab	5.557	10.196	70.245ab	84.566	0.520
CN50	50	6.187	36.172c	6.881	8.787	71.521ab	86.204	0.328
CN100	100	5.953	38.954abc	6.048	10.027	64.657b	88.633	0.383
CN150	150	6.087	42.044a	4.834	11.689	65.231b	87.905	0.629
	Precizyon PRO 50, 50 g/t	5.960	38.012bc	8.230	10.533	73.048a	86.184	0.967
	Precizyon PRO 50, 75 g/t	6.320	41.868a	4.733	9.734	72.633a	84.108	0.522
Nutrition	p -value	0.0572	0.0023	0.2132	0.4068	0.1057	0.1427	0.3813
	Linear	0.497	0.012	0.317	0.294	0.661	0.045	0.517
	Quadratic	0.355	0.001	0.078	0.214	0.202	0.343	0.12
Precizyon PRO 50	CP	0.96	0.065	0.033	0.77	0.60	0.34	0.16
50 g/t*	CN50	0.039	0.11	0.24	0.16	0.74	0.99	0.079
	CN100	0.93	0.45	0.13	0.76	0.16	0.085	0.099
	CN150	0.077	0.0012	0.013	0.59	0.23	0.27	0.29
Precizyon PRO 50	CP	0.031	0.095	0.19	0.69	0.64	0.85	0.99
75 g/t**	CN50	0.28	0.0068	0.097	0.39	0.79	0.40	0.12
	CN100	0.031	0.09	0.30	0.86	0.16	0.11	0.17
	CN150	0.11	0.86	0.85	0.38	0.24	0.16	0.61
	p -value	0.1171	0.0003	0.0089	0.5519	0.0392	0.1263	0.0663
	SEM	0.0814	0.6623	0.5839	1.0481	1.824	1.2089	0.1358
	C.V.(%)	2.33	2.91	16.73	17.87	4.6	2.43	28.21

Note: The means labeled with different letters (a, b, etc.) are significantly different from each other according to the Tukey's multiple comparison test. Means that share the same letter are not significantly different.

* p -value of the comparisons of the CN150 + 50 g/t diet with the others without supplementation.

** p -value of the comparisons of the CN150 + 75 g/t diet with the others without supplementation.

TABLE 13 - Histomorphometric data of the anterior, medial, and posterior intestines of tilapia fed diets without and with nutritional reduction and supplementation of Precizyon PRO 50 in the CN150 diet at 50 and 75 g/t, including villi height (μm), villi width (μm), lamina (μm) and height:width ratio.

	Diets	Nutritional reduction	Villi height, μm	Villi width, μm	Lamina, μm	Height: width
Anterior	CP	0	173.742ab	45.119ab	11.624a	4.110ab
	CN50	50	171.167b	47.773a	8.480b	3.611b
	CN100	100	194.305ab	41.196ab	9.615ab	4.910a
	CN150	150	162.545b	38.766b	10.743ab	4.371ab
		Precizyon PRO 50, 50 g/t	211.841a	41.356ab	7.874ab	5.218a
		Precizyon PRO 50, 75 g/t	189.430ab	43.168ab	9.239ab	4.425ab
		<i>p</i> -value	0.0065	0.0234	0.004	0.0019
		SEM	9.802	1.9404	0.7291	0.2824
		C.V.(%)	23.84	20.33	33.98	28.45
Medial	CP	0	173.845ab	39.955c	18.287a	4.614a
	CN50	50	145.418b	49.320a	14.653ab	2.955b
	CN100	100	197.038a	44.742abc	16.086ab	4.484a
	CN150	150	205.480a	40.133c	12.328b	5.347a
		Precizyon PRO 50, 50 g/t	211.264a	41.308bc	15.175ab	5.197a
		Precizyon PRO 50, 75 g/t	195.229a	47.728ab	16.462ab	4.126ab
		<i>p</i> -value	0.0004	0.0004	0.0077	< 0.001
		SEM	11.075	1.819	1.094	0.299
		C.V.(%)	26.34	18.55	31.6	30.12
Posterior	CP	0	98.341c	57.927a	17.956b	1.744b
	CN50	50	73.112d	52.074a	16.094b	1.413b
	CN100	100	102.263bc	58.895a	25.973a	1.862b
	CN150	150	81.848cd	41.362b	25.690a	2.080b
		Precizyon PRO 50, 50 g/t	122.196b	28.610c	11.778b	4.485a
		Precizyon PRO 50, 75 g/t	162.861a	37.204bc	13.401b	4.590a
		<i>p</i> -value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
		SEM	5.147	2.3869	1.8202	0.214
		C.V.(%)	21.56	23.2	44.04	35.51

Note: The means labeled with different letters (a, b, etc.) are significantly different from each other according to the Tukey's multiple comparison test. Means that share the same letter are not significantly different.

**p*-value of the comparisons of the CN150 + 50 g/t diet with the others without supplementation.

***p*-value of the comparisons of the CN150 + 75 g/t diet with the others without supplementation

4 DISCUSSION

The findings of the present study provide compelling evidence that dietary supplementation with exogenous protease positively influences growth performance, nutrient digestibility, intestinal histomorphology and fillet quality in Nile tilapia (*O. niloticus*). The enzymatic activity on dietary proteins is a critical mechanism facilitating these enhancements, as it improves the digestion and absorption of nutrients, particularly amino acids, which are essential for protein synthesis and tissue accretion.

A quadratic dose-response relationship was identified for performance parameters, including live weight, WG and feed conversion ratio, with optimal dosages ranging from 65 to 77 g/t. Specifically, the estimated optimal inclusion levels for live weight, WG and feed conversion were determined to be 71.15, 71.26 and 77.00 g/t, respectively, following the complete 135-day experimental period. These results align with the study conducted by Mohamed et al. (2020), which reported significant enhancements in final body weight, WG and feed conversion ratio in tilapia fed protease at concentrations of 0, 5 and 10 g/kg, corresponding to 0, 500 and 1000 g/t. Their findings indicated a clear dose-dependent improvement in growth and feed efficiency. In our investigation, despite the evaluated doses (25–125 g/t) being markedly lower than those employed by Mohamed et al. (2020), we achieved superior or comparable performance metrics, suggesting that lower dosages of specific proteases may suffice, contingent upon enzyme origin and activity.

Saleh et al. (2022) further validate these results by demonstrating that protease supplementation at 250 and 500 g/t in tilapia diets enhanced feed efficiency, protein utilization and water quality by reducing ammonia and nitrite levels. Notably, in our study, although no significant changes in FI were observed ($p = 0.6814$), substantial improvements in feed conversion ratio were identified, particularly at 77 g/t, underscoring the efficacy of protease supplementation in optimizing nutrient utilization rather than merely augmenting feed consumption. Additionally, Ragaa et al. (2017) reported favourable outcomes with higher doses (200–500 g/t), emphasizing that the effectiveness of protease supplementation may be influenced by dietary composition, enzyme activity and the duration of the feeding trial.

In our research, enhancements in protein digestibility were substantiated by digestibility assays, as well as by

histomorphological modifications in the intestinal mucosa. Specifically, protease supplementation significantly increased the height and width of intestinal villi, particularly in the medial and distal segments of the intestine, where digestive and absorptive activities are most pronounced. These structural alterations suggest an expanded absorptive surface area, facilitating enhanced nutrient uptake. Importantly, no structural damage or pathological changes were noted, indicating the safety of the tested enzyme (Precizyon PRO 50), even with prolonged dietary inclusion.

The mode of action of proteases is significantly influenced by the pH levels within the gastrointestinal tract. Acidic proteases, such as pepsin and the exogenous protease examined in this study, are active in the acidic environment of the stomach. In contrast, neutral and alkaline proteases, including trypsin and chymotrypsin, function effectively within the intestinal milieu (Dabrowski and Glogowski 1977). Research conducted by Lin et al. (2007) demonstrated that tilapia receiving diets supplemented with protease, β -glucanase and xylanase exhibited an increase in endogenous protease secretion (specifically trypsin), enhanced protein retention and improved overall digestibility. These findings support the hypothesis of a synergistic effect between exogenous and endogenous enzymes, facilitating the efficient breakdown of complex dietary proteins into absorbable amino acids.

Exogenous enzymes can mitigate the antinutritional effects associated with plant-based ingredients, thereby enhancing the nutritional value of alternative protein sources, such as palm kernel meal. This aspect is particularly pertinent to the current study, which predominantly employed plant-based diets. In this context, protease supplementation may have alleviated the impact of protease inhibitors naturally present in ingredients like soybean meal, resulting in increased overall protein availability.

Regarding carcass and fillet yield, both experimental trials indicated significant improvements associated with protease supplementation. Optimal doses, specifically 68.5, 95 and 73.25 g/t, correlated with superior fillet yield and reduced visceral fat content. These outcomes are likely linked to enhanced amino acid absorption and metabolic utilization. According to Portz and Furuya (2012), following digestion, amino acids absorbed in the intestine are transported to the liver via the portal vein, where they undergo rapid metabolism and are directed to tissues necessitating protein synthesis, such as skeletal muscle. This pathway emphasizes the direct

relationship between protein digestibility, nutrient retention and fillet yield.

Moreover, protease supplementation had a notable impact on meat quality traits, including fillet pH and cooking weight loss. These alterations suggest potential enhancements in meat tenderness, moisture retention and overall sensory appeal. Cooking loss is particularly relevant to consumer perception, as higher water retention typically correlates with juicier and more tender fillets. Although no studies have directly linked protease supplementation to meat quality in fish, the findings of the present study indicate this as a promising avenue for future research. Similar conclusions have been reached by Debnath et al. (2005) and Goda et al. (2012), who highlighted the role of enzymes in improving nutrient absorption, which can indirectly affect muscle quality and composition.

Despite both studies in this research using relatively moderate doses of Precizyon PRO 50 (50 and 75 g/t), the responses observed concerning performance, digestibility, histology and meat quality were significant. Among the tested doses, 50 g/t emerged as the most efficient, balancing biological efficacy with economic feasibility. The present findings substantiate the effectiveness of acid protease supplementation in Nile tilapia diets, not only in enhancing performance but also in promoting intestinal health and improving fillet quality. However, the mechanisms underlying the observed improvements in meat quality remain unclear and necessitate further investigation to elucidate and better comprehend the relationships between dietary enzymes and fillet characteristics.

Dietary protease supplementation, particularly utilizing acid proteases such as the exogenous protease examined, represents a viable and effective strategy for enhancing growth, feed efficiency, nutrient utilization and product quality in Nile tilapia. These results align with previous studies (Mohamed et al. 2020; Saleh et al. 2021; Ragaa et al. 2017; Lin et al. 2007; Farhangi and Carter 2007; Shi et al. 2016; Kemigabo et al. 2019), thereby supporting its broader implementation in commercial aquaculture, particularly in the context of plant-based diets and sustainable feed formulations.

In response to dietary restriction and protease supplementation, Nile tilapia exhibit specific histological changes in the liver and spleen. Protease supplementation in diets containing soy-bean meal has been shown to improve intestinal health and metabolism, with notable effects on the liver, such as reduced aspartate aminotransferase activity and

increased HSI, indicating enhanced liver function and reduced stress on the organ (Schneider et al. 2025). Histological examinations of the liver in various studies reveal that dietary interventions can lead to significant alterations. For instance, feeding Nile tilapia with dried sewage sludge resulted in drastic histological alterations in the liver, likely due to pollutants, which underscores the importance of diet quality in aquaculture (Abdelhamid et al. 2014). Similarly, the use of selenomethionine supplementation at high levels led to liver hypertrophy, glycogen accumulation and necrosis, indicating that while selenium is essential, excessive amounts can impair liver metabolism (Gomes et al. 2016). In terms of the spleen, dietary interventions such as vitamin.

E supplementation have been shown to progressively restore normal histomorphology, suggesting a protective effect against histopathological damage (Monier et al. 2024). Additionally, histopathological studies in polluted environments have reported immune cell infiltration and inflammatory indices in the spleen, highlighting the organ's role in responding to environmental stressors (Getnet et al. Early View). Overall, these findings suggest that dietary components and environmental conditions significantly influence the histological health of the liver and spleen in Nile tilapia, with protease supplementation offering potential benefits in improving liver function and reducing stress-related damage.

The inclusion of the exogenous protease Precizyon PRO 50 had distinct and measurable effects on the histomorphology of the intestine, liver and spleen of Nile tilapia. In the intestine, protease supplementation significantly increased villi length and width in the proximal and medial regions compared to the control diet, without inducing changes in the distal region. This morphological improvement is consistent with enhanced absorptive surface area, which may result from the protease's ability to hydrolyse complex proteins and reduce antinutritional factors, thus improving nutrient availability and reducing mucosal stress. Such changes in intestinal architecture have been reported in other fish species supplemented with dietary proteases, where improved villus morphology is linked to better feed efficiency and growth performance.

In the liver, fish receiving protease-supplemented diets displayed normal histological architecture, with well-preserved hepatocytes, distinct nuclei and intact cytoplasmic organization and no evidence of inflammation or necrosis. This contrasts with the subtle signs of cellular stress observed in some non-supplemented groups, suggesting that protease inclusion may alleviate hepatic metabolic load by

enhancing nutrient digestibility and reducing the accumulation of undigested dietary protein and nitrogenous waste.

In the spleen, protease-fed fish exhibited a less concentrated distribution of melanomacrophage centres compared to the negative controls. A reduced melanomacrophage density is often indicative of lower immunological activation and oxidative stress, which aligns with the hypothesis that improved protein digestion and amino acid absorption help maintain systemic homeostasis. Together, these findings indicate that dietary protease not only optimizes nutrient utilization but also contributes to the maintenance of structural and functional integrity in key digestive and immune organs.

5 CONCLUSION

The addition of exogenous Precizyon PRO 50 to Nile tilapia diets significantly enhanced nutrient digestibility, growth metrics, intestinal structure and fillet quality, with optimal inclusion levels identified between 71 and 77 g/t. Supplementation at 50–75 g/t countered impaired performance from reduced amino acids, improving growth, fillet yields and overall physiological condition, thereby demonstrating the efficacy of protease as a nutritional strategy in aquaculture.

Author Contributions

Naiane Cristina de Lima Silva: conceptualisation, methodology, data curation, data analysis, writing – review and editing, final review. **Mario Augusto Monteiro Silva:** data collection, final review, validation, visualization. **Maria Érica da Silva Oliveira:** data collection, final review, validation, visualization. **Joice Teixeira Souza:** data collection, final review, validation, visualization. **Ana Cecília Araújo Lopes:** data collection, final review, validation, visualization. **Vanessa Maria Freitas da Silva:** data collection, final review, validation, visualization. **Marcos Aurelio Victor de Assunção:** data collection, final review, validation, visualization. **Romulo de Carvalho Cabral:** data collection, final review, validation, visualization. **Natanael Silva Félix:** data collection, final review, validation, visualization. **Moacir Franco de Oliveira:** data collection, final review, validation, visualization. **Juliana Forgiarini:** conceptualisation, methodology, data curation, review and editing, final review. **Matheus Ramalho de Lima:** conceptualisation, methodology, data curation, data analysis, writing – review and editing, final review.

Consent

The authors have nothing to report.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

Data will be made available on request.

References

- AOAC. 2011. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19th ed. AOAC International. www.eoma.aoac.org.
- Batista, L. G., et al. 2019. “The Effects of Protease Supplementation in the Diet of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) on Growth Performance, Nutrient Digestibility, and Waste Production.” *Aquaculture* 507: 38–43.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2022. *Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal*. MAPA.
- Dabrowski, K., and J. Glogowski. 1977. “Studies on the Role of Exogenous Proteolytic Enzymes in Digestion Processes in Fish.” *Hydrobiologia* 54, no. 2: 129–134. <https://doi.org/10.1007/BF00034986>.
- Debnath, D., A. K. Pal, N. P. Sahu, et al. 2005. “Effect of Dietary Microbial Phytase Supplementation on Growth and Nutrient Digestibility of *Pangasius pangasius* (Hamilton) Fingerlings.” *Aquaculture Research* 36, no. 2: 180–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01203.x>.
- Farhangi, M., and C. G. Carter. 2007. “Effect of Enzyme Supplementation to Dehulled Lupin-Based Diets on Growth, Feed Efficiency, Nutrient Digestibility and Carcass Composition of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).” *Aquaculture Research* 38, no. 12: 1274–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01789.x>.
- Feitosa, N. M., et al. 2021. “Digestive Protease Supplementation for Nile Tilapia Juveniles (*Oreochromis niloticus*): Performance, Fillet Quality and Digestive Enzymes Activity.” *Aquaculture Research* 52, no. 1: 316–327.
- Goda, M. A. A., et al. 2012. “Effect of Using Baker’s Yeast and Exogenous Digestive Enzymes as Growth Promoters on Growth, Feed Utilization and Hematological Indices of Nile Tilapia.” *Journal of Agricultural Science and Technology B* 2: 15–28.
- Hamm, R. 1960. “Biochemistry of Meat Hydration.” *Advanced Food Research* 10: 335–362.

- Kemigabo, C., L. W. Jere, D. Sikawa, C. Masembe, J. Kang'ombe, and
- M. Abdel-Tawwab. 2019. "Growth Response of African Catfish, *Clarias gariepinus* (B.), Larvae and Fingerlings Fed Protease-Incorporated Diets." *Journal of Applied Ichthyology* 35: 480–487. <https://doi.org/10.1111/jai.13877>.
- Lima, T. D., et al. 2021. "Effects of Dietary Protease on Growth Performance, Body Composition, Digestive Enzymes Activities and Plasma Metabolites of Nile Tilapia Fed Diets With Different Protein Levels." *Aquaculture* 535: 736314.
- Lin, S., K. Mai, and B. Tan. 2007. "Effects of Exogenous Enzyme Supplementation in Diets on Growth and Feed Utilization in Tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*." *Aquaculture Research* 38, no. 15: 1645–1653. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01825.x>.
- Mohamed, S. H., Y. M. Eman, M. A. Ahmed, et al. 2020. "Effect of Dietary Protease at Different Levels of Malic Acid on Growth, Digestive Enzymes and Haemato-Immunological Responses of Nile Tilapia, Fed Fish Meal Free Diets." *Aquaculture* 522: 735124. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735124>.
- Osório, J. C. S., M. T. M. Osório, P. O. C. Jardim, M. A. Pimentel, J. L. O. Pouey, and W. E. Lüder. 1998. *Métodos para Avaliação de Carne Ovina "in Vivo", Na Carcaça e Na Carne*. Universitária/UFPEL.
- Portz, L., and W. M. Furuya. 2012. "Energia, Proteína e Aminoácidos." In *NUTRIQUA-Nutrição e Alimentação de Espécies de Interesse para a Aquicultura Brasileira*, edited by D.M. Fracalossi and J.E.P. Cyrino, 65–77. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática.
- Ragaa, N. M., N. M. A. Elala, A. M. Kamal, and N. F. Kamel. 2017. "Effect of a Serine-Protease on Performance Parameters and Protein Digestibility of Cultured *Oreochromis niloticus* Fed Diets With Different Protein Levels." *Pakistan Journal of Nutrition* 16, no. 3: 148–154. <https://doi.org/10.3923/pjn.2017.148.154>.
- Saleh, E. S. E., S. S. Tawfeek, A. A. A. Abdel-Fadeel, A. S. A. Abdel-Daim, A.-R. H. Abdel-Razik, and I. M. I. Youssef. 2022. "Effect of Dietary Protease Supplementation on Growth Performance, Water Quality, Blood Parameters and Intestinal Morphology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)." *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 106: 419–428. <https://doi.org/10.1111/jpn.13591>.
- Santos, E. B., et al. 2020. "Effects of Dietary Supplementation With an Exogenous Protease on Growth, Digestive Enzymes Activity and Intestinal Microbiota of Nile Tilapia." *Aquaculture Research* 51, no. 12: 5721–5731.
- Shi, Z., X.-Q. Li, M. A. K. Chowdhury, J.-N. Chen, and X.-J. Leng. 2016. "Effects of Protease Supplementation in Low Fish Meal Pelleted and Extruded Diets on Growth, Nutrient Retention and Digestibility of Gibel Carp, *Carassius auratus gibelio*." *Aquaculture* 460: 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.049>.
- Schneider, T. L. S., R. C. Scheid, N. C. Peixoto, and R. Lazzari. 2025. "Metabolic and Intestinal Morphometric Responses of Nile Tilapia Fed Diets Containing Soybean and Protease." *Animals* 15, no. 3: 349. <https://doi.org/10.3390/ani15030349>.
- Abdelhamid, A. M., A. I. Mehrim, A. A. M. Abdel Hamid, and M. A. Alkatan. 2014. "Possible Effects of Feeding Fish the Dried-Treated Sewage: II-Concerning Blood Profile and Histological Structure of the Liver." 5, no. 10: 583–603. <https://doi.org/10.21608/JAPPMU.2014.70666>.
- Gomes, G. R., C. d. Cruz, R. Sakabe, F. M. Ramos, and R. Y. Fujimoto. 2016. "Histopatologia Do fígado de Tilápias-do-Nilo Suplementadas com Selenometionina." *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 51, no. 3: 288–291. <https://doi.org/10.1590/S0100-204x2016000300012>.
- Monier, M. N., Y. S. Grana, A. A. Amer, et al. 2024. "Dietary Vitamin E (α -Tocopherol Acetate) Modulates Growth, Digestive Enzymes, Histopathology, and Vulnerability of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* to Aeromonas Hydrophila Infection." *Animal Feed Science and Technology* 318: 116147. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.116147>.
- Getnet, M. A., M. Y. Mekonnen, H. M. Yimam, A. M. Berihun, and B. A. Maled. Early View. "Histopathology Based Study of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fish Species as a Biomarker for Water Pollution Evaluation in the Southern Gulf of Lake Tana." <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4558018/v1>.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta de estudar o efeito de diferentes doses de uma protease Precizyon PRO 50 na dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), observando o sobre o desempenho zootécnico, digestibilidade e qualidade do filé, demonstrou resultados bastante positivos no que diz respeito ao uso de uma dose adequada, visando à melhoria dos parâmetros que favorecem a otimização da produtividade aquícola.

Os resultados obtidos evidenciaram melhorias significativas no desempenho zootécnico. Ao avaliar o efeito da protease Precizyon PRO 50 em diferentes concentrações na dieta da Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), comparando-as e observando as contribuições para melhor desempenho zootécnico, digestibilidade e qualidade do filé e as alterações histológicas como intestino, fígado e baço, foi possível determinar as melhores doses da protease a serem usadas para obter significativos resultados na melhoria dos parâmetros zootécnicos.

Concluiu-se que a adição de Precizyon PRO 50 exógeno às dietas de tilápia do Nilo foi a dose de melhor efeito na digestibilidade dos nutrientes, nos parâmetros de crescimento, na estrutura intestinal e na qualidade do filé. A otimização dos níveis identificados foi de 71 e 77 g/t. Assim, a suplementação de 50 a 75 g/t compensou o desempenho prejudicado pela redução de aminoácidos, melhorou o crescimento, o rendimento de filé e a condição fisiológica geral, o que resultou na eficácia da protease como estratégia nutricional na aquicultura.

ANEXOS



