Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Substituição da farinha de peixe pelo concentrado proteico de soja em dietas para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e dourados (*Salminus brasiliensis*)

Roselany de Oliveira Corrêa

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2016

Roselany de Oliveira Corrêa
Bióloga

Substituição da farinha de peixe pelo concentrado proteico de soja em dietas para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e dourados (*Salminus brasiliensis*)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Corrêa, Roselany de Oliveira
Substituição da farinha de peixe pelo concentrado proteico de soja em dietas para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e dourados (*Salminus brasiliensis*) / Roselany de Oliveira Corrêa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
103 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Eficiência digestiva 2. Fontes proteicas 3. Soja 4. Enterite 5. Trato gastrointestinal 6. Enzimas I. Título

CDD 634.375
C824e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

A Marco Antonio, Lucas e Mariana,

por seu amor incondicional

e enorme paciência.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

À EMBRAPA, por ter concedido minha liberação para o doutorado, investindo em minha capacitação.

À FAPESP pelo financiamento do projeto de tese.

Aos funcionários do Setor de Piscicultura: sua competência e companheirismo foram muito importantes.

Aos colegas e professores com quem convivi no decorrer destes quatro anos. Aos colegas e estagiários do Setor por sua ajuda, sempre bem vinda, na execução dos experimentos. Lígia, Fredy, Thaline e Thiago: aprendi muito em sua companhia e sou extremamente grata.

Agradecimento especial ao Prof. Zico, por ter me recebido em seu Laboratório e oferecido a oportunidade de compor sua equipe. Cresci muito profissionalmente. Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
LISTA DE FIGURAS 13
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....17
1 INTRODUÇÃO.....19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....23
2.1 A soja.....23
2.2 Fatores antinutricionais da soja 25
2.3 Substituição da farinha de peixe em dietas para peixes onívoros 27
2.4 Substituição da farinha de peixe em dietas para peixes carnívoros.....29
2.5 Modelos utilizados no estudo: biologia, hábito alimentar e características do trato gastrointestinal..... 30
2.6 Estrutura histológica do segmento intestinal de peixes 33
2.7 Digestão de peixes.....36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....41
3.1 Coeficientes de digestibilidade aparente e dietas experimentais.....41
3.1.1 Peixes e condições experimentais.....43
3.2 Efeitos de níveis crescentes de substituição da farinha de peixe por concentrado proteico de soja na dieta 43
3.2.1 Peixes e condições experimentais.....47
3.2.2 Atividade enzimática 48
3.2.3 Análises histológicas 50
3.3 Análises centesimais.....52
3.4 Análises estatísticas 52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
4.1 Digestibilidade do concentrado proteico de soja para pacu e dourado.....55
4.2 Ensaio I: Desempenho zootécnico de pacus alimentados com dietas contendo níveis crescentes de concentrado proteico em substituição à farinha de peixe 58
4.2.1 Respostas fisiológicas do pacu 64
4.2.1.1 Atividade de enzimas digestivas.....64
4.2.1.2 Histologia do intestino anterior de pacus 70

4.3 Ensaio II: Desempenho zootécnico de dourados alimentados com dietas contendo níveis crescentes de concentrado proteico de soja em substituição à farinha de peixe 74
4.3.1 Respostas fisiológicas do dourado 79
4.3.1.1 Atividade de enzimas digestivas 79
4.3.1.2 Histologia do intestino anterior de dourados 85
4.4 Considerações sobre o uso do concentrado proteico de soja em rações para pacus e dourados 88
5 CONCLUSÕES 91
REFERÊNCIAS 93

RESUMO

Substituição da farinha de peixe pelo concentrado proteico de soja em dietas para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e dourados (*Salminus brasiliensis*)

Em função de sua disponibilidade no mercado e qualidade nutricional, derivados da soja são importantes fontes de proteína na alimentação animal. Apresentam perfil de aminoácidos semelhante ao de fontes animais, o que estimula seu uso como potencial substituto da farinha de peixe nas rações para aquicultura. No entanto, são deficientes em aminoácidos sulfurados e apresentam fatores antinutricionais que prejudicam o crescimento de peixes. O processamento da soja permite obter produtos mais refinados e altamente digestíveis, como concentrados proteicos (CPS), que têm elevado teor proteico e baixa quantidade de fatores antinutricionais, extraídos no processo de fabricação. Neste contexto, foi determinado o Coeficiente de Digestibilidade Aparente (CDA) do CPS em dietas para juvenis de duas espécies de Characidae autóctones: pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e dourado (*Salminus brasiliensis*). Também foram avaliados os efeitos do uso deste ingrediente em níveis crescentes de substituição da farinha de peixe na dieta (ensaios com seis tratamentos e quatro repetições), com o objetivo de determinar o nível seguro de substituição sem prejudicar o ganho de peso. O pacu apresentou CDA para proteína (95,33 %) e energia (84,29 %) mais altos que o dourado ($CDA_{proteína}$ = 82,6 %; $CDA_{energia}$ = 66,6 %), indicando maior plasticidade da espécie para o aproveitamento de fontes vegetais. Baseado em ensaios de desempenho, nas dietas para pacu foi possível substituir até 78,05 % da farinha de peixe das dietas experimentais, enquanto que para dourados, até 37,2%. Acima destes níveis, houve redução no crescimento. A substituição crescente da farinha de peixe pelo CPS exerceu efeito regulatório sobre a atividade de enzimas pancreáticas nos primeiros segmentos do intestino das duas espécies, mensurada através da atividade da protease inespecífica, lipase inespecífica e α-amilase. Também promoveu redução na altura das dobras intestinais quando a substituição foi total, detectada através da morfometria da parede intestinal do intestino anterior. Estes efeitos podem ser consequência da ação conjunta de fatores antinutricionais da soja, principalmente inibidores de enzimas, potencializados quando a farinha de peixe foi totalmente substituída pelo CPS; e da habilidade com a qual cada espécie digere / absorve os nutrientes. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o CPS pode ser utilizado em substituições parciais da farinha de peixe em dietas para peixes onívoros e carnívoros.

Palavras-chave: Eficiência digestiva; Fontes proteicas; Soja; Enterite; Trato gastrointestinal; Enzimas

ABSTRACT

Replacement of fish meal by soybean protein concentrate in diets for pacus (*Piaractus mesopotamicus*) and dourados (*Salminus brasiliensis*)

Because of market availability and nutritional quality, soybean and its by-products are important sources of protein for the animal feed industry. The amino acid profile of soy products is similar to that of animal sources, encouraging their use as surrogate protein source to fishmeal (FM) in aquafeeds. However, soy products and by-products are deficient in sulfur amino acids and contain anti-nutritional factors that hamper fish growth. Secondary processing of soybean meals yield more refined and highly digestible protein ingredients such as the soy protein concentrate (SPC), which have higher protein contents and lower concentration of anti-nutritional factors, partially extracted or inactivated during the manufacturing process. In such a context, this work determined SPC's Apparent Digestibility Coefficient (ADC) in diets for two juveniles neotropical, native Characins species: pacu (*Piaractus mesopotamicus*), and dourado (*Salminus brasiliensis*), and also studied the effects of replacing graded levels of FM by SPC (six treatment levels and four repetions) in the aim to determine the optimum substitution level for better growth. Pacu presented higher ADC for protein (95,33 %) and energy (84,29 %) than dourado ($ADC_{protein}$ = 82,6 %; ADC_{energy} = 66,6 %), indicating the plasticity of the specie to utilize plant sources. Based on growth performance, for pacu it was possible to substitute until 78,05% of FM, whereas for dourado, until 37,20%. Above these levels, there were reduction on growth performance. The increasing replacement of FM by SPC had regulatory effect on the activity of pancreatic enzymes in the first segment of the intestine of both species, measured through enzymatic assays for unspecific protease, unspecific lipase and α-amylase. It also caused a reduction on intestinal fold height of proximal intestine. All of these effects can be attributed to soybean anti-nutritional factors, especially enzyme inhibitors, whose action was enhanced when FM was completely replaced by the SPC; and the specific ability of each specie to digest / absorb plant nutrients. It is safe to infer that SPC can only be used as partial replacement of FM in diets for omnivore and carnivore fish.

Keywords: Digestive efficiency; Protein source; Soya; Enteritis; Gastrointestinal tract; Enzyme

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Homberg, 1889) – modelo onívoro, mostrando o trato gastrointestinal: (1) estômago, (2) cecos pilóricos, (3) intestino anterior, (4) intestino médio e (5) intestino posterior..... 32

Figura 2 – Dourado (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816) – modelo carnívoro.....32

Figura 3 –Trato gastrointestinal de dourado: (1) estômago, (2) cecos pilóricos, (3) intestino anterior, (4) intestino médio e (5) intestino posterior..... 33

Figura 4 –Parede do intestino de pacus identificando, na túnica mucosa: (DP) dobra primária; (DS) dobra secundária; ⇩ - ramificações; ☆ - lâmina própria; (SM) submucosa; (M) muscular; H.E.; barra = 100 µm 35

Figura 5 – Mucosa do intestino de dourado com dobras primárias simples, sem ramificações; H.E.; barra = 100 µm 35

Figura 6 – Representação esquemática das digestões cavitária e terminal: (A) distribuição de enzimas no lúmen intestinal e / ou adsorvidas no glicocálice dos enterócitos; (B) interação enzima x substrato e o transporte de produtos para o citosol, feito através de proteínas transportadoras no caso de produtos da digestão de proteínas e carboidratos. (1) Enzimas da borda em escova; (2) enzimas pancreáticas; (3) proteínas transportadoras; (4) substratos. Adaptado de Ugolev e Laey (1973) 37

Figura 7 – Sistema tipo Guelph modificado, onde foram feitos os ensaios de digestibilidade 43

Figura 8 – Sistema onde foram realizados os ensaios de desempenho 47

Figura 9 – Taxa de alimentação de pacus (% da biomassa) por níveis de substituição 59

Figura 10 – Ganho de peso de pacus por nível de substituição, ajustado através dos modelos quadrático e de regressão segmentada. Setas indicam a primeira intersecção (49%) da equação quadrática com o platô da regressão segmentada e ponto de quebra deste último modelo (78,05%). Círculo (○) representa o equivalente ao ponto de quebra da regressão segmentada na curva quadrática (70 %)..... 62

Figura 11 – Relação hepatossomática de pacus (média ± EP) por níveis de substituição 63
Figura 12 – Atividade relativa da protease inespecífica (A), lipase inespecífica (B) e amilase (C) por segmento do trato gastrointestinal de pacu. Letras indicam diferença estatística da atividade entre segmentos (Teste t, p < 0,05) 65
Figura 13 – Atividade da protease inespecífica, lipase e amilase por nível de substituição nos cecos pilóricos, intestino anterior do pacu e o total da atividade nas duas estruturas. Barras representam intervalo de confiança de 0,95 69
Figura 14 – Dobras do intestino anterior de pacus submetidos aos níveis 0% CPS (a) e 100% CPS (b); H.E.; barra = 100 µm 70
Figura 15 – Leucócito eosinófilo (seta) infiltrado no epitélio da mucosa no intestino anterior de pacu; H.E.; barra = 10 µm 74
Figura 16 – Taxa de alimentação de dourados (% da biomassa) por níveis de substituição 75
Figura 17 – Ganho de peso (GP) de dourados estimados pelos modelos quadrático (yq) e regressão segmentada (ybl). Setas indicam primeira intersecção (20% CPS) e ponto de quebra (37,2% CPS). Círculo (○) representa o equivalente ao ponto de quebra do broken na curva quadrática (23 %). No eixo secundário é visualizada a eficiência de retenção proteica de dourados por nível de substituição estimada pela equação [ERP = 32,9870 – 0,0542X – 0,00098X2] (R2 = 0,98) 77
Figura 18 – Atividade relativa da protease inespecífica (A), lipase inespecífica (B) e amilase (C) por segmento do trato gastrointestinal de dourado. Letras indicam diferença estatística da atividade entre segmentos (Teste t, α = 0,05) 80
Figura 19 – Atividade da protease inespecífica, lipase inespecífica e amilase por nível de substituição nos cecos pilóricos, intestino anterior do dourado e o total da atividade nas duas estruturas. Barras indicam intervalo de confiança de 0,95 84
Figura 20 – Dobras intestinais de dourados submetidos aos níveis 0% (a) e 100% (b); H.E.; barra = 100 µm 86

Figura 21 – Epitélio da mucosa intestinal de dourado com infiltrações de leucócitos eosinófilos (setas); H.E.; barra = 100 µm 87
Figura 22 – Atividade enzimática relativa de protease inespecífica, lipase inespecífica e amilase nos dois segmentos do trato gastrointestinal (cecos pilóricos + intestino anterior) de pacus e dourados. Letras representam diferença estatística entre espécies (Teste t, α = 0,05).....90

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 – Derivados da soja utilizados na alimentação animal 20
Tabela 2 – Aminoácidos essenciais em diferentes derivados da soja e na farinha de peixe. Valores expressos em gramas de aminoácido por 100g de proteína (Adaptada de PERKINS, 1995; HERTRAMPF; PIEDAD-PASCUAL, 2000*; PASTORE et al., 2013**) 24
Tabela 3 – Composições das dietas referências para pacu e dourado 42
Tabela 4 – Composição química do concentrado proteico de soja.....42
Tabela 5 – Dietas formuladas para o ensaio de desempenho do pacu.....45
Tabela 6 – Dietas formuladas para o ensaio de desempenho do dourado 46
Tabela 7 – Valores de alíquota, pH e tempo de incubação utilizados nas marchas analíticas para mensurar as atividades enzimáticas em segmentos do trato gastrointestinal de pacus e dourados 49
Tabela 8 – Composição de ingredientes e coeficientes de digestibilidade aparente do concentrado proteico de soja, obtidos neste estudo, e do farelo de soja, segundo relatos da literatura.....57
Tabela 9 – Desempenho zootécnico de pacus por nível de substituição. Valores médios de três peixes por caixa (n = 4) e respectivo erro padrão. Letras indicam diferenças entre níveis (ANOVA, α = 0,05).....60
Tabela 10 – Equações referentes aos dados de ganho de peso (GP) ajustados aos modelos quadrático e regressão segmentada.....62
Tabela 11 – Composição de carcaça de pacus. Média de três peixes por unidade experimental (12 peixes por nível de substituição). Letras indicam diferenças entre níveis de substituição (ANOVA, α = 0,05).....64
Tabela 12 – Atividades enzimáticas nos cecos pilóricos (CP), intestino anterior (IA) e total das duas estruturas (T) de pacus por níveis de substituição. Valores representam a média de três peixes por unidade experimental (n = 4) e respectivo erro padrão. Letras indicam diferenças entre níveis de substituição (ANOVA, α = 0,05).....66
Tabela 13 – Análises histológicas quantitativas e qualitativas da mucosa de pacus. Média de doze peixes por tratamento e letras indicam

diferenças entre níveis de substituição para cada variável (ANOVA, α = 0,05) 73

Tabela 14 – Variáveis de desempenho zootécnico do dourado por nível de substituição. Média de quatro peixes por unidade experimental (n = 4) e respectivo erro padrão. Letras superscritas indicam diferenças entre os níveis de substituição (ANOVA, α = 0,05) 76

Tabela 15 – Equações referentes aos dados de ganho de peso (GP) de dourados ajustados aos modelos de regressão quadrático e regressão segmentada 77

Tabela 16 – Composição de carcaça dourado. Média de três peixes por unidade experimental (doze peixes por nível de substituição); letras indicam diferenças entre níveis de substituição (ANOVA, α = 0,05) 79

Tabela 17 – Atividade enzimática nos cecos pilóricos (CP), intestino anterior (IA) e total dos dois segmentos (T) de dourados por nível de substituição. Média de três peixes por unidade experimental (doze peixes por nível de substituição) e erro padrão. Letras indicam diferenças entre níveis (ANOVA, α = 0,05) 81

Tabela 18 – Avaliação quantitativa e qualitativa da mucosa intestinal de dourados por níveis de substituição. Média de 12 peixes por tratamento e letras indicam diferenças entre níveis de substituição para cada variável (ANOVA, α = 0,05) 87

Quadro 1 – Score semi-qualitativo utilizado para medir o grau de alterações no intestino anterior de pacus e dourados 51

1 INTRODUÇÃO

A farinha de peixe é a fonte proteica de referência nas formulações para organismos aquícolas. Apresenta perfil de aminoácidos essenciais adequado às exigências nutricionais de peixes, tem ótima palatabilidade e fatores que estimulam o crescimento (NRC, 2011). No entanto, é um recurso finito e de alta demanda na indústria de alimentação animal. A aquicultura é uma atividade que cresceu muito nas últimas décadas, o que contribuiu para gerar um desequilíbrio entre demanda e oferta deste ingrediente para a fabricação de rações para peixes, tornando-o economicamente inviável (HARDY 2010; GATLIN III et al., 2007).

Este contexto estimulou a busca por fontes proteicas alternativas que agregassem disponibilidade de mercado (preço e oferta) às qualidades da farinha de peixe. A soja é a oleaginosa mais cultivada em todo o mundo, com mais de 200 milhões de toneladas produzidas entre 2011/12 (FAO, 2015), 25% das quais destinada à indústria de alimentação animal (PASTORE et al., 2013).

Das fontes de proteína vegetal atualmente disponíveis no mercado, a soja é a que apresenta perfil de aminoácidos que mais se aproxima ao das fontes animais, sendo deficiente apenas em metionina e cisteína. No entanto, a presença de fatores antinutricionais diminui a disponibilidade de seus nutrientes, destacando-se efeitos deletérios causados por inibidores de tripsina, lectinas, saponinas, ácido fítico e fitoestrógenos, aos quais se atribui redução de crescimento e indução de processos inflamatórios na mucosa intestinal (COUTO et al., 2014; NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2011; KNUDSEN et al., 2008; VAN DEN INGH, 1996).

Existem vários derivados da soja que podem ser utilizados nas formulações para peixes, cada um com características distintas, resumidas na Tabela 1 (adaptado de BUTOLO, 2010; REGITANO-D'ARCE, 2006). O processamento da soja aumenta seu valor nutricional. Quanto mais refinado, maior o teor de proteína no produto, dado que parte dos fatores antinutricionais são inativados ou extraídos durante o processo. Com ressalva àqueles de natureza proteica, como os inibidores de protease e lectinas, cujos teores aumentam ainda mais nos concentrados proteicos.

Tabela 1 - Derivados da soja utilizados na alimentação animal

Produto	Características	PB mín (%)
Grão integral de soja moído	Grão moído sem processamento	34
Grão integral de soja, tostado e moído	Grão integral após tratamento térmico e posterior moagem	35
Farelo semi-integral de soja	Produto do grão de soja submetido à extração mecânica (expeler) e a tratamento térmico	40
Farelo de soja (solvente)	Produto tostado, resultante do processo de extração por solvente dos grãos. Deste processo são obtidos dois produtos: (a) farelo de soja (com casca) e (b) farelo descascado ou Hipro (sem casca)	(a) 42 - 44 (b) 46 - 48
Proteína texturizada de soja	Produto da extrusão da farinha de soja desengordurada	52
Concentrado proteico de soja	Produto obtido por maceração do farelo em: (a) água acidificada (pH 4 e 5), (b) uma mistura de água e etanol (60 e 80% etanol), ou (c) com água quente (30 a 45 min), para a solubilização dos carboidratos solúveis e minerais	> 60

Dos derivados da soja utilizados na alimentação animal, o farelo de soja (solvente) é o mais comum nas dietas para peixes, no entanto os fatores limitantes da soja (deficiência de aminoácidos e antinutrientes) restringem altos níveis de inclusão nas formulações. O uso de concentrados proteicos de soja poderia viabilizar inclusões mais altas. No entanto, o grau de sensibilidade aos níveis de inclusão é espécie-específico e também pode se expressar de forma diferente ao longo do ciclo de criação. Larvas e alevinos, por exemplo, são mais sensíveis aos efeitos deste ingrediente que juvenis. Por isso faz-se necessário avaliar o efeito de diferentes níveis de inclusão nas dietas por fase do ciclo, de modo a gerar informações que permitam criar alternativas eficientes visando o máximo desempenho.

Rações comerciais tendem a utilizar baixas inclusões de farinha de peixe (< 30%), havendo necessidade de restringir seu uso às fases iniciais do ciclo ou para espécies de alto valor comercial (PASTORE et al., 2013). Neste contexto, este estudo foi desenvolvido para avaliar o efeito da substituição de 20% de farinha de peixe (FP) em rações à base de farelo de soja para pacu (modelo onívoro) e dourado (modelo carnívoro). A substituição foi feita por concentrado proteico de soja (CPS), em função da sua elevada qualidade nutricional e baixo teor de antinutrientes. Para compor a base proteica das dietas experimentais foi utilizado o farelo de soja, compondo aproximadamente 17% da proteína dietética nas dietas formuladas para o pacu e 32% nas dietas para dourado. Os objetivos deste estudo foram, então, determinar os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e da energia do CPS para juvenis de pacu e dourado; determinar o nível ideal de substituição da FP pelo CPS nas dietas experimentais através de ensaios de desempenho realizados com cada espécie; e avaliar

possíveis efeitos da substituição da FP pelo CPD no perfil de enzimas digestivas (protease inespecífica, lipase inespecífica e amilase) e na microestrutura da mucosa intestinal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A soja

O grão de soja (*Glycine max*) é uma das fontes de proteína e energia mais ricas e disponíveis no mundo, sendo utilizada tanto na forma original (crua) para ruminantes, como processada em alimentos para monogástricos (BUTOLO, 2010). O grão apresenta proteínas de reserva (α-, ß-, ϒ-conglicinas, glicinina e outras globulinas), que lhe conferem o peso molecular de cerca de 140.000 a 300.000 Da e que diferem em suas propriedades físico-químicas. Sua proteína tem estrutura globular, o que dificulta a ação proteolítica de enzimas digestivas, havendo necessidade de romper sua estrutura interna para viabilizar a digestão, sobretudo quando o ingrediente é pouco processado. Com base em estudos feitos com espécies de peixes nativos, a digestibilidade da proteína do farelo de soja (~ 45 – 47 % PB) situa-se entre 80 - 90 % para peixes onívoros e 67 - 90 % para carnívoros. Esta variação está relacionada ao derivado utilizado nas formulações, seu nível de inclusão e a sensibilidade específica do animal aos fatores antinutricionais (ABIMORAD et al., 2008; BORGHESI et al., 2009; BRAGA et al., 2008; FURUYA et al., 2001; GONÇALVES; CARNEIRO, 2003; PEZZATO et al., 2002; STECH et al., 2010).

Entre os componentes bioativos da soja, estão incluídos ß-amilase, citocromo C, lectina, lipoxygenase, urease, inibidor de Kunitz (inibidor de tripsina ou quimotripsina) e inibidor de Bowman-Birk (inibidor de quimotripsina e tripsina), além de metabólitos secundários incluindo isoflavonas, saponinas, ácido fítico, oligossacarídeos (agentes de flatulência) e goitrógenos, cuja concentração no alimento, pode proporcionar efeitos positivos ou negativos. Além disso, a soja é rica fonte de fósforo, no entanto de baixa disponibilidade, uma vez que cerca de 70% dele está ligado ao ácido fítico (PASTORE et al., 2013).

Considerando que grande parte destes constituintes pode limitar o valor nutricional dos ingredientes derivados da soja, é possível diminuir ou inativar sua atividade através do processamento adequado, de modo a tornar disponíveis os nutrientes da soja. Para isso, podem ser utilizados vários métodos de processamento, como tratamento térmico, extração em água e/ou etanol, tratamento com enzimas, fermentação, entre outros, que permitem a obtenção de diferentes produtos (farelos, concentrados, isolados proteicos) de melhor qualidade (SINGH et al., 2008).

Em geral, ingredientes pouco processados, como a soja crua, têm baixa digestibilidade, sobretudo para peixes carnívoros (GONÇALVES; CARNEIRO, 2003). No entanto, o excesso de processamento também tem efeito nocivo, diminuindo a disponibilidade de aminoácidos. A lisina é sensível a altas temperaturas, podendo sofrer a reação de Maillard, complexando com carboidratos e formando a fructosil-lisina, ou em condições de alto pH, estabelecer ligações cruzadas com outros aminoácidos (lisinoalanina), ou ainda, sendo convertidas de L- para D-lisina. Nenhuma destas formas pode ser utilizada como fonte de lisina pelo organismo (BUTOLO, 2010; FRIEDMAN; BRANDON, 2001; NRC, 2011). Considerando susceptibilidade da lisina[1] aos efeitos do processamento, é importante sempre fazer sua suplementação nas dietas à base de soja.

Entre as fontes de proteína vegetais existentes, produtos derivados da soja são os que apresentam melhor perfil de aminoácidos. Os dez aminoácidos essenciais estão presentes nestes produtos em quantidades próximas àquelas das fontes animais, sendo deficiente apenas em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) (Tabela 2). No entanto, o perfil de aminoácidos do ingrediente não é critério suficiente para prever a utilização da proteína no alimento, porque a presença de fatores antinutricionais pode prejudicar sua digestibilidade e diminuir o valor nutricional da dieta.

Tabela 2 - Aminoácidos essenciais em diferentes derivados da soja e na farinha de peixe. Valores expressos em gramas de aminoácido por 100g de proteína (Adaptada de PERKINS, 1995; HERTRAMPF; PIEDAD-PASCUAL, 2000*; PASTORE et al., 2013**)

Aminoácidos	Farelo de soja	CPS (extração alcoólica)	Farinha de resíduos de peixe (68% PB)*	Farinha de peixe (65,5% PB)**
Arginina	7,0	7,7	5,0	3,85
Histidina	2,7	2,7	2,0	1,61
Isoleucina	4,9	5,0	3,3	3,17
Leucina	8,0	8,2	6,0	5,05
Lisina	6,4	6,5	6,3	5,04
Metionina	1,4	1,4	2,0	1,99
Fenilalanina	5,3	5,2	2,6	2,78
Treonina	4,2	4,3	2,6	2,82
Triptofano	1,2	1,4	1,5	0,75
Valina	5,3	5,3	2,9	3,50

* Valores médios da farinha de peixe de resíduos da pesca (espécies não definidas)

[1] Cerca de 85% da lisina pode tornar-se indisponível durante o processamento (FRIEDMAN; BRANDON, 2001)

2.2 Fatores antinutricionais da soja

Entende-se por fator antinutricional (FAN), qualquer substância endógena presente no ingrediente que produz efeitos negativos na saúde e no balanço de nutrientes quando ingerido por animais ou humanos (NRC, 2011). Entre os efeitos normalmente relacionados a estes fatores estão distúrbios digestivos, redução no crescimento e na eficiência alimentar, hiperplasia pancreática, hipoglicemia, disfunção hepática, alterações na morfologia e função da tireóide e supressão da imunidade.

Na soja são encontrados inibidores de protease, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrógenos, antivitaminas, fitosterois e alergênicos (NRC, 2011), dos quais os mais relacionados a efeitos deletérios relatados em peixes são:

Inibidores de protease. Proteínas presentes na soja que, em condições naturais (tecido vivo), protegem a planta contra predação de insetos. Quando presentes nos alimentos fornecidos aos peixes, estes inibidores complexam com proteases pancreáticas no intestino, diminuindo a eficiência digestiva. A soja apresenta dois tipos de inibidores de protease: inibidor de Bowman-Birk, que pode complexar com uma molécula de tripsina e uma molécula de quimotripsina simultaneamente; e inibidor de Kunitz, que apresenta um sítio de ligação para tripsina, mas que também pode complexar com quimotripsina em uma ligação menos estável. O inibidor de Kunitz, no entanto, complexa com apenas um tipo de molécula por vez.

No intestino, estes inibidores estabelecem ligação estável com a tripsina e/ou com a quimotripsina, reduzindo sua atividade. Em compensação, promove a secreção de colecistoquinina (CCK) na parede intestinal e este hormônio, por sua vez, estimula o pâncreas a aumentar a produção de enzimas digestivas, tornando-se hiperplásico e hipertrófico. Esta condição leva a maior excreção de nitrogênio nas fezes e consequente perda endógena de aminoácidos sulfurados, nos quais as enzimas são ricas, ocasionando maior impacto nutricional uma vez que a soja é deficiente nestes aminoácidos (GARCÍA-CARREÑO, 1996; REGITANO-D'ARCE, 2006; KROGDAHL et al., 2010). Em peixes, a exposição prolongada aos fatores antinutricionais da soja pode ocasionar exaustão do pâncreas, reduzindo sua capacidade de síntese das enzimas digestivas (OLLI et al., 1994). Embora estes inibidores sejam sensíveis ao calor, eles não são completamente inativados ou extraídos no processamento da soja. A porção que permanece no alimento pode causar efeitos indesejáveis, cuja proporção depende da concentração e do tempo de exposição.

Lectinas. Glicoproteínas, parcialmente termoestáveis, têm baixa solubilidade em álcool e são resistentes aos processos de digestão no trato gastrointestinal. Apresentam ao menos um domínio catalítico que complexa, de forma reversível, carboidratos específicos (mono- e oligossacarídeos) no intestino proximal e, principalmente, no intestino distal. Quando se ligam aos enterócitos, alteram o transporte de nutrientes; inibem hidrolases da borda em escova; fragilizam as junções celulares, aumentando a permeabilidade da mucosa; causam hipertrofia no intestino e atrofia nos órgãos internos como o fígado; e provocam aumento na síntese de muco. Seus efeitos deletérios são potencializados mediante a presença de saponinas (CHIKIWATI, 2013; NRC, 2011).

Fitato. Composto de inositol com seis grupamentos fosfato, e o ácido fítico, sal ou complexo de proteínas, interferem na absorção de microelementos essenciais (Ca, Mg, Cu, Fe e Zn) formando complexos pouco solúveis, prejudicando em particular a absorção do zinco. Também complexam proteínas, reduzindo sua digestibilidade e inibem a atividade das enzimas pepsina, amilase e tripsina (NRC, 2011; REGITANO-D'ARCE, 2006).

Saponinas. Grupos diversos de glicosídeos termoestáveis e solúveis em álcool. Complexam com moléculas de colesterol da membrana plasmática dos enterócitos ocasionando aumento na permeabilidade da membrana e facilitando a captação de moléculas que normalmente não são absorvidas, como alérgenos. Em consequência, induzem inflamação no trato gastrointestinal, prejudicam a digestibilidade de nutrientes, reduzem o colesterol do sangue e a produção de sais biliares, interferindo na digestão de lipídeos. Como estão ligadas à membrana dos enterócitos e a taxa de renovação celular no intestino é alta, seus efeitos podem ter menor impacto, intensificando-se apenas quando associados a outros antinutrientes (FRANCIS et al., 2001; NRC, 2011).

A presença destes fatores nos derivados da soja desencadeia eventos e efeitos comuns a diferentes espécies de peixes:

- efeito regulatório sobre a produção de enzimas pancreáticas;
- redução na área de superfície do intestino, uma resposta do organismo ao baixo conteúdo de nutrientes da digesta ou à presença de substâncias que possam ter potencial toxicidade. Resulta da intensa proliferação e apoptose de enterócitos nas dobras intestinais (CHIKIWATI et al. 2013), que sofrem encurtamento e consequente aumento na espessura da lâmina própria; digestão terminal, que acontece na borda em escova dos enterócitos também fica comprometida, assim

como a absorção, o que se evidencia com a diminuição de vacúolos supranucleares;

- vulnerabilidade da barreira intestinal, na forma de aumento na permeabilidade da mucosa e fragilidade nas junções celulares dos enterócitos, permitindo a absorção de moléculas / antígenos que, em situação de normalidade, não entrariam no sistema, e também favorece a translocação de bactérias do lúmen intestinal (autóctones ou alóctones), que podem desencadear a ocorrência de bacterioses;
- instalação de processo inflamatório, que somado aos dois últimos eventos descritos acima, ocorrem migrações de células inflamatórias (leucócitos agranulócitos e granulócitos) para a mucosa e sua infiltração na submucosa e lâmina própria. O grau de inflamação é responsivo ao nível de inclusão da soja na alimentação e, em casos mais graves, pode ocasionar fragmentação do tecido. No entanto, é um processo reversível, considerando que a mucosa intestinal é constantemente renovada. Neste caso, a intensa proliferação celular ocorre em resposta ao dano causado no tecido, principalmente no epitélio. Quando a renovação celular é muito alta, o tecido concentra alto número de células imaturas, ocasionando baixa expressão de suas características funcionais.

2.3 Substituição da farinha de peixe em dietas para peixes onívoros

Vários estudos avaliam a substituição da farinha de peixe por produtos derivados da soja, tanto em peixes onívoros quanto carnívoros. De modo geral, espécies onívoras apresentam maior plasticidade para digerir / absorver nutrientes oriundos de fontes proteicas vegetais. O problema está em conseguir disponibilizar no alimento todos os nutrientes essenciais à espécie considerando a fase do ciclo em que se encontra. Larvas e alevinos, por exemplo, têm maior exigência proteica que juvenis e, talvez, sejam mais sensíveis aos fatores limitantes dos ingredientes vegetais, o que restringe a utilização de níveis elevados de inclusão.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe onívoro que se alimenta tanto de fontes vegetais quanto animais (LIMA; GOULDING, 1998). Juvenis alimentados com dietas à base de farelo de soja (100 % da proteína dietética), embora apresentem redução de consumo, têm desempenho tão bom quanto aqueles alimentados com dietas que têm a farinha

de peixe como única fonte de proteína (VAN DER MEER et al., 1997). Carpas (*Cyprinus carpio* L.) também apresentam bom desempenho quando alimentadas com dietas à base de soja, mas a suplementação com aminoácidos (metionina e lisina) é condição indispensável (VIOLA, 1992; VIOLA et al., 1982). Uran et al. (2008) mostraram que, na verdade, carpas desenvolvem uma inflamação na mucosa intestinal (enterite) quando alimentadas com dietas à base de soja, mas os sintomas diminuem com o tempo.

De modo geral, altos níveis de inclusão de soja na dieta exigem suplementação com aminoácidos, mas a mistura de fontes proteicas animais e vegetais, ou de 'blends' vegetais, pode melhorar a disponibilidade de aminoácidos na dieta e, em alguns casos, até dispensar a suplementação. As combinações de fontes vegetais e animais suplementadas com aminoácidos permitem a substituição parcial ou total da farinha de peixe nas dietas sem prejudicar o crescimento dos peixes (WANG et al., 1997; CATACUTAN, 2004).

Nas formulações para bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) é possível reduzir em 50 % o uso da farinha de peixe, combinando o farelo de soja (50 % da proteína dietética) com grãos fermentados (resíduos de destilaria) (ROBINSON et al., 2004), embora a substituição total por soja também seja possível (GODA et al., 2007). Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) são muito resistentes ao uso de fontes vegetais, sendo possível substituir totalmente a farinha de peixe (20 % da proteína dietética) pela mistura de concentrado proteico de soja (36% da proteína dietética) com farinha de vísceras de aves (22% da proteína dietética), suplementando com aminoácidos cristalinos, sem que haja comprometimento do crescimento (THOMPSON et al., 2012). Furuya et al. (2004) relataram redução no ganho de peso e na retenção de proteína quando tilápias foram alimentadas com dietas contendo farelo de soja (63% da dieta) sem suplementação com aminoácidos e fosfato bicálcico.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie onívora que responde bem a altos níveis de soja nas dietas. Mesmo assim, Fernandes et al. (2001) recomendaram a combinação do farelo de soja com a farinha de peixe por proporcionar melhor perfil de aminoácidos, melhorar os níveis de cálcio e fósforo e, consequentemente, o crescimento de juvenis. Stech e Carneiro (2015) avaliaram o uso de diferentes produtos da soja (soja extrudada, soja tostada e soja crua) na substituição total (100%) e parcial (50%) da farinha de peixe, e registraram melhor desempenho e maior retenção proteica em substituições parciais da farinha de peixe por soja tostada; o tratamento térmico inativou antinutrientes termolábeis e ocasionou maior digestibilidade da proteína.

Em geral, peixes onívoros respondem bem a altos níveis de inclusão de soja (> 50%) nas dietas. A redução de crescimento atribuída ao desbalanço de aminoácidos pode ter menor impacto com a suplementação ou a utilização de combinações de ingredientes. Existem poucos estudos sobre efeitos de antinutrientes da soja em peixes onívoros, talvez pela plasticidade morfológica e funcional do trato gastrointestinal destas espécies que lhes permite ter ótimo crescimento mesmo utilizando fontes de menor valor biológico.

2.4 Substituição da farinha de peixe em dietas para peixes carnívoros

Peixes carnívoros apresentam diferentes graus de sensibilidade aos fatores limitantes da soja. Salmonídeos em geral são extremamente sensíveis, apresentam redução de crescimento e desenvolvem enterite, principalmente no intestino distal, quando alimentados com dietas à base de soja por tempo prolongado.

Salmões do Atlântico (*Salmo salar*) desenvolveram enterite mesmo quando suas dietas (40 % PB) continham 25 % FP (VAN DEN INGH et al., 1996), mas para trutas (*Onchorhynchus mykiss*) foi possível substituir até 75 % da FP por CPS sem efeito deletério ao crescimento (MÉDALE et al., 1998). Entretanto, o mesmo resultado não foi registrado quando a substituição foi feita por FS, o que ocasionou grave enterite (KNUDSEN et al., 2008). Juvenis de “Asian seabass” (*Lates calcarifer*) mostraram-se sensíveis, sendo possível substituir apenas 15 % da FP nas dietas (40% PB) por produtos e subprodutos da soja (BOONYARATPALIN et al., 1998). O beijupirá (*Rachycentron canadum*) não sofreu redução dos parâmetros de crescimento quando a substituição foi parcial: 75 % da FP foi substituída por uma combinação de ingredientes vegetais, suplementada com metionina, lisina e taurina, mas houve declínio do crescimento quando a substituição foi total (SALZE et al., 2010).

Produtos mais refinados da soja (concentrados, isolados proteicos e produtos da fermentação) podem substituir uma quantidade maior de FP nas dietas dos peixes. Murashita et al. (2013) relataram que a eficiência de produtos da fermentação pode estar no pequeno tamanho da molécula proteica, o que propicia fácil absorção. No entanto, fatores antinutricionais que persistem no processamento podem apresentar-se ainda mais concentrados nestes ingredientes, caso dos inibidores de protease.

A maioria dos estudos realizados com peixes carnívoros relata a ocorrência de enterites como consequência do uso da soja na alimentação. Ostaszewska et al. (2005) relataram o desenvolvimento de patologias no trato digestivo de trutas alimentadas com dietas à base de CPS como única fonte proteica, além de redução na atividade de enzimas da borda em escova e do lúmen intestinal, o que motivou diminuição na absorção de nutrientes.

Assim como acontece com onívoros, os efeitos deletérios da soja registrados em carnívoros não estão relacionados a um único fator antinutricional, mas à interação entre eles. Knudsen et al. (2008) observaram que dietas com altos níveis de inclusão de FS (61 % da proteína dietética) induziram enterite no intestino distal de salmões e que a saponina era a provável fonte da alteração. De fato, a saponina age na mucosa intestinal aumentando sua permeabilidade e, como consequência, deixa o organismo susceptível a antígenos (a soja apresenta fatores antigênicos) presentes no lúmen intestinal, que podem invadir o sistema e desencadear um processo inflamatório. A saponina sozinha não causaria a enterite que, na realidade, é um efeito secundário. Além disso, não se pode excluir a possibilidade de participação da microbiota neste processo, pois o aumento na permeabilidade da mucosa pode viabilizar a translocação de bactérias potencialmente patogênicas para o interior do organismo (ROMERO et al., 2014).

2.5 Modelos utilizados no estudo: biologia, hábito alimentar e características do trato gastrointestinal

Foram utilizados dois modelos com hábitos alimentares distintos: o pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) – modelo onívoro, e o dourado, *Salminus brasiliensis* (Cuvier 1816) – modelo carnívoro. O pacu é um Characiforme da família Characidae, subfamília Myleinae, nativo das Bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai e seus tributários. É um peixe onívoro, de hábitos diurnos, e no ambiente natural seu comportamento alimentar não é contínuo, caracterizando-se por períodos de alta ingestão de carboidratos; consequentemente seu sistema fisiológico-metabólico é adaptado ao armazenamento de reservas energéticas (BICUDO et al., 2013; URBINATI; GONÇALVES, 2005).

A espécie atinge maturidade sexual aos três anos e pode ser reproduzida em confinamento por indução hormonal, no período de outubro a março. Ovos eclodem entre 18 – 22h após o início da incubação (22 – 28° C) e quarenta e oito horas depois já aceitam

alimento natural. Aos 4-5 dias após a eclosão, as larvas estão aptas a receber dieta artificial (URBINATI; GONÇALVES, 2005).

O pacu apresenta trato gastrointestinal longo, adaptado ao consumo de alimentos de baixa digestibilidade, estômago fúndico e intestino de tamanho médio, além da presença de cecos pilóricos (Figura 1). No interior do intestino as dobras se distribuem no sentido longitudinal, sendo maiores e mais complexas na porção mediana, o que sugere alta capacidade de absorção. No reto, as dobras encontram-se distribuídas em rede, desuniformes (NORDI, 2014; GONÇALVES et al., 2013).

Peixes do gênero *Salminus são* caraciformes reofílicos de médio porte (15 – 75 cm de comprimento padrão) (Figura 2). Na atualidade, existem quatro espécies identificadas: *S. affinis* (Steindachner 1880), distribuída nas Bacias dos rios Magdalena (Colômbia) e Santiago (Equador); *S. hilarii* (Valenciennes 1850), distribuída nas Bacias do Alto Rio Paraná, São Francisco, Tocantins, Alto Amazonas e Orinoco; *S. franciscanus* (Lima e Britski 2007), endêmica da Bacia do Rio São Francisco, e *S. brasiliensis* (Cuvier 1816), de ocorrência nas Bacias do Paraná, Paraguai, Uruguai e do Jacuí (MIRANDE, 2009; RODRIGUEZ-OLARTE, 2006).

Peixes do gênero *Salminus* sp. são piscívoros de hábitos diurnos, têm desenvolvimento inicial rápido, são apreciados na pesca esportiva e pela qualidade de sua carne. A reprodução acontece uma vez ao ano, no período chuvoso. Expressam dimorfismo sexual temporário, somente no período reprodutivo: enrugamento da nadadeira anal, perceptível ao tato (DAYRIKI, 2009). A desova é total e pode ser induzida por protocolos convencionais de indução hormonal (WEINGARTNER; ZANIBONI FILHO, 2005). A eclosão acontece aproximadamente 15 horas após a fertilização. As larvas absorvem completamente o saco vitelínico no terceiro dia após a eclosão (a 23 – 25 °C), mas a alimentação exógena é iniciada entre 25 – 28 horas após a eclosão. Com aproximadamente 20,5 dias (~ 50 mm), são considerados juvenis e esta fase se estende até a primeira maturidade sexual que acontece para machos no primeiro ano de vida e para fêmeas, no segundo ano (NAKATANI et al., 2001; VEGA-ORELLANA, 2003).

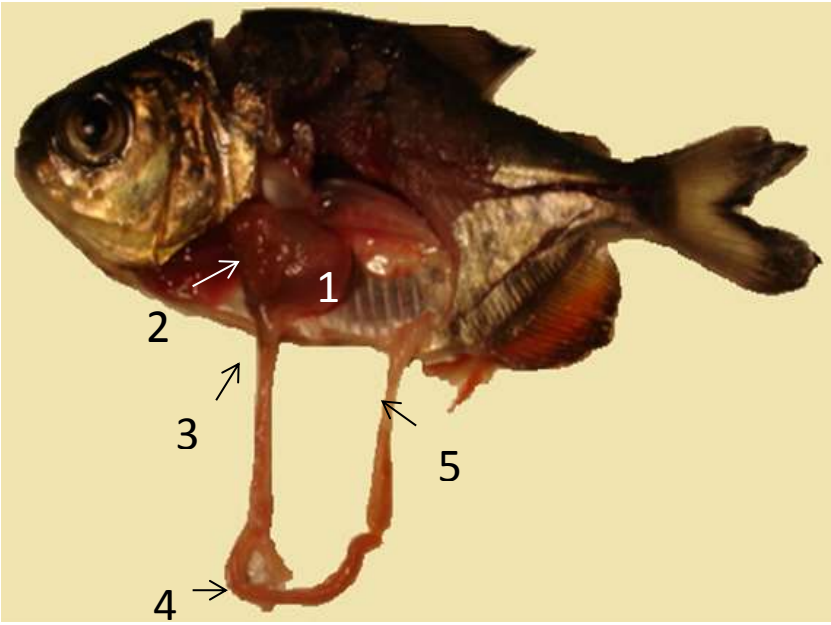


Figura 1 – Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Homberg, 1889) – modelo onívoro, mostrando o trato gastrointestinal: (1) estômago, (2) cecos pilóricos, (3) intestino anterior, (4) intestino médio e (5) intestino posterior

Figura 2 - Dourado (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816) – modelo carnívoro

A espécie tem boca terminal, característica de peixes predadores, com fenda oral ampla e maxila ligeiramente prognata, permitindo maior abertura da boca. Os dentes são cônicos e servem apenas para capturar presas, normalmente engolidas inteiras (RODRIGUES; MENIN, 2008). A cavidade peritoneal é pequena e ocupada principalmente pelo tubo digestivo. Dourados têm esôfago comprimido e curto, distensível em função da presença de uma camada muscular bem desenvolvida e de pregas longitudinais que se estendem continuamente até a região pilórica do estômago. O estômago é um compartimento em 'Y' (cecal), divido em regiões cárdica, cecal e pilórica, separado do intestino proximal pelo esfíncter pilórico. O intestino do dourado é tubular e delgado, com revestimento interno formando dobras complexas, distribuídas principalmente no sentido longitudinal (Figura 3). A disposição das dobras contribui para a retenção da digesta ao longo do trajeto crânio-caudal, uma vez que esta espécie não tem valva ileorretal, que normalmente separa intestino posterior e reto, regulando o fluxo do conteúdo entre estes dois compartimentos. No dourado, o intestino posterior desemboca diretamente no ânus (RODRIGUES; MENIN, 2008).

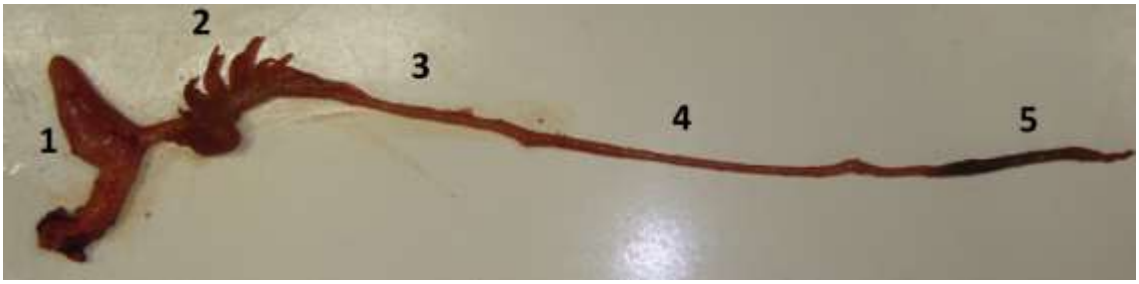


Figura 3 – Trato gastrointestinal de dourado: (1) estômago, (2) cecos pilóricos, (3) intestino anterior, (4) intestino médio e (5) intestino posterior

2.6 Estrutura histológica do segmento intestinal de peixes

Na estrutura do trato gastrointestinal, o intestino é um compartimento multifuncional, uma vez que realiza funções relacionadas à digestão e absorção de nutrientes e imunidade. Está separado do estômago pelo esfíncter pilórico e desemboca no ânus. Ao longo de sua extensão podem ser identificados três segmentos: intestino proximal, mediano e distal. As regiões proximais têm contribuição efetiva na digestão e absorção de nutrientes e a região distal, na absorção de proteínas e peptídeos intactos (GONÇALVES et al., 2013). Neste trabalho, foram relatados efeitos dos níveis de substituição da farinha de peixe pelo CPS na mucosa do intestino proximal de pacus e dourados, cuja microestrutura é muito semelhante, com paredes constituídas por quatro túnicas:

Túnica serosa (mais externa), é formada por várias camadas de tecido conjuntivo contínuas com tecidos conjuntivos adjacentes. Quando o intestino é suspenso pelo mesentério, a camada serosa é coberta pelo mesotélio e sustentada por uma camada delgada de tecido conjuntivo, formando a membrana serosa (KIERSZENBAUM, 2004).

Túnica muscular, formada por duas subcamadas de feixes de fibras musculares lisas, distribuídas mais internamente, ao redor do lúmen do tubo (camada circular interna); e mais externamente, ao longo do tubo (camada longitudinal externa).

Túnica submucosa, formada por tecido conjuntivo denso intensamente vascularizado, eventualmente permeado por eosinófilos dispersos (observações originais). Eosinófilos são leucócitos granulócitos recrutados por tecidos que sofrem algum dano (processo inflamatório) causado por fatores alergênicos ou infecção parasitária (YAN; SHAFFER, 2009), no entanto sua presença, em pequena quantidade, no intestino de peixes é comum considerando a função imunológica deste compartimento. Também foram observados linfócitos dispersos e infiltrados na mucosa (provável migração).

Túnica mucosa, que se projeta para o lúmen do intestino, em dobras revestidas por um epitélio colunar simples cujas células predominantes são enterócitos. Este epitélio encontra-se apoiado em uma camada de tecido conjuntivo chamada lâmina própria. Nas duas espécies utilizadas neste estudo foram identificadas dobras primárias e secundárias. As dobras primárias dos pacus são muito ramificadas (Figura 4), enquanto que em dourados são simples, desprovidas de ramificações (Figura 5). Os enterócitos apresentam microvilosidades no ápice e, juntamente com as dobras intestinais, são importantes para aumentar a área de superfície do intestino. Entre os enterócitos existem células produtoras de muco (caliciformes), fundamentais para a lubrificação do trato, digestão, absorção, controle de doenças infecciosas e colonização da microbiota (CAO; WANG, 2009; VAN DER MAREL et al., 2014).

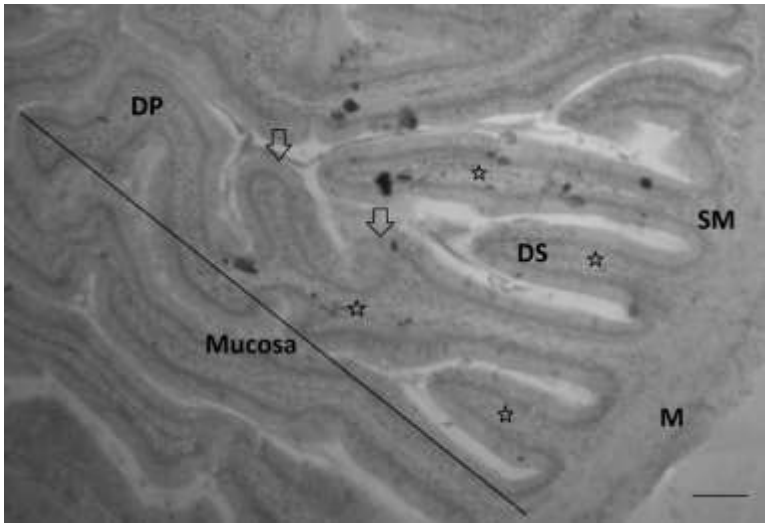


Figura 4 - Parede do intestino de pacus identificando, na túnica mucosa: (DP) dobra primária; (DS) dobra secundária; ⇩ - ramificações; ☆ - lâmina própria; (SM) submucosa; (M) muscular; H.E.; barra = 100µm

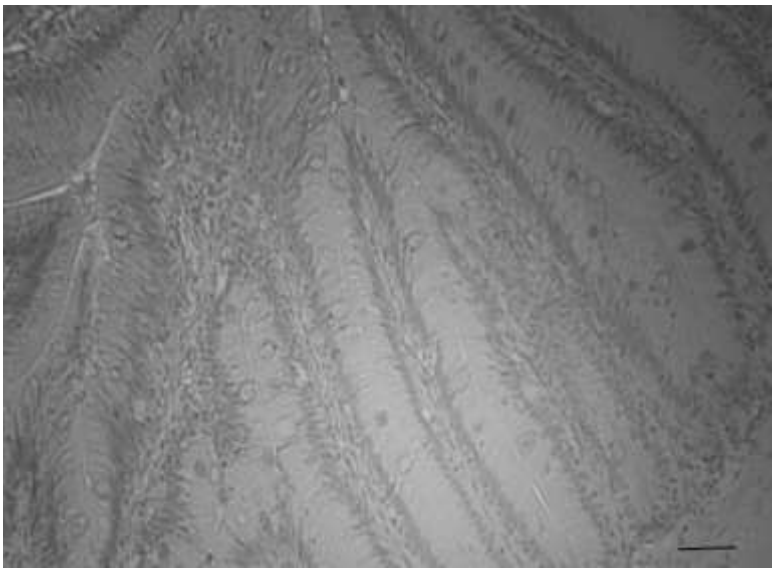


Figura 5 - Mucosa do intestino de dourado com dobras primárias simples, sem ramificações; H.E.; barra = 100 µm

A estrutura da mucosa intestinal é moldada pelo tipo de alimento que o peixe consome. O aumento ou a redução da superfície do intestino pode ser uma estratégia tanto para ter um aproveitamento melhor do alimento consumido, quanto para proteção contra possíveis efeitos deletérios ocasionados pelo alimento (GERMAN et al., 2010).

As alterações causadas pela soja acometem principalmente a mucosa intestinal dos peixes são limitadas ao intestino posterior em salmões e trutas, mas podem se manifestar ao longo de todo o trato gastrointestinal (REFSTIE et al., 2006). Em onívoros estas alterações não são tão comuns. Pacus, "Atlantic halibut", *Hippoglossus hipoglossos*, e "red snapper", *Lutjanus argentimaculatus*, alimentados com dietas à base de soja não manifestaram enterite em nenhum segmento do intestino (CATACUTAN; PAGADOR, 2004; BERGE et al., 1999; OSTASZEWSKA et al., 2005).

Como o intestino é uma região de alta renovação celular, as alterações são reversíveis, sendo por isso denominadas "enterite não-infecciosa" (REFSTIE et al., 2006). As principais características da parede intestinal de peixes acometidos pela enterite são: diminuição da altura e hiperplasia das dobras intestinais que ocasiona aumento na espessura da lâmina própria; redução de vacúolos supranucleares, indicativo de restrição de processos absortivos e de endocitose; espessamento da camada submucosa; elevada infiltração celular (leucócitos monocíticos e granulocíticos) nas camadas submucosa e mucosa; proliferação celular e disfunções intensas.

2.7 Digestão em peixes

Entende-se por digestão a hidrólise e solubilização dos nutrientes da digesta. Acontece em três dimensões: **digestão cavitária**, por ação de enzimas pancreáticas liberadas no lúmen do intestino; **digestão de membrana (ou terminal)**, por enzimas presentes na borda em escova dos enterócitos, e **digestão intracelular**, por ação de enzimas presentes no citosol de enterócitos ou nos lisossomos (KUZ'MINA, 1997). Para que aconteça a digestão na borda em escova é fundamental que a digestão cavitária reduza o tamanho das moléculas de nutrientes (substratos) a fragmentos menores (efetivamente pela ação de enzimas pancreáticas), de modo que consigam passar através do glicocálice e alcançar a borda em escova. No glicocálice, enzimas pancreáticas encontram-se adsorvidas e agem intensamente sobre os fragmentos reduzindo-os ainda mais para subsidiar a ação das enzimas da borda[2]. É evidente, então, que os tipos de digestão mencionados são complementares (Figura 6).

[2] Segundo Ugolev e Laey (1973), moléculas de carboidratos devem ter tamanho equivalente a 10-20 resíduos de glucose para serem absorvidas, enquanto que peptídeos não podem exceder 10-80 resíduos de aminoácidos.

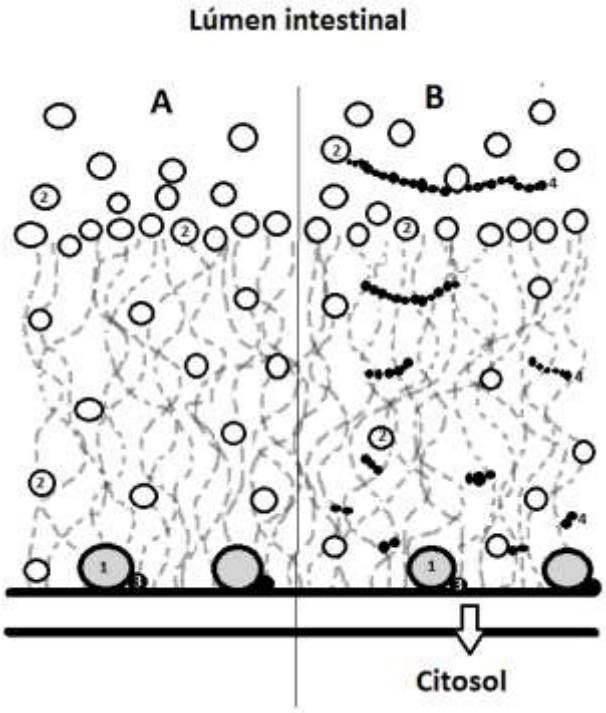


Figura 6 - Representação esquemática das digestões cavitária e terminal: (A) distribuição de enzimas no lúmen intestinal e / ou adsorvidas no glicocálice dos enterócitos; (B) interação enzima x substrato e o transporte de produtos para o citosol, feito através de proteínas transportadoras no caso de produtos da digestão de proteínas e carboidratos. (1) Enzimas da borda em escova; (2) enzimas pancreáticas; (3) proteínas transportadoras; (4) substratos. Adaptado de Ugolev e Laey (1973)

No estômago, proteases – principalmente pepsinas – reduzem proteínas a polipeptídeos. No intestino, estes peptídeos sofrem ação de proteases pancreáticas (tripsina, quimotripsina, elastina, carboxipeptidases A e B), sendo reduzidos a fragmentos menores. Na borda em escova, aminopeptidases e dipeptidases hidrolisam estes fragmentos tornando-os aptos à absorção. A absorção de aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos ocorre por transporte ativo através de canais simporte, junto com o Na^+. Simultaneamente, carboidratos sofrem o mesmo processo principalmente nos cecos e intestino proximal, sendo reduzidos a monossacarídeos por ação de enzimas pancreáticas (amilase) e enzimas da borda em escova (glucoamilase e sacarase) para serem finalmente absorvidos. O transporte para o interior do enterócito é feito por um sistema carreador dependente de Na+ - transporte ativo (BAKKE et al., 2010).

A digestão dos lipídios é iniciada no estômago onde a lipase gástrica tem atuação fraca[3], mas mesmo assim hidrolisa gorduras de baixo ponto de fusão e emulsificadas. Nos cecos pilóricos e intestino proximal, a atividade é mais efetiva; componentes da bile liberada nestes compartimentos emulsificam a gordura e ativam as lipases pancreáticas. As lipases agem efetivamente sobre a gordura reduzindo-a a ácidos graxos e monoglicerídeos. Os produtos da hidrólise da gordura se combinam com sais biliares para formar micelas e são absorvidos nos enterócitos por difusão (TOCHER, 2003).

A atividade das enzimas digestivas é modulada pela dieta, denotando a digestibilidade dos nutrientes que a compõem. O perfil enzimático em peixes carnívoros favorece a digestão de proteínas e lipídeos (maior relação lipase/protease), mas em peixes onívoros, o perfil enzimático favorece a digestão de carboidratos (maior relação amilase/protease e amilase/lipase) (BAKKE et al., 2011), apesar de exceções registradas na literatura, atribuídas à plasticidade fenotípica de espécies (CARUSO et al., 2009; CASTRO et al., 2013).

Considerando que a dieta é uma fonte heterogênea de nutrientes, o valor biológico de seus ingredientes e a interação (qualitativa e quantitativa) de seus constituintes, pode causar desbalanço no processo digestivo e consequente redução ou inibição da atividade enzimática. Dietas à base de fontes proteicas vegetais são frequentemente relacionadas a estes efeitos devido à presença de fatores antinutricionais, estando os inibidores de tripsina da soja entre os mais citados. Estes inibidores diminuem a digestibilidade da proteína quando presentes em altas concentrações (> 5 mg g^{-1}). No entanto, algumas espécies conseguem compensar seus efeitos deletérios aumentando a secreção de tripsina e quimotripsina até a exaustão do pâncreas difuso (OLLI et al., 1994). Outro efeito consiste na alteração da superfície da mucosa intestinal, o que prejudica a digestão terminal e a absorção de nutrientes (SANTIGOSA et al., 2008; SILVA et al., 2010).

A atividade das enzimas lipolíticas pode ser afetada por saponinas, que têm alta afinidade com colesterol e sais biliares, interferindo na digestão de lipídeos e no metabolismo de esteróis. Fitoesteróis são compostos presentes na porção lipídica das plantas e são introduzidos nos alimentos para os organismos aquáticos em geral, peixes em particular, através dos óleos vegetais. Estes compostos competem com o colesterol pelas vias de absorção nos enterócitos, resultando no aumento da excreção de colesterol e sais biliares nas

[3] Na verdade, relatos sobre a presença de lipases no estômago são contraditórios (KUZ'MINA, 2007; MORAES; ALMEIDA, 2014), uma vez que a presença da enzima pode resultar da contaminação da amostra por fragmentos do pâncreas difuso.

fezes. Além disso, ocasiona aumento na conversão de colesterol em ácidos biliares no fígado, com subsequente redução nos níveis de colesterol do plasma sanguíneo em peixes (BAKKE et al., 2014; COUTO et al., 2014). De modo geral, o conteúdo da digesta pode regular tanto a síntese quanto a atividade das enzimas digestivas (KARASOV et al., 1988).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coeficientes de digestibilidade aparente e dietas experimentais

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) foram determinados através do método indireto, com uso de 0,1% de óxido de crômio (Cr_2O_3) como marcador inerte. As fezes foram coletadas de forma passiva em um sistema modificado do tipo Guelph (Figura 7). A dieta referência (Tabela 3) foi formulada com ingredientes práticos, extrudada em matriz de 3 mm, seca em estufa de circulação forçada de ar (50°C) por 24h e armazenada em câmara fria (- 18°C) até sua utilização. A dieta teste foi preparada substituindo-se 30% da dieta referência pelo concentrado proteico de soja [CPS] (Tabela 4). Os coeficientes de digestibilidade das dietas e dos nutrientes foram calculados através das eq. (1) e (2) (NRC, 2011):

$$\boldsymbol{CDA_{\,D} = 100 - (100 \times (\%\,Cr_2O_{3_D} \div \%\,Cr_2O_{3_F}) \times (PB_{\,F} \div PB_{\,D}))} \qquad (1)$$

$$\boldsymbol{CDA_{\,N} = CDA_{DT} + (CDA_{DT} - CDA_{DR}) \times ((0,7 \times PB_{DR}) \div (0,3 \times PB_I)} \qquad (2)$$

onde:

$\%Cr_2O_{3\ D}$ = percentagem de óxido de crômio na dieta

$\%Cr_2O_{3\ F}$ = percentagem de óxido de crômio nas fezes

PB_F = percentagem de proteína bruta nas fezes

PB_D = percentagem de proteína bruta na dieta

CDA_N = coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente

CDA_{DT} = coeficiente de digestibilidade aparente da dieta teste

CDA_{DR} = coeficiente de digestibilidade aparente da dieta referência

PB_{DR} = percentagem de proteína bruta na dieta referência

PB_I = percentagem de proteína bruta no ingrediente

Tabela 3 - Composições das dietas referência para pacu e dourado

	Dieta referência	
Ingredientes	**pacu**	**dourado**
	---------- g kg^{-1} ----------	
Farelo de soja	420,00	100,00
Farinha de peixe	70,00	579,00
Farelo de milho	207,00	36,94
Farelo de trigo	120,00	10,00
Amido	145,80	167,40
Óleo de soja	10,00	-
Óleo de peixe	-	93,70
Metionina	7,00	1,66
Lisina	-	1,00
Fosfato bicálcico	9,00	-
Mistura mineral e vitamínica [1]	10,00	10,00
BHT [2]	0,20	0,20
Óxido de crômio	1,00	1,00
Nutrientes (valores analisados)	---------- % ----------	
Proteína bruta	29,87	52,80
Extrato etéreo	3,24	10,29
Fibra bruta	5,99	2,35
Matéria mineral	6,41	8,75
Energia bruta (kcal g^{-1})	4129	4842

[1] Mistura mineral e vitamínica (Premix Nutrifish Guabi®, Campinas, SP, Brazil) – enriquecimento por kg do produto: Fe 15000 mg; Cu 15000 mg; Zn 12500 mg; I 375 mg; Mn 12500 mg; Se 87.5 mg; Co 125 mg; vitamin A 2 500 0000 IU; vitamin D3 600 000 IU; vitamin E 37 500 IU; vitamin K 3 750 mg; vitamin C 50 000; vitamin B1 4 000 mg; vitamin B2 4 000 mg; vitamin B6 4 000 mg; vitamin B12 4 000 mg; pantothenic acid 12 000 mg; biotin 15 mg; folic acid 1 250 mg; niacin 22 500 mg; BHT 15 000 mg

[2] Butil-hidroxi-tolueno

Tabela 4 - Composição química do concentrado proteico de soja [1]

Nutrientes	**Conteúdo**
	%
Matéria seca	93,9
Proteína bruta	64,14
Extrato etéreo	2,00
Fibra bruta	4,21
Matéria mineral	5,94
Cálcio	0,34
Fósforo	0,73
Inibidor de tripsina [2] (mg g^{-1})	3,00
Energia bruta (kcal kg^{-1})	4515

[1] Selecta, Goiânia, GO

[2] Especificação do fabricante

3.1.1 Peixes e condições experimentais

Juvenis de dourado (16,02 ± 0,17 g) e pacu (63,34 ± 2,12 g) foram distribuídos em grupos de 40 indivíduos, alojados em caixas de polipropileno (1000 L), sendo três repetições. Os peixes foram adaptados à ração experimental por um período de sete dias, e em sequêcia alimentados três vezes ao dia até a saciedade aparente; as coletas de fezes foram feitas ao longo do tempo em dias intercalados. Ao final do dia os peixes eram anestesiados (benzocaína 0,5 g 10 L^{-1}) e transferidos para as unidades de coleta de fezes, onde permaneciam por um período de 12 horas (Figura 7). As fezes foram coletadas por sedimentação em recipientes refrigerados, centrifugadas (3100 *g*, 4°C, 10 min) e guardadas em freezer (- 20°C) até que as análises de composição fossem realizadas. Parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados durante todo o experimento através da sonda multiparâmetro Horiba U-50. Foram feitas medições de oxigênio dissolvido (% OD), pH e temperatura (°C) duas vezes por semana; testes para a quantificação da amônia tóxica foram realizados semanalmente através de kit (Labcon Test para água doce).

Figura 7 - Sistema tipo Guelph modificado, onde foram feitos os ensaios de digestibilidade

3.2 Efeitos de níveis crescentes de substituição da farinha de peixe por concentrado proteico de soja na dieta

Foram realizados ensaios de desempenho em condições experimentais semelhantes para os modelos em questão, embora em períodos de tempo distintos. Dietas isoproteicas e isoenergéticas foram formuladas com ingredientes práticos, considerando as exigências

nutricionais de cada espécie. Nas dietas controle foram utilizadas como principais fontes proteicas, o farelo de soja e a farinha de peixe. A inclusão da farinha de peixe foi fixada em 20%, correspondente a 14,4 e 13,3% da proteína dietética nas dietas controle para pacu e dourado, respectivamente. Os demais tratamentos consistiram da substituição da farinha de peixe pelo CPS nas proporções de 20, 40, 60, 80 e 100% (Tabelas 5 e 6). As dietas foram extrudadas em matriz de 3 mm, secas em estufa com circulação forçada de ar (50 °C) por 24h e armazenadas em câmara fria (- 18°C) até sua utilização.

Tabela 5 - Dietas formuladas para o ensaio de desempenho do pacu

	Níveis de substituição da farinha de peixe pelo CPS					
Ingredientes	**0%**	**20%**	**40%**	**60%**	**80%**	**100%**
	---------- g kg^{-1} ----------					
Farinha de peixe	200,00	160,00	120,00	80,00	40,00	0,00
CPS[1]	0,00	40,00	80,00	120,00	160,00	200,00
Farelo de soja	400,00	395,00	393,00	389,00	381,00	377,50
Farelo de trigo	34,80	34,80	24,80	24,80	32,80	34,80
Amido	95,00	95,00	111,00	111,00	110,00	120,00
Farelo de milho	156,00	156,00	156,00	156,00	156,00	156,00
óleo de soja	59,00	57,00	50,00	46,00	42,00	38,50
a-celulose	20,50	22,00	20,00	22,00	21,00	11,00
Lisina	9,50	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
DL-Metionina	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Fosfato bicalcico	5,00	10,00	15,00	21,00	21,00	32,00
Premix[2]	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
BHT[3]	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Nutrientes (valores analisados)	---------- % ----------					
MS	96,73	93,91	95,43	96,78	94,63	96,46
PB	37,61	35,67	35,48	36,85	36,11	36,07
EE	12,15	10,84	7,59	7,27	5,84	4,53
FB	4,01	4,25	4,18	4,47	4,58	4,01
MM	7,04	6,70	6,91	7,16	6,89	7,45
ENN[4]	35,92	36,45	41,27	41,03	41,21	44,4
EB (kcal kg^{-1})	4542	4554	4621	4544	4498	4397

[1] Selecta (Goiânia, GO)

[2] Premix (Premix Nutrifish Guabi®, Campinas, SP, Brazil) por kg do produto: Fe 15000 mg; Cu 15000 mg; Zn 12500 mg; I 375 mg; Mn 12500 mg; Se 87.5 mg; Co 125 mg; vitamina A 2 5000000 IU; vitamina D3 600000 IU; vitamina E 37 500 IU; vitamina K 3 750 mg; vitamina C 50000; vitamina B1 4 000 mg; vitamina B2 4 000 mg; vitamina B6 4 000 mg; vitamina B12 4 000 mg; ácido pantotênico 12000 mg; biotina 15 mg; ácido fólico 1250 mg; niacina 22 500 mg; BHT 15000 mg

[3] Butil-hidroxi-tolueno

[4] ENN = MS - (PB + EE + FB + MM)

Tabela 6 - Dietas formuladas para o ensaio de desempenho do dourado

	Níveis de substituição da farinha de peixe pelo CPS					
Ingredientes	**0%**	**20%**	**40%**	**60%**	**80%**	**100%**
	---------- g kg^{-1} ----------					
Farinha de peixe	200,00	160,00	120,00	80,00	40,00	0,00
CPS[1]	0,00	40,00	80,00	120,00	160,00	200,00
Farelo de soja	610,90	616,70	622,60	628,40	631,30	618,00
Óleo de soja	123,90	132,30	135,20	137,80	142,00	150,50
Lisina	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	13,00
DL-Metionina	5,10	5,30	5,60	5,90	6,30	6,70
Fosfato bicalcico	39,90	25,10	16,20	7,30	0,00	1,60
Premix[2]	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
BHT[3]	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Nutrientes (valores analisados)	---------- % ----------					
MS	96,82	97,07	95,56	97,07	96,14	95,89
PB	45,82	46,88	46,63	46,38	45,86	45,54
EE	5,16	5,45	6,96	6,18	5,58	6,53
FB	2,26	2,99	2,88	2,46	3,56	4,17
MM	10,41	8,55	7,67	6,61	7,67	5,67
ENN[4]	33,17	33,20	31,42	35,44	33,47	33,98
EB (kcal kg^{-1})	4312	4354	4207	4199	4297	4198

[1]Selecta
[2] Premix (Premix Nutrifish Guabi®, Campinas, SP, Brazil) por kg do produto: Fe 15000 mg; Cu 15000 mg; Zn 12500 mg; I 375 mg; Mn 12500 mg; Se 87.5 mg; Co 125 mg; vitamin A 2 500 0000 IU; vitamin D3 600 000 IU; vitamin E 37 500 IU; vitamin K 3 750 mg; vitamin C 50 000; vitamin B1 4 000 mg; vitamin B2 4 000 mg; vitamin B6 4 000 mg; vitamin B12 4 000 mg; pantothenic acid 12 000 mg; biotin 15 mg; folic acid 1 250 mg; niacin 22 500 mg; BHT 15 000 mg
[3] Butil-hidroxi-tolueno
[4] ENN = MS - (PB + EE + FB + MM)

3.2.1 Peixes e condições experimentais

Juvenis de pacu (38,90 ± 1,19 g, 12 peixes / caixa) e dourado (101,10 ± 2,96 g, 15 peixes por caixa) foram distribuídos em caixas de 300L (n = 4), alojadas em sistema fechado de recirculação de água, fotoperíodo de 10 : 14 horas (claro : escuro), em um delineamento experimental inteiramente aleatorizado, e aclimatizados ao sistema e às dietas experimentais por sete dias, após o que os peixes foram alimentados por 90 dias, em duas refeições diárias (8:00 e 17:00h) até a saciedade aparente (Figura 8) com as dietas experimentais. Parâmetros físicos e químicos da água – oxigênio dissolvido (4,38 ± 0,35 mg L^{-1}), pH (7,93 ± 0,05) e temperatura (26,5 ± 0,26 °C) e amônia (< 0,4 mg L^{-1}) foram mantidos em níveis aceitáveis para o bem estar das espécies. O monitoramento foi feito com a sonda multiparâmetro Horiba U-50 e kit para amônia tóxica (Labcon Test para água doce).

Figura 8 - Sistema onde foram realizados os ensaios de desempenho

Ao final do período experimental foi feita a pesagem dos lotes de peixes de cada unidade experimental. Nove peixes de cada unidade foram eutanasiados por dose letal de anestésico (benzocaína; 10 mg L^{-1}) em água resfriada. Três indivíduos foram pesados individualmente e dissecados; cecos pilóricos e intestino foram coletados para análises de atividade enzimática; o fígado foi retirado e pesado para cálculos de índice hepatosomático. As estruturas destinadas às análises de atividade enzimática foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra congelador (- 80°C) até o momento da realização das análises.

Também foram retiradas amostras de tecido do intestino anterior (n=3) para análises histológicas e três peixes inteiros de cada caixa foram destinados à composição de carcaça. O desempenho zootécnico dos peixes foi avaliado através das seguintes variáveis:

- Taxa de alimentação (% biomassa)
  TA = 100 x (consumo / biomassa média do tanque^{-1})

- Ganho de peso (g)
  GP = peso final - peso inicial

- Conversão alimentar aparente
  CAA = (consumo de ração)/(ganho de peso)

- Taxa de crescimento específico (% dia^{-1})
  TCE= 100 × [(Ln peso final - Ln peso inicial) /dias)]

- Taxa de eficiência proteica (%)
  TEP = (ganho de peso / proteína dietética ingerida) x 100

- Eficiência de retenção proteica (%)
  ERP = (proteína corporal final / proteína dietética ingerida) x 100

- Relação hepato-somática (%)
  RHS=100 x [(peso do fígado)/(peso corporal total)]

3.2.2 Atividade enzimática

Foram quantificadas as atividades enzimáticas de protease inespecífica (adaptado de WALTER, 1984), lipase inespecífica (adaptado de ALBRO et al., 1985) e amilase (kit CNPG Liquiform, ref. 142) em cecos pilóricos e intestino anterior, total de nove peixes por tratamento. Amostras de tecidos foram homogeneizadas com um Ultra-Turrax (IKA T10 Basic) em solução tampão 0,02 M Tris / 0,01 M Fosfato, pH 7,0, em 50% de glicerol (*v/v*), centrifugadas a 12000 rpm por cinco minutos, a 3°C e o sobrenadante (homogeneizado) utilizado para a determinação da atividade específica das enzimas. Alíquota, pH e tempo de

incubação utilizados nas marchas analíticas foram previamente estabelecidos para cada tecido e espécie em questão (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de alíquota, pH e tempo de incubação utilizados nas marchas analíticas para mensurar as atividades enzimáticas em segmentos do trato gastrointestinal de pacus e dourados

		Pacu			Dourado		
		pH	Alíquota (µL)	Tempo de incubação (min)	pH	Alíquota (µL)	Tempo de incubação (min)
Protease inespecífica	Cecos	8,0	50	90	7,8	80	90
	Intestino	8,0	110	90	7,8	120	60
Lipase inespecífica	Cecos	8,0	70	60	7,8	100	60
	Intestino	8,0	70	60	7,8	50	60
α - Amilase	Cecos	7,0	10	0,5	7,0	10	0,5
	Intestino	7,0	10	0,5	7,0	10	0,5

Para avaliar a atividade da protease não específica foi utilizada caseína 1% como substrato. A incubação foi feita a 26,5 °C (média ambiental) pelo tempo estabelecido para cada segmento do trato. A reação foi interrompida com TCA 20 % e as amostras, centrifugadas a 12000 rpm por três minutos, sendo a densidade óptica do sobrenadante lida a 280 nm, utilizando tirosina como padrão. Foram utilizados dois controles: um branco da enzima e um branco do substrato. A atividade específica foi expressa em micromoles de tirosina hidrolisada por min^{-1} mg^{-1} de proteína (U mg^{-1} proteína).

A atividade da lipase não específica foi determinada pela hidrólise de phenyl-myristato. As amostras foram incubadas com 0,4 mM de p-nitrophenyl myristato em 24 mM de amônio bicarbonato, pH 7,8 e 0,5% de triton X-100 a 26,5 °C, por 60 minutos. Foram utilizados dois controles (branco da enzima e branco do substrato). A reação foi interrompida com NaOH 25 mM e a densidade óptica lida a 405 nm. A atividade foi definida como a quantidade de substrato hidrolisado em µmol min^{-1} mg^{-1} de proteína (U mg^{-1} de proteína).

A atividade da α-amilase nas amostras foi determinada através de kit (Amilase CNPG Liquiform, Labtest, referência 142), usando 2-cloro-p-nitrofenil-α-D-maltotriosídeo como substrato a 37°C (temperatura recomendada pelo fabricante). A atividade específica foi expressa em U mg^{-1} de proteína. O conteúdo de proteína nos homogeneizados dos tecidos

utilizados foi determinado pelo método descrito em Bradford et al. (1976), utilizando albumina bovina (1 mg mL^{-1}) como padrão.

3.2.3 Análises histológicas

Amostras do intestino anterior foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS 0,1M, pH 7,0) por duas horas. Em seguida, foram armazenadas em solução de paraformaldeído 4% em PBS por um período de 12 h a 3°C. As amostras foram então lavadas em PBS (0,1 M, pH 7,0) e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) (Cruz, 2013). Infiltração e polimerização foram feitas em resina (Kit Technovit 7000, Kulzer). Os blocos foram aparados, colados em blocos de madeira e seccionados em micrótomo rotativo manual (EasyPath), obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. Cada lâmina continha oito cortes não sequenciais. Os cortes foram corados em H&E e analisados em microscópio óptico acoplado a um sistema computadorizado de captura de imagens (BEL Photonics, BIO3T). Foram feitas três lâminas por caixa e em cada uma delas, selecionados seis campos para as seguintes medições: altura da dobra (AD), espessura da submucosa (SM), espessura da camada muscular (M) e contagem de células caliciformes. As medidas foram feitas utilizando o software BEL EURISKO (Bel Engineering, Italy), no aumento constante de 40 x para as medidas e de 100 x para a contagem de células caliciformes. Também foi utilizado um score semi-qualitativo adaptado de Uran (2008) e Baeverfjord e Krogdahl (1996), através do qual foi feita a caracterização da mucosa do intestino anterior de pacu e dourado. Aspecto das dobras intestinais, alterações nos vacúolos supranucleares, hiperplasia do tecido conjuntivo, infiltração de leucócitos granulócitos e distribuição de células caliciformes foram descritos através de um score de 0 a 4, sendo zero a representação de uma condição normal e 4 o grau mais acentuado de alteração (Quadro 1). O grau de alteração da mucosa foi determinado, para cada característica, pela média do score.

Quadro 1 - Score semi-qualitativo utilizado para medir o grau de alterações no intestino anterior de pacus e dourados

SCORE
I. Aparência das dobras intestinais
(1) Tamanho normal (2) Alguma dilatação ou encurtamento (3) Encurtamento da maioria das dobras (4) Redução nas ramificações e rompimento de tecido
II. Vacúolos supranucleares
(1) Vacúolos largos ocupando quase toda a porção apical dos enterócitos (2) Vacúolos de tamanho médio ocupando menos da metade dos enterócitos (3) Pequenos vacúolos próximos da membrana apical da maioria dos enterócitos (4) Ausência de vacúolos
III. Células caliciformes
(1) Células dispersas – padrão normal (2) Aumento no número, mas distribuição continua dispersa (3) Células agrupadas (4) Células densamente agrupadas
IV. Infiltração de granulócitos eosinofílicos
(1) Não foi visualizado (2) Pequena quantidade na submucosa (3) Presença na submucosa (maior quantidade) e migração para a lâmina própria (menor quantidade) (4) Grande quantidade tanto na submucosa quanto na lâmina própria
V. Grau de alargamento da lâmina própria
(1) Camada fina e delicada de tecido conjuntivo em toda a dobra (2) Lâmina própria mais distinta em algumas dobras (3) Evidente aumento da lâmina própria na maioria das dobras (4) Lâmina própria espessa geralmente associada à redução na altura da dobra
VI. Submucosa
(1) Fina camada de tecido conjuntivo entre a base das dobras e a camada muscular (submucosa) (2) Discreto aumento na espessura da submucosa (3) Aumento visível na espessura da submucosa (4) Espessamento da submucosa

3.3 Análises centesimais

Ingredientes, dietas e fezes foram caracterizados quanto aos conteúdos de umidade, proteína bruta e energia bruta de acordo com metodologia estabelecida pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2000). A umidade foi feita através do método gravimétrico, a 105 °C até peso constante. Proteína bruta pelo método de Kjeldahl e energia bruta através de calorimetria adiabática usando ácido benzoico como padrão. O extrato etéreo foi determinado por hidrólise ácida. O teor de fibra pelo método gravimétrico, em mufla a 555°C e incineração da matéria orgânica em bico de Bunsen. A quantificação do óxido de crômio foi feita por espectrometria de absorção atômica após digestão ácida (CBO Análises Laboratoriais, Campinas, SP).

3.4 Análises estatísticas

Dados utilizados para estimar os coeficientes de digestibilidade aparente da fração proteica (n=3) e da energia (n=3) foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) e teste Tukey para comparação de médias. Para verificar o atendimento às premissas de normalidade e homogeneidade de variância de resíduos foram realizados os testes Kolmogorov-Smirnov e Brown-Forsythe respectivamente. Quando necessário dados foram transformados para obtenção de distribuição normal (indicados nas tabelas com †)[4].

Dados de ganho de peso de pacus e dourados, foram submetidos aos modelos quadrático e de polinômios ortogonais de regressão segmentada (PORTZ et al., 2004), para estimar níveis de substituição que proporcionassem melhor desempenho. Os dois modelos foram sobrepostos conforme procedimento descrito em Baker et al. (2002), que considera como nível ótimo, o correspondente a 1ª intersecção da curva quadrática com o platô da curva de regressão segmentada. Com base nos níveis estimados pelos modelos, optou-se por considerar o intervalo entre a 1ª intersecção e o ponto de quebra da regressão segmentada como sendo o recomendado para garantir o melhor crescimento.

Resultados que não atenderam às premissas de normalidade de resíduos e homogeneidade de variância, assim como do score semi-qualitativo foram tratados como não paramétricos e submetidos aos testes de Kruskal-Wallis H e Man Whitney U. Comparações

[4] Valores obtidos no ensaio de desempenho com pacu, referentes às variáveis ganho de peso, taxa de crescimento específico e relação hepatossomática foram transformados elevando-se respectivamente à potência de 2,6; 6,6 e -1.

de médias da atividade enzimática entre pacus e dourados foram feitas através de Teste t. Para todas as análises estatísticas foi considerado o nível de significância de 5% e utilizados os programas STATISTICA 7.0 (STATSOFT) e R (The R Foundation for Statistical Computing).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Digestibilidade do concentrado proteico de soja para pacu e dourado

O coeficiente de digetibilidade reflete a eficiência com a qual o organismo hidrolisa nutrientes e pode ser influenciado pelas propriedades físicas e químicas dos componentes da dieta (NRC, 2011). Este ensaio foi conduzido em ambiente com temperatura constante (27 °C) e os demais parâmetros de qualidade da água foram mantidos em níveis aceitáveis para as espécies. Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína e da energia do concentrado proteico de soja para dourado foram mais baixos do que aqueles registrados para o pacu. Diferenças na morfologia e funcionamento do trato gastrointestinal podem explicar este resultado. O dourado tem intestino curto e adaptado a alimentos altamente digestíveis, ricos em proteínas de alto valor biológico e pobres em carboidratos, enquanto pacu tem intestino relativamente mais longo, próprio para receber alimentos pouco digestíveis e que exigem extensiva exposição à mucosa intestinal para sua digestão.

O CPS utilizado neste experimento foi obtido por extração alcoólica (Selecta, Goiânia, GO). Neste processo, grande parte dos carboidratos é reduzida e a proteína fica mais concentrada que no farelo de soja (SINGH et al., 2008). Como consequência, fatores antinutricionais de caráter proteico, como inibidores de protease, são preservados encontrando-se ainda mais concentrados no CPS que em ingredientes menos processados (REGITANO D'ARCE, 2006). A soja apresenta inibidores de Kunitz, que agem sobre a tripsina, e de Bowman-Birk, que agem sobre a tripsina e a quimotripsina. Estes fatores se ligam a sítios específicos nestas enzimas inativando-as ou reduzindo a eficiência de sua reação sobre o substrato (FRIEDMAN, 2001). Apesar do CPS apresentar menor teor de carboidratos (17,6% na base seca) do que o farelo de soja (FS) (32 – 34% na base seca) (LUSAS; RHEE, 1995), polissacarídeos são conservados e podem interferir de modo negativo na digestibilidade do alimento, aumentando a viscosidade da digesta e tornando difícil a ação das enzimas digestivas, inclusive sobre a proteína.

Proteínas (aminoácidos), lipídeos e carboidratos dietéticos são fontes de energia para os peixes (NRC, 2011). Os CDAs da energia foram mais baixos que os da proteína para as duas espécies. Pacus apresentaram maior CDA da energia que dourados, sendo provável que a contribuição da microbiota intestinal, cuja diversidade é maior em onívoros, tenha contribuído para aumentar a disponibilidade dos nutrientes da fonte vegetal, principalmente carboidratos, destinados a atender a demanda energética do organismo.

O dourado, no entanto, mostrou-se menos tolerante aos níveis de inibidores contidos no CPS, justificando o menor CDA da energia em comparação com os relatos de Braga et al. (2008) e Borghesi et al. (2009) para CDAs do farelo de soja (Tabela 8). Inibidores de lipase presentes na soja e seus co-produtos contribuem para a baixa digestibilidade de lipídeos, causando hipocolesterolemia e diminuindo os níveis de sais biliares; os fatores antinutricionais atuam não apenas na inibição de enzimas pancreáticas, mas também na digestão da borda em escova, inibindo receptores ou alterando sua permeabilidade (NRC, 2011; GU et al., 2014).

Em geral, peixes adaptam suas funções metabólicas aos substratos dietéticos, regulando a secreção de enzimas de modo a melhorar a utilização dos alimentos (JHAVERI et al., 2015). É provável que o dourado, uma espécie carnívora, apresente baixa atividade de α-amilase, celulase e invertase, o que lhe confere baixa habilidade para utilizar carboidratos, presentes em grande quantidade nas fontes vegetais (CHAUDHURI et al., 2012). Além disso, devem apresentar menor atividade de transportadores deste nutriente em sua borda em escova (se comparados a pacus), características que também podem justificar a baixa digestibilidade da energia.

O contrário foi registrado para o pacu, que tendo hábito alimentar onívoro, apresenta alta atividade de α-amilase, o que lhe permite aproveitar melhor ingredientes de origem vegetal. Além disso, o fato de aproveitar eficientemente os carboidratos como fontes de energia (BICUDO et al., 2013; ABIMORAD; CARNEIRO, 2004), garante um efeito poupador da proteína.

Tabela 8 - Composição de ingredientes e coeficientes de digestibilidade aparente do concentrado proteico de soja, obtidos neste estudo, e do farelo de soja, segundo relatos da literatura

Espécie	Ing	PB	EE	FB	EB	Peso médio	CDA_{PB}	CDA_{EB}	PD	ED
		%	%	%	kcal kg^{-1}	g	%	%	%	kcal kg^{-1}
Dourado	CPS	64,14	2,00	4,21	4515	16,0 ± 0,2	82,6 ± 3,7	66,6 ± 2,3	52,81	3010
Dourado[1]	FS	47,50	3,82	4,82	4306,39	19,5 ± 5,0	93,60	87,8	44,46	3781,01
Dourado[2]	FS	47,37	1,38	5,92	-	33,5 ± 1,4	94,51	85	44,76	-
Pacu	CPS	64,14	2,00	4,21	4515	63,34 ± 2,12	95,33 ± 0,01	84,29 ± 0,01	61,15	3805,55
Pacu[3]	FS	44,6	0,29	1,19	4203	250	81,1	63,7	36,17	2677,31
Pacu[4]	FS	44,8	2,00	7,6	4087	34,2 ± 13,8	90,6	78,1	40,59	3191,95
Pacu[5]	FS	44,7			ND		93,9	ND	41,97	ND

Ing - Ingrediente
FS – farelo de soja
CPS – concentrado proteico de soja
[1] Borghesi et al., 2009
[2] Braga et al., 2008
[3] Abimorad e Carneiro, 2004
[4] Abimorad et al., 2008
[5] Stech et al., 2010

A concentração de inibidores da protease varia em função da cultivar de soja utilizada e do processamento ao qual é submetida, que pode inativar estes inibidores pelo calor ou removê-los parcialmente pelo fracionamento (CARVALHO; STECH, 1997; HART et al., 2010). A eficiência com a qual o processamento inativa fatores antinutricionais deve ser bem avaliada na seleção de uma fonte proteica vegetal, uma vez que processamentos severos desnaturam a proteína prejudicando seu valor biológico, enquanto que os brandos podem ser ineficientes. Stech et al. (2010), por exemplo, relataram maior estabilidade de inibidores de tripsina na soja submetida a tratamento térmico com baixo teor de umidade (soja extrudada), o que para pacu parece não ter tido efeito sobre a digestibilidade da proteína.

O processamento de grãos de soja a produtos proteicos derivados, como concentrados, aumenta a concentração dos inibidores de proteases devido ao seu caráter proteico (REGITANO-D'ARCE, 2006). Consequentemente, 5 a 20% da atividade dos inibidores permanecem nos produtos comerciais (FRIEDMAN; BRANDON, 2001). Isso pode ter contribuído para que o CDA da proteína do CPS para dourado fosse menor que aqueles registrados na literatura para o FS (~ 94 %). Resultados de digestibilidade mais próximos aos encontrados para o dourado foram obtidos para salmão do Atlântico por Refstie et al. (1999), que relataram que a redução na digestibilidade das dietas foi relacionada à presença de inibidores de tripsina e ao fitato, que pode complexar com a proteína, afetar a ativação do tripsinogênio e a estabilidade da tripsina. Os CDAs obtidos referenciam o CPS com um ingrediente de alta qualidade que pode ser uma alternativa nas formulações para pacu e dourado.

4.2 Ensaio I: Desempenho zootécnico de pacus alimentados com dietas contendo níveis crescentes de concentrado proteico em substituição à farinha de peixe

No decorrer deste ensaio não houve registro de mortalidade. O uso de fontes proteicas vegetais em dietas para peixes pode afetar a palatabilidade das rações, prejudicando o consumo. A taxa de alimentação (% biomassa) dos pacus, no entanto, não sofreu efeito dos níveis de substituição ($p = 0,059$), embora tenha mostrado tendência a diminuir nos níveis mais altos (80 e 100%) (Figura 9). Este resultado pode ser efeito da presença de fatores antinutricionais, potencializado pela redução crescente nos níveis de farinha de peixe. Além disso, deve-se considerar o efeito (provavelmente mais intenso) proporcionado pelo farelo de soja que também compunha a base proteica das dietas. A concomitante redução da farinha de peixe, cuja qualidade palatabilizante é indiscutível, pode tê-lo potencializado.

A redução no consumo registrada nos últimos níveis também pode ser interpretada como sendo uma estratégia do organismo para prevenir e / ou retardar a ocorrência de disfunções metabólicas em decorrência dos fatores antinutricionais (GERMAN et al., 2010).

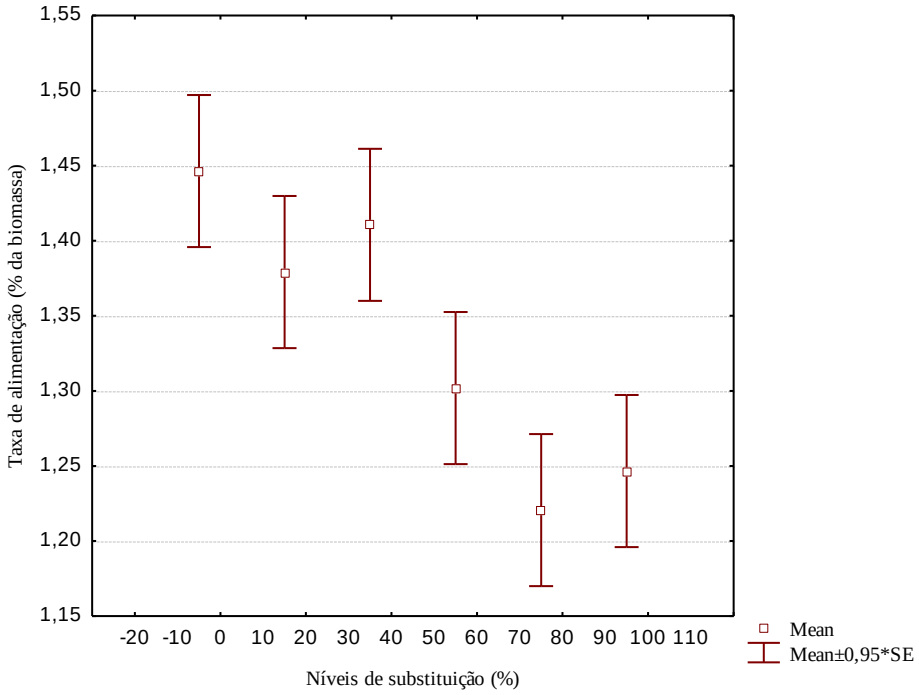


Figura 9 – Taxa de alimentação de pacus (% da biomassa) por níveis de substituição

A conversão alimentar aparente também não apresentou diferença entre os tratamentos, embora pacus tenham apresentado melhores resultados entre os níveis 60 e 80% (Tabela 9). Os valores de conversão alimentar registrados refletem a plasticidade fenotípica da espécie, que consegue modular sua fisiologia digestiva e absortiva para se adaptar à substituição da fonte proteica animal pela vegetal (GERMAN et al., 2010). A piora no índice de conversão alimentar registrada no nível 100 %, pode estar relacionada a dois fatores: (1) diferença na estabilidade dos grânulos desta dieta, cuja flutuabilidade era maior em comparação com os dos demais níveis, característica que pode ter induzido a um comportamento de apreensão diferente nos pacus submetidos ao nível 100%, que pode ter levado a uma superestimativa do consumo; e (2) desbalanço de nutrientes da dieta, que estimulou o maior consumo para atender a demanda energética do organismo (HEPHER, 1988), apesar da taxa de alimentação não contribuir claramente para a validação desta hipótese.

Tabela 9 - Desempenho zootécnico de pacus por nível de substituição. Valores médios de três peixes por caixa (n = 4) e respectivo erro padrão. Letras indicam diferenças entre níveis (ANOVA, α = 0,05)

	Níveis de substituição (%)						
	0	20	40	60	80	100	p
GP †	266,06 [a] (9,10)	238,83 [a] (22,67)	239,15 [a] (12,09)	231,77 [a] (17,56)	215,42 [a] (14,19)	167,59 [b] (30,95)	0,039
TCE †	2,29 (0,03)	2,14 (0,09)	2,19 (0,04)	2,14 (0,08)	2,08 (0,05)	1,84 (0,17)	0,059
CAA	0,84 (0.02)	0,83 (0,02)	0,84 (0,02)	0,78 (0,03)	0,75 (0,01)	0,83 (0,04)	0,116
TEP	3,16 (0,08)	3,37 (0,09)	3,36 (0,07)	3,47 (0,14)	3,69 (0,07)	3,34 (0,17)	0,066
ERP	50,10 (2,17)	53,26 (1,23)	50,14 (1,21)	53,55 (3,47)	52,87 (1,37)	51,78 (1,64)	0,712
RHS †	1,79 [a] (0,05)	1,65 [a] (0,04)	1,56 [ab] (0,07)	1,62 [a] (0,04)	1,93 [a] (0,15)	1,35 [b] (0,07)	0,001

(†) estatística feita com dados transformados

GP (ganho de peso, g); TCE (taxa de crescimento específico, % dia^{-1}); CAA (conversão alimentar aparente); TEP (taxa de eficiência proteica, %); ERP (eficiência de retenção proteica, %); RHS (relação hepatossomática, %)

A taxa de eficiência proteica (TEP) gera um ranking entre as dietas experimentais, que expressa a qualidade da proteína dietética e seu consequente aproveitamento para mantença e crescimento (FRIEDMAN, 1996; HEPHER, 1988). Pacus apresentaram alta TEP (> 3,0) e esta variável não sofreu efeito dos níveis de substituição da FP pelo CPS (p = 0,066), mostrando que a espécie conseguiu utilizar com eficiência a proteína vegetal para crescimento. A eficiência de retenção proteica do pacu (> 50%) reforça o registrado para os valores de TEP, denotando o ótimo aproveitamento da fonte proteica vegetal e sua conversão em massa corporal. Também não houve efeito do tratamento sobre os níveis de substituição (p = 0,712).

Muitos estudos de desempenho relacionam o uso de fontes proteicas vegetais nas dietas com redução do crescimento de peixes (ESPE et al., 2006; HART et al., 2010; ROLAND et al., 2015). A inclusão de 40 % destas fontes nas dietas já é suficiente para causar este efeito, principalmente mediante o uso de baixos níveis de farinha de peixe. Os fatores

antinutricionais constituem a principal causa da baixa eficiência de utilização dos nutrientes (HUA; BUREAU, 2012).

O efeito dos níveis de substituição da farinha de peixe pelo CPS sobre o ganho de peso (GP) do pacu foi estudado através de análises de regressão conforme modelo descrito em Baker et al. (2002). Através deste modelo, a primeira intersecção entre a curva quadrática e o platô da curva de regressão segmentada determina que para garantir o ganho de peso, seria recomendada a substituição até o nível de 49% para pacus, mostrando-se extremamente conservador para a espécie onívora (Figura 10). No entanto, o ponto de quebra da curva de regressão segmentada estimou que a substituição pode ser feita até o nível de 78,05 % (Tabela 10), mais próximo do nível de 80 %, a partir do qual foi observada redução no ganho de peso do pacu (Tabela 9).

Estes resultados permitem inferir que pacus digerem habilidosamente a proteína vegetal, sendo possível substituir até 78,05 % da farinha de peixe por CPS nas dietas experimentais. No entanto, a substituição total não é recomendada porque causa detrimento ao crescimento quer seja pelo desbalanço de aminoácidos ou por fatores antinutricionais. Neste estudo, apesar da suplementação com lisina e metionina em todos os níveis de substituição, houve redução no crescimento em função dos fatores antinutricionais. Esta mesma tendência foi relatada em substituições totais da FP por CPS em dietas para trutas e salmões (HUA; BUREAU, 2012; SALZE et al., 2010; THOMPSON et al., 2012). Cada espécie expressa um grau de resistência diferente à inclusão da soja na dieta, o que tem uma forte relação com a estratégia digestiva utilizada por cada uma.

Para aumentar a inclusão de fontes vegetais nas dietas sem prejudicar o crescimento, podem ser utilizadas combinações (“blends”) de fontes vegetais e/ou animais de modo a ter um melhor balanço de aminoácidos (NRC, 2011). Espécies onívoras como a tilápia têm bom desempenho quando submetidas a dietas à base de soja e farinha de vísceras de aves, sem a necessidade de suplementação com aminoácidos cristalinos (THOMPSON et al., 2012). “Blends” vegetais, suplementados com fosfato bicálcico e aminoácidos cristalinos, também favorecem redução de efeitos deletérios normalmente associados à proteína vegetal (FURUYA et al., 2001).

Tabela 10 - Equações referentes aos dados de ganho de peso (GP) ajustados aos modelos quadrático e regressão segmentada

Variável	Modelo	Equação	R^2	p
GP †	Quadrático	$GP^{2.6} = 1929111 - 6629\,\mathcal{X} - 45\,\mathcal{X}^2$	0.93	0.0049
	Regressão segmentada	$X < 78.05;\ GP^{2.6} = 1929190 - 8828\mathcal{X}$ $X > 78.05;\ GP^{2.6} = 1240252 - 22930\,(\mathcal{X} - 78.5)$	0.96	0.0040

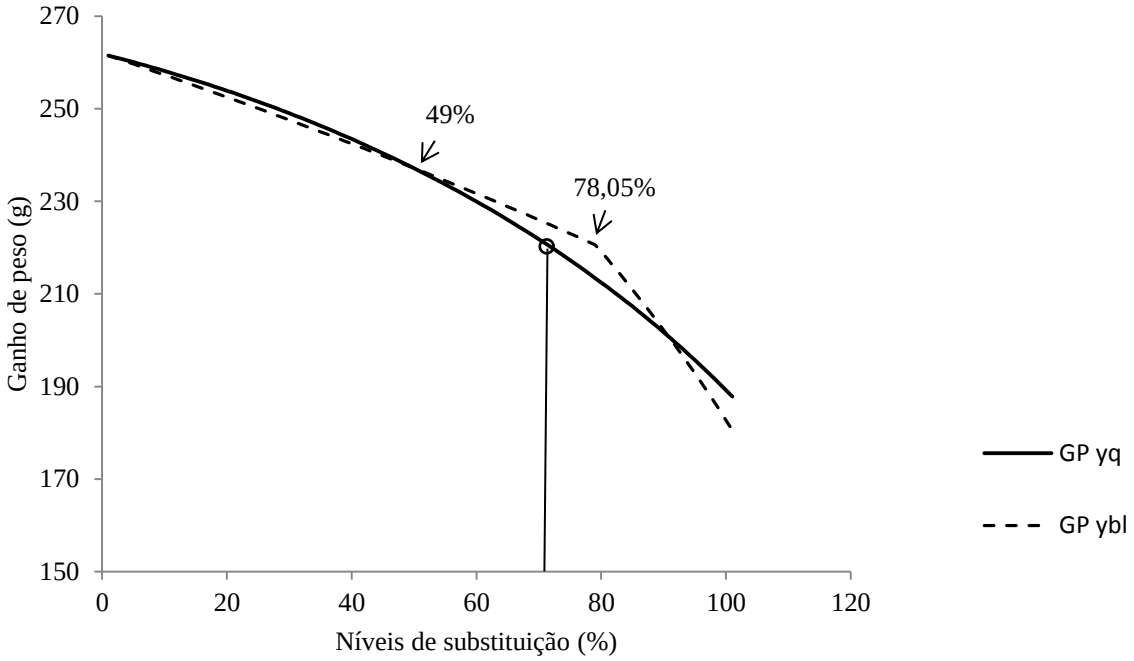


Figura 10 – Ganho de peso de pacus por nível de substituição, ajustado através dos modelos quadrático e de regressão segmentada. Setas indicam a primeira intersecção (49%) da equação quadrática com o platô da regressão segmentada e ponto de quebra deste último modelo (78,05%). Círculo (○) representa o equivalente ao ponto de quebra da regressão segmentada na curva quadrática (70 %).

Peixes podem estocar grande quantidade de glicogênio e gordura no fígado, sendo que variações na quantidade estocada expressam seu estado fisiológico. Estas variações podem ser estimadas através da relação hepatossomática (RHS). A alimentação é uma fonte de variação importante para a RHS, considerando que devem suprir as exigências energéticas dos peixes (TAVARES-DIAS et al., 2000). Com o aumento nos níveis de substituição a RHS de pacus

diminuiu, responsiva à composição das formulações e mostrando-se mais baixa quando a substituição foi total (Figura 11). Fontes vegetais apresentam menor digestibilidade de lipídeos em função do seu grau de saturação, e dos fatores antinutricionais, que impedem a ação de lipases pancreáticas sobre micelas de gordura, o que pode ter contribuído para o menor valor de RHS no nível 100%, cuja dieta era composta somente por fontes vegetais. Escaffre et al. (2007) relataram que trutas submetidas a dietas à base de SPC apresentaram RHS menor que quando alimentadas com dietas à base de farinha de peixe, sendo que este resultado coincidiu com a baixa deposição de gordura no fígado destes peixes.

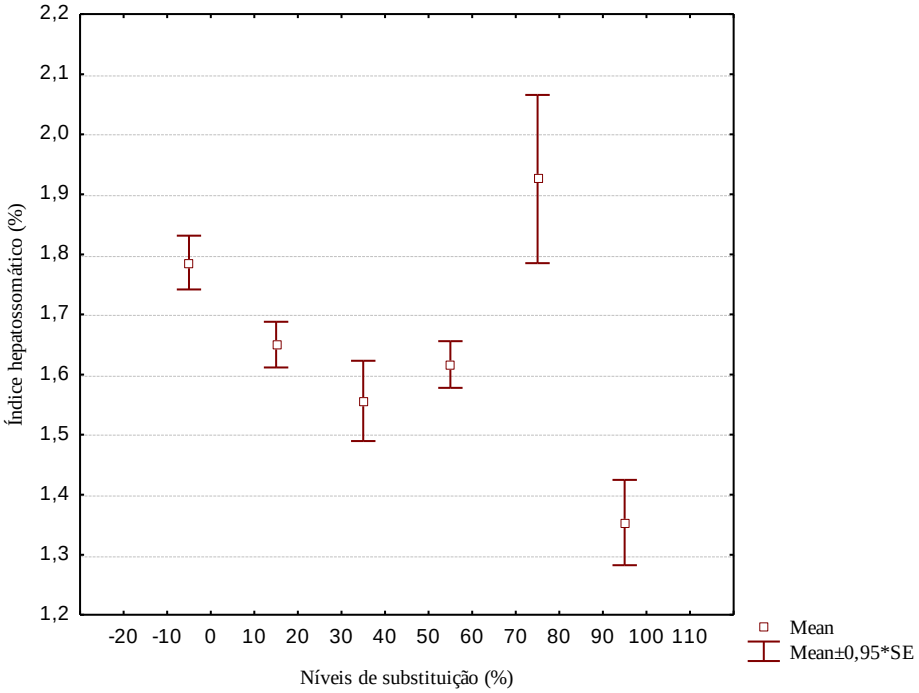


Figura 11 - Relação hepatossomática de pacus (média ± EP) por níveis de substituição

A substituição da FP pelo CPS não teve efeito na retenção de proteína (p = 0,712), que foi alta no pacu (em média 51,95 %). A composição química da carcaça dos pacus alimentados com dietas com níveis mais altos de substituição diferiu quanto à matéria seca e a deposição de gordura (Tabela 11). A matéria seca da carcaça diminuiu com a substituição da FP pelo CPS, apresentando valores mais baixos nos níveis 80 e 100% (p = 0,0001). Peixes alimentados com as dietas com os maiores níveis substituição depositaram pouca gordura na carcaça (p = 0,0018), consequência da decrescente disponibilidade de gordura dietética e possível aumento na concentração de fatores antinutricionais de natureza proteica como os inibidores de enzimas, que podem prejudicar a digestão / absorção deste nutriente. A deposição de proteína não sofreu efeito do tratamento (p = 0,4087), mantendo a média de

17,07 ± 0,17 % (média ± erro padrão); indicativo de que pacus utilizaram eficientemente a proteína do CPS para crescimento (DUMAS et al., 2007). A deposição de cinzas também não apresentou diferença entre níveis de substituição (p = 0,8378) e manteve valores de 3,49 ± 0,23 % (média ± erro padrão).

Tabela 11 - Composição de carcaça de pacus. Média de três peixes por unidade experimental (12 peixes por nível de substituição). Letras indicam diferenças entre níveis de substituição (ANOVA, α = 0,05)

	Níveis de substituição (%)								
Nutriente	Inicial	0	20	40	60	80	100	EP	p
MS	30,9	35,67 [a]	34,27 [ab]	34,22 [ab]	32,81 [bc]	30,69 [c]	31,17 [c]	0,43	0,0001
PB	16,04	15,53	16,23	15,51	15,44	14,75	15,77	0,19	0,4087
EE	10,03	13,89 [a]	12,32 [abc]	12,68 [ab]	11,52 [abc]	10,43 [bc]	9,82 [c]	0,36	0,0018
MM	4,06	3,59	3,68	3,42	3,48	3,38	3,99	0,13	0,8378

4.2.1 Respostas fisiológicas do pacu

Para avaliar os efeitos dos níveis de inclusão na estrutura e funcionamento do trato gastrointestinal foram estudadas as atividades das enzimas protease e lipase inespecíficas e amilase nos cecos pilóricos e intestino anterior de pacus, além da microestrutura do intestino anterior com o objetivo de identificar possíveis alterações, principalmente na túnica mucosa, relacionadas à substituição da farinha de peixe pelo CPS.

4.2.1.1 Atividade de enzimas digestivas

O perfil enzimático está diretamente relacionado com o hábito alimentar de uma espécie (HIDALGO; SANZ, 1999; KUZ'MINA, 2007). O pacu, de hábito alimentar onívoro, apresenta perfil de enzimas que lhe permite digerir tanto alimentos de origem animal quanto vegetal. Em geral, organismos onívoros conseguem se adaptar a diferentes substratos (composição da digesta), toleram altos níveis de carboidrato na dieta e conseguem utilizar este nutriente quer seja pela produção de enzimas endógenas (carboidrases), quer seja pela ação da microbiota intestinal (mais diversa em onívoros que em carnívoros), cujas enzimas produzidas

podem ter uma contribuição relevante para a digestão (GERMAN, 2011; KARASOV et al., 2011). Além disso, peixes onívoros apresentam maior número de transportadores de glucose comparativamente aos peixes carnívoros, que garantem alta assimilação de carboidratos (KARASOV; DIAMOND, 1988). A proteína é um nutriente tão importante na nutrição de um peixe carnívoro quanto na de um onívoro. No entanto, peixes onívoros conseguem poupar o uso da proteína como fonte de energia, dada sua habilidade em digerir carboidratos (GERMAN, 2011; ALMEIDA et al., 2006).

A atividade da protease inespecífica foi maior nos cecos pilóricos que no intestino anterior dos pacus ($p = 0,0381$), indicando que os processos digestivos e absortivos são mais intensos neste segmento; não houve diferença nas atividades da lipase inespecífica ($p = 0,0606$) e amilase ($p = 0,4552$) entre os dois compartimentos estudados (Figura 12). Esta característica é comum a várias espécies de peixes, independente de hábito alimentar; regiões proximais do intestino apresentam atividades enzimáticas mais altas por que concentram um volume maior de enzimas pancreáticas (BAKKE et al., 2011; KROGDAHL et al., 2015). É ainda possível que grande parte do pâncreas difuso esteja localizado no tecido mesentérico que envolve os cecos. Além disso, ao longo do trânsito intestinal, outros fatores também contribuem para diminuir a atividade enzimática, como a digestão proteolítica, recirculação enteropancreática e degradação das enzimas por bactérias (CHIKWATI et al., 2013), efeitos mais facilmente identificados no intestino posterior.

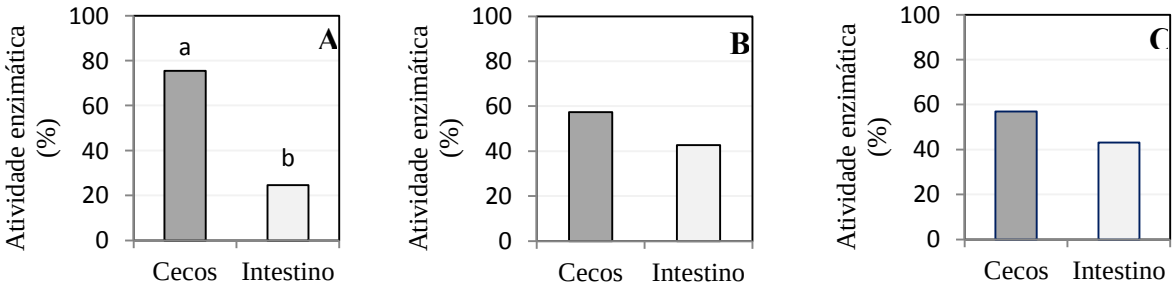


Figura 12 - Atividade relativa da protease inespecífica (A), lipase inespecífica (B) e amilase (C) por segmento do trato gastrointestinal de pacu. Letras indicam diferença estatística da atividade entre segmentos (Teste t, $p < 0,05$)

Analisando a atividade enzimática por nível de substituição para cada segmento do trato, foi possível perceber que a atividade digestiva foi intensa nos cecos. No entanto, a resposta aos níveis de substituição foi evidente quando analisada a atividade total dos segmentos (cecos + intestino) para cada enzima (Figura 13). Desta forma, foi registrado que a atividade da protease inespecífica nos pacus apresentou tendência a aumento, apesar de não significativo, relativo aos níveis crescentes de substituição da FP pelo CPS (20 a 100%) (Tabela 12). Os inibidores de protease da soja estimulam o pâncreas a aumentar a síntese de enzimas, no entanto, promovem a redução da atividade enzimática no lúmen intestinal (FRIEDMAN, 2001; LILEENG et al., 2007; KROGDAHL et al, 1994, 2010; OLLI et al., 1994; CASTRO et al., 2013; GU et al., 2014). Este efeito pode ter ocasionado a menor atividade proteolítica nos tratamentos iniciais, cuja inclusão de farelo de soja era maior que nos três últimos tratamentos.

Tabela 12 - Atividades enzimáticas nos cecos pilóricos (CP), intestino anterior (IA) e total das duas estruturas (T) de pacus por níveis de substituição. Valores representam a média de três peixes por unidade experimental (n = 4) e respectivo erro padrão. Letras indicam diferenças entre níveis de substituição (ANOVA, α = 0,05)

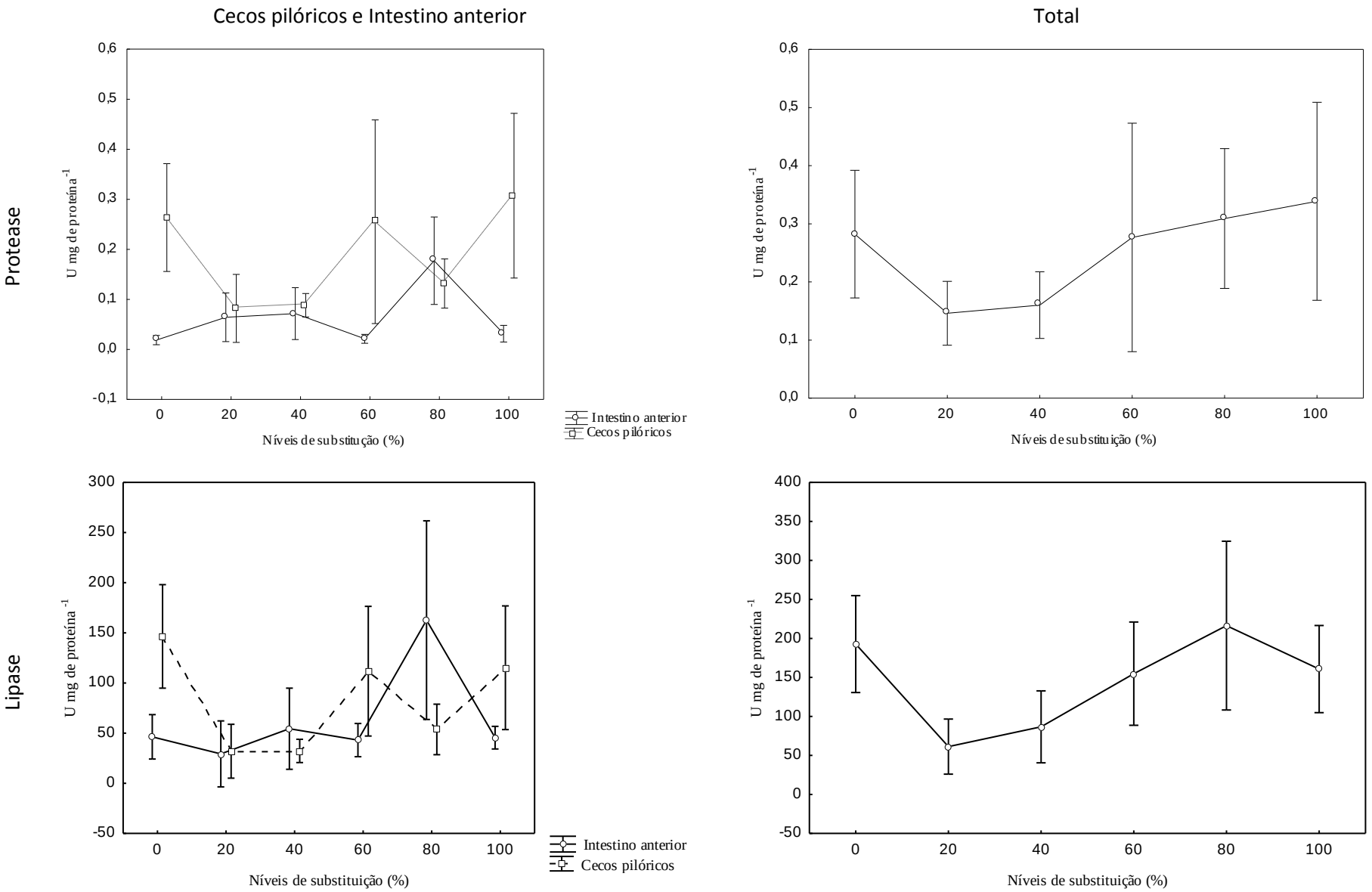
	Níveis de substituição (%)							
região	0	20	40	60	80	100	Total	p
	Protease (U mg^{-1} de proteína)							
CP	0,28 [a] (0,05)	0,08 [bc] (0,02)	0,09 [c] (0,01)	0,28 [ab] (0,09)	0,13 [abc] (0,02)	0,31 [a] (0,07)	0,19 (0,02)	0,0093
IA	0,02 [a] (0,01)	0,06 [bc] (0,02)	0,09 [c] (0,02)	0,02 [a] (0,01)	0,16 [d] (0,04)	0,03 [ab] (0,01)	0,07 (0,01)	< 0,01
T	0,31 (0,54)	0,16 (0,01)	0,19 (0,04)	0,20 (0,05)	0,26 (0,05)	0,32 (0,09)	0,24 (0,02)	0,2826
	Lipase (U mg^{-1} de proteína)							
CP	156,15 [a] (22,86)	31,96 [bc] (9,67)	30,21 [b] (4,95)	122,98 [a] (28,29)	52,63 [c] (9,46)	115,19 [a] (25,21)	82,86 (10,03)	0,0003
IA	49,45 [a] (10,28)	29,32 [a] (11,84)	61,21 [a] (17,10)	45,87 [a] (7,30)	147,55 [b] (39,93)	45,50 [a] (4,62)	68,35 (10,69)	0,0209
T	199,55 [ab] (30,21)	72,24 [ab] (8,34)	87,95 [b] (19,54)	149,34 [ab] (31,63)	207,23 [a] (39,78)	153,79 [ab] (31,60)	147,03 (14,37)	0,0112
	Amilase (U mg^{-1} de proteína)							
CP	2239,32 (490,01)	782,21 (204,11)	907,14 (87,17)	2100,39 (671,12)	1101,50 (134,04)	1890,75 (320,49)	1481,07 (157,62)	0,0977
IA	338,77 [ace] (52,10)	1428,46 [abd] (404,66)	1780,80 [bd] (386,08)	435,51 [ce] (73,46)	2591,84 [d] (555,02)	252,05 [e] (50,37)	1230,32 (195,98)	< 0,01
T	2754,81 (582,19)	2624,07 (227,41)	2650,70 (502,51)	1912,55 (515,63)	3249,63 (569,83)	2131,71 (456,51)	2609,68 (214,83)	0,6345

A atividade da protease foi mais alta quando a substituição foi 100%, coincidindo com a redução de crescimento dos pacus submetidos a este tratamento. Apesar de o pâncreas aumentar a síntese de enzimas, a excreção simultânea do complexo ‘inibidor de protease - enzima proteolítica’, causa a perda de aminoácidos sulfurados, o que pode prejudicar o crescimento do peixe, como evidenciado no nível 100%.

A atividade total da lipase inespecífica aumentou com os níveis crescentes de substituição da FP pelo CPS (p = 0,0112), no entanto, no nível 100% houve redução da atividade da lipase. A alta atividade proteolítica registrada neste nível pode ter ocasionado a hidrólise das proteases não-proteolíticas (lipases e amilases), reduzindo sua atividade, semelhante ao que acontece em mamíferos (CHIKIWATI et al., 2013). A soja também apresenta inibidores de lipase, que interferem na digestão da gordura. É possível que o mesmo mecanismo compensatório que o pâncreas sofre para aumentar a eficiência digestiva da proteína, também aconteça para a lipase.

Tendência semelhante foi registrada na atividade da amilase, apesar de não terem sido detectadas diferenças entre tratamentos (p = 0,6345). A maior atividade numérica da amilase foi registrada no nível 80% CPS. A baixa atividade no nível 100% CPS pode ser considerada efeito da alta atividade proteolítica característica deste nível, conforme descrito anteriormente.

Como o alimento é uma composição heterogênea que se modifica durante o trânsito intestinal, seus nutrientes interagem entre si e modulam ou modificam a atividade das enzimas (KUZ’MINA, 2007; UGOLEV; LAEY 1973). O perfil de atividade das enzimas digestivas de pacus alimentados com níveis crescentes de CPS nas dietas denotou o aproveitamento dos nutrientes (proteína, gordura e carboidrato) principalmente nos níveis mais altos de substituição parcial, indicando o alto potencial de uso deste ingrediente nas rações para esta espécie.


Cecos pilóricos e Intestino anterior
Total
Protease
Lipase
U mg de proteína -1
Níveis de substituição (%)
Intestino anterior
Cecos pilóricos

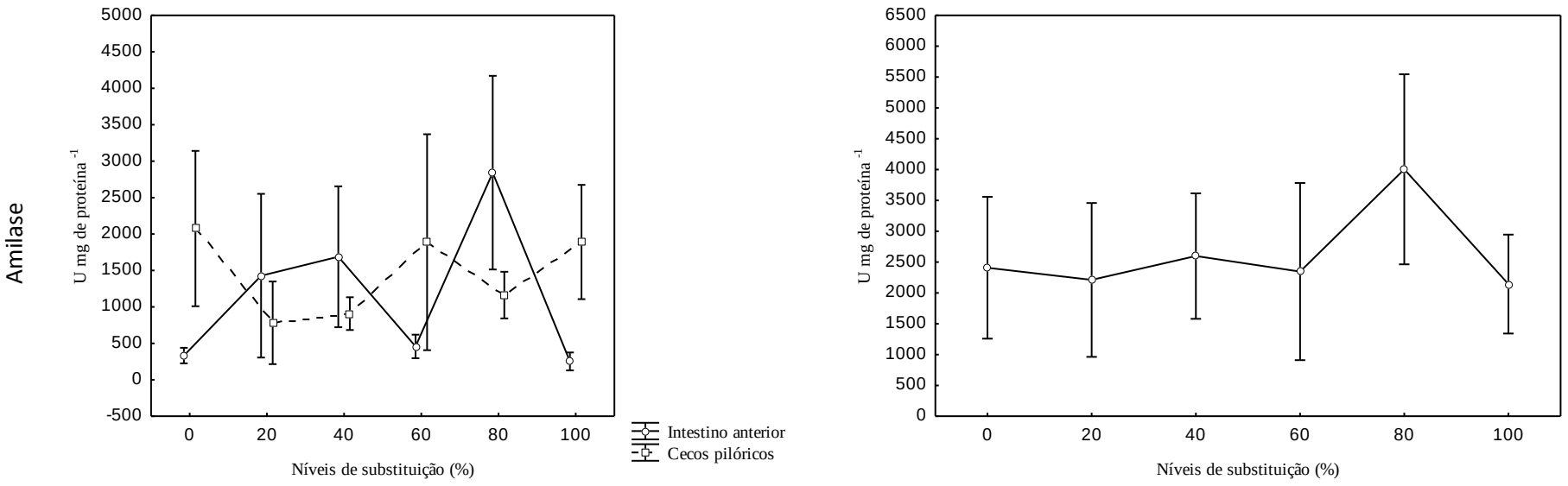


Figura 13 - Atividade da protease inespecífica, lipase e amilase por nível de substituição nos cecos pilóricos, intestino anterior do pacu e o total da atividade nas duas estruturas. Barras representam intervalo de confiança de 0,95

4.2.1.2 Histologia do intestino anterior de pacus

Foi registrado aumento na espessura da lâmina própria em todos os níveis de substituição, fenômeno considerado uma característica de enterite, inflamação da mucosa intestinal que pode ser desencadeada por fatores antinutricionais da soja (URAN et al., 2009; KROGDAHL et al., 2010; VAN DEN INGH et al., 1996). A formulação de todas as dietas experimentais continha uma base de cerca de 40% de farelo de soja, suficiente para ocasionar este efeito. Ostaszewska et al. (2005) relataram alterações na mucosa do intestino posterior de pacus alimentados com rações cuja fração proteica era composta principalmente por farelo de soja (44% da dieta) e caseína (20 % da dieta). Além desta característica, comum a todos os tratamentos, foi perceptível alteração na estrutura da mucosa dos pacus submetidos ao nível 100%, cuja área superficial foi menor, refletida na menor altura das dobras intestinais (Figura 14).

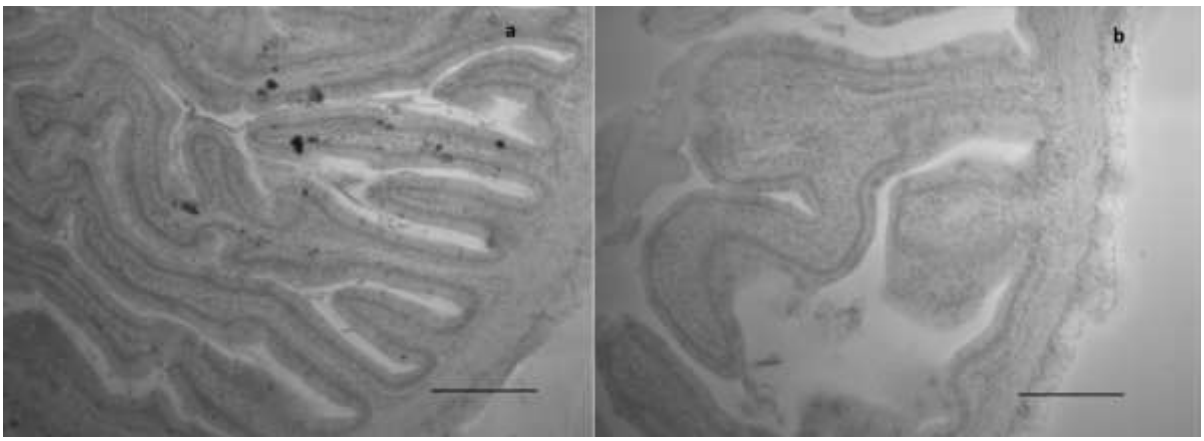


Figura 14 - Dobras do intestino anterior de pacus submetidos aos níveis 0% CPS (a) e 100% CPS (b); H.E.; barra = 100 µm

A redução na área do intestino proximal provavelmente contribuiu para a significativa redução no crescimento dos pacus alimentados com dietas contendo 100% CPS. Chikiwati et al. (2013) relataram que os enterócitos proliferam na base das dobras intestinais e migram para o ápice ao longo do seu ciclo, e nesta região sofrem apoptose. Fatores antinutricionais da soja estimulam a proliferação e apoptose de enterócitos ao longo de toda a dobra, diminuindo o tempo de “turnover” celular e, consequentemente, reduzindo a área das dobras intestinais. Como consequência, a mucosa afetada concentra grande número de células imaturas, não tão eficientes em suas funções.

No pacu, também foi registrada a fragmentação do epitélio no ápice das dobras. A maioria das alterações causadas pelo uso da soja na alimentação de peixes é relatada em espécies carnívoras, aparentemente mais sensíveis (BANSEMER et al., 2015; BOWYER et al., 2013; REFSTIE et al., 2006; VAN DEN INGH, 1996). Lilleeng et al. (2007) explicaram que no intestino de salmões, a intensa atividade proteolítica que acontece em resposta a presença de inibidores de tripsina na digesta, causou indesejável proteólise dos tecidos intestinais. Na parede do intestino de peixes também existem tripsinas. Quando o intestino é danificado por fatores antinutricionais da soja, o aumento na atividade da tripsina no lúmen intestinal (mecanismo compensatório) pode ativar a atividade destas proteases nos tecidos, causando sua degeneração e agravando o processo inflamatório (LILEENG et al., 2007; CHIKWATI et al., 2013). Este efeito pode justificar a alteração ocorrida na mucosa intestinal dos pacus do nível 100%, uma vez que, neste estudo, a atividade proteolítica analisada nos segmentos proximais do intestino mostrou-se alta.

Em onívoros existem poucos estudos que relacionam a redução no crescimento à ocorrência de danos na microestrutura intestinal causados pelos antinutrientes da soja. É possível que a taxa de renovação do epitélio intestinal tenha relação com a intensidade da resposta que cada espécie expressa. Carpas, por exemplo, sofrem alterações na mucosa intestinal quando alimentadas com dietas à base de soja, no entanto, a espécie se adapta ao alimento e os sintomas regridem rapidamente (CHIKWATI, 2013; URAN et al., 2009).

Muitos estudos atribuem a saponinas o desencadear do processo de alteração da mucosa intestinal, porque aumentam a permeabilidade da parede intestinal (BAKKE et al., 2014; KROGDAL et al., 2015; KNUDSEN et al., 2008), no entanto, dificilmente o processo inflamatório é instalado pela presença de um único fator. A ação de saponinas pode ser potencializada por outros fatores como lectinas, que fragilizam as junções celulares; danificam a borda em escova, interferindo na digestão e absorção de nutrientes; alteram o turnover dos enterócitos, induzindo proliferação celular intensa; perturbam o metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos; estimulam aumento ou atrofia dos órgãos internos como o fígado, entre outros (CHIKIWATI, 2013).

A presença da soja no alimento também promove modificação na microbiota intestinal porque altera a composição do muco liberado pelas células caliciformes (BANSEMER et al., 2015; GREEN et al., 2013; NAYAK, 2010; VAN DER MAREL et al., 2014), consequentemente pode favorecer a instalação de bactérias indesejáveis. Em função da

fragilidade instalada na mucosa intestinal, estas bactérias podem sofrer translocação invadindo o sistema e contribuindo para a evolução a um quadro patológico (RINGO et al., 2010).

O efeito deletério do fator antinutricional depende da sua concentração no alimento e da interação com outros fatores, mas é difícil estabelecer valores que caracterizem níveis altos ou baixos, porque as espécies expressam diferentes graus de sensibilidade aos níveis de antinutrientes (KROGDAHL et al., 2015). Além disso, existem poucos estudos feitos com dietas purificadas e que permitem estabelecer valores mais exatos. Saponinas, por exemplo, quando em baixas concentrações, parecem ter efeito positivo sobre o desempenho animal (GU et al., 2014; FRANCIS et al., 2001). É possível que oligossacarídeos (estaquiose e rafinose) também não causem redução no crescimento de carpas (*Carassius auratus gibelio* ♀ x *Cyprinus carpio* ♂) e passem intactos através do trato gastrointestinal dos peixes (CAI et al., 2012; DIMITROGLOU et al., 2010; NRC, 2011).

Na mucosa intestinal dos pacus, nenhuma das características avaliadas pelo score semi-qualitativo sofreu efeito do tratamento ($p > 0.05$). Vacúolos supranucleares nos enterócitos mostraram-se pouco desenvolvidos, indicando possível redução nos processos absortivos, sobretudo de lipídeos (ESCAFFRE et al., 2007). Este resultado coincide com o registrado na composição de carcaça, cuja deposição de gordura diminuiu com o aumento nos níveis de substituição de FP por CPS. A soja não tem colesterol (SINGH et al., 2008) e a presença de saponinas pode ter contribuído para diminuir a digestibilidade de lipídeos, uma vez que têm alta afinidade por moléculas de colesterol nas membranas celulares e por sais biliares, impedindo a ação das lipases sobre micelas de gordura (COUTO et al., 2014; SORENSEN et al., 2011).

Muitos estudos relacionam o aumento no número de células caliciformes com a enterite (BANSEMER et al., 2015; OLSEN et al., 2007; SORENSEN et al., 2011). No entanto, o número de células caliciformes na mucosa intestinal de pacus não sofreu o efeito da substituição da FP pelo CPS ($p=0,51$), apesar do aumento registrado no nível 100% CPS (Tabela 13). Chikwati et al. (2013) relatou que em salmões não acontece proliferação de células caliciformes o que acontece, na verdade, é a perda de enterócitos em função do agravamento da inflamação.

Tabela 13 - Análises histológicas quantitativas e qualitativas da mucosa de pacus. Média de doze peixes por tratamento e letras indicam diferenças entre níveis de substituição para cada variável (ANOVA, α = 0,05)

	Níveis de substituição (%)							
Medições (µm)	0	20	40	60	80	100	EP	P
Altura da dobra	1384 [a]	949 [bc]	928 [bc]	1202 [ac]	889 [bc]	868 [b]	35,91	< 0,01
Espessura da dobra	79	75	117	59	81	103	9,24	0,5262
Sub mucosa	98 [ab]	78 [abc]	85 [abc]	71 [abc]	95 [b]	64 [c]	2,86	0,0018
Muscular	241 [a]	161 [b]	158 [b]	253 [a]	205 [a]	160 [b]	8,01	0,0002
Score semi qualitativo								
Dobras intestinais	2,50	3,50	3,25	2,50	2,75	3,25	0,16	0,3410
Vacúolos supranucleares	2,00	2,50	2,50	2,25	2,25	2,25	0,09	0,6093
Células caliciformes	2,75	3,00	3,25	2,25	2,00	3,00	0,19	0,3555
Infiltração de leucócitos	2,25	2,50	1,75	2,00	2,25	2,25	0,21	0,9331
Lâmina própria	3,25	3,50	3,00	3,25	3,00	3,00	0,08	0,3313
Submucosa	3,50	3,25	2,75	2,75	2,25	2,75	0,14	0,1321
Média do score	2,71	3,04	2,75	2,54	2,42	2,75	0,08	0,3370
Quantidade de células caliciformes	57,25	62,50	60,25	42,50	32,50	52,00	4,98	0,5154

Na lâmina própria e submucosa do intestino, foi registrada infiltração de leucócitos mononucleares e eosinófilos granulocíticos (Figura 15), normalmente relacionados à resposta imunológica do organismo a algum dano no tecido ou processo inflamatório instalado (KIRON, 2012; YAN; SHAFFER, 2009). No entanto, sua ocorrência não foi relacionada aos níveis de inclusão de CPS na dieta ($p > 0,05$). Apesar da análise qualitativa da camada muscular mostrar tendência à diminuição na espessura com os crescentes níveis de substituição, as medições mostraram que, na verdade, a camada torna-se espessa no intervalo entre os níveis 60 e 80 %, indicativo de maior motilidade e consequente aumento na capacidade absortiva (UGOLEV; LAEY, 1973).

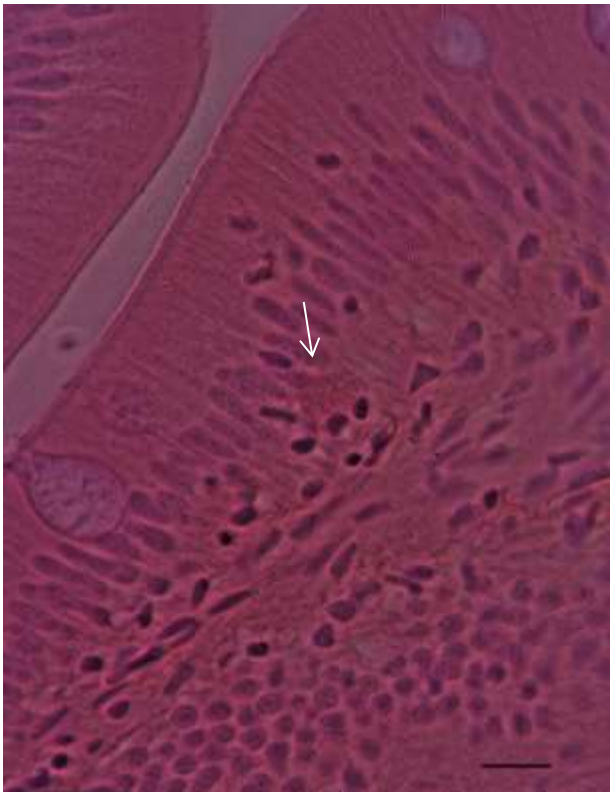


Figura 15 - Leucócito eosinófilo (seta) infiltrado no epitélio da mucosa no intestino anterior de pacu; H.E.; barra = 10 µm

4.3 Ensaio II: Desempenho zootécnico de dourados alimentados com dietas contendo níveis crescentes de concentrado proteico de soja em substituição à farinha de peixe

Com exceção do tratamento controle (0 % CPS), foram registradas casualidades em todos os tratamentos partir do 42° dia. Nos níveis de substituição 20 e 40 %, a sobrevivência foi de 99,33 %, mas nos níveis 60, 80 e 100 % o percentual foi de 90,0, 91,67 e 53,33 % respectivamente. Tal fato reflete a baixa tolerância de dourados a altos níveis de inclusão das fontes vegetais utilizadas nas dietas. Apesar de não ter sido detectada diferença entre níveis de substituição na taxa de alimentação dos dourados ($p = 0,4204$), houve visível tendência a aumento no consumo nos níveis de inclusão de 60 a 100 % CPS, indicando que a pior qualidade nutricional destas dietas (em comparação com o controle), estimulou aumento de consumo para atender às exigências nutricionais da espécie (Figura 16).

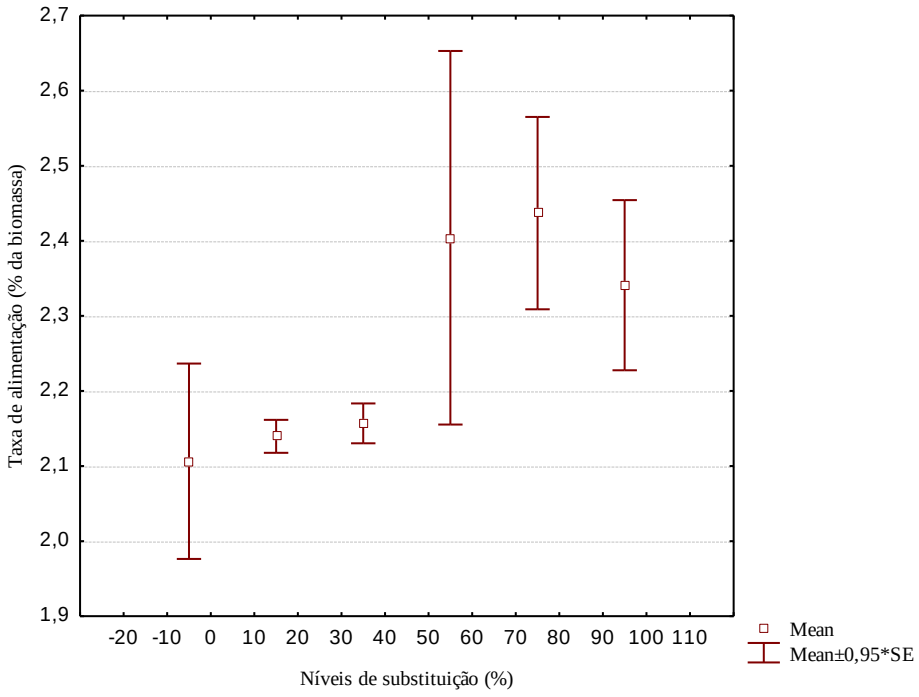


Figura 16 - Taxa de alimentação de dourados (% da biomassa) por níveis de substituição

A conversão alimentar aparente do dourado piorou com aumento dos níveis de inclusão de CPS, principalmente no nível 100 % de substituição (Tabela 16). A piora nos valores de conversão pode indicar que a proteína dietética estava sendo utilizada como fonte de energia, considerando que a deposição de proteína na carcaça diminuiu no nível 100 % CPS. Peixes carnívoros em geral são pouco eficientes no aproveitamento de carboidratos das fontes vegetais e não apresentam a plasticidade fenotípica comum a peixes onívoros como o pacu, que habilidosamente digerem/absorvem carboidratos e os utilizam como fontes de energia, poupando as proteínas. A taxa de eficiência proteica (TEP) foi afetada pelos níveis de substituição ($p = 0,0003$), sendo que a partir do nível 60 % CPS, a proteína dietética não foi bem aproveitada pela espécie, provavelmente em função da maior concentração de fatores antinutricionais contidos principalmente no farelo de soja, cujos níveis de inclusão nas dietas foram crescentes, e da baixa tolerência dos dourados aos seus efeitos.

A eficiência de retenção proteica do dourado reforçou o registrado em relação à TEP, evidenciando que, acima do nível de inclusão de 60 % CPS, menos de 26 % da proteína dietética foi convertida em crescimento (Tabela 14). De modo geral, a retenção proteica do dourado foi baixa, mesmo no tratamento controle onde a retenção foi de apenas 33 %. Este efeito está relacionado à formulação das dietas experimentais que tinham por base proteica o FS, cujos fatores antinutricionais tornaram a proteína dietética pouco disponível para um

carnívoro. A substituição da FP pelo CPS potencializou o efeito destes fatores prejudicando o crescimento dos dourados.

Tabela 14 - Variáveis de desempenho zootécnico do dourado por nível de substituição. Média de quatro peixes por unidade experimental (n = 4) e respectivo erro padrão. Letras superscritas indicam diferenças entre os níveis de substituição (ANOVA, α = 0,05)

	Níveis de substituição (%)						
Variável	0	20	40	60	80	100	P
GP	55,15 [a] (2,45)	52,95 [a] (4,83)	49,17 [ab] (2,42)	35,89 [bc] (4,85)	26,27 [cd] (2,17)	11,92[d] (2,11)	< 0,01
TCE	2,45 [a] (0,03)	2,42 [a] (0,08)	2,35 [ab] (0,05)	2,02 [bc] (0,15)	1,77 [c] (0,07)	1,33 [d] (0,07)	< 0,01
CAA	1,18 [a] (0,08)	1,21 [a] (0,02)	1,24 [a] (0,02)	1,57 [a] (0,27)	1,68 [ab] (0,12)	2,70 [b] (0,56)	0,0020
TEP	1,87 (0,13)	1,78 (0,03)	1,75 (0,02)	1,57 (0,22)	1,39 (0,09)	1,19 (0,34)	0,0705
ERP	33,39[a] (2,28)	30,52[ab] (1,24)	30,10 [ab] (0,57)	25,51 [abc] (3,34)	23,11 [bc] (1,82)	17,32 [c] (1,69)	0,0007
RHS	1,82 (0,04)	1,81 (0,03)	1,79 (0,02)	1,79 (0,07)	1,77 (0,07)	2,10 (0,21)	0,1491
Sobrevivência (%)	100[a]	99,33[a]	99,33[a]	90[ab]	91,67[ab]	53,33[b]	0,0237

GP (ganho de peso, g); TCE (taxa de crescimento específico, % dia^{-1}); CAA (conversão alimentar aparente); TEP (taxa de eficiência proteica, %); ERP (eficiência de retenção proteica, %); RHS (relação hepatossomática, %)

Tendo como referência o ganho de peso (GP) de dourados do tratamento 0% CPS, houve redução de 21,63 % nesta variável quando a substituição da farinha de peixe pelo concentrado de soja foi total. Alguns peixes carnívoros são muito sensíveis à soja, e a inclusão de 10% de farelo nas rações já é suficiente para promover redução no crescimento (URAN et al., 2009).

Efeitos dos níveis de substituição sobre a variável GP foram avaliados através do ajuste dos dados aos modelos de regressão quadrática e regressão segmentada conforme adaptações descritas em Baker et al. (2002). Os coeficientes de determinação estimados indicaram que mais de 90 % da variação de GP dos dourados foi explicada pelos modelos (Tabela 15). A primeira intersecção do platô da curva de regressão segmentada com a curva quadrática foi considerada como nível máximo recomendado para garantir o ganho de peso

(20 %), sendo que o ponto de quebra do broken-line estimou o nível máximo de 37,20 %. Considerando que não houve diferença na eficiência de retenção de proteína entre os dois primeiros níveis de substituição (20 e 40 %) e que a maior retenção foi registrada no tratamento controle (0 %), optou-se por considerar até o nível de 37 % como o ideal para garantir o ganho de peso para dourados (Figura 17).

Tabela 15 - Equações referentes aos dados de ganho de peso (GP) de dourados ajustados aos modelos de regressão quadrático e regressão segmentada

Variável	Modelo	Equação	R^2	p
GP	Quadrático	$\mathrm{GP} = 55.74316 - 0.06432\,\mathcal{X} - 0.00340\,\mathcal{X}^2$	0.99	< 0.01
	Regressão segmentada	$\mathcal{X} < 30.90;\ \mathrm{GP} = 55.1517 - 0.08882\mathcal{X}$ $\mathcal{X} > 30.90;\ \mathrm{GP} = 52.4071 - 0.4554\,(\mathcal{X} - 30.90)$	0.94	< 0.01

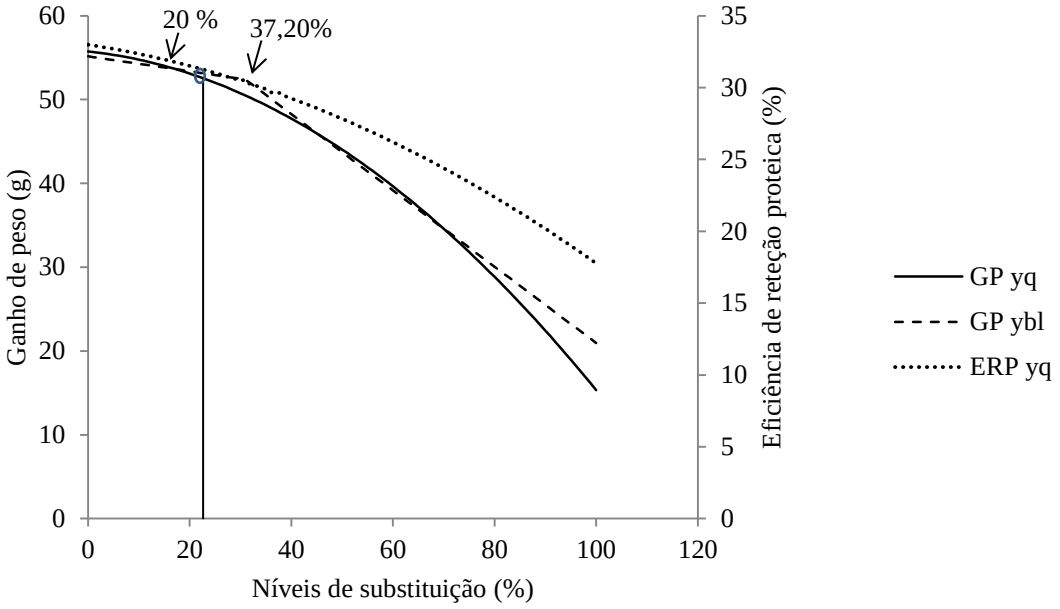


Figura 17 – Ganho de peso (GP) de dourados estimados pelos modelos quadrático (yq) e regressão segmentada (ybl). Setas indicam primeira intersecção (20% CPS) e ponto de quebra (37,2% CPS). Círculo (○) representa o equivalente ao ponto de quebra do broken na curva quadrática (23 %). No eixo secundário é visualizada a eficiência de retenção proteica de dourados por nível de substituição estimada pela equação [ERP = 32,9870 – 0,0542X – 0,00098X^2] (R^2 = 0,98)

A redução no crescimento dos dourados registrada neste ensaio é resposta comum em carnívoros quando submetidos a dietas com inclusões de fontes vegetais (BOWYER et al., 2013; MEDALE et al., 1998; REFSTIE et al., 2006; VAN DEN INGH et al., 1996), embora os efeitos adversos variem conforme a resistência específica de cada espécie aos níveis de inclusão e ao tempo de exposição (KROGDAHL et al., 2010). Para *Seriola lalandi*, por exemplo, não é recomendado o uso de ingredientes derivados da soja principalmente no inverno (BANSEMER et al., 2015). Dietas contendo soja induzem redução na espessura da camada de muco que protege o intestino, alteram a microbiota do lúmen intestinal, interferem na homeostase do sistema imune e, consequentemente, proporcionam a instalação de bactérias indesejáveis. Todos estes eventos se agravam quando o animal é submetido a uma situação de estresse, como a exposição a baixas temperaturas características do inverno, que aumentam a susceptibilidade do organismo ao desenvolvimento de enterites ou evolução para outros quadros patológicos como bacterioses, tão frequentes em sistemas de criação (BANSEMER et al., 2015; ESCAFFRE et al., 2007; URAN et al., 2009).

Em rações para onívoros, de modo geral, é possível substituir mais de 60% da farinha de peixe por farelo de soja (GATLIN III et al., 2007); para carnívoros, esta proporção cai para valores inferiores a 50 %. Em substituições totais para carnívoros, mesmo sendo por derivados refinados como CPS registra-se, na maioria das vezes, declínio do crescimento, mesmo havendo suplementação com aminoácidos (MEDALE et al., 1996; MURASHITA et al., 2013; SALZE et al., 2010; VAN DEN INGH et al., 1996). É provável que, nestes casos, o crescimento do carnívoro esteja refletindo a depleção de algum nutriente próprio da farinha de peixe, e que está ausente em seu substituto.

Não foram registrados efeitos dos tratamentos sobre a relação hepatossomática de dourados ($p = 0,87$), embora peixes submetidos ao nível 100 % apresentassem maior RHS. Este efeito também pode ter sido consequência da alta mortalidade que acometeu os peixes deste tratamento. A diminuição da densidade de peixes nas caixas proporcionou crescimento desigual em comparação com caixas de maior densidade, o que refletiu de forma significativa no nível 100%. A deposição de proteína na carcaça, por outro lado, sofreu efeito do tratamento ($p = 0,0216$), diminuindo com o aumento nos níveis de substituição da FP por CPS. Em peixes, a deposição de gordura corporal está relacionada à disponibilidade da proteína consumida (DUMAS et al., 2007). A deposição de proteína na carcaça de dourados reforçou o fato de que o tratamento afetou o crescimento e que o pior efeito foi registrado quando a substituição foi total. No entanto, considerando a deposição crescente de farelo de

soja nas dietas, é possível que este resultado esteja mais relacionado a este ingrediente que ao CPS.

A deposição de gordura sofreu redução numérica absoluta no nível 100%, indicativo da menor disponibilidade dos lipídeos dietéticos à medida que as substituições aumentaram. Como foi utilizado óleo de soja na composição das dietas e considerando que a farinha de peixe também é fonte de gordura, à medida que este ingrediente foi sendo substituído pelo CPS, o aproveitamento da gordura diminuiu (Tabela 16).

Tabela 16 - Composição de carcaça dourado. Média de três peixes por unidade experimental (doze peixes por nível de substituição); letras indicam diferenças entre níveis de substituição (ANOVA, $\alpha = 0,05$)

	Níveis de substituição (%)								
Nutriente	Inicial	0	20	40	60	80	100	EP	p
MS	23,24	33,13	33,86	34,40	32,26	32,74	30,78	0,38	0,1219
PB	16,43 [a]	17,72 [a]	17,20 [a]	17,25 [a]	17,03 [a]	17,16 [a]	15,71 [b]	0,17	0,0216
EE	2,39	11,79	10,79	13,89	11,51	11,87	10,42	0,46	0,3609
MM	3,95	3,23	4,04	3,51	3,82	3,71	2,30	0,23	0,4413

4.3.1 Respostas fisiológicas do dourado

Foram mensuradas as atividades de enzimas digestivas (protease inespecífica, lipase inespecífica e α-amilase) em dois segmentos do trato de dourados (cecos pilóricos e intestino anterior), uma vez que os fatores antinutricionais da soja (principalmente inibidores de proteases) têm ação regulatória sobre a produção e atividade de enzimas pancreáticas. Também foi feita a análise da microestrutura da mucosa do intestino anterior, considerando a possibilidade da soja desencadear alterações na mucosa intestinal que pudessem prejudicar os processos digestivos e consequentemente, o crescimento.

4.3.1.1 Atividade de enzimas digestivas

O perfil enzimático dos dourados caracterizou-se por intensa atividade proteolíca e amilolítica nos cecos pilóricos, o que pode estar relacionado à maior área de superfície da mucosa característica deste segmento, somada à maior disponibilidade destes nutrientes. A hidrólise da gordura, no entanto, foi maior no intestino anterior (Figura 18).

Não houve efeito dos níveis de substituição sobre as atividades de protease (p = 0,7261), lipase (p = 0,8315) e amilase nos cecos pilóricos de dourado (p = 0,6604) (Tabela 17). A elevada atividade da protease nos cecos, em todos os níveis de substituição, pode ser consequência de maior deposição de tecido pancreático no mesentério que envolve este segmento. Além disso, é importante considerar que os fatores antinutricionais da soja (principalmente inibidores de tripsina) têm um efeito regulador sobre o pâncreas, estimulando-o a produzir maior quantidade de enzimas (GATLIN III et al., 2007; KROGDAHL et al., 2010; LILLEENG et al., 2007) de modo a compensar a redução / inibição na atividade enzimática por fatores antinutricionais relatada em estudos de avaliação da soja na alimentação de peixes (CHIKIWATI et al., 2013a; GU et al., 2014).

Apesar da diferença na atividade observada entre segmentos, não houve efeito das dietas na atividade da protease e da amilase nos cecos pilóricos. O efeito só foi observado na atividade da amilase do intestino anterior, que aparentemente respondeu ao teor de carboidratos (ENN, %) estimado para as dietas experimentais (Tabela 6).

No entanto, houve maior atividade lipolítica no intestino anterior de dourados submetidos aos três primeiros níveis de substituição. A maior atividade foi observada em níveis onde (comparativamente) houve menor inclusão de farelo de soja e maior inclusão de farinha de peixe, características importantes e que influenciaram na disponibilidade das fontes de lipídeos que compunham as dietas.

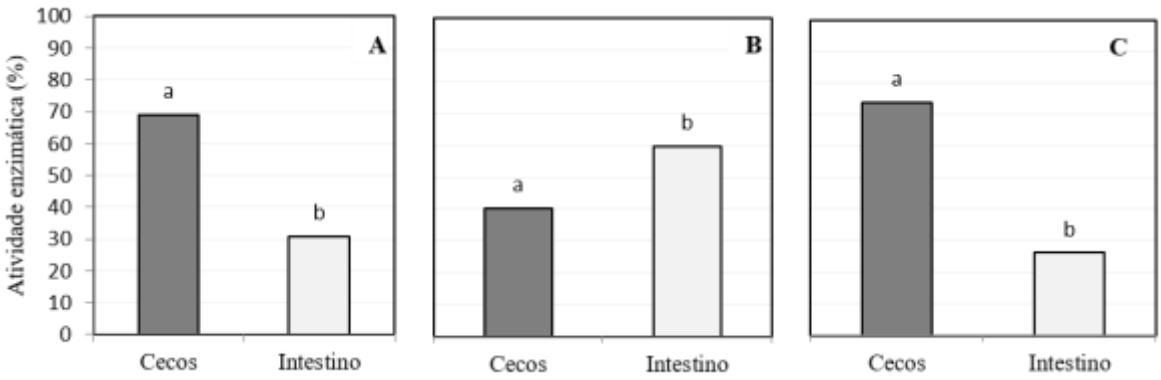


Figura 18 – Atividade relativa da protease inespecífica (A), lipase inespecífica (B) e amilase (C) por segmento do trato gastrointestinal de dourado. Letras indicam diferença estatística da atividade entre segmentos (Teste t, α = 0,05)

Tabela 17 – Atividade enzimática nos cecos pilóricos (CP), intestino anterior (IA) e total dos dois segmentos (T) de dourados por nível de substituição. Média de três peixes por unidade experimental (doze peixes por nível de substituição) e erro padrão. Letras indicam diferenças entre níveis (ANOVA, α = 0,05)

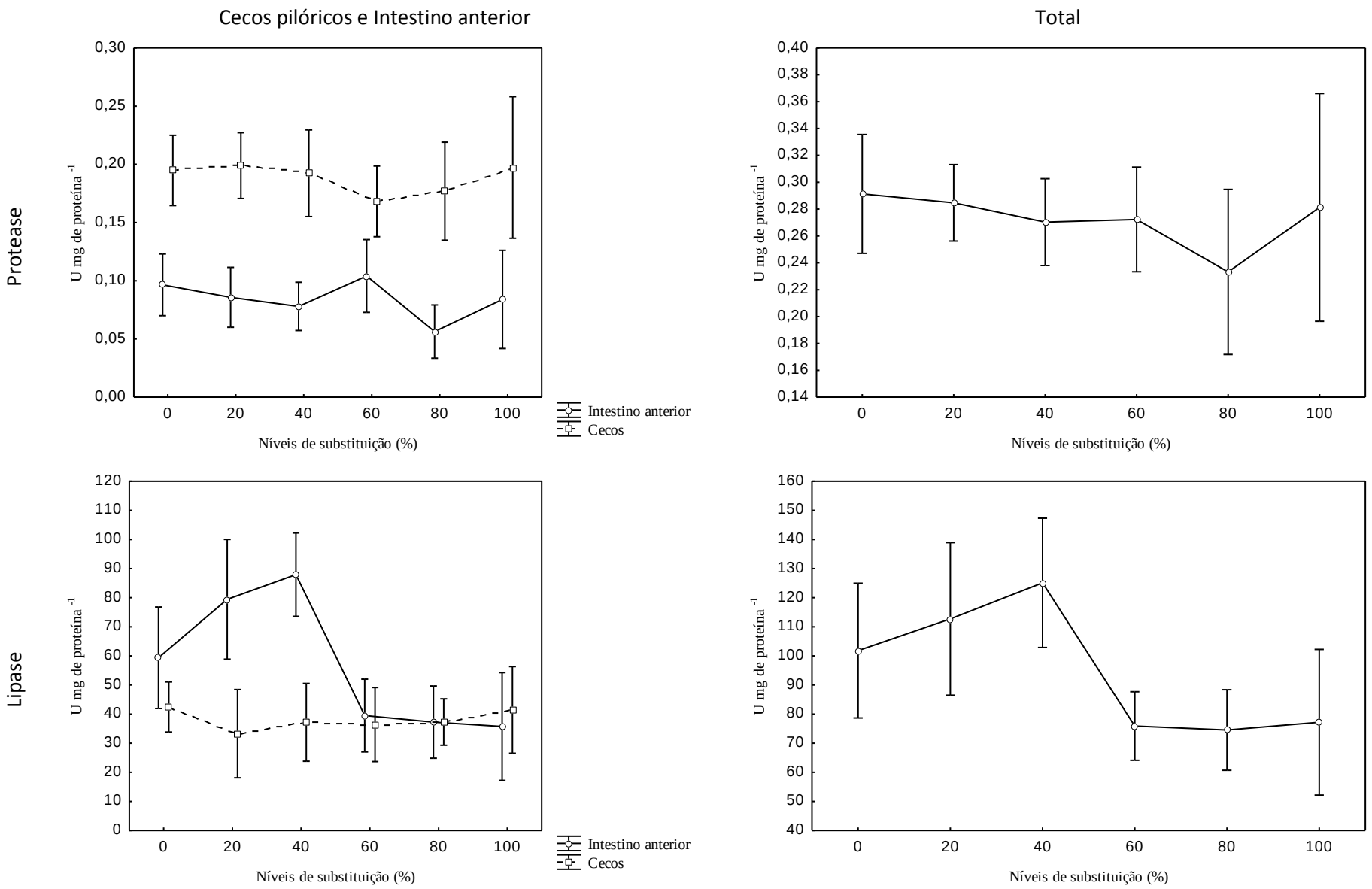
	Níveis de substituição (%)							
	0	20	40	60	80	100	Total	p
	Protease (U mg^{-1} de proteína)							
CP	0,19 (0,01)	0,19 (0,01)	0,19 (0,02)	0,17 (0,01)	0,18 (0,02)	0,19 (0,02)	0,19 (0,01)	0,7261
IA	0,09 (0,01)	0,08 (0,01)	0,08 (0,01)	0,10 (0,01)	0,06 (0,01)	0,08 (0,02)	0,08 (0,01)	0,1114
T	0,33 (0,03)	0,27 (0,02)	0,28 (0,02)	0,28 (0,01)	0,23 (0,04)	0,25 (0,04)	0,27 (0,01)	0,2133
	Lipase (U mg^{-1} de proteína)							
CP	42,45 (3,98)	33,27 (6,79)	37,18 (6,00)	36,41 (5,62)	37,28 (3,57)	41,45 (6,09)	38,03 (2,13)	0,8315
IA	59,36 [a] (8,07)	79,44 [a] (9,23)	87,91 [ac] (6,43)	39,50 [b] (5,52)	37,25 [b] (5,57)	35,75 [b] (7,56)	58,23 (3,89)	0,0000
T	120,41 [ab] (4,43)	122,61 [ab] (15,39)	133,37 [b] (12,58)	72,61 [ac] (8,83)	69,96 [c] (8,31)	79,46 [ac] (14,68)	103,17 (6,25)	0,0003
	Amilase (U mg^{-1} de proteína)							
CP	245,39 (19,79)	228,97 (13,50)	263,04 (26,31)	245,90 (23,72)	215,36 (21,67)	226,31 (15,68)	238,44 (8,57)	0,6604
IA	78,26 [abc] (10,30)	82,25 [abc] (13,37)	63,49 [abc] (8,81)	117,75 [b] (20,22)	58,61 [c] (11,18)	104,04 [abc] (17,83)	82,02 (5,84)	0,0281
T	304,01 (43,94)	338,17 (23,04)	317,45 (20,90)	374,94 (66,03)	275,17 (43,57)	308,05 (29,23)	315,04 (15,38)	0,6721

Analisando a atividade total (cecos + intestino anterior) da protease inespecífica, foi perceptível que quando o dourado foi submetido a dietas em cuja composição havia maior quantidade de FP e menor de FS, a atividade proteolítica foi maior, com exceção no nível 100 %, denotando que a substituição total da FP tem efeito deletério e tornam a proteína menos disponível para esta espécie (Figura 19).

A elevação na atividade proteolítica dos peixes alimentados com a dieta contendo 100 % CPS pode ser consequência da menor inclusão de FS na dieta formulada para o tratamento 100%, uma vez que ela quebra a sequência de inclusões crescentes deste ingrediente observada ao longo dos tratamentos. No entanto, também pode ser consequência da atividade simultânea de tripsinas não pancreáticas que naturalmente ocorrem em tecidos inflamados (LILEENG et al., 2007). Considerando-se que a mucosa intestinal de dourados alimentados com dietas contendo 100% CPS apresentou sinais característicos de enterite, este efeito também poderia estar relacionado.

A atividade da lipase mostra que a digestão da gordura foi em grande parte deslocada para o intestino anterior, indicando a menor disponibilidade deste nutriente. A possível ação de inibidores de lipase pode ter prejudicado a digestão da gordura. Murashita et al. (2013) relacionam a diminuição na produção de bile ao uso de dietas à base de soja, o que poderia interferir na digestão da gordura e reduzir o nível de colesterol no plasma. O colesterol, por sua vez, tem função importante na digestibilidade de lipídeos. São metabolizados no fígado em sais biliares, que ativam lipases e emulsificam a gordura formando micelas (TOCHER, 2003). Em geral, a digestibilidade da gordura é menor quanto maior for o uso de fontes vegetais e isso se deve à presença de saponinas, fibras, fitosteróis e fitoestrógenos (KROGDAHL et al., 2010).

A hidrólise de carboidratos foi mais intensa nos cecos pilóricos, provavelmente pela maior deposição de tecido pancreático nos tecidos que envolvem este segmento. A atividade total mostrou tendência a redução da atividade nos níveis mais altos de substituição, denotando a menor disponibilidade deste nutriente para a espécie.


Cecos pilóricos e Intestino anterior
Total
Protease
Lipase
U mg de proteína -1
Níveis de substituição (%)
Intestino anterior
Cecos

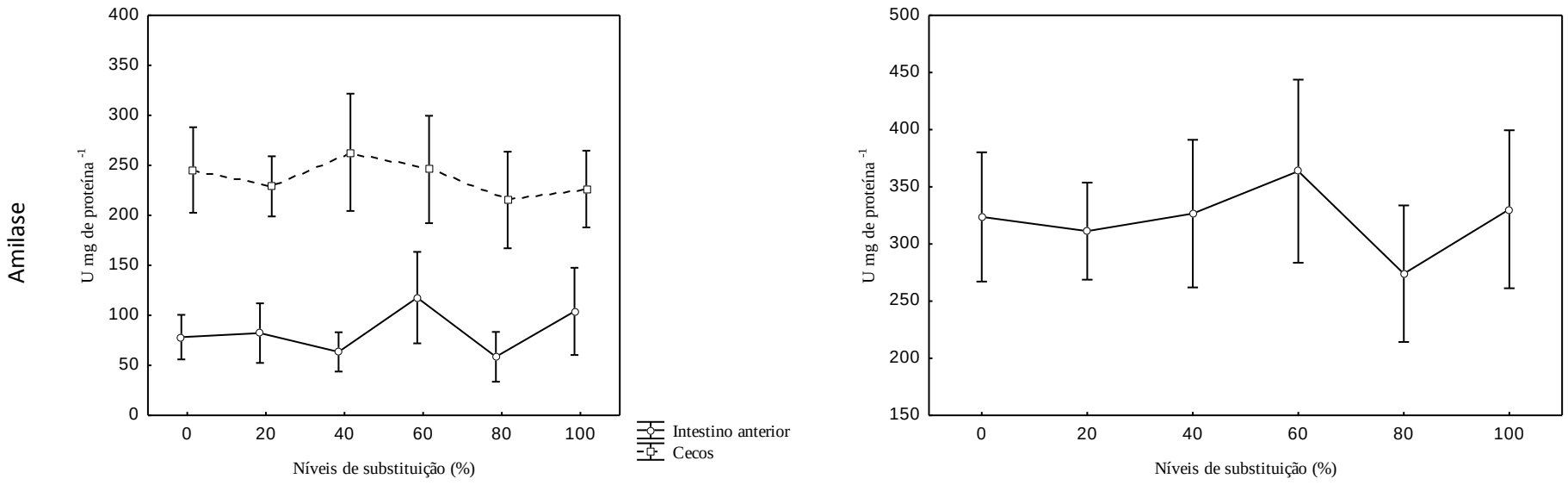


Figura 19 - Atividade da protease inespecífica, lipase inespecífica e amilase por nível de substituição nos cecos pilóricos, intestino anterior do dourado e o total da atividade nas duas estruturas. Barras indicam intervalo de confiança de 0,95

4.3.1.2 Histologia do intestino anterior de dourado

As medidas tomadas na parede do intestino anterior – altura e espessura da dobra, espessura da submucosa e espessura da muscular – possibilitaram mensurar o efeito da substituição da farinha de peixe pelo CPS na estrutura deste segmento. As dobras do intestino anterior do dourado são simples, desprovidas de ramificações, e apresentaram discreto espessamento da lâmina própria quando a dieta continha 100 % CPS, mas as diferenças foram, no entanto, não significativas (p = 0,3366).

A altura das dobras intestinais diminuiu com os crescentes níveis de substituição (p = 0,0133), ficando mais curtas nos peixes alimentados com dietas contendo 100% CPS. Em geral, fatores antinutricionais da soja aumentam o "turnover" de enterócitos nas dobras intestinais. Como consequência, a mucosa passa a ser formada predominantemente por células imaturas, menos eficientes nos processos digestivos e absortivos (CHIKIWATI et al., 2013).

A inclusão de CPS nas dietas não causou alterações na submucosa (p = 0,8961) ou na camada muscular (p = 0,1230), apesar da tendência a leve espessamento registrada. Em geral, altos níveis de inclusão de soja nas dietas para peixes carnívoros causam graves alterações na morfologia da mucosa (VAN DEN INGH et al., 1991; URAN et al., 2009; OSTASZEWSKA et al., 2005; VAN DER MAREL et al., 2014). A caracterização qualitativa através do score permitiu observar as alterações teciduais, visíveis principalmente no nível 100%, no entanto não houve efeito do tratamento sobre as características analisadas (p = 0,9252). A característica mais evidente foi o rompimento do epitélio no ápice das dobras intestinais, indicando que a lâmina própria foi fragilizada, o que provavelmente expôs o sistema a antígenos presentes no lúmen intestinal e que em condições normais, não são absorvidos.

Nas laterais das dobras foi registrada intensa proliferação celular e espessamento da submucosa, o que contribuiu para seu encurtamento (Figura 20). A redução de área do intestino pode ser interpretada como um mecanismo para conservação de energia quando o alimento não supre suas necessidades nutricionais, ou como estratégia para evitar a absorção de substâncias que teriam propriedades deletérias (GERMAN et al., 2010; REFSTIE et al., 2010).

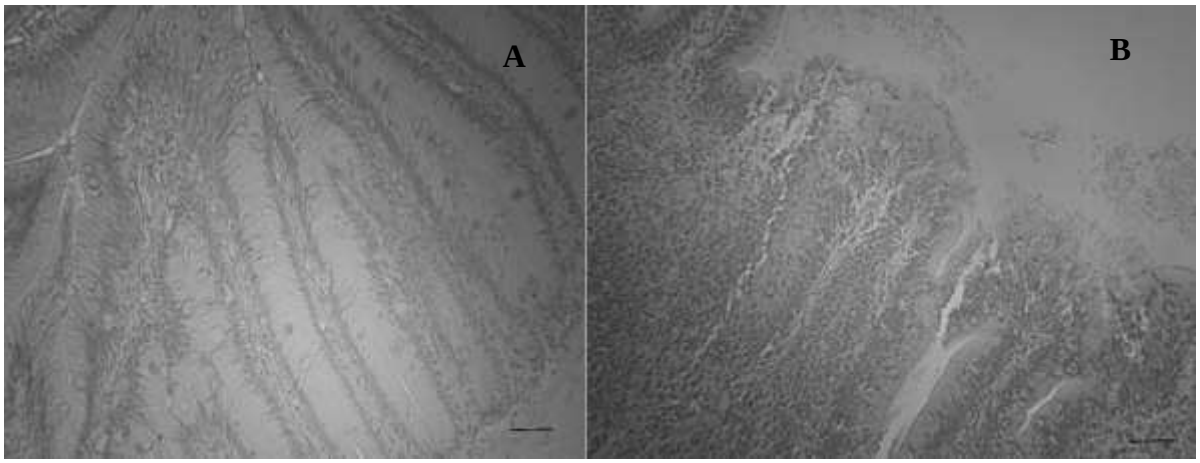


Figura 20 – Dobras intestinais de dourados submetidos aos níveis 0% (a) e 100% (b); H.E.; barra = 100 µm

No epitélio, os enterócitos apresentaram pequenos a médios vacúolos supranucleares, distribuídos no ápice das células, indicativos de baixa atividade absortiva. No entanto, não houve diferença na quantidade ou tamanho destes vacúolos entre os diferentes tratamentos que permitisse relacioná-los a efeitos no crescimento (Tabela 18). A frequência de ocorrência das células caliciformes não diferiu entre os tratamentos, mas tendeu a diminuir ao longo dos níveis 0 a 80 %. Nos peixes alimentados com a dieta 100 % CPS as células caliciformes se mostraram mais agrupadas, o que pode ser interpretado como efeito da intensa proliferação celular e apoptose de enterócitos que ocorreu nas dobras intestinais. Como células caliciformes têm ciclo mais longo que enterócitos, sua renovação é relativamente mais lenta, dando a falsa impressão de que também estão sofrendo intensa proliferação (CHIKIWATI et al., 2013).

Eventualmente foram observados eosinófilos distribuídos na submucosa e infiltrados na lâmina própria (Figura 21). A alta incidência destes leucócitos sinaliza a ocorrência de processos alérgicos ou parasitoses, no entanto, sua presença no intestino foi considerada normal, uma vez que o intestino exerce importante função imunológica (GOMEZ et al., 2013; ROTHENBERG et al., 2001) e também à não existência de um padrão histopatológico para o diagnóstico de processos inflamatórios no trato gastrointestinal de peixes, como já existente para mamíferos (DAY et al., 2008).

Todas as alterações registradas prejudicam processos de digestão e absorção de nutrientes. É provável que a combinação de efeitos de fatores antinutricionais tenha ocasionado a fragmentação da mucosa de dourados. Consequentemente, os animais ficaram

fragilizados e susceptíveis a doenças, uma vez que o rompimento da barreira intestinal viabiliza o acesso de bactérias potencialmente patogênicas (REFSTIE et al., 2006, URAN et al., 2009). A sobrevivência foi bastante reduzida no tratamento 100% CPS (Tabela 19), provável consequência das alterações registradas no intestino.

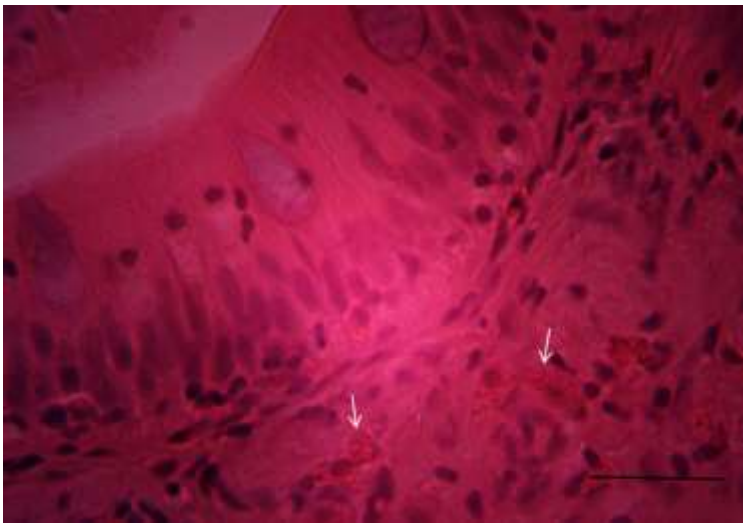


Figura 21 - Epitélio da mucosa intestinal de dourado com infiltrações de leucócitos eosinófilos (setas); H.E.; barra = 100 µm

Tabela 18 - Avaliação quantitativa e qualitativa da mucosa intestinal de dourados por níveis de substituição. Média de 12 peixes por tratamento e letras indicam diferenças entre níveis de substituição para cada variável (ANOVA, α = 0,05)

	Níveis de substituição (%)							
Medições (µm)	0	20	40	60	80	100	EP	p
Altura da dobra	678 [a]	645 [ab]	569 [ab]	589 [ab]	563 [ab]	530 [b]	13,17	0,0133
Espessura da dobra	73	55	82	50	48	69	4,95	0,3366
Sub mucosa	20	24	25	25	27	23	0,64	0,8961
Muscular	126	155	144	148	142	123	3,72	0,1230
Score semi qualitativo								
Dobras intestinais	1,50	2,50	2,00	1,50	1,75	2,50	0,15	0,1784
Vacúolos supranucleares	2,75	2,75	3,00	3,00	2,75	3,00	0,06	0,7006
Células caliciformes	2,50	2,25	1,50	1,75	1,50	2,25	0,15	0,2568
Infiltração de leucócitos	1,25	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,4457
Lâmina própria	1,75	2,50	2,00	1,75	2,00	2,25	0,11	0,3611
Submucosa	1,00	1,00	1,25	1,25	1,00	1,25	0,07	0,7006
Média do score	1,79	2,00	1,79	1,71	1,67	2,04	0,11	0,9252
Quantidade de células caliciformes	33,00	28,50	22,25	22,25	23,50	38,50	2,94	0,5513

4.4 Considerações sobre o uso do concentrado proteico de soja em rações para pacus e dourados

O concentrado proteico de soja é uma fonte de proteína vegetal que agrega características nutricionais desejáveis à formulação de rações de alta qualidade: tem alto teor proteico, perfil de aminoácidos semelhante ao de fontes animais e baixa concentração de fatores antinutricionais. Estas características contribuíram para os altos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e da energia estimados para os dois modelos utilizados neste estudo, que embora tenham hábitos alimentares diferentes, pertencem à mesma família.

Em formulações de dietas comerciais, de modo geral, a farinha de peixe (resíduo) é incluída nos níveis de 0 – 20 % para peixes onívoros e de 3 – 25 % para carnívoros (PASTORE et al., 2013). Neste estudo, optou-se por avaliar a substituição de 20 % de farinha de resíduo de salmão por CPS em dietas para as duas espécies. Nas dietas experimentais formuladas, foi utilizado apenas o farelo de soja e a farinha de peixe como base proteica para diminuir a interferência de fatores antinutricionais que normalmente estão presentes nas fontes vegetais.

Com base nas curvas de ganho de peso dos peixes submetidos aos diferentes tratamentos, infere-se que o CPS pode substituir até 78 % da farinha de peixe nas dietas para o pacu e até 37 % nas dietas para dourado. Acima destes níveis houve redução no crescimento, causado pela presença de fatores antinutricionais que prejudicaram a disponibilidade da proteína dietética e promoveram alterações na mucosa intestinal interferindo em sua homeostase. Como a proteína da soja é deficiente em metionina e grande parte da lisina torna-se indisponível quando exposta a altas temperaturas (reação de Maillard), a suplementação com aminoácidos ou mesmo a mistura com fontes animais (não necessariamente a farinha de peixe) ou com outras fontes vegetais são estratégias que podem corrigir esta deficiência de forma eficiente, e até mesmo contribuir para melhorar a palatabilidade da dieta (NRC, 2011).

Mesmo concentrados proteicos que têm baixo teor destes fatores, podem causar este efeito, principalmente em peixes carnívoros (VAN DEN INGH et al., 1991). Em salmonídeos, a redução no crescimento ocorre principalmente devido ao impacto que as fontes vegetais causam na integridade da mucosa intestinal (ESPE et al., 2006). A inativação completa destes fatores exigiria um intenso processamento que poderia prejudicar a qualidade da proteína

(FRIEDMAN; BRANDON 2001). Desta forma, é importante avaliar níveis de inclusão adequados às espécies de interesse, uma vez que o grau de resistência aos fatores antinutricionais da soja é espécie-específico. Peixes carnívoros são mais sensíveis que onívoros e normalmente desenvolvem enterite no intestino distal, onde a taxa de renovação celular é mais baixa que nos demais segmentos, permitindo que o tecido danificado por fatores antinutricionais da soja permaneça exposto por maior tempo. Mesmo assim, alterações na mucosa também podem ocorrer em outros segmentos do intestino. Salmões e trutas, por exemplo, são modelos muito utilizados em estudos de substituição da farinha de peixe por fontes vegetais, capazes de expressar estes efeitos mesmo com níveis de inclusão considerados baixos (10% da dieta).

Pacus e dourados sofreram redução na altura das dobras intestinais à medida que os níveis de substituição foram aumentando, sobretudo quando alimentados com a dieta 100 % CPS: além da consequente redução na área de superfície da mucosa, também foi registrada fragmentação do epitélio que reveste o ápice das dobras intestinais. Esta fragmentação pode estar relacionada a um aumento na apoptose de enterócitos e a ação de proteases (tripsina não pancreática) da parede intestinal, que são ativadas pelas proteases pancreáticas quando a mucosa intestinal está danificada (CHIKWATI et al., 2013; LILLEENG et al., 2007). Apesar de visível, não foi possível mensurar esta alteração através do score qualitativo utilizado, em função da grande variação registrada nos diferentes tratamentos. De todos os segmentos do intestino, o anterior é aquele que apresenta mais alta taxa de renovação celular, o que pode ter contribuído para a grande variação registrada, sendo importante, em estudos posteriores, também analisar o segmento distal, onde provavelmente as alterações serão mais constantes. É possível que as alterações na estrutura da mucosa intestinal das duas espécies tenham sido causadas pela ação combinada de mais de um fator antinutricional, presentes nos derivados de soja utilizados nas formulações, principalmente inibidores de proteases (tripsina, lipase e amilase) que estão mais concentrados no CPS.

Pacus apresentaram maior atividade da lipase inespecífica e amilase; enquanto dourados apresentaram maior atividade da protease inespecífica (Figura 22). Ao longo de sua história evolutiva, carnívoros desenvolveram a habilidade de produzir enzimas endógenas que lhes permitiram digerir com eficiência fontes proteicas animais (base de sua alimentação natural) e perderam a capacidade de regulação fenotípica que lhes permitiria ativar maior número de transportadores de glucose; consequentemente, têm pouca habilidade em digerir / absorver carboidratos (KARASOV et al., 2011; KARASOV; DIAMOND, 1988).

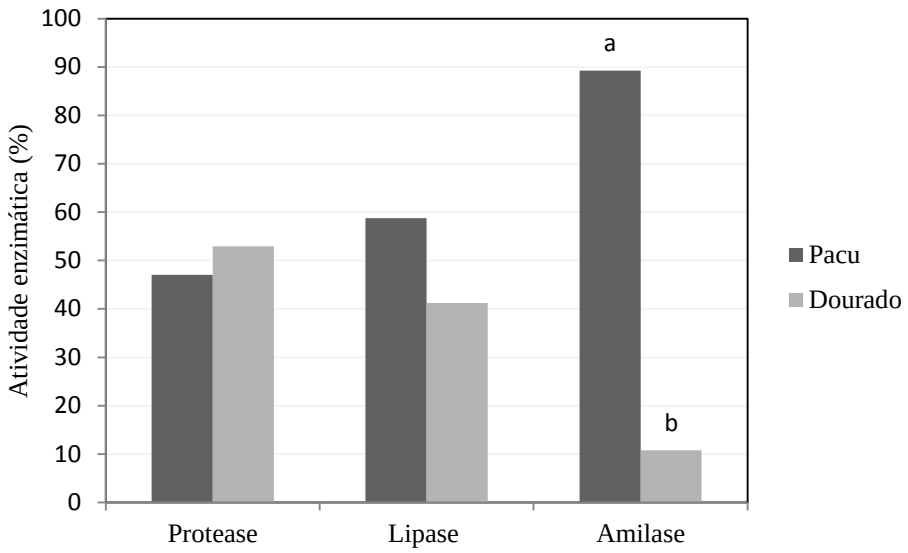


Figura 22 - Atividade enzimática relativa de protease inespecífica, lipase inespecífica e amilase nos dois segmentos do trato gastrointestinal (cecos pilóricos + intestino anterior) de pacus e dourados. Letras representam diferença estatística entre espécies (Teste t, α = 0,05)

Peixes onívoros, por sua vez, aproveitam carboidratos e gorduras como fonte de energia, poupando a proteína, cuja utilização é priorizada ao crescimento. Isso ficou evidente no perfil enzimático do pacu que, contrariamente ao dourado, consegue modular a atividade de suas enzimas endógenas à dieta.

Apesar da diferença numérica registrada entre a atividade da protease inespecífica de pacus e dourados, não foram detectadas diferenças significativas e isto denota o fato de que, independente de hábito alimentar, a proteína constitui um nutriente fundamental para qualquer organismo (KARASOV et al., 2011). No entanto, pacus conseguiram utilizar a proteína de forma mais eficiente, mesmo quando as inclusões de CPS foram mais altas.

5 CONCLUSÕES

Pacus mostraram ter maior plasticidade para digerir e absorver os nutrientes disponíveis no concentrado proteico de soja, que pôde substituir até 78 % da farinha de peixe nas dietas experimentais sem prejudicar o ganho de peso da espécie. Dourados não conseguiram hidrolisar os nutrientes da digesta com tanta eficiência quanto o pacu, sendo possível substituir até 37 % da farinha de peixe nas dietas. Inclusões superiores a estes níveis ocasionaram redução de crescimento para as duas espécies. Pacus e dourados apresentaram alterações na mucosa intestinal quando a substituição foi total (nível 100%), sofrendo redução na altura das dobras intestinais, o que pode ter prejudicado a digestão / absorção dos nutrientes e refletido em menor crescimento. Estas alterações podem ter sido efeito da ação conjunta de mais de um fator antinutricional (principalmente os de natureza proteica), potencializados pela ausência da farinha de peixe nas dietas. Com base nos resultados obtidos, é recomendada a substituição apenas parcial da farinha de peixe pelo CPS tanto em dietas para pacus quanto para dourados.

REFERÊNCIAS

ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração proteica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 5, p. 1101-1109, 2004.

ABIMORAD, E.G.; SQUASSONI, G.H.; CARNEIRO, D.J. Apparent digestibility of protein, energy, and amino acids in some selected feed ingredients for pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, p. 374-380, 2008.

ALMEIDA, L.C.; LUNDSTEDT, L.M.; MORAES, G. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 12, p. 443-450, 2006.

ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. **The Journal of General Physiology**, New York, v. 22, n. 1, p. 79-87, 1938.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** 17th ed. Gaithersburg, 2000. 1141 p.

BAEVERFJORD, G.; KROGDAHL, A. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 19, p. 375-387, 1996.

BAKER, D.H.; BATAL, A.B.; PARR, T.M.; AUGSPURGER, N.R.; PARSONS, C.M. Ideal ratio (relative to lysine) of tryptophan, threonine, isoleucine, and valine for chicks during the second and third weeks post hatch. **Poultry Science**, Oxford, v. 81, n. 4, p. 485–494, 2002.

BAKKE, A.M.; GLOVER, C.; KROGDAHL, A. Feeding, digestion and absorption of nutrients. In: GROSELL, M.; FARRELL, A.P.; BRAUNER, C.J. **The multifunctional gut of fish**. London: Elsevier, 2010. p. 57-110.

BAKKE, A.M.; CHIKWATI, E.M.; VENOLD, F.F.; SAHLMANN, C.; HOLM, H.; PENN, M.; OROPEZA-MOE, M.; KROGDAHL, A. Bile enhances glucose uptake reduces permeability, and modulates effects of lectins, trypsin inhibitors and saponins on intestinal tissue. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A**, Philadelphia, v. 168, p. 96-109, 2014.

BANSEMER, M.S.; FORDER, R.E.A.; HOWARTH, G.S.; SUITOR, G.M.; BOWYER, J.; STONE, D.A.J. The effect of dietary soybean meal and soy protein concentrate on the intestinal mucus layer and development of subacute enteritis in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at suboptimal water temperature. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 1-11, 2015.

BERGE, G.M.; GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S.J. Soy protein concentrate in diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 178, n. 1/2, p. 139–148, 1999.

BICUDO, A.J.A.; ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Exigências nutricionais e alimentação do pacu. In: FRACALOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. **Nutriaqua:** nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013. p. 217-230.

BOONYARATPALIN, M.; SURANEIRANAT, P.; TUNPIBAL, T. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, p. 67-78, 1998.

BORGHESI, R.; DAIKIRI, J.K.; CYRINO, J.E.P. Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for dourado *Salminus brasiliensis*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, p. 453-458, 2009.

BOWYER, J.N.; QIN, J.G.; SMULLEN, R.P.; ADAMS, L.R.; THOMSON, M.J.S.; STONE, D.A.J. The use of a soy product in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) feeds at different water temperatures: 1. Solvent extracted soybean meal. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 384/387, p. 35-45, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, L.G.; BORGHESI, R.; CYRINO, J.E.P. Apparent digestibility of ingredientes in diets for *Salminus brasiliensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 271-274, 2008.

BUTOLO, J.E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal.** 2. ed. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2010. 430 p.

CAI, C.F.; WANG, W.J.; YE, Y.T.; KROGDAHL, A.; WANG, Y.L.; XIA, Y.M. Effect of soybean meal, raffinose and stachyose on the growth, body composition, intestinal morphology and intestinal microflora of juvenile allogynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*♀ x *Cyprinus carpio*♂). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 43, p. 128-138, 2012.

CAO, X.J.; WANG, W.M. Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. **Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 38, p. 254-261, 2009.

CARVALHO, M.R.B.; STECH, M.R. Avaliação da composição centesimal e das atividades dos fatores antinutricionais em diferentes cultivares de soja. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, n. esp., p. 139–145, 1997.

CASTRO, C.; PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; COUTINHO,F.; POUSÃO-FERREIRA, P.; BRANDÃO, T.M.; OLIVA-TELES, A.; PERES, H. Digestive enzymes of meagre (*Argyrosomus regius*) and white seabream (*Diplodus sargus*): effects of dietary brewer's spent yeast supplementation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 416/417, p. 322-327, 2013.

CATACUTAN, M.R.; PAGADOR, G.E. Partial replacement of fishmeal by defatted soybean meal in formulated diets for the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal 1775). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 299–306, 2004.

CHIKWATI, E.M.; GU, J.; PENN, M.H.; BAKKE, A.M.; KROGDAHL, Å. Intestinal epithelial cell proliferation and migration in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: effects of temperature and inflammation. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 353, n. 1, p. 123–137, 2013.

CHIKWATI, E.M.; SAHLMANN, C.; HOLM, H.; PENN, M.H.; KROGDAHL, A.; BAKKE, A.M. Alterations in digestive enzyme activities during the development of diet-induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 402/403, p. 28-37, 2013.

CHOWDHURY, M.A.K.; TACON, A.G.J.; BUREAU, D.P. Digestibility of amino acids in Indian mustard protein concentrate and Indian mustard meal compared to that of a soy protein concentrate in rainbow trout an Atlantic salmon. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 356/357, p. 128-134, 2012.

COUTO, A.; KORTNER, T.M.; PENN, M.; BAKKE, A.M. Effects of dietary soy saponins and phytosterols on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during the on-growing period. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 198, p. 203-214, 2014.

COUTO, A.; KORTNER, T.M.; PENN, M.; BAKKE, A.M.; KROGDAHL, A.; OLIVA-TELES, A. Dietary saponins and phytosterols do not affect growth, intestinal morphology and immune response of on-growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 180-193, 2015.

DAY, M.J.; BILZER, T.; MANSELL, J.; WILCOCK, B.; HALL, E.J.; JERGENS, A.; MINAMI, T.; WILLARD, M.; WASHABAU, R. Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. **Journal of Comparative Pathology**, Philadelphia, v. 138, suppl. 1, p. 1–43, 2008.

DAYRIKI, J.K. **Exigência em aminoácidos e farelo de soja na nutrição de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier 1816).** 2009. 137 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) -– Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D.L.; SPRING, P.; SWEETMAN, J.; MOATE, R.; DAVIES, S.J. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 300, p. 182-188, 2010.

DUMAS, A.; DE LANGE, C.F.M.; FRANCE, J.; BUREAU, D.P. Quantitative description of body composition and rates of nutrient deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 273, n. 1, p. 165–181, 2007.

ESCAFFRE, A.M.; KAUSHIK, S.; MAMBRINI, M. Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 273, p. 127-138, 2007.

ESPE, M.; LEMME, A.; PETRI, A.; EL-MOWAFI, A. Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, p. 255-262, 2006.

FAO. **Food outlook:** biannual report on global food markets. Rome, 2015. 142 p.

FERNANDES, J.B.K.; CARNEIRO, D.J.; SAKOMURA, N.K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 617-626, 2001.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v.199, p. 197–227, 2001.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources: a review. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 1996, p. 6–29, 1996.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D.L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 3, p. 1069-1086, 2001.

FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; PEZZATO, A.C.; BARROS, M.M.; MIRANDA, E.C. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 1143–1149, 2001.

GATLIN III, D.M.; BARROWS, F.T.; BROWN, P.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, T.G.; HARDY, R.W.; HERMAN, E.; HU, G.; KROGDAHL, A.; NELSON, R.; OVERTURF, K.; RUST, M.; SEALEY, W.; SKONBERG, D.; SOUZA, E.J.; STONE, D.; WILSON, R.; WURTELE, E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 38, p. 551-579, 2007.

GERMAN, D.P. Digestive efficiency. In: FARRELL, A.P. **Encyclopedia of fish physiology:** from genome to environment. San Diego: Academic Press, 2011. v. 3, p. 1596–1607.

GERMAN, D.P.; NEUBERGER, D.; CALLAHAN, M.N.; LIZARDO, N.R.; EVANS, D.H. Feast to famine: the effects of food quality and quantity on the gut structure and function of a detritivorous catfish (Teleostei: Loricariidae). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A**, Philadelphia, v. 155, p. 281-293, 2010.

GODA, A.M.; EL-HAROUN, E.R.; CHOWDHURY, M.A. Effect of totally or partially replacing fish meal by alternative protein sources on growth of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) reared in concrete tanks. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 38, p. 279-287, 2007.

GOMEZ, D.; SUNYER, J.O.; SALINAS, I. The mucosal imune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 1-11, 2013.

GONÇALVES, E.G.; CARNEIRO, D.J. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia de alguns ingredientes utilizados em dietas para pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n.4, p.779–786, 2003.

GONÇALVES, L.U.; RODRIGUES, A.P.O.; MORO, G.V.; CARGNIN-FERREIRA, E.; CYRINO, J.E.P. Morfologia e fisiologia do sistema digestório de peixes. In: FRACALOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. **Nutriaqua:** nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013. p. 9–36.

GREEN, T.J.; SMULLEN, R.; BARNES, A.C. Dietary soybean protein concentrate-induced intestinal disorder in marine farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* is associated with alterations in gut microbiota. **Veterinary Microbiology**, Philadelphia, v. 166, n. 1/2, p. 286-292, 2013.

GU, M.; KORTNER, T.M.; PENN, M.; HANSEN, A.K.; KROGDAHL, A. Effect of dietary plant meal and soya-saponin supplementation on intestinal and hepatic lipid droplet accumulation and lipoprotein and sterol metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 111, p. 432-444, 2014.

GU, M.; PENN, M.; BAKKE, A.M.; LEIN, I.; KROGDAHL, A. Effects of diet supplementation of soya-saponins, isoflavones and phytosterols on Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) fry fed from start-feeding. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 604-613, 2015.

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

HART, S.D.; BHARADWAJ, A.S.; BROWN, P.B. Soybean lectins and trypsin inhibitors, but not oligosaccharides or the interactions of factors, impact weight gain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 306, p. 310-314, 2010.

HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes.** Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 388 p.

HIDALGO, M.C.; SANZ, E.U.A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits: proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 170, p. 267-283, 1999.

HUA, K.; BUREAU, D. Exploring the possibility of quantifying the effects of plant protein ingredients in fish feeds using meta-analysis and nutritional model simulation-based approaches. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 356/357, p. 284-301, 2012.

JHAVERI, P.; PAPASTAMATIOU, Y.P.; GERMAN, D.P. Digestive enzyme activities in the guts of bonnethead sharks (*Sphyrna tiburo*) provide insight into their digestive strategy and evidence for microbial digestion in their hindguts. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 189, p. 76–83, 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643315002019>. Acesso em: 17 set. 2015.

KARASOV, W.H.; DIAMOND, J.M. Interplay between physiology and ecology in digestion. **BioScience**, Tampa, v. 38, n. 9, p. 602–611, 1988.

KARASOV, W.H.; MARTÍNEZ DEL RIO, C.; CAVIEDES-VIDAL, E. Ecological physiology of diet and digestive systems. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 73, p. 69–93, 2011.

KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e biologia cellular:** uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 654 p.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 173, p. 111-133, 2012.

KNUDSEN, D.; JUTFELT, F.; SUNDH, H.; SUNDELL, K.; KOPPE, W. Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soybean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 100, p. 120-129, 2008.

KORTNER, T.M.; BJORKHEM, I.; KRASNOV, A.; TIMMERSHAUS, G.; KROGDAHL, A. Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 111, p. 2089-2103, 2014.

KROGDAHL, Å.; LEA, T.B.; OLLI, J.J. Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: physiology**, Philadelphia, v. 107, n. 1, p. 215–219, 1994.

KROGDAHL, A.; SUNDBY, A.; HOLM, H. Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*): enzyme pH optima, chime pH and enzyme activities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 449, n. 1, p. 27-36, Mar. 2015.

KROGDAHL, A.; PENN, M.; THORSEN, J.; REFSTIE, S.; BAKKE, A.M. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, p. 333-344, 2010.

KROGDAHL, A.; GAJARDO, K.; KORTNER, T.M.; PENN, M.; GU, M.; BERGE, G.M.; BAKKE, A.M. Soya saponins induce enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 15, p. 3887-3902, Mar. 2015.

KUZ'MINA, V.V.; GELMAN, A.G. Membrane-linked digestion in fish. **Reviews in Fisheries Science**, Texas, v. 5, n. 2, p. 99–129, 1997.

LILLEENG, E.; FROYSTAD, M.K.; OSTBY, G.C.; VALEN, E.C.; KROGDAHL, A. Effects of diets containing soybean meal on trypsin mRNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A**, Philadelphia, v. 147, p. 25-36, 2007.

LIMA, C.A.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui:** ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: Sociedade Civil Mamirauá, 1998. 186 p.

LUSAS, E.W.; RHEE, E.K.C. Soy protein processing and utilization. In: ERICKSON, D.R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. St. Louis: AOCS, 1995. p. 117-160.

MÉDALE, F.; BOUJARD, T.; VALLÉE, F.; BLANC, D.; MAMBRINI, M.; ROEM, A.; KAUSHIK, S. Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. **Aquatic Living Resources**, Cambridge, v. 11, n. 4, p. 239-246, 1998.

MIRANDE, J.M. Weighed parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, Hoboken, v. 25, p. 574–613, 2009.

MORAES, G.; ALMEIDA, L.C. Nutrição e aspectos funcionais da digestão de peixes. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 2014. p. 233–252.

MURASHITA, K.; AKIMOTO, A.; IWASHITA, Y.; AMANO, S.; SUZUKI, N.; MATSUNARI, H.; FURUITA, H.; SUGITA, T.; YAMAMOTO, T. Effects of biotechnologically processed soybean meals in a non-fish meal diet on growth performance, bile acid status, and morphological condition of the distal intestine and liver of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science**, Heidelberg, v. 79, p. 447-457, 2013.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce:** desenvolvimento e manual de identificação. Disponível em: <http://livros.nupelia.uem.br/ovos-e-larvas/pdf/11_salminus_brasiliensis.PDF>. Acesso em: 08 jan. 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutritional requirements of fishes.** Washington: Academic Press, 2011. 376 p.

NAYAK, S.K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, p. 1553-1573, 2010.

NORDI, W.M. **Desenvolvimento dos tecidos entérico, hepático e muscular de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) e dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier 1816) alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado.** 2015. 125 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

OLLI, J.J.; HJELMELAND, K.; KROGDAHL, A. Soybean trypsin inhibitors in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L): effects on nutrient digestibilities and trypsin in pyloric caeca homogenate and intestinal content. **Comparative Biochemistry Physiology**. Part A, Philadelphia, v. 109A, n. 4, p. 923-928, 1994.

OLSEN, R.E.; HANSEN, A.C.; ROSENLUND, G.; HEMRE, G.I.; MAYHEW, T.M.; KNUDSEN, D.L.; EROLDOGAN, O.T.; MYKLEBUST, R.; KARLSEN, O. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). II – Health aspects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 272, n. 612/624, p. 612-624, 2007.

OSTASZEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; PALACIOS, M.E.; OLEJNICZAK, M.; WIECZOREK, M. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 245, p. 273-286, 2005.

PASTORE, S.C.G.; GAIOTTO, J.R.; RIBEIRO, F.A.S.; NUNES, A.J.P. Formulação de rações e boas práticas de fabricação. In: FRACALOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. **Nutriaqua:** nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013. p. 295-346.

PERKINS, E.G. Composition of soybeans and soybean products. In: ERICKSON, D.R. **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Illinois: AOACS Press; United Soybean Board, 1995. p. 9-28.

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

PORTZ, L.; CYRINO, J.E.P. Digestibility of nutrients and amino acids of different protein sources in practical diets by largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepéde, 1802). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, p. 312-320, 2004.

REFSTIE, S.; SVIHUS, B.; SHEARER, K.D.; STOREBAKKEN, T. Nutrient digestibility in Atlantic salmon and broiler chickens related to viscosity and non-starch polysaccharide content in different soyabean products. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 331–345, 1999.

REFSTIE, S.; LANDSVERK, T.; BAKKE-MCKELLEP, A.M.; RINGO, E.; SUNDBY, A.; SHEARER, K.D.; KROGDAHL, A. Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard or bioprocessed soybean meal. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 261, p. 269-284, 2006.

REGITANO D'ARCE, M.A.B. Produtos proteicos de soja. In: OETTERER, M.; REGITANO D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. p. 355-402.

RINGO, E.; LOVMO, L.; KRISTIANSEN, M.; BAKKEN, Y.; SALINAS, I.; MYKLEBUST, R.; OLSEN, R.E.; MAYHEW, T.M. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, p. 451-467, 2010.

RODRIGUES, S.S.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestivo de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 2, p. 65–75, 2008.

RODRIGUES-OLARTE, D.; TAPHORN, D.C.B. Abundance, feeding and reproduction of *Salminus* sp. (Pisces: Characidae) from mountain streams of the Andean piedmont in Venezuela. **Neotropical Ichtyology**, Maringá, v. 4, n. 1, p. 73–79, 2006.

ROMERO, J.; RINGO, E.; MERRIFIELD, D.L. The gut microbiota of fish. In: MERRIFIELD, D.; RINGO, E. **Aquaculture nutrition:** health, probiotics, and prebiotics. Oxford: Willey Blackwell, 2014. p. 75–100.

ROTHENBERG, M.E.; MISHRA, A.; BRANDT, E.B.; HOGAN, S.P. Gastrointestinal eosinophils. **Immunological Reviews**, Hoboken, v. 179, p. 139-155, 2001.

SALZE, G.; MCLEAN, E.; BATTLE, P.R.; SCHWARZ, M.H.; CRAIG, S.R. Use of soy protein concentrate an novel ingredients in the total elimination of fish meal an fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 298, p. 294-299, 2010.

SANTIGOSA, E.; SÁNCHEZ, J.; MÉDALE, F.; KAUSHIK, S.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J.; GALLARDO, M.A. Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 282, p. 68-74, 2008.

SILVA, F.C.P.; NICOLI, J.R.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; LE GALL, M.M.; KAUSHIK, S.; GATESOUPE, F.J. Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 306, p. 233-237, 2010.

SINGH, P.; KUMAR, R.; SABAPATHY, S.N.; BAWA, A.S. Functional and edible uses of soy protein products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Hoboken, v. 7, p. 14-28, 2008.

SORENSEN, M.; PENN, M.; EL-MOWAFI, A.; STOREBAKKEN, T.; CHUNFANG, C.; OVERLAND, M.; KROGDAHL, A. Effects of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes, gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 314, p. 145-152, 2011.

STECH, M.R.; CARNEIRO, D.J. Processed soybean in diets for pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 37, n. 1, p. 1-8, 2015.

STECH, M.R.; CARNEIRO, D.J.; CARVALHO, M.R.B. Fatores antinutricionais e coeficientes de digestibilidade aparente da proteína de produtos de soja para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 255-262, 2010.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Relação hepatosomática e esplenosomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 273-281, 2000.

THOMPSON, K.R.; VELASQUEZ, A.; PATTERSON, J.; METTS, L.S.; WEBSTER, C.D.; BRADY, Y.J.; GANNAM, A.L.; TWIBELL, R.G; OSTRAND, S.L. Evaluation of plant and animal protein sources as partial or total replacement of fish meal in diets for Nile tilapia fry and juvenile stages. **North American Journal of Aquaculture**, London, v. 74, n. 3, p. 365-375, 2012.

TOCHER, D.R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science**, Texas, v. 11, p. 107–184, May 2003.

UGOLEV, A.M.; LAEY, P. A concept of enzymic hydrolysis on cell membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 300, p. 105-128, 1973.

URÁN, P.A.; AYDIN, R.; SCHRAMA, J.W.; VERRETH, J.A.J.; ROMBOUT, J.H.W.M. Soybean meal-induced uptake block in Atlantic salmon *Salmo salar* distal enterocytes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 73, n. 10, p. 2571–2579, 2008.

URÁN, P.A.; SCHRAMA, J.W.; ROMBOUT, J.H.W.M.; TAVERNE-THIELE, J.J.; OBACH, A.; KOPPE, W.; VARRETH, J.A.J. Time-related changes of the intestinal morphology of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 32, p. 733-744, 2009.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: Ed. UFSM, 2005. p. 225–256.

VAN DEN INGH, T.S.G.A.M.; KROGDAHL, Å.; OLLI, J.J.; HENDRIKS, H.G.C.J.M.; KONINKX, J.G.J.F. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 297–305, May 1991. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0044848691901746>. Acesso em: 28 set. 2015.

VAN DEN INGH, T.S.G.A.M.; OLLI, J.J.; KROGDAHL, A. Alcohol-soluble components in soybeans cause morphological changes in the distal intestine of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 19, p. 47-53, 1996.

VAN DER MAREL, M.; PROPSTING, M.J.; BATTERMANN, F.; JUNG-SCHROERS, V.; HUBNER, A.; ROMBOUT, J.H.W.M.; STEINHAGEN, D. Differences between intestinal segments and soybean meal induced changes in intestinal mucus composition of common carp *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 20, p. 12-24, 2014.

VAN DER MEER, M.B.; FABER, R.; ZAMORA, J.E.; VERDEGEM, M.C.J. Effect of feeding level on feed losses and feed utilization of soya and fish meal diets in *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, p. 391-403, 1997.

VEGA-ORELLANA, O.M. **Larvicultura do dourado (*Salminus brasiliensis*):** desenvolvimento ontogenético de proteinases digestórias e transição alimentar. 2003. 69 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

VIOLA, S.; LAHAV, E.; ARIELI, Y. Response of Israeli carp, *Cyprinus carpio* L., to lysine supplementation of a practical ration at varying conditions of fish size, temperature, density and ration size. **Aquaculture and Fisheries Management**, Hoboken, v. 23, p. 49–58, 1992.

VIOLA, S.; MOKADY, S.; RAPPAPORT, U.; ARIELI, Y. Partial and complete replacement of fishmeal by soybean meal in feeds for intensive culture of carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 26, n. 3/4, p. 223–236, 1982.

WALTER, H.E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as subtracts. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1984. v. 5, p. 270-277.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Dourado. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: Ed. UFSM, 2005. p. 257-286.

YAN, B.M.; SHAFFER, E.A. Primary eosinophilic disorders of the gastrointestinal tract. **Gut**, London, v. 58, p. 721-732, 2009.