Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Alterações histológicas do epitélio intestinal de juvenis de dourado *Salminus
brasiliensis* alimentados com dietas contendo fontes proteicas vegetais

Thaline Maira Pachelli da Cruz

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

Piracicaba
2017

Thaline Maira Pachelli da Cruz
Zootecnista

Alterações histológicas do epitélio intestinal de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis*
alimentados com dietas contendo fontes proteicas vegetais

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

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

Piracicaba
2017

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

Cruz, Thaline Maira Pachelli da

Alterações histológicas no epitélio intestinal de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* alimentados com dietas contendo fontes proteicas vegetais / Thaline Maira Pachelli da Cruz. - - Piracicaba, 2017.

67 p.

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

1. Farelo de algodão 2. Farelo de amendoim 3. Dourado 4. Histologia intestinal 5. Células caliciformes 6. Enterite I. Título

DEDICATÓRIA

À meu filho Arthur Henrique Pachelli Araújo.

In memoriam Carlos Roberto Pachelli.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela oportunidade e por toda a graça alcançada em minha vida.

Aos meus pais, **Ananias e Crédice** e aos meus irmãos, **Thatiane e Thiago** pelo amor incondicional e apoio.

Ao meu filho **Arthur Henrique**, que reluziu a minha vida e me transcendeu forças para continuar a prosperar e realizar os meus sonhos. Te amo!

A minha madrinha **Luzia** pelo carinho;

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jose Eurico Possebon Cyrino**, por todos os conselhos, apoios, críticas e aprendizados que levarei comigo.

Aos funcionários do setor de piscicultura, **Sérgio Wanderlei Pena e Ismael Baldessin Junior** pelo apoio, força e amizade.

Aos meus amigos do Setor de Piscicultura **Roselany, Fredy, João Fernando, Thiago, Rafael Barone, Rafael Sabione e Evandro** pelo aprendizado em equipe.

Aos amigos do LAFA, **Marcelo, Gean, Giuliana, Patrícia, Debora, Wiole, Jessica e Mariana** pela amizade.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (**NAP/MEPA**) da ESALQ/USP pelo auxílio e disponibilidade para realização da microscopia eletrônica de varredura.

A **CAPES** pela concessão de bolsa de estudos nos primeiros meses do meu programa.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de bolsa de estudos e apoio à pesquisa, processo 2014/15618-2.

A **todos** meu MUITO OBRIGADA!

EPÍGRAFE

“ A maior recompensa pelo esforço de uma pessoa não é o que ela ganha com isso, mas o que ela se torna através dele”

John Rushing

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. O DOURADO <i>SALMINUS BRASILIENSIS</i> CUVIER, 1817	13
2.2. MORFOLOGIA, HISTOLOGIA E FISILOGIA DO SEGMENTO INTESTINAL.....	14
2.3. A PROTEÍNA NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES CARNÍVOROS.....	16
2.4. FONTES DE PROTEÍNA NAS DIETAS DOS PEIXES.....	18
2.5. FATORES ANTINUTRICIONAIS DAS FONTES DE PROTEÍNA DE ORIGEM VEGETAL	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. ENSAIO I – DIGESTIBILIDADE	33
3.2. ENSAIO II – DESEMPENHO E HISTOLOGIA INTESTINAL	36
3.2.1. Coleta das amostras.....	38
3.2.2. Microscopia óptica.....	39
3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	40
3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. ENSAIO I- DIGESTIBILIDADE	41
4.2. ENSAIO II- DESEMPENHO E HISTOLOGIA DO EPITÉLIO INTESTINAL.....	42
4.2.1. Histologia do epitélio intestinal	46
4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	51
5. CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS	57
ANEXO.....	67

RESUMO

Alterações histológicas do epitélio intestinal de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* alimentados com dietas contendo fontes proteicas vegetais

Restrições econômicas e ambientais trazem a necessidade de substituir a farinha de peixe em dietas de organismos aquáticos por matérias-primas menos dispendiosas de origem vegetal. Entretanto, tais fontes proteicas vegetais possuem fatores antinutricionais que podem ter efeitos negativos sobre o sistema digestório dos peixes, alterando a saúde e, em consequência, a produção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a digestibilidade e alterações na histologia do epitélio intestinal de juvenis do Characiforme carnívoro dourado, *Salminus brasiliensis*, alimentados com dietas contendo farelo de soja (FSO), farelo de algodão (FAL) e farelo de amendoim (FAM) como principais fontes proteicas. Foram conduzidos dois experimentos: digestibilidade (Ensaio I) e histológico (Ensaio II). O Ensaio I foi conduzido em protocolo padrão utilizando dietas práticas adicionadas do marcador inerte óxido de cromo III (Cr_2O_3) e sistema Guelph modificado para coleta de fezes e consequente cálculo dos coeficientes de digestibilidade. No Ensaio II as mesmas fonte proteicas – FSO, FAL e FAM – foram utilizadas em substituição à proteína da farinha de peixe em uma dieta controle com cinco níveis de inclusão: 0 (controle), 25,0 %; 50%; 75,0% e 100%, em um delineamento inteiramente aleatorizado ($n=3$). O experimento teve a duração de 40 dias, e as coleta de amostras de tecido foram feitas aos 20 e 40 dias. As amostras do intestino posterior foram analisadas quanto às características histológicas e morfológicas, além de quantificação de células caliciformes e análise histomorfométrica do tecido intestinal. Não foram registradas diferenças para os coeficientes de digestibilidade da proteína e energia no ensaio de digestibilidade. O ensaio de desempenho mostrou que a inclusão de FAM e FAL nas dietas melhora o consumo de alimento comparativamente ao FSO. Em relação as variáveis histológicas, os níveis que condicionaram alterações significativas nos parâmetros morfométricos foram FSO50 e FOS75. O FSO50 promoveu uma redução das dobras intestinais aos 20 dias, porém aos 40 dias houve aumento na altura das dobras, no espessamento da lâmina-própria e aumento na densidade das células caliciformes. Considerando a microscopia de varredura, sinais acentuados de enterite foram registrados. A alteração na morfologia e histologia do epitélio intestinal foi reflexo da interação de efeitos dos fatores antinutricionais presentes em cada fonte proteica vegetal. Consequentemente, registrou-se menor ganho de peso, crescimento e diminuição da homeostase intestinal, embora os melhores consumos e CAA fossem registrados para os peixes alimentados com FAL e FP. Conclui-se que o FSO causou enterite nos juvenis de dourado e FAL e FAM podem ser utilizados na alimentação de dourado.

Palavras-chave: Farelo de algodão; Farelo de amendoim; Dourado; Histologia intestinal; Células caliciformes; Enterite; Microscopia eletrônica de varredura

ABSTRACT

Histological changes of intestinal epithelium of juveniles dourado *Salminus brasiliensis* fed diet with vegetables proteins sources alternatives

Economic and environment constraints have brought the need to replace fishmeal (FM) in diets of aquatic organisms by less expensive feedstuff, especially dietary protein sources. However, such protein sources generally of plant origin, e.g. soybean meal, have antinutritional factors that can negatively affect digestive system of the fish, impairing health and consequently, production. To identify possible effects of plant protein sources in the diets for carnivore fish, this study evaluated effects of various dietary plant protein sources on digestibility, performance, histology of the intestinal epithelium of the carnivore, Neotropical Characin dourado, *Salminus brasiliensis*, fed plant protein-based diets. A digestibility trial was carried out in standard protocol using diets with inert marker chromium oxide III (Cr_2O_3) and modified system Guelph for feces. A performance test evaluated the use of three plant protein sources, soybean meal (SBM), cottonseed meal (CTM) and peanut meal (PTM) as surrogate protein source to fishmeal in a practical diet in five levels inclusion: 0 (control); 25.0%; 50.0%; 75.0% and 100%, in a randomized block design (n=3). Samples of tissue of intestinal tract of fish were collected in the distal segment at 20 and 40 days of the feeding period, and analyzed for histological and morphological characteristics. No differences were recorded for apparent digestibility coefficients (ADC) of feedstuff and energy and protein of feedstuffs. Dietary CM and PM elicited better feed consumption comparatively to the other feedstuff, Fish fed diet diet SBM50 presented reduction of intestinal folds at 20 days, but at 40 days had increased folds height, lamina propria thickening, and increased goblet cell density. Considering a scanning microscopy, evident signs of enteritis were registered. The alteration in the morphology and histology of the intestinal epithelium reflected the interaction of effects of the antinutritional factors present in each vegetable protein source, resulting in lower weight gain, growth and decreased intestinal homeostasis, even though best feed consumption and ADC were registered for fish fed CTM and FM. Concluded that SBM caused enteritis and CTM and PM can be used in feeding dourado.

Keywords: Cottonseed meal; Peanut meal; Dourado; Gut Histology; Enteritis; Goblet cells; Scanning electron microscopy

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – SEGMENTAÇÃO ARBITRÁRIA DO SISTEMA DIGESTÓRIO DO DOURADO (FOTO ORIGINAL T.M.P. CRUZ).	39
FIGURA 2. ESTRUTURA HISTOLÓGICA DO INTESTINO POSTERIOR DE DOURADO.	46
FIGURA 3. DOBRAS NO INTESTINO POSTERIOR DE DOURADO	47
FIGURA 4. MUCOSA COM SUAS DOBRAS E CAMADA MUSCULAR DO INTESTINO POSTERIOR DE DOURADO.	48
FIGURA 5. FORMATO DAS DOBRAS NO INTESTINO POSTERIOR DE DOURADO.	51
FIGURA 6. EPITÉLIO INTESTINAL DOS JUVENIS DE DOURADO ALIMENTADOS COM DIETAS FORMULADAS À BASE DE FARINHA DE PEIXE.	52
FIGURA 7. EPITÉLIO INTESTINAL COM SECREÇÃO DE MUCO PELAS CÉLULAS CALICIFORMES E PRESENÇA DE VACÚOLOS	53
FIGURA 8. REAÇÃO INFLAMATÓRIA NO INTESTINO POSTERIOR COM A PRESENÇA DAS CÉLULAS DE DEFESA.	53
FIGURA 9. ALTERAÇÕES CAUSADAS NO EPITÉLIO INTESTINAL DE JUVENIS ALIMENTADOS COM FONTES VEGETAIS.	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DA DIETA REFERÊNCIA (MATÉRIA NATURAL) DOS ENSAIOS DE DIGESTIBILIDADE.....	34
TABELA 2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL DA FARINHA DE PEIXE (FP), FARELO DE SOJA (FSO), FARELO DE ALGODÃO (FAL) E FARELO DE AMENDOIM (FAM).	35
TABELA 3. COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES UTILIZADAS NO ENSAIO HISTOLÓGICO DE JUVENIS DE DOURADO.	38
TABELA 4. COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE DOS NUTRIENTES E DA ENERGIA DA RAÇÃO REFERÊNCIA, E DOS INGREDIENTES TESTADOS PARA DOURADO.....	42
TABELA 5. EFEITOS DAS FONTES PROTEICAS VEGETAIS SOBRE OS PARÂMETROS DE DESEMPENHO DE JUVENIS DE DOURADO.	43
TABELA 6. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE JUVENIS DE DOURADO ALIMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE DIFERENTES FONTES PROTEICAS VEGETAIS.....	45
TABELA 7. EFEITOS SOBRE OS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO EPITÉLIO INTESTINAL...	47
TABELA 8. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DO EPITÉLIO INTESTINAL DO INTESTINO POSTERIOR DE JUVENIS DE DOURADO ALIMENTADOS COM FONTES PROTEICAS VEGETAIS.....	50
TABELA 9. - CONTINUAÇÃO	50

1. INTRODUÇÃO

A busca pela maior eficiência na produção de alimentos tem se tornado uma preocupação constante em resposta ao aumento da população mundial. Em 2015 o consumo de peixe no mundo atingiu uma média de 20 kg *per capita*; no Brasil, o consumo *per capita* de pescado chegou a 14,5 kg (FAO, 2016). No mesmo ano a produção chegou a 483×10^3 t de pescado, com destaque para os estados de Rondônia, Paraná e Mato Grosso com as seguintes produções: $84,3 \times 10^3$ t, $69,2 \times 10^3$ t e $47,4 \times 10^3$ t, respectivamente. Neste cenário as principais espécies foram tambacu e tambatinga com 7,7%, tilápia com 45,4 % e tambaqui com 28,1% (IBGE, 2015).

O aumento constante da produção mundial de pescados vem tornando necessário substituir a farinha de peixe em dietas por matérias-primas menos dispendiosas de origem vegetal. Entretanto em uma produção de peixes carnívoros, o custo na produção é maior em relação aos outros hábitos alimentares uma vez que estas espécies exigem dietas com nível de proteína elevado.

Na piscicultura, as fontes proteicas vegetais são utilizadas na alimentação como alternativa à farinha de peixe. Entretanto por possuírem fatores antinutricionais (FAN) devem passar por um tratamento adequado (térmico, químico, fermentativo ou biotecnológico) para que os nutrientes possam ser digeridos pelos peixes não apresentando efeitos negativos sobre a saúde. Os FAN ou antinutrientes são substâncias endógenas, presentes especialmente em alimentos de origem vegetal, que ao serem ingeridas pelos animais e humanos são responsáveis por efeitos negativos sobre a saúde e balanço de nutrientes (NRC, 2011). Saúde pode ser definida como um estado de ausência de doenças e patologias que prejudicam as células, os tecidos e as suas respectivas funções, ou seja, a habilidade normal do animal no desenvolvimento de suas funções fisiológicas (Segner et al., 2012). Consequentemente, as respostas positivas e negativas dos alimentos e ingredientes vegetais – desempenho, fisiologia digestiva, características histológicas do epitélio intestinal etc. – vêm sendo estudadas em diversas espécies, entretanto ainda são poucos os estudos em espécies endêmicas e neotropicais (Van der Inghi, 1991; Ringo et al, 2000; Evans et al, 2005; Ostazewska et al, 2005; Heikkinen et al, 2006; Merrifield et al, 2009; Olsen et al, 2007; Cai et al, 2012).

O termo digestibilidade pode ser compreendido como a eficiência com que o organismo hidrolisa os nutrientes sendo influenciado pelos componentes da dieta (NRC, 2011). O hábito alimentar dos peixes e as diferenças anatômicas e fisiológicas podem explicar as diferenças nos coeficientes de digestibilidade para os diferentes nutrientes para as diferentes espécies. Desta forma peixes carnívoros, que possuem o intestino curto, são adaptados a alimentos digestíveis, ricos em proteínas de alto valor biológico e pobre em carboidratos (Moro et al., 2016; 2017). O monitoramento da estrutura histológica do trato digestório é o método mais utilizado para avaliação dos efeitos de dietas comerciais que utilizam matérias-primas de origem vegetal em peixes (Raskovic et al., 2011). Os efeitos destas fontes proteicas vegetais podem alterar a integridade da mucosa do epitélio intestinal (Krogdahl et al, 2000; Ringo et. al, 2000; Evans et al., 2005; Ostazewska et al., 2005; Heikkinen, 2006; Hansen et al., 2007; Merrifield et al., 2009; Cai et al., 2012).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das fontes proteicas vegetais alternativas na alimentação de dourado, *Salminus brasiliensis*, Characiforme ictiófago nativo que tem despertado o interesse dos piscicultores nas regiões sul e sudeste, através da digestibilidade dos nutrientes de dietas formuladas a partir de fontes proteicas de origem vegetal, e a histologia do epitélio intestinal, registrando a possível ocorrência de enterite ou não, perda da integridade da mucosa, vacuolização e infiltração de células inflamatórias no tecido além da morfologia do epitélio. Os resultados deste estudo devem contribuir para o melhor entendimento da fisiologia da nutrição da espécie, que mesmo possuindo grande importância econômica, necessita estudos que avaliem alternativas nutricionais que possibilitem maior eficiência da produção em nível nacional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O dourado *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1817

O dourado, *Salminus brasiliensis* (Characiformes: Characidae: Salmininae), é um peixe ictiófago com distribuição geográfica abrangendo a bacia do Prata, rio São Francisco, Paraná, Paraguai e Uruguai (Nakatami, 2001). Tem-se conhecimento de outras duas espécies do gênero *Salminus* no Brasil, *Salminus affinis* e *Salminus hilarii*. O período reprodutivo da espécie estende-se de novembro a janeiro, com desova total, migração reprodutiva e sem qualquer cuidado com a prole (Nakatami, 2001). Na produção, as larvas são reconhecidas como animais carnívoros generalistas, ou seja, predam uma ampla gama de alimentos de origem animal; de hábito alimentar diurno, a espécie tem carne de qualidade apreciada pelo consumidor, o que lhe confere elevado valor de mercado (Cyrino et al., 2013).

As características anatômicas e fisiológicas do trato gastrointestinal de peixes carnívoros como o dourado diferem daquelas de peixes com outros hábitos alimentares. O tubo digestório de maneira geral é curto e adaptado à ingestão de presas inteiras. Todavia há poucas informações sobre a anatomia de seu tubo digestório, que se resumem em dois estudos descritivos (Rodrigues e Menin, 2006; Rodrigues e Menin, 2008). Basicamente, o tubo digestório pode ser dividido em três segmentos: (a) intestino anterior – segmento que compreende o esôfago e o estômago, cujo limite posterior é marcado pelo esfíncter pilórico e pelos orifícios dos ductos hepatopancreáticos; (b) intestino médio – segmento que compreende o intestino propriamente dito, cuja porção terminal é marcada pela inserção de uma glândula retal ou de cecos; e (c) intestino posterior ou reto, que desemboca no ânus, uma vez que em *S. brasiliensis* não se distingue a válvula ileorretal, presente em grande parte dos peixes (Rodrigues e Menin, 2008). Com uma dieta rica em proteína, não é metabolicamente adaptado a aproveitar carboidratos dietéticos, uma vez que isto ocorre devido à baixa atividade da enzima α -amilase, celulase e invertase, diminuindo a habilidade de aproveitar carboidratos das fontes proteicas vegetais e, conseqüentemente, a digestibilidade (Moro et al., 2016; 2017).

2.2. Morfologia, histologia e fisiologia do segmento intestinal

Os peixes podem ser classificados com base nos diferentes hábitos alimentares: carnívoros, ictiófagos, herbívoros, onívoros, iliófagos, bentófagos, planctófagos, filtradores entre outros. Desta forma a morfologia, estrutura e a fisiologia do trato gastrointestinal dos peixes varia em função da espécie e do hábito alimentar. O trato gastrointestinal pode ser dividido em quatro regiões distintas: bucofaringe, esôfago, estômago e intestino (Fiertak; Kilarshi, 2002). Peixes carnívoros, como o dourado, são caracterizados por um o intestino curto, reto e espesso, enquanto os onívoros, como o pacu, têm intestino em forma de “N”, e os herbívoros, intestino longo, enovelado e fino. Morfologicamente o intestino pode ser dividido em região proximal, mediana e distal, e em intestino posterior ou reto, dependendo da presença ou ausência da válvula íleo-retal (Gonçalves et al., 2013) segmento proximal é responsável pelo final da digestão, início da absorção e secreção de muco; o segmento medial pela absorção de nutrientes e altas produções de muco; e o posterior ou reto pela absorção de macromoléculas proteicas em sua forma intacta (Stroband; Van Der Veen, 1981). A absorção no intestino posterior ocorre através da pinocitose, mecanismo de penetração de fluidos na célula através da invaginação da membrana celular, com a formação de vesículas citoplasmáticas (Barbieri and Blasquez, 2008) Este mecanismo pode permanecer funcional até o animal chegar à vida adulta, podendo variar entre as espécies e durante as diferentes fases da vida, larval, juvenil e adulta (Stroband; Van Der Veen, 1981).

A estrutura histológica intestinal dos teleósteos pode ser classificada em diferentes camadas compostas por diferentes tecidos. O epitélio intestinal dos peixes é constituído geralmente por quatro tecidos: mucosa, submucosa, muscular e serosa (Genten et al., 2011). A camada mucosa, conhecida pelas dobras, é formada por tecido epitelial simples cilíndrico com especialização na membrana denominada de microvilosidades. As dobras macroscópicas, denominadas pregas, são estruturas que aparecem em grande quantidade e variedade aumentando a superfície de absorção e secreção do órgão (Genten et al., 2009). Como unidade celular do epitélio encontra-se os enterócitos, e entre eles estão distribuídas as células caliciformes, as células rodlets e os vacúolos de absorção. As células epiteliais de

maneira geral são responsáveis pela digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes, renovação celular, extrusão e apoptose, e proteção contra desenvolvimento de patógenos.

Os enterócitos são células cilíndricas que constituem a maior população de células epiteliais que revestem o intestino, sendo o único tipo celular envolvido no processo absorptivo. As microvilosidades são responsáveis pelo aumento da área de absorção e a sua superfície de revestimento intestinal está localizada na região apical dos enterócitos. Quando ela é degradada a absorção pode estar comprometida, pois enzimas como dissacaridasas e dipetidases produzidas pelos enterócitos fazem parte de sua membrana plasmática (Stroband; Van Der Veen, 1981).

Além da absorção de nutrientes o epitélio intestinal atua como a primeira linha de defesa. Entre as células absorptivas e os enterócitos, encontram-se as células caliciformes, responsáveis pela produção de muco. O muco secretado por estas células confere proteção e pode inibir a colonização de agentes bacterianos e é constituído por mucinas que se diferenciam em ácidas e neutras; ambas protegem contra os microrganismos, as ácidas principalmente são resistentes à ação de bactérias glicosidas e proteases (Deplancke e Gaskins, 2001). Adicionalmente peptídeos, lisozima, lipoproteínas, complementos, anticorpos e proteases, contribuem com a proteção. O sistema imunológico intestinal destrói os patógenos através da imunidade inata, criando barreiras, podendo provocar adaptações em diferentes locais da mucosa. Por isso, a visualização da célula caliciforme se torna uma ferramenta interessante para manutenção da saúde do epitélio intestinal.

No contorno basal das células epiteliais encontra-se a lâmina própria ou submucosa composta por tecido conjuntivo, uma estreita faixa de complexo de colágeno (fibras elásticas e colágeno), mucopolissacarídeos, vasos sanguíneos e nervos distribuídos em duas regiões distintas conhecidas como estrato compactum e estrato granuloso (Gentem et al., 2011). Além de suas respectivas células que podem indicar sinal de inflamação (leucócitos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos) ou envolvimento com a imunidade. A camada muscular é formada por duas camadas de músculo liso, circular interna e longitudinal externa, cuja função está relacionada com os movimentos peristálticos. É cercada por uma membrana serosa composta pelo mesotélio, um endotélio simples plano e um tecido conjuntivo frouxo (Schep et al., 1999).

Os segmentos intestinais apresentam diferenças em relação a sua função. Na primeira porção do intestino médio ocorre a absorção de nutrientes (monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos) enquanto que a porção posterior ou distal é responsável pela pinocitose de macromoléculas proteicas e pela resposta imunológica (Genten et al, 2009). No intestino posterior, linfócitos, macrófagos e células eosinofílicas granulares estão presentes tanto dentro dos espaços intercelulares dos enterócitos quanto do tecido conjuntivo subjacente (Schep et al., 1999).

Das proteínas de origem alimentar ingeridas pelos peixes, cerca de 80% sofrem digestão enzimática e são absorvidas no segmento proximal do intestino, e o restante passa para os outros segmentos intestinais posteriores; o processo de pinocitose nos segmentos posteriores se comporta como um mecanismo auxiliar da absorção de proteína, dada a digestão inadequada das proteínas pelos peixes (Barbieri e Blasquez, 2008). De maneira geral, a digesta no intestino é degradada pela ação das enzimas específicas para nutrientes que são hidrolisados em moléculas mais simples (aminoácidos, monossacarídeos e ácidos graxos) para que possam ser absorvidas pelo organismo. A velocidade e a eficiência com a qual este processo acontece são fortemente relacionadas às características morfofuncionais do trato intestinal (Bakke et al., 2010). O dourado pode apresentar baixa atividade de α -amilase, celulase e invertase, o que confere baixa habilidade para utilizar carboidratos das fontes vegetais (Chaudhuri et. al., 2012).

A digestão da proteína no estômago dos peixes é feita pela ação da pepsina, estimulada pelo ambiente ácido. Quando o quimo chega ao intestino, várias proteases, como as serinas, são secretadas pelo pâncreas e continuam a hidrólise (Alarcon et al., 2001).

2.3. A proteína na alimentação de peixes carnívoros

Entre os nutrientes exigidos na alimentação e nutrição dos peixes, proteínas e lipídios são as principais fontes de energia. Todavia, a exigência proteica dos peixes é quantitativamente maior que a energética, como decorrência do menor dispêndio de energia para locomoção, da excreção nitrogenada e do incremento calórico, assim como da maior capacidade de utilização de energia a partir do

catabolismo de proteínas em relação aos carboidratos, os quais têm aproveitamento diferenciado de acordo com o hábito alimentar da espécie, sendo menor em peixes carnívoros que em peixes onívoros (NRC, 2011).

Os organismos aquáticos têm necessidade de aminoácidos, supridos pelas proteínas. Estruturalmente, as proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligação covalente, atuando no sistema fisiológico como catalizadores biológicos pelas enzimas, transportando os nutrientes (vitaminas, lipídeos, ferro, cobre e oxigênio), responsáveis pelo movimento das estruturas musculares (actina e miosina), pelos sistemas estruturais (colágeno); transmissão de impulsos nervosos e crescimento e diferenciação celular, entre outros (Nelson, Cox; 2012). Nos teleósteos, os aminoácidos (proteínas) representam de 64 a 75% da massa corporal (Bicudo 2008). Na ração, a maior parte dos custos corresponde à fração proteica e quando desbalanceada, ela é fonte de nitrogênio (amônia) excretada para a água. A excreção da amônia ocorre via brânquias e é o principal resíduo metabólico proteico dos peixes, portanto alimentos com excesso de proteína ou com desbalanço em sua composição em aminoácidos aumentam a excreção de amônia, e esta é tóxica para os peixes (Cyrino et al., 2010).

Desta forma a utilização do conceito da proteína ideal é a maneira mais adequada para aperfeiçoar a absorção de aminoácidos dietéticos dos peixes e diminuir consideravelmente a excreção de amônia pelos peixes (Cyrino et al., 2010). Os aminoácidos essenciais que devem ser inclusos na dieta são: arginina, isoleucina, histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina, treonina e valina; os não essenciais incluem alanina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutâmico, glicina, prolina e serina. Em geral a lisina, o aminoácido mais limitante nas dietas, está presente em maior proporção no tecido muscular dos peixes. Peixes carnívoros como o dourado necessitam de rações com teores elevados de lisina, sendo que a suplementação desse aminoácido está estreitamente relacionada ao aumento do ganho de peso, à melhora na conversão alimentar, ao aumento na retenção de nitrogênio e à redução no conteúdo de lipídios na carcaça (Bai e Gatlin, 1994).

Como os peixes são pecilotérmicos, a alta exigência em proteína se deve ao fato de apresentarem menor consumo de energia, uma vez que a temperatura corporal é regulada de acordo com a temperatura da água. Em relação ao crescimento, geralmente a exigência diminui com o aumento da idade e hábito alimentar espécie-específico. De forma geral a quantidade de proteína na dieta de

peixes carnívoros varia entre 26% a 32%. A maioria das dietas deve apresentar níveis de aminoácidos elevados para juvenis, de 35 a 50%. Salmões, por exemplo, necessitam 15% de aminoácidos essenciais na dieta quando adultos, mas quando juvenis necessitam de 50% (NRC, 2011). Em geral os salmonídeos são extremamente sensíveis resultando em redução do crescimento e enterite, no intestino distal, quando alimentados com dietas à base de soja por tempo prolongado (Uran et al., 2008).

A quantidade de informações sobre as exigências dietéticas em proteína e amino ácidos do dourado é reduzida. Basicamente, Machado (2004) determinou a exigência em proteína de alevinos de dourado alimentado os peixes com seis dietas isoenergéticas (4000 kcal EM kg⁻¹) e semipurificadas com níveis crescentes de PB (33,93; 38,11; 41,18; 45,33; 49,65 e 53,61%) duas vezes ao dia até a saciedade aparente por 94 dias e relatou que peixes alimentados com dietas contendo 41,18% PB apresentavam melhores índices de conversão alimentar e que de uma maneira geral a composição corporal dos peixes em proteína, cinzas e umidade não foram influenciadas pelas diferentes concentrações de proteína da dieta. Teixeira (2006) relatou que dietas semipurificadas com 4000 a 4376 kcal EM kg⁻¹ e 40,32 % de PB proporcionam melhor ganho de peso de juvenis de dourado. Finalmente, Dairiki et al. (2009) estudaram a exigência em aminoácidos na nutrição de juvenis de dourado, e relataram que o nível de 2,5% de lisina dietética resultou em um melhor índice de conversão alimentar (ICA), e que 1,40% de arginina piorou o índice de CA. Não existem registros na literatura relacionados a efeitos da inclusão de ingredientes vegetais nas dietas no desempenho e alterações histopatológicas em dourados.

2.4. Fontes de proteína nas dietas dos peixes

A farinha de peixe (FP) é ainda a principal fonte proteica utilizada na alimentação de peixes carnívoros em função do alto conteúdo em proteína (51 a 72 %), perfis adequados de aminoácidos (lisina, metionina, treonina e triptofano) e bom teor de fósforo (Oliva Teles, 2012). É um produto derivado do principalmente processamento de resíduos do pescado marinho, tais como cabeças, nadadeiras e vísceras. Dados da FAO (2016) indicam que a produção de FP diminuiu e se estabilizou ao longo dos anos juntamente com o avanço da aquicultura, que utiliza 35% da FP produzida no mundo, o que a torna onerosa e cara (Uran, 2008).

No Brasil a farinha de peixe disponível é originária da sardinha e processada de peixes rejeitados para o consumo humano. Ao ser utilizada torna-se necessário a inclusão de antioxidantes para evitar a formação de produtos de oxidação (Butolo, 2002). Todavia por ser de alto custo, tem-se buscado no mercado uma fonte alternativa ou parcialmente substituta (Cyrino et al., 2010).

Fontes vegetais alternativas à FP podem também ser utilizadas em dietas para peixes desde que não apresentem efeitos negativos no desempenho zootécnico e que reduzam os custos de produção. O farelo de soja [FSO] é o ingrediente mais estudado como fonte proteica vegetal para peixes. Todavia, o uso de FSO em dietas para peixes exige a suplementação com metionina e outros aminoácidos sintéticos, além de um processamento adequado a fim de destruir os fatores antinutricionais que se encontram presentes (Dairiki, 2009). O FSO apresenta baixo teor de fósforo e cinzas, que podem ser incluídos com a suplementação mineral, bem como tornados mais disponíveis pela adição de fitase, que aumenta a disponibilidade de fósforo quelatado pelo ácido fítico. Quando o FSO desengordurado é submetido à extração alcoólica obtém-se o concentrado proteico de soja [CPS] (Blaufuss e Trushenski, 2011), de melhor valor biológico, mas de custo mais elevado.

Os fatores antinutricionais (FAN) presentes no FSO, em especial lectinas e inibidores de tripsina e saponinas, podem ser reduzidos ou removidos com o tratamento térmico adequado; caso contrário podem reduzir o crescimento e a eficiência alimentar, conforme relatado para especialmente para salmonídeos. Desta forma, removendo a maior parte dos fatores antinutricionais, melhora-se a palatabilidade e diminui uma possível irritação intestinal. Adicionalmente, a soja pode ser considerada uma fonte de peptídeos bioativos para nutrição humana. Aproximadamente 65 a 80% do total de proteínas da soja são β -conglucininas e glicininas, com atividades imunoestimulante e hipocolesterolêmico, que reduzem a concentração de colesterol em humanos e animais, respectivamente (Wang e Mejia, 2005).

Entretanto, as mesmas proteínas, glicina e β -conglucina, também são consideradas alergênicas e provocam reações de hipersensibilidade na mucosa intestinal. Estas reações de hipersensibilidade às proteínas da soja podem provocar alterações na morfologia intestinal, como o encurtamento das vilosidades e o aumento da profundidade da cripta. Além disso, podem estar presentes na digesta

ileal, devido à dificuldade de hidrólise dessas proteínas, afetando o desempenho de animais monogástricos (Li et al., 1991).

A inclusão do FSO na dieta de salmonídeos induz uma resposta inflamatória causada pela presença de FAN, quadro caracterizado pelo encurtamento das dobras primárias e secundárias, alargamento da lâmina própria e infiltração de células inflamatórias: linfócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e imunoglobulina M (IgM) (Baeverfjord e Krogdahl, 1996). As alterações funcionais incluem uma redução das atividades enzimáticas na borda em escova (Krogdahl, et al., 2003), redução da absorção de macromoléculas (Uran, et al., 2008) e aumento da permeabilidade intestinal (Knudsen et al., 2008). Entretanto, Uran et al. (2008) relatam também que os salmonídeos não são as únicas espécies que desenvolvem enterite associada à presença de FSO na dieta; as carpas respondem de forma semelhante, porém os sinais diminuem ao longo do tempo.

A enteropatia associada à adição de FSO nas dietas de peixes está relacionada com as funções do sistema imunológico no trato gastrointestinal e é considerada uma ferramenta de investigação que deve ser incluída nos estudos de alimentação (Krogdahl et al, 2010). Alterações na atividade de lisozima da mucosa intestinal, seguida de espessamento na mucosa e ausência de efeitos no plasma foram relatadas em salmão e relacionadas à presença de FSO na dieta (Krogdahl et al., 2000; Sitja-Bobadilla et al., 2003) e trutas apresentaram vacuolização anormal, inflamação das células e perda da integridade da mucosa do epitélio intestinal, diminuindo a defesa contra patógenos invasores (Heikknen et al, 2006). Em bacalhaus do Atlântico foi relatada hipertrofia e hiperplasia das células caliciformes intestinais (Olsen et al, 2007). Carpas crucianas, *Carassius carassius*, apresentaram uma densidade maior de vacúolos grandes e homogêneos no citoplasma, e pequenas microvilosidades nas células intestinais (Cai et al., 2012) e bagres do canal, *Ictalurus punctatus*, apresentaram histopatologia no fígado, como necrose e diminuição no tamanho do núcleo dos hepatócitos (Evans et al, 2005). Finalmente, alterações na microbiota intestinal, alterações foram identificadas em salmão mas não em carpas (Ringo et al., 2006; Cai et al., 2012).

Gu et al. (2015) suplementaram dietas de salmão com saponinas, isoflavanóides e fitoesteróis da soja e registraram alterações morfológicas no fígado, caracterizada pela redução do tamanho dos hepatócitos e deformidades esqueléticas nos peixes alimentados com dietas suplementados com fitoesteróis,

concluindo que dietas isentas de isoflavanóides podem afetar as funções intestinais, o metabolismo hepático e a formação óssea em salmão. Alterações também foram observadas em trutas quando alimentadas com dietas semi-purificadas a base de caseína suplementadas com saponinas e lectinas da soja, como desenvolvimento anormal das microvilosidades, vacúolos de pinocitose e hiperplasia do tecido conjuntivo da mucosa intestinal (Iwashita et al., 2009).

O farelo de algodão *Gossypium hirsutum* L. [FAL], muito utilizado na alimentação de ruminantes, possui alto teor de fibras e proteínas, além de conter baixos níveis de cistina, metionina e lisina. Entretanto a presença de gossipol é um dos fatores limitantes quanto à sua utilização para monogástricos. O gossipol liga-se ao ferro da dieta, tornando-o indisponível e causando deficiência deste mineral (Bútolo, 2002). Para minimizar este problema, o FAL deve ser submetido a tratamento com óxido férrico (El-Sayed, 1999; Salero et al., 1999).

A presença do gossipol em dietas para peixes tem sido identificada como um fator limitante ao desempenho. Quando usado em substituição da farinha de peixe até 50% de inclusão na dieta de tilápias *Oreochromis niloticus*, não altera o crescimento, entretanto acima de tais níveis esta alteração é significativa (Mbahinzireki et al., 2001). Kasheif et al. (2013) relataram alterações histológicas (e.g. necrose) no fígado de tilápias quando a dieta apresentava 100% de substituição da FSO pelo FAL, o mesmo registrado por Mbahinzireki et al. (2000) com até 50% de substituição. Entretanto, os resultados foram diferentes em carpas. Em carpas pretas *Mylopharyngodon piceus*, Yi Hu et al. (2014) relataram que a inclusão de até 75% do FAL substituindo o FSO na dieta não reduziu o crescimento. Em espécies tropicais, como o piavuçu, *Leporinus macrocephalus*, a substituição do FSO pelo FAL influenciou o peso final, a conversão alimentar aparente e taxa de eficiência proteica com melhores valores que corresponde aos teores de 40,42; 34,23 e 36,00% de inclusão de FAL nas dietas, ou seja, o FAL pode substituir até 50% da proteína do FSO (Galdioli et al., 2001).

Ao substituir o farelo de soja pelo farelo de algodão em dietas para tilápias, Kleeman et al. (2011), observaram que o FAL pode compor até 32,00% da dieta sem afetar o desempenho, hematologia e a saúde do intestino, além de ser altamente palatável para esta espécie. Kasheif et al. (2013) registraram a ocorrência de necrose hepática ao utilizarem FAL como única fonte proteica na dieta de tilápias. Os sinais registrados foram a degeneração dos hepatócitos, agregação de células

inflamatórias entre os hepatócitos e presença de aminotransferase alanina (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro em peixes alimentados com dietas contendo mais de 50% de farelo de algodão como fonte de proteína. Em carpas pretas, a fisiologia é diferente: Hu et al. (2014) relataram que até 75% de substituição do FSO pelo FAL não reduz o crescimento, porém, os níveis altos de FAL acarretam diminuição significativa das células sanguíneas, das atividades das enzimas catalase no soro, da lisozima, e do sistema complemento C3.

O farelo de amendoim, *Arachis hypogaea* L. [FAM], é um subproduto da torta, que após passar pelo moinho, se apresenta na forma de farelo com alto teor de proteína. Entretanto sua composição varia conforme a fonte e o processo empregado para a extração do óleo. Quando descascado e laminado, seu valor nutritivo assemelha-se ao do FSO e é superior ao do FAL, porém apresenta níveis inferiores de lisina, metionina e treonina em comparação com a soja. Os fatores antinutricionais do FAM são os inibidores de tripsina, goitrogênios e as saponinas (porém termolábeis) (Butolo, 2002; Hertrampf e Piedad-Pascual, 2000).

A inclusão de FAM na dieta de tilápias resulta em redução no ganho de peso quando os níveis de inclusão passam de 50%, podendo este resultado estar relacionado à deficiência de aminoácidos essenciais (lisina, metionina e treonina) ou à presença de fatores antinutricionais (Jackson et al., 1982; Hasan et al., 1997; Agbo et al., 2011). Cai et al. (2013) registraram que o uso do FAM em substituição à FP na dieta de carpas crucianas não gerou alterações significativas no consumo de ração com 25 e 50% de inclusão, mas alterações na mucosa intestinal e respostas inflamatórias foram registradas, sugerindo que altos níveis do FAM em dietas de carpa cruciana não só reduzem o crescimento, mas também produzem riscos de saúde para a espécie. Finalmente, Yildirim et al. (2014), relataram que a substituição da FP pelo FAM em dietas da tilápias de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) afeta negativamente o crescimento, mas não afeta a composição corporal.

2.5. Fatores antinutricionais das fontes de proteína de origem vegetal

Os fatores antinutricionais (FAN) ou antinutrientes são substâncias endógenas presentes em plantas e alimentos, que ao serem ingeridos pelos animais produzem efeitos negativos sobre a saúde e balanço de nutrientes. Estes efeitos

podem variar de acordo com a espécie, a idade ou estágio de desenvolvimento, o tamanho, o sexo, a saúde, a nutrição e o estresse (NRC, 2011).

A inclusão das fontes proteicas vegetais na alimentação de peixes como alternativa ao uso da FP traz tanto efeitos negativos quanto positivos sobre a produtividade e a saúde dos peixes confinados. As dietas práticas utilizadas na aquicultura são formuladas e processadas a partir da mistura de diferentes ingredientes com diferentes perfis de FAN, resultando em uma interação com efeitos combinados (NRC, 2011). De modo geral os efeitos relatados são: as fibras interferem na digestão e absorção de nutrientes; o ácido fítico prejudica a digestão mineral em monogástricos; os inibidores enzimáticos inibem a digestão e utilização dos carboidratos, proteínas e lipídeos dos animais; as lectinas ligam-se aos receptores da parede celular nos peixes; as saponinas interferem na digestão proteica e lipídica; os glucosinolatos aumentam a captação de iodo na glândula tireoide; os fitoesteróis interferem na absorção e no metabolismo do colesterol e os oligossacarídeos podem alterar a microbiota intestinal (Krogdahl et al, 2010). Os efeitos detrimenais geralmente aparecem quando os peixes são alimentados com dietas com níveis de FAN acima do tolerado, uma característica espécie-específica, os salmões e tilápias são os mais sensíveis (Francis et al., 2001; NRC et al, 2011).

Os FANs também interferem na digestibilidade, na absorção ou utilização de nutrientes, diminuição da disponibilidade biológica dos aminoácidos essenciais e minerais, além de causar irritações e lesões na mucosa intestinal, no fígado e alterações em parâmetros imunológicos e hematológicos (NRC, 2011). A maioria dos trabalhos com peixes carnívoros relata uma diminuição no ganho de peso (GP) dos peixes alimentados com fontes vegetais (diretamente relacionada à baixa digestibilidade destas fontes para estas espécies). Adicionalmente, as fontes vegetais podem ter baixa palatabilidade, o que pode interferir negativamente no consumo e, em caso de altos níveis de inclusão, também a microbiota intestinal, resultando em um aumento na variabilidade de espécies comensais pelo acúmulo de nutrientes não digestíveis no trato gastrointestinal do hospedeiro (Ringo et al., 2006, Merrifield et al., 2009, Ostazewska et al., 2005, Uran et al, 2008).

Os inibidores enzimáticos são encontrados nos farelos de soja, amendoim, algodão, canola, ervilha, girassol e feijão, entre outros. São proteínas que formam complexos estequiométricos com as suas respectivas enzimas e inibem a sua atividade no trato gastrointestinal (Krogdahl et al, 2010), mesmo assim não ocorre a

completa inativação induzindo a efeitos secundários nos animais (NRC, 2011). Estruturalmente, estes inibidores são classificados em dois grupos: a) Kunitz: compostos sensíveis à temperatura (termo lábeis) com especificidade primária à tripsina; e b) Bowman-Birk: compostos termoestáveis que inibem a atividade da tripsina e da quimotripsina em sítios de ligação diferentes (Silva e Silva, 2000). Os inibidores enzimáticos podem ainda ser classificados de acordo com o mecanismo molecular da hidrólise em: 1 - proteases de serina, e.g. tripsina e quimotripsina; 2 - as proteases de cisteína, e.g. catepsina; 3 - metaloproteases, aminopeptidases; e 4 - ácido proteases, e.g. pepsina, gastricina (Alarcon et al, 2001).

Fisiologicamente, o inibidor enzimático liga-se a enzimas proteolíticas pancreáticas tornando-as inativas (Silva e Silva, 2000). Com a baixa na produção destas enzimas proteolíticas, ou seja, a inibição da tripsina, o pâncreas é estimulado a secretar a colecistoquinina. Com o aumento na concentração plasmática de colecistoquinina, há um estímulo para a secreção de tripsina no pâncreas e a vesícula é biliar é estimulada a esvaziar seu conteúdo no intestino. Esta síntese de tripsina resulta num aumento da exigência para a proteína e, em particular, para o aminoácido cisteína na dieta dos peixes. Outros sinais são: hipertrofia pancreática; redução da digestibilidade aparente da proteína; perda de capacidade de regulação da coagulação sanguínea; ativação do sistema complemento; aumento da atividade de células inflamatórias e redução da atividade das enzimas proteolíticas secretadas para o lúmen intestinal (Olli e Kroghdahl 1994; Liddle et al., 1984; Silva e Silva, 2000; Potempa et al., 1994; Alarcon et al., 2001). Kroghdahl et al. (1994) investigaram os efeitos dos níveis crescentes de inibidores de proteinase dietéticas sobre a digestibilidade da proteína e cisteína nos diferentes segmentos intestinais de truta arco-íris e demonstraram que os inibidores enzimáticos aumentaram a secreção de enzimas pancreáticas ricas em cisteína e reduziram a digestibilidade aparente mesmo que em baixos níveis.

Os inibidores de lipase são importantes para a prevenção da autodigestão de reserva lipídica e estão presentes no farelo de soja, girassol e amendoim. Estes inibidores derivados da soja inativam a lipase através da ligação com a superfície das gotículas de gordura emulsionadas (NRC, 2011). Os inibidores de amilase do trigo são mais ativos contra amilase em carpas e tilápias (Fernandez et al., 2001).

As lectinas, presentes no farelo de soja, são proteínas heterogêneas conhecidas como aglutininas ou hemaglutininas, solúveis, que possuem no mínimo

um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos através de receptores glicoconjugados localizados na superfície sobre as células epiteliais intestinais maduras e, ao migrarem pelas criptas das vilosidades, as células epiteliais alteram o perfil de glicosilação não enzimática dos componentes da membrana celular, resultando em efeitos no intestino (NRC, 2011). Essas proteínas são resistentes à desnaturação pelo calor assim como na passagem pelo trato digestivo. As lectinas possuem dois ou mais sítios de ligação e vão aglutinar as células com receptores de glicação semelhantes, por exemplo, enterócitos e células sanguíneas, uma vez que receptores diferem em vários sítios de glicação, e a susceptibilidade para uma lectina em particular pode diferir (Krogdhal et al., 2010).

A lectina pode ligar-se com carboidratos glicoconjugados, N-acetil-D-Galactosamine, presentes na camada borda em escova do epitélio intestinal. Ao serem alimentados com farelo de soja, salmões do Atlântico apresentaram estas alterações no intestino distal (Buttle et al., 2001). Por outro lado, quando salmões foram alimentados com farinha de feijão, a lectina atuou inibindo o transporte de glicose dentro do epitélio intestinal (Bakke-McKellep et al., 2008), diferentemente do farelo de soja, que não causa inibição da absorção de glicose. Sinais de enterite foram registrados em salmão do Atlântico, trutas arco-íris e carpa comum (Van der Inghi e Krogdahl, 1990; Rumsey et al., 1994; Uran et al., 2008). O comprometimento desta sinalização da célula intestinal afetada interfere na regulação do transporte, na secreção dos hormônios intestinais, na proliferação de células da mucosa e no metabolismo de nutrientes (Hendriks et al., 1990).

Iwashita et al. (2008) destaca que em truta arco-íris, as lectinas do FSO pareceram não afetar a morfologia intestinal, sugerindo que quando suplementadas em dietas semi-purificadas, juntamente com uma mistura de saponinas, isoflavonas, fitato e sacarose, resultam em um aumento na proliferação de tecido conjuntivo fibroso na lâmina própria do intestino distal. Todavia, quando suplementadas isoladamente na dieta semi-purificada, não promovem em alterações histológicas intestinais.

Buttle et al. (2001) relataram que salmões alimentados com dietas contendo níveis crescentes de lectina do FSO exibiram patologia no intestino, com sinais de alteração na integridade do epitélio do vilo, descamação da mucosa para o lúmen intestinal e células infiltradas na lâmina própria. Em trutas, porém estavam presentes vacúolos esparsos distribuídos de forma irregular no intestino distal. Estes resultados

podem ser explicados pela máxima ligação e baixa constante de dissociação do farelo de soja das camadas borda em escova no intestino distal. Como a maioria dos efeitos das lectinas estão ligadas ao metabolismo intestinal, de maneira geral dietas contendo alimentos como o FSO causam alterações nas mucosas do trato gastrointestinal. Há aumento na densidade de células caliciformes o que gera uma hipertrofia na produção de muco, prejudicando a absorção do epitélio, diminuição de vacúolos absorptivos, e as microvilosidades dos enterócitos sofrem encurtamento com aumento de formação de vesículas nas microvilosidades (Francis et al., 2001).

Saponinas são esteróides ou glicosídeos termoestáveis solúveis em álcool, encontrados na soja, ervilha, girassol e tremoço. São moléculas anfipáticas, contendo um esteróide hidrofóbico que é ligado com uma ou mais cadeia de açúcares hidrofílicos. A glicação varia entre as saponinas e pode incluir glucose, galactose, ácido glucurônico, xilose ou ramnose (Krogdahl et al., 2010). Quando adicionadas à água, saponinas são altamente tóxicas aos peixes causando alterações no epitélio das brânquias através de sua ação detergente (Francis et al., 2001). Krogdahl et al. (1995) não encontrou efeitos negativos das saponinas na saúde de salmão do Atlântico alimentados com dietas contendo farelo de soja.

Em relação aos efeitos na digestão das proteínas e absorção de vitaminas, as saponinas ligam-se com o colesterol e formam um complexo insolúvel que não pode ser absorvido (NRC, 2011). Consequentemente há um aumento da permeabilidade das células do epitélio intestinal e inibição dos transportes de nutrientes na mucosa (Couto et al., 2015). Adicionalmente, precipitam o colesterol, provocam hemólise e são tóxicas quando injetadas, pois aumentam a permeabilidade da parede intestinal expondo-as a patógenos (Collins, 2014). Em salmonídeos, saponinas estão envolvidas no desenvolvimento da enterite, porém não atuam sozinhas (Knudsen et al., 2008; Uran et al., 2008). Elas desempenham um papel-chave na enterite induzida, porém o composto puro não irá induzir enterite, a menos que algum outro componente da planta também esteja presente na dieta (Baeverfjord e Krogdahl, 1996; Knudsen et al., 2008; Krogdahl et al., 2010). Como resultado foi relatado diminuição do crescimento em salmão do Atlântico alimentado com dietas contendo saponinas (Chikwati et al., 2012). Devido a sua atividade detergente, as saponinas aumentam a digestibilidade dos carboidratos reduzindo a viscosidade e prevenindo uma possível ação obstrutiva normal dos alimentos contra o movimento da digesta no intestino (Francis et al., 2001).

Dentre os efeitos benéficos das saponinas registram-se ação antifúngica, anticâncer, antiviral, atividade imunoestimulante e propriedades antioxidantes. Couto et al. (2015), avaliaram dietas contendo 1 a 2 g kg⁻¹ de saponinas, fitoesteróis e combinação de ambos na pescada europeia ("European sea bass *Dicentrarchus labrax*) e não registraram efeitos das saponinas sobre o crescimento, a digestibilidade e as atividades das enzimas digestivas, exceto uma alteração com efeito combinado que resultou em variação no tamanho do vacúolo supranuclear e inflamações no intestino distal. Krogdahl et al. (2015) relataram que as saponinas da soja induzem um quadro de enterite em salmão do Atlântico alimentados com dietas suplementadas com 2-4 g saponinas kg⁻¹, caracterizada pelo encurtamento da mucosa, pelas células inflamatórias que se infiltram na lâmina própria, e pela diminuição no número de vacúolos de absorção nos enterócitos; resultados semelhantes foram relatados por Silva et al. (2015) também para o salmão do Atlântico.

Os oligossacarídeos estão presentes nas leguminosas e cereais, quimicamente são derivados de α -galactosil de sacarose (Henri e Saini, 1989). Estes oligossacarídeos não são hidrolisados pelas enzimas endógenas dos monogástricos e são, portanto, de pouco valor para peixes carnívoros. Estes compostos são osmoticamente ativos e podem causar diarreia interferindo na digestão dos nutrientes (Refstie et al., 2005). É possível que o aumento dos níveis de oligossacarídeos nos alimentos possa estimular o crescimento de certos microrganismos e, conseqüentemente, alterar a microbiota. Há indícios de que manose e frutose podem exercer papel de probióticos (Krogdahl, et al, 2010).

Os principais oligossacarídeos da soja, sucrose, rafinose e estaquiose, quando presentes em altas proporções nas dietas de trutas diminuem a digestibilidade do alimento. Em salmão efeitos benéficos foram observados, não alterando a histologia do trato gastrointestinal, digestibilidade e crescimento (Krogdahl, 1995).

Os glucosinolatos/goitrogênicos são triglicerídeos, encontrados em espécies da família Brassicaceae (mostarda) e soja, e sua função está relacionada com distúrbios de síntese da produção do hormônio tireoidiano. Como consequência destes distúrbios ocorre alargamento da tireóide, gerando um bócio que age diretamente na glândula (Gaitan, 1990). A hidrólise dos glucosinolatos é catalisada

pelas tioglucosidases presentes nos próprios alimentos. Os principais efeitos encontrados nos animais são a redução da palatabilidade e do crescimento.

Os tiocianetos podem interferir com a disponibilidade de iodo, por outro lado 5-vinyl-1,3-oxazolodine-2-thione (VOT) é responsável pelas alterações morfológicas e fisiológicas na tireóide (NRC, 2011). Altos níveis de tiocianetos na dieta interferem na captação de iodo, reduzindo o consumo e o crescimento além de interferir nas funções renais e hepáticas (Collins, 2014). Níveis de 0.22-2.18 mmol kg⁻¹ de glucosinolatos na dieta não afetaram a ingestão, o crescimento e os níveis dos hormônios tireoidianos em do pargo, *Pagrus auratus* (Glencross et al., 2004). Entretanto, em trutas, níveis de 1.4 -19,3 mmol glucosinolatos kg⁻¹ de dieta causaram redução do crescimento e alteraram a histologia tireoidiana (Burel et al.; 2000).

Burel et al. (2001) sugerem que os efeitos não sinalizados dos glucosinolatos nos peixes aumentam no ambiente marinho em relação aos peixes de água doce em função da disponibilidade de iodo no habitat. Em embriões de zebrafish, *Brachidanio rerio*, foi relatada redução de locomoção e má-formação crânio-facial (Fetter et al., 2015). De fato, Francis et al. (2001) afirmam que a disfunção da tireóide induzida pela ingestão de glucosinolatos na dieta afeta o metabolismo do crescimento nos peixes. Porém estabelecer um nível na dieta torna-se difícil, uma vez que há disponibilidade de dados inadequados sobre a concentração tóxica de compostos como isotiocianetos e nitrilas, ambos responsáveis pelos efeitos negativos.

Taninos são poliésteres de ácidos fenólicos como ácido gálico e derivados da D-glucose. Taninos dietéticos podem induzir distúrbios digestivos ligando as enzimas ou complexando os componentes do alimento como proteína e minerais (NRC, 2011). São responsáveis pela redução da absorção da vitamina B12 (Francis et al, 2001). Os taninos podem ser classificados em duas formas: hidrolisáveis e não hidrolisáveis. As formas hidrolisáveis são facilmente degradadas em sistemas biológicos, uma vez que formam pequenos compostos que adentram na corrente sanguínea e ao longo do tempo causando toxicidade principalmente no fígado e rins, gastroenterites, hemorragias e necrose (Francis et al., 2001).

As carpas toleram 20 g de tanino do tipo não-hidrolizável por kg na dieta sem afetar o crescimento e o consumo (NRC, 2011). Pinto et al., (2001) estudaram o desempenho de piauçu *Leporinus macrocephalus*, alimentados com dietas contendo

0,00; 0,23; 0,46; 0,69; 0,92 e 1,37 % de taninos totais e relataram que níveis de até 0,69% de taninos totais não comprometeram a conversão alimentar e taxas de eficiência proteicas nas rações, mas o ganho de peso dos peixes que receberam dietas com níveis iguais ou superiores a 0,46% de taninos totais foi reduzido. As variáveis morfo-fisiológicas alteradas foram o índice hepatossomático e o conteúdo de extrato etéreo e proteína bruta no fígado. Os autores concluíram que esta espécie é mais sensível aos taninos condensados, que prejudicam o metabolismo e diminuem o valor biológico dos nutrientes nas rações.

O fitato e o ácido fítico são encontrados em vegetais e estocados primariamente como forma primária de inositol e fosfato nas sementes. A maioria das plantas contém ácido fítico (Collins, 2014). O farelo de soja, por exemplo, contém de 10-15 g fitato por quilograma. O ácido fítico forma um complexo com as proteínas em baixo pH, não é absorvido e passa indigerível nas fezes (NRC, 2011; Collins, 2014). Para evitar este problema recomenda-se a adição da enzima fitase às rações. A atividade da fitase pode ser dependente de temperatura, tanto externa quanto interna do corpo do peixe; a atividade em trutas, por exemplo, é comprometida uma vez que a temperatura do corpo é muito mais baixa que animais terrestres (Collins, 2014).

O ácido fítico interfere também nas atividades de proteases gástricas e intestinais, exercendo impacto negativo sobre a digestibilidade dos aminoácidos (Collins, 2014). Consequentemente, a digestibilidade de minerais como Mg e Zn também diminui, resultando em baixas concentrações de Ca, Mg e Zn na coluna vertebral e diminuindo a atividade da tripsina no intestino, induzindo a inflamações no intestino distal, como relatado para o salmão do Atlântico (Denstadli et al., 2006; Helland et al., 2006). Foi também relatado sinais de hipertrofia e vacuolização no citoplasma de cecos pilóricos e diminuição do crescimento de trutas alimentadas com dietas adicionadas de ácido fítico (NRC, 2011).

Com uma pigmentação amarela, o gossipol é um aldeído polifenólico presente no algodão, com teores variando até 6%, solúvel em lipídeos e considerado tóxico para animais monogástricos. A forma de seus dois enantiômeros pode variar de acordo com o processamento. A forma livre tem função pro e anti-oxidante, e em ocasiões de estresse, origina espécies reativas de oxigênio, quebra o DNA, e em seguida se liga a membranas inibindo a síntese de DNA, e diminuindo o ferro e a glutatona em mamíferos (Francis et al., 2001; NRC, 2011;). Adicionalmente, pode

ligar-se ao ferro da dieta tornando-o indisponível e causando deficiência deste mineral em animais monogástricos (Salaro et al., 1999; Butolo, 2002).

Nos peixes, a idade, o tamanho dos animais e o tipo de dieta condicionam efeitos diferentes do gossipol. Os efeitos tóxicos incluem a diminuição do consumo, do crescimento, do hematócrito, da hemoglobina e da capacidade reprodutiva (NRC, 2011). Efeitos danosos também são observados sobre a mucosa intestinal. O gossipol pode ainda induzir deficiência de metionina, necrose nas células do fígado, encurtamento da membrana glomerular e acúmulo dos grânulos de pigmentos ceróides.

Níveis de 0,1 % de gossipol na dieta resultam em degenerações no fígado dos peixes (Francis et al., 2001). Por outro lado, a inclusão de 900 mg de gossipol kg^{-1} na dieta de juvenis de bagre do canal estimula o sistema imunológico e melhora na atividade do macrófago e da lisozima no soro (Yildirim et al., 2003).

O ácido graxo ciclopropeno ou ciclopropenoídicos, encontrado no óleo e no farelo de algodão, ocorre em duas formas principais: estercúlico (ácido 9,10-metilenooctadec-9-enóico) e malválico (ácido 8,9-metilenooctadec-8-enóico). Ambos inibem a atividade das desaturases, gerando alterações no metabolismo lipídico e aumento acúmulo de ácido graxo saturado no corpo dos animais. Em trutas, ciclopropenos alteram o sistema oxidase e outras enzimas do fígado, além de promover acúmulo anormal de glicogênio, necrose e fibrose nos hepatócitos (NRC, 2011).

De ocorrência no girassol e no farelo de soja, os inibidores de arginase são derivados de nitrogênio dos componentes fenólicos do ácido clorogênico. Sua atividade pode ser inibida e bloqueada por agentes redutores orgânicos, como a L-cisteína, e é inativado pela oxidação. Nos peixes, estes inibidores participam do metabolismo e biossíntese da L-arginina e ativação de macrófagos, além de reduzirem a proliferação e a diferenciação celular, lesando principalmente os enterócitos e aumentando a produção de óxido nítrico (NRC, 2011).

Os alérgenos fazem parte do consumo humano e animal, e estão disponíveis no farelo de soja por conter glicinina, β -conglucina e proteínas. Fisiologicamente reagem com anticorpos da imunoglobulina E induzindo a reações alérgicas, que resultam em uma degranulação celular e liberação de histamina, tornando-as resistentes a hidrólise no TGI (NRC, 2011). Como consequência, lesionam a mucosa intestinal, geram anormalidades nas dobras, estimulam as

respostas imunes não específicas e os movimentos anormais da digesta no intestino (Francis et al., 2001). As reações de hipersensibilidade são relatadas em Perciformes e ausência de efeitos histamínicos em salmão. Estas reações ocorrem normalmente no intestino distal, região sensível à estimulação do antígeno onde as respostas imunológicas são liberadas no intestino com antígenos para estas regiões (NRC, 2011).

O farelo de soja contém glicinina e β -conglucina, e proteínas globulares envolvidas em reações alérgicas que afetam o crescimento de trutas. No intestino distal esta inflamação é frequente em salmão do Atlântico, resultando em resposta inflamatória nas células intestinais (Baeverfjord e Krogdahl, 1996).

Em seu mecanismo de ação, os FAN interagem entre si, naqueles ingredientes que possuem mais de um fator. Desta maneira estes efeitos podem ser tanto benéficos como detrimentais. Alguns FAN possuem a capacidade de interagir com as lectinas removendo desta forma a ação inibitória dos taninos e amilase. Saponinas da soja não induzem a resposta inflamatória no intestino distal de salmão, porém quando combinadas com lupinas causam inflamação e aumentam a permeabilidade intestinal. Alterações na microbiota intestinal também são observadas quando há interação com as saponinas. A combinação de inibidores de lectina e tripsina da soja induz a diminuição da absorção de glicose nas células epiteliais do intestino de salmão (NRC 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios que compõem este trabalho foram conduzidos no Laboratório de Nutrição de Peixes do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as determinações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ESALQ), Protocolo CEUA 2015-03.

3.1. Ensaio I – Digestibilidade

Uma dieta referência (Tabela 1) foi formulada com ingredientes práticos através do conceito de proteína ideal, extrudada em matriz de 3 mm, seca em estufa com circulação de ar forçada (50°C) por 24 horas e armazenada em câmara fria (-18 °C) até a sua utilização. As dietas-teste foram preparadas substituindo-se 30% da dieta referência por FSO, FAL e FAM para determinação dos coeficientes de digestibilidade de cada um destes ingredientes (Tabela 2).

Tabela 1. Composição da dieta referência (matéria natural) dos ensaios de digestibilidade

Ingredientes	Inclusão
	%
Farelo de soja	40,00
Farinha de peixe	30,00
Farelo de milho	8,00
Farelo de trigo	15,00
Amido	16,74
Óleo de soja	5,00
Metionina	0,50
Lisina	0,50
Fosfato bi cálcico	0,00
Premix ¹	1,00
BHT ²	0,02
Oxido de crômio	0,10
Composição	
Energia Bruta (kcal kg ⁻¹)	4505,00
Fibra Bruta (%)	3,96
Extrato Etéreo (%)	6,95
Proteína Bruta (%)	37,33
Matéria Mineral (%)	9,39

¹ Enriquecimento por kg do produto (Premix Nutrifish Guabi®, Campinas, SP, Brasil): Fe 15000 mg; Cu 15000 mg; Zn 12500 mg; I 375 mg; Mn 12500 mg; Se 87.5 mg; Co 125 mg; vitamina A 2 500 0000 IU; vitamina D3 600 000 IU; vitamina E 37 500 IU; vitamina K 3 750 mg; vitamina C 50 000; vitamina B1 4 000 mg; vitaminB2 4 000 mg; vitamina B6 4 000 mg; vitamina B12 4 000 mg; acido pantotênico 12 000 mg; biotina 15 mg; acido fólico 1 250 mg; niacina 22 500 mg; BHT 15 000 mg

² Butil-hidroxí-tolueno.

Tabela 2. Composição química e nutricional da farinha de peixe (FP), farelo de soja (FSO), farelo de algodão (FAL) e farelo de amendoim (FAM).

Composição/Ingredientes	FP	FSO	FAL	FAM
Matéria seca (%)	93,89	87,85	91,47	91,93
Extrato etéreo (%)	8,30	0,92	2,89	1,09
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4373,00	4172,00	4160,00	4311,00
Fibra Bruta (%)	9,31	41,99	28,40	14,24
Proteína Bruta (%)	63,24	47,05	47,63	56,47
Matéria Mineral (%)	20,50	6,74	6,22	6,44
Cálcio	6,31	0,33	0,22	0,12
Fósforo	3,30	0,60	1,04	0,58
Aminoácidos				
Essenciais				
Arginina	3,78	3,38	5,90	7,03
Histidina	2,20	1,22	1,28	1,28
Isoleucina	2,14	1,73	1,22	1,68
Leucina	4,15	2,91	2,42	3,3
Lisina	4,50	2,86	2,48	2,49
Metionina	1,76	0,34	0,41	0,36
Fenilalanina	2,30	1,94	2,33	2,61
Tirosina	2,67	1,60	1,26	2,18
Triptofano	0,70	0,49	0,54	0,46
Valina	3,09	1,72	1,66	1,87
Não-essenciais				
Acido Aspártico	4,04	5,50	4,21	6,35
Glutamina	7,09	8,63	9,54	11,03
Alanina	4,02	1,84	1,58	2,00
Cisteína	0,89	0,52	0,66	0,67
Glicina	4,89	2,24	2,08	3,93
Prolina	3,06	2,55	1,87	2,66
Serina	2,45	2,63	2,23	3,07
Tirosina	1,90	1,49	1,26	2,18

Juvenis de dourado (45,00 ± 0,15 g) foram distribuídos em grupos de 20 indivíduos, alojados em nove gaiolas plásticas (150 L) submersas em três tanques de polipropileno (1.000 L) sob fluxo contínuo de água e aeração constante e adaptados às condições experimentais por um período de sete dias. A temperatura e a aeração da água dos tanques foram controladas diariamente e sua renovação foi parcial. A temperatura média para o período da manhã e da tarde foram 24,22 ± 4,25 e 28,94 ± 0,78 °C, respectivamente.

Após o período de adaptação os peixes passaram a ser alimentados cinco vezes ao dia (08h30m, 10h30m, 12h30m, 14h30m e 16h30m) até a saciedade aparente e 60 minutos após a última alimentação, eram transportados aos tanques

cilíndrico-cônico (200L) dotados de sistema de troca superficial de água, onde permaneciam até às 07h00m do dia seguinte. Durante este período, era feita a coleta de fezes por sedimentação diretamente em recipientes acoplados ao fundo dos tanques e imersos em gelo para preservar as fezes da degradação bacteriana. As coletas foram feitas até a obtenção de 15 g de fezes secas para cada unidade experimental. As fezes coletadas foram centrifugadas (3.100 g, 4°C, 10 min) e preservadas em freezer (-20°C) para posterior liofilização, moagem e determinação da composição centesimal: matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), fibra bruta (FB) e energia bruta (EB) (AOAC, 2000) (CBO Análises, Campinas, SP). Ingredientes e rações foram analisados quanto aos teores de energia bruta e proteína bruta (AOAC, 2000). A concentração do indicador inerte (óxido de cromo -Cr₂O₃) das rações e fezes feita segundo metodologia de Bremer Neto et al. (2005). Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) foram calculados como segue.

Para nutrientes (Hepher, 1998):

$$CDA = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% Cr_2O_3 \text{ na dieta}}{\% Cr_2O_3 \text{ nas fezes}} \right) \right] \times \left(\frac{\% \text{ do nutriente ou energia bruta nas fezes}}{\% \text{ do nutriente ou energia bruta na dieta}} \right)$$

Para ingredientes (Portz e Cyrino, 2004)

$$CDA = \left[CDA \text{ da dieta experimental} - \frac{(0,7 \times CDA \text{ da dieta referência})}{0,3} \right]$$

3.2. Ensaio II – Desempenho e histologia intestinal

O ensaio II foi realizado em delineamento inteiramente aleatorizado, esquema fatorial, com uma dieta controle à base de farinha de peixe, três fontes proteicas vegetais (FSO, FAL e FAM) com e quatro níveis de inclusão cada uma com três repetições (3 x 5 x 3). Os níveis utilizados para a substituição de cada fonte foram 0 (dieta controle- FP), 25,0 %; 50%; 75,0% e 100% em cada fonte (Tabela 3).

Juvenis de dourado (13,47 ± 2,70 g; 10,97 ± 0,46 cm comprimento padrão) foram mantidos por 40 dias em tanques de polipropileno (300 L; n = 10) com suprimento de água e aeração constantes, e alimentados duas vezes ao dia até a saciedade aparente (Figura 2); a cada alimentação era feito o controle do consumo

de alimento. O fotoperíodo do sistema foi de 12h-claro:12h-escuro. A primeira coleta das amostras intestinais ocorreu aos 20 dias e a segunda aos 40 dias. Para tanto, os peixes foram submetidos a jejum de 24 horas e anestesiados em solução de benzocaína 0,5% imediatamente antes da biometria.

Dados biométricos obtidos foram utilizados para estimar as seguintes variáveis: ganho de peso ($GP = \text{peso final} - \text{peso inicial}$); conversão alimentar [$CA = \text{consumo (g)} / \text{ganho de peso (g)}$]; taxa de eficiência proteica [$TEP\% = \text{ganho de peso (g)} / \text{proteína na dieta (g)}$]; taxa de crescimento específico [$TCE\% = 100 \times [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{dias}]$]. Oxigênio dissolvido ($5,85 \pm 0,42 \text{ mg L}^{-1}$), pH ($7,69 \pm 0,63$) e temperatura ($25,84^\circ\text{C} \pm 1,14$) foram monitorados diariamente através de sonda multiparâmetro, enquanto que a amônia ($0,04 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,25$), foi monitorada uma vez por semana através de kit colorimétrico (Labcon Test água doce).

Tabela 3. Composição das rações utilizadas no ensaio histológico de juvenis de dourado.

	FPE		FSO			FAL				FAM			
Ingredientes	RR	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
			----- % -----										
Farinha de peixe	35,50	26,63	17,75	8,88		26,63	17,75	8,88		26,63	17,75	8,88	
Farelo de soja		8,88	17,75	26,63	35,50								...
Farelo de algodão						8,88	17,75	26,63	35,50				
Farelo de Amendoim										8,88	17,75	26,63	35,5
Gluten de milho	10,88	17,59	15,47	20,49	20,07	11,83	12,79	13,74	14,70	11,53	12,19	12,84	13,50
Farinha de vísceras	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
Milho grão	33,50	30,37	26,80	24,12	21,00	33,01	32,54	32,05	31,58	32,45	31,41	30,36	29,33
Farelo de trigo	1,50	2,38	3,25	4,12	5,00	1,12	0,75	0,37		2,12	2,75	3,37	4,00
Óleo de soja	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L-lisina	1,00	0,83	0,65	0,48	0,31	0,9	0,8	0,7	0,6	0,89	0,75	0,67	0,55
Fosfato bicalcico	...	0,62	1,25	1,87	2,50	0,62	1,25	1,87	2,5	0,5	1	1,5	2,00
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix vitamínico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
NaCl	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Hidrolisado de fígado	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Celulose	3,50	2,74	2,00	1,24	0,5	2,62	1,75	0,87	...	2,62	1,75	0,87	...
Nutrientes (valores analisados)													
MS	94,46	93,25	92,53	89,64	88,09	94,21	94,08	93,84	93,43	94,27	94,31	93,39	93,69
PB	46,51	43,15	42,44	43,00	43,80	46,47	46,66	45,31	44,25	48,75	46,78	45,43	45,56
EE	9,06	8,27	7,56	5,87	5,38	8,57	7,82	7,37	6,29	9,2	8,08	6,9	6,26
FB	1,22	1,74	2	2,75	2,46	1,97	3,45	4,14	6,14	1,38	1,93	2,52	2,89
Umidade	5,54	6,75	7,47	6,36	6,91	5,79	5,92	6,16	6,57	5,73	5,69	6,61	6,31
MM	13	11,28	9,99	8,15	6,71	12,03	11,38	9,87	8,37	13,1	11,09	9,25	7,68
EB (kcal kg ⁻¹)	4.462,00	4.413,00	4.316,00	4.202,00	4.066,00	4.432,00	4.435,00	4.466,00	4.477,00	4.427,00	4.437,00	4.348,00	4.387,00

3.2.1. Coleta das amostras

Imediatamente após a retirada do trato gastrointestinal, a porção do intestino foi removida e suas alças desfeitas. O intestino foi dividido em região anterior, médio e posterior. A porção do intestino posterior foi coletada de maneira intacta (Figura 1). Uma amostra aleatória de três peixes por tratamento foi coletada e destinada às análises de microscopia óptica e microscopia de varredura.

Figura 1 – Segmentação arbitrária do sistema digestório do dourado (foto original T.M.P. Cruz).

3.2.2. Microscopia óptica

A fixação das amostras de tecido foi feita em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,2 por 2 horas. As amostras intestinais foram repicadas em tamanhos de 3 x 3 mm e armazenadas em solução de paraformaldeído 4% em PBS a 3°C por doze horas. Em seguida, os tecidos foram lavados com PBS 0,1 M, pH 7,2, desidratados em soluções crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), pré-infiltrados em etanol e resina (3:1; 1:1), e em seguida infiltrados com 100% de resina glicol metacrilato (Technovit®, 7100, Kulzer). Após a infiltração, as amostras foram imersas em histomoldes com resina adicionada de endurecedor e mantidas em estado de anaerobiose em estufa com temperatura de 38 °C durante uma semana. Os blocos obtidos foram aparados, fixados em blocos de madeira e seccionados por navalha de aço em um micrótomo manual EasyPath, obtendo-se dez cortes longitudinais e transversais de 5 µm de espessura, não sequenciais e em seguidas corados com hematoxilina e eosina (H&E). Foi confeccionada uma lâmina por segmento por peixe, e em cada uma delas foram selecionados 10 campos para as seguintes aferições morfológicas do tecido intestinal: altura da dobra (AD), submucosa ou lâmina-própria (SB), espessura da camada muscular (ECM) e quantificação do total de células caliciformes (GC). As medidas foram feitas utilizando o software Microscope AxiVision LE® (Zeiss Group, Oberkochen, Alemanha), e para a quantificação do total das células caliciformes utilizou-se o software Image J® (National Institutes of Health, EUA). Para análise da integridade da mucosa intestinal, foi feita a caracterização das dobras intestinais, e detectada a presença de vacúolos supranucleares, infiltração de células de

leucócitos granulócitos e alterações celulares no tecido conjuntivo explanadas por diversos autores.

3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura

Após serem armazenadas em solução Karnovsky, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio solução a 2% por duas horas e lavadas três vezes consecutivas com água destilada. Em seguidas as amostras foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de acetona 30 e 50 (uma vez por 10 minutos), 70% (uma vez por duas horas), 90% (uma vez por quinze minutos) e 100% (três vezes por 15 minutos). Ao término da desidratação, as amostras foram acondicionadas em gaiolas e submetidas a secagem ao ponto crítico (Blazers CPD-030). Em seguida, foram montados os 'stubs', metalizadas com ouro paládio (40 µm) a vácuo (Blazers MED-010) e examinados ao microscópio eletrônico (LEO 435 VP, Carl Zeiss). Dez imagens por amostra foram captadas e assim feitas a classificação morfológica das disposições das dobras e verificadas alterações presentes no epitélio e nas microvilosidades.

3.3. Análises estatísticas

Os dados de desempenho foram submetidos à análise de variância constatado o efeito da fonte vegetal e o nível de inclusão e interação entre este e o efeito em relação ao controle (Schaarschmidt e Vaas, 2009), os dados de histologia foram também submetidos a análise de variância considerando adicionalmente o efeito do dia de coleta. A suposição de homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos foram testadas mediante os testes de Brown Forsythe e Shapiro-Wilk, respectivamente. Contrastes ortogonais foram delimitados para comparação dos tratamentos (desempenho) e para comparar entre cada tratamento e o controle em cada um das datas de coleta (Schaarschmidt e Vaas, 2009). Quando a suposição de homogeneidade de variâncias não foi satisfeita, optou-se por contrastes ortogonais com variâncias heterógenas (Esther Herberich¹, Johannes Sikorski², Torsten Hothorn^{1*}). Os dados foram analisados com o uso do aplicativo R v3.4.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio I- Digestibilidade

O termo digestibilidade pode ser compreendido como a eficiência com que o organismo hidrolisa os nutrientes, sendo influenciado pelos componentes da dieta, ou seja, a fração do alimento disponível para o animal (NRC, 2011). O hábito alimentar do dourado e as suas diferenças anatômicas e fisiológicas podem explicar as variações nos coeficientes de digestibilidade para os diferentes nutrientes.

A avaliação dos ingredientes proteicos deve ser feita em função da digestibilidade dos nutrientes presentes. As fontes vegetais apresentam fatores antinutricionais tais como inibidores de proteases, fitatos, entre outros, que reduzem a digestibilidade dos alimentos.

A digestibilidade está relacionada com a atividade enzimática do trato gastrointestinal, variando de acordo com a espécie. Desta maneira, os peixes adaptam suas funções metabólicas aos substratos dietéticos, regulando a secreção de enzimas de modo a melhorar a utilização dos alimentos. No caso do dourado, o intestino é curto e adaptado a alimentos altamente digestíveis e densos em nutrientes, ricos em proteína e pobres em carboidratos. Este baixo aproveitamento de carboidratos ocorre devido à baixa atividade de carboidrases (α -amilase, celulase e invertase) sobre as fontes vegetais (Allan et al., 2000; Chaudhuri et al., 2012). Como carnívoros possuem menor plasticidade digestiva que onívoros (p.ex.), a atividade de carboidrases em seu TGI é menor; assim, eles não têm habilidade em digerir as fontes vegetais (ricas em carboidratos). Os polissacarídeos não amiláceos interferem na digestibilidade e aumentam a viscosidade da dieta o que dificulta a ação de enzimas sobre a proteína.

O FSO apresentou menor coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da proteína bruta (PB) que o FAM, ($CDA_{FSO} = 82,27 \pm 4,92$; $CDA_{FAM} = 96,73 \pm 0,45$, respectivamente) ($p=0,07$) (Tabela 4). Borghesi et al. (2009) não registraram diferenças na digestibilidade da proteína bruta da farinha de peixe, da farinha de abatedouro avícola, do farelo de soja e da protenose de milho para o dourado, que neste estudo também digeriu eficientemente a PB do FAM e da FP.

Tabela 4. Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e da energia da ração referência, e dos ingredientes testados para dourado.

Digestibilidade	FP	FSO	FAL	FAM
	%	%	%	%
Proteína	95,72 ± 0,36	82,27 ± 4,92	88,0 ± 9,60	96,73 ± 0,45
Energia	85,71 ± 0,94	81,82 ± 9,12	66,72 ± 12,17	76,55 ± 0,94

Valores calculados com o uso dos coeficientes de digestibilidade aparente com o $n=3 \pm$ desvio padrão.

Não foi registrada diferença para o CDA da energia bruta dos ingredientes restados ($p=0,1658$), o que pode ser explicado pela variação na composição de cada ingrediente-teste. Braga et al. (2008) determinaram o valor nutricional de diferentes fontes proteicas para juvenis do dourado alimentados ad libitum e verificaram que entre os ingredientes de origem vegetal, a glutenose apresentou os melhores resultados para CDAEB e CDAPB (95,7 e 96,9%, respectivamente), e a farinha de sangue se destacou entre os ingredientes de origem animal (94,1 e 96,3%, respectivamente). O CDAPB do FAM neste trabalho apresentou valores semelhantes a estas fontes de proteína testadas por Braga et al (2008).

4.2. Ensaio II- Desempenho e histologia do epitélio intestinal

A inclusão de FAM nas dietas aumentou o consumo diário de ração (Tabela 6). Tal fato pode ser explicado pela melhor palatabilidade dos ingredientes FAL e FAM. Entretanto isto não implicou em uma melhora na conversão alimentar aparente, provavelmente porque a digestibilidade para energia desses ingredientes seja menor, implicando em um aumento no consumo para satisfazer a exigência energética. As proteínas do FAL e do FAM estão mais disponíveis que a do FSO, porém a energia tem baixo aproveitamento o que poderia ter interferido no consumo.

A conversão alimentar aparente do FAL100 foi $0,79 \pm 0,48$ com efeito significativo apenas para esta fonte ($p=0,01831$). Como os peixes carnívoros, não utilizam de forma eficiente os carboidratos das fontes vegetais devido à baixa secreção da α -amilase, provavelmente ocorreu uma piora nos valores de conversão principalmente para o FSO 100 que diminuiu o crescimento.

A taxa de eficiência proteica (TEP) não foi afetada pelas fontes proteicas vegetais alternativas, embora os fatores antinutricionais estivessem presentes na

composição dos ingredientes vegetais. As fontes vegetais também alteraram a taxa de crescimento específico. Efeito foi observado do FSO em relação ao FAL e do FAL em relação ao FAM. Sabe que FANs além de efeitos negativos no crescimento e saúde, também podem ter efeitos benéficos quando utilizados em pequenas concentrações (Krogdhal et al, 2015). Este resultado pode ser justificado para o FAL que embora tenha gossipol em sua composição, o processamento do ingrediente ou a dosagem deste fator possa ter estimulado o crescimento.

Tabela 5. Efeitos das fontes proteicas vegetais sobre os parâmetros de desempenho de juvenis de dourado.

Parâmetros	P-value		
	Fonte	Nível	Fonte x Nível
Ganho de peso	0,0004	0,6276	0,0959
Consumo diário	0,0011	0,3077	0,3662
CAA	0,01831	0,7857	0,1994
TEP	0,0692	0,7495	0,1620
TCE	0,0085	0,7348	0,0811

TCE – taxa de crescimento específico (% dia⁻¹)

CAA – conversão alimentar aparente

TEP – taxa de eficiência proteica

O ganho de peso decresceu em peixes alimentados com dieta contendo FAM e FSO comparativamente àqueles alimentados com dietas contendo FP e FAL. Enquanto a inclusão de FSO na dieta geralmente resulta em pior desempenho, efeitos positivos da inclusão do FAL são destacados por vários autores em diversas espécies. Quando usado em substituição da farinha de peixe até 50% de inclusão na dieta de tilápias *Oreochromis niloticus*, o FAL não altera os parâmetros de desempenho, entretanto acima de tais níveis ocorrem alterações significativas (Mbahinzireki et al. 2001). Entretanto, Yi Hu et al. (2014) relataram que em carpas pretas, *Mylopharyngodon piceus*, a inclusão de até 75% do FAL substituindo o FSO na dieta não reduziu o crescimento. O Anostomidae neotropical piavuçu *Leporinus macrocephalus* alimentado com dietas FSO em substituição ao FAL, apresentaram melhores índices de peso final, conversão alimentar aparente e taxa de eficiência proteica quando a inclusão de FAL nas dietas não ultrapassava 50% da proteína do FSO (Galdioli et al., 2001). Para tilápia-do-Nilo a inclusão de FAM na dieta resulta em queda no ganho de peso quando os níveis de inclusão forem acima de 50%, desta forma este resultado pode estar relacionado à deficiência de aminoácidos essenciais (lisina, metionina e treonina) ou a presença de fatores antinutricionais,

conforme Jackson et al (1982), Hasan et al. (1997) e Agbo et al (2011) respectivamente. Em carpas crucianas, *Carassius auratus*, Cai et al. (2013) relataram que o uso do FAM em substituição à FP na dieta não gerou alterações significativas no consumo de ração com 25 e 50% de inclusão FAM, entretanto alterações na mucosa intestinal e respostas inflamatórias foram registradas. Sugerindo que altos níveis do FAM em carpa cruciana não só reduziram o crescimento, mas também trouxeram riscos de saúde para a espécie.

O uso do FSO na dieta não influenciou positivamente o crescimento do dourado, efeito observado principalmente em espécies carnívoras (Tabela 5). Olsen et al. (2007) sugerem que até 75% da substituição total da FP por FSO em dietas para bacalhau do Atlântico não afeta o desempenho da espécie, porém quando a FP é substituída totalmente ocorre alteração da morfologia intestinal gerando uma hipertrofia e hiperplasia das células caliciformes intestinais ocasionando uma enterite, mais específica no intestino distal. Resultados similares foram relatados para salmonídeos por Van der Inghi et al. (1991).

Tabela 6. Desempenho zootécnico de juvenis de dourado alimentados com diferentes níveis de diferentes fontes proteicas vegetais.

Parâmetros	Níveis de Substituição												
	FP		FSO			FAL				FAM			
	0	25	50	75	100	25	50	75	100	25	50	75	100
Peso inicial	13,58 ± 0,64	14,33 ± 1,56	12,98 ± 2,44	11,48 ± 1,02	14,40 ± 2,17	11,53 ± 4,34	15,03± 2,05	14,33 ± 2,11	12,40 ± 0,10	12,83 ± 2,49	10,10 ± 2,40	13,43 ± 0,51	12,07 ± 1,10
Peso final	36,07 ± 4,47	28,29 ± 3,57	30,56 ± 1,48	28,97 ± 1,66	25,79 ± 9,05	34,59 ± 2,10	34,30 ± 2,75	42,56 ± 4,77	57,55 ± 37,14	35,93 ± 3,62	32,20 ± 5,46	30,00 ± 2,60	31,33 ± 3,21
Ganho de peso	22,48 ± 3,47	13,96 ± 2,71	17,57 ± 1,43	17,49 ± 1,17	11,39 ± 7,17	23,06 ± 4,28	19,27± 2,15	28,23 ± 2,68	38,05 ± 25,05	23,09 ± 4,15	22,10 ± 8,55	16,57 ± 3,09	19,27 ± 3,61
Ganho de peso/dia	0,56 ± 0,10	0,35 ± 0,07	0,44 ± 0,04	0,44 ± 0,03	0,28 ± 0,18	0,58 ± 0,11	0,48 ± 0,05	0,71 ± 0,07	0,60 ± 0,19	0,58 ± 0,10	0,55 ± 0,21	0,41 ± 0,08	0,48 ± 0,09
Consumo/dia	0,57 ± 0,04	0,57 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,56 ± 0,36	0,54 ± 0,07	0,65 ± 0,03	0,64 ± 0,01	0,65 ± 0,04	0,58 ± 0,09	0,68 ± 0,07	0,60 ± 0,04	0,59 ± 0,04	0,64 ± 0,04
CAA	1,02 ± 0,12	1,68 ± 0,41	1,28 ± 0,20	1,28 ± 0,15	1,56 ± 0,30	1,16 ± 0,28	1,33 ± 0,17	0,93 ± 0,14	0,79 ± 0,48	1,21 ± 0,37	1,21 ± 0,51	1,44 ± 0,21	1,38 ± 0,33
TEP (%)	2,12 ± 0,25	1,43 ± 0,31	1,87 ± 0,27	1,84 ± 0,23	1,49 ± 0,28	1,93 ± 0,45	1,62 ± 0,19	2,40 ± 0,36	2,58 ± 1,22	1,78 ± 0,46	1,95 ± 0,66	1,55 ± 0,21	1,66 ± 0,42
TCE (%)	2,43 ± 0,20	1,70 ± 0,24	2,17 ± 0,36	2,32 ± 0,15	1,37 ± 0,64	2,89 ± 1,05	2,07 ± 0,09	2,73 ± 0,10	2,68 ± 0,39	2,60 ± 0,54	2,95 ± 1,17	2,00 ± 0,31	2,39 ± 0,47

GP – ganho de peso (g)

TCE – taxa de crescimento específico (% dia⁻¹)

CAA – Conversão alimentar aparente

TEP – taxa de eficiência proteica

4.2.1. Histologia do epitélio intestinal

O tecido intestinal do dourado assemelha-se ao arranjo estrutural de outras espécies de teleósteos. Na camada mucosa o tecido era do tipo epitelial simples com a presença de células caliciformes entre os enterócitos. Na submucosa ou lâmina-própria foram identificados linfócitos e presença de vasos sanguíneos. A camada muscular inclui o músculo liso circular interno e longitudinal externo e a última camada, serosa, é revestida pelo mesotélio (Figura 2). De maneira geral, as dobras do intestino posterior do dourado são simples, altas e distribuídas em anastomose. A coloração H&E revelou estruturas proteicas que foram coradas pelos ácidos (eosina) permitindo observar estruturas acidófilas: o citoplasma. Por isso o citoplasma e as fibras colágenas do tecido conjuntivo são corados em rosa. Os resultados das medidas morfométricas do epitélio intestinal estão apresentados na Tabela 7 e na Tabela 8 estão discriminadas as médias com comparação de contrastes. Para a análise morfométrica da altura das dobras, considerou-se o início da região basal da dobra até o ápice da mesma (Figura 3). Efeito de interação fonte x nível x abate foi observado para a altura da dobra (AD) (Tabela 7).

Figura 2. Estrutura histológica do intestino posterior de dourado.

Mucosa (Muc); Lâmina-própria (LP); muscular (Mus) e serosa (*). Barra:100 μ m. H&E.

Tabela 7. Efeitos sobre os parâmetros morfométricos do epitélio intestinal.

Parâmetros	p-value						
	F	A	N	F x A	N x A	F x N	F x A x N
Altura da dobra (µm)	0,093	0,0041	0,0539	0,0419	0,0111	0,0419	0,0048
Lâmina-propria (µm)	0,4629	0,0026	0,0098	0,3575	0,0048	0,0002	0,1254
Camada Muscular (µm)	0,0331	0,0341	0,1953	0,0012	0,0242	0,0001	0,0115
Total de Células Caliciformes	0,1003	0,3539	0,0422	0,0014	0,0976	0,0191	0,0002

F: fonte; A: abate; N: nível.

Figura 3. Dobras no intestino posterior de dourado A: Altura da dobra do epitélio intestinal dos juvenis de dourado; B: Dobras em anastomose. H&E.

Aos 20 dias a altura das dobras (AD) dos peixes alimentados com as dietas FSO50 e FAL100 foram menores em relação ao controle FP , sugerindo um efeito do FAN presente nestas fontes causando um encurtamento das dobras. Correa (2016) relatou encurtamento das dobras em juvenis de dourado alimentados com níveis crescentes de concentrado proteico de soja. Desta forma, as dobras são formadas por células imaturas, prejudicando os processos absorptivos e digestivos (Chikiwati et. al, 2013). Por outro lado, aos 40 dias a AD dos peixes alimentados com a dieta FSO50 foi semelhante ao controle FP aos 20 dias. Este fato implica em que aos 40 dias o FSO induziu a uma resiliência no intestino posterior, ou seja, a capacidade do peixe em se adaptar e os enterócitos renovarem o tecido epitelial.

A lâmina-própria ou submucosa formada por tecido conjuntivo tem relação direta com enteropatias causadas por fontes proteicas vegetais, uma vez que células inflamatórias (linfócitos) aparecem quando ocorre sinal de inflamação. Efeito de interação para fonte x abate e fonte x nível foram registrados. Os juvenis de dourado

que receberam FSO50 ($276,15 \pm 19,64$) apresentaram aumento no comprimento da lâmina-própria em comparação à FP aos 20 dias, enquanto que para o mesmo tratamento do FSO50 aos 40 dias houve uma diminuição, sendo semelhante ao controle aos 20 dias, apresentando o mesmo padrão para a altura das dobras. Ocasionalmente eosinófilos (linfócitos) estavam presentes na lâmina-própria, indicando processos alérgicos e inflamações, entretanto considerando a função imunológica do intestino, a presença destas células também é normal.

As células caliciformes, responsáveis pela produção de muco, lubrificação e proteção da mucosa contra agentes bacterianos, estavam presentes em todos os tratamentos (Figura 4). O fato do epitélio intestinal apresentar uma maior densidade destas células pode ser um indicativo de processo de agressão, ou uma relação com as diferentes condições de alimentação e à atividade antibacteriana (Honorato et al., 2011; Santos et al., 2007). Efeito de fonte x abate x nível foi registrado. De forma geral os juvenis que receberam FSO50 e FSO75 apresentaram aumento da densidade das células caliciformes aos 40 dias – $45,22 \pm 1,34$ e $36,66 \pm 3,84$, respectivamente, um sinal de aumento da produção de mucinas e muco para a passagem da digesta. Aos 20 dias os peixes alimentados com dietas contendo FSO 50 ($15,77 \pm 1,83$) e FSO75 ($15,88 \pm 1,83$) apresentavam menos células caliciformes que aqueles alimentados com a dieta controle FP ($31,00 \pm 5,48$). Aos 40 dias os peixes alimentados com a dieta FAL25 ($22,44 \pm 1,53$) apresentavam menos células caliciformes comparativamente àqueles alimentados com a dieta controle (FP) ($32,55 \pm 4,72$).

Figura 4. Mucosa com suas dobras e camada muscular do intestino posterior de dourado. A: Células caliciformes entre os enterócitos; B: Espessura da camada muscular, circular interna (Ci) e longitudinal externa (Le) H&E.

A camada muscular é responsável pelos movimentos peristálticos e a sua espessura pode ser alterada no segmento intestinal pela espécie, o hábito alimentar e a composição da proteína da dieta (Cao e Wang, 2009; Cardoso, 2005; Makino, 2010). Nessa análise considerou-se na aferição a camada muscular interna e externa (Figura 5). Efeito de interação para fonte x período x nível foi registrado para a espessura da camada muscular. Os tratamentos que aumentaram a espessura da camada muscular (ECM) significativamente dos 20 aos 40 dias foram: FSO75, FAL25, FAL100 e FAM50. Estes resultados indicam que o aumento da ECM está relacionado com o aumento no trânsito intestinal.

Por outro lado, aos 20 dias, peixes alimentados com as dietas FSO75 ($104,07 \pm 4,49$) e FAL100 ($111,82 \pm 6,06$) apresentaram menor espessura da camada muscular em relação ao controle ($153,16 \pm 16,32$). Aos 40 dias peixes do tratamento FSO100 apresentaram o maior comprimento da camada muscular ($181,93 \pm 33,40$) comparativamente ao controle FP ($77,99 \pm 44,63$). Peixes alimentados com a dieta FAM50 apresentavam aos 40 dias uma queda acentuada na espessura da camada muscular, de $131,86 \pm 17,50$ para $66,87 \pm 7,55$.

De forma geral quando peixes carnívoros ingerem fontes proteicas vegetais, principalmente a soja, ocorrem alterações na morfologia da mucosa (Chikiwait et. al., 2013). Correa (2016), ao oferecer crescentes níveis de substituição de CPS para juvenis de dourado, registrou que a característica mais evidente foi o rompimento do epitélio no ápice das dobras intestinais, sugerindo que a lâmina-própria foi fragilizada e, desta forma, acabou expondo o sistema aos antígenos presentes no lúmen intestinal, o que em condições normais não aconteceria. Além de intensa proliferação celular nas laterais das dobras, os vacúolos epiteliais estavam localizados nos ápice dos enterócitos supranucleares, sugerindo baixa atividade absorptiva. As células bastonetes ("rodlet cells") também estavam presentes no intestino posterior e sua função pode estar associada a quadros de parasitoses.

Todas estas alterações atuaram de forma negativa na digestão e absorção dos nutrientes, e estavam presentes nos animais independentemente das fontes vegetais das dietas, com características acentuadas nos níveis acima de 50% do ingrediente substituindo a FP, principalmente para o FSO. Desta maneira os juvenis de dourado que receberam dietas com altos níveis de fontes vegetais acabaram por fragilizar o sistema imunológico, situação que, em condições de sistema de produção, poderia torná-los susceptíveis a doenças e parasitoses.

Tabela 8. Medidas morfométricas do epitélio intestinal do intestino posterior de juvenis de dourado alimentados com fontes proteicas vegetais.

Parâmetros	FP		FSO		
		25	50	75	100
Altura da dobra (µm)					
20 dias	402,69 ± 34,16a	462,09 ± 58,04	131,13 ± 35,70Bb	198,66 ± 105,77	316,79 ± 88,91
40 dias	350,76 ± 101,31	391,59 ± 63,24	462,51 ± 33,51A	343,78 ± 53,97	426,39 ± 112,19
Lâmina-própria (µm)					
20 dias	140,98 ± 15,12a	162,30 ± 21,30	276,15 ± 19,64Ab	125,72 ± 19,88	122,50 ± 24,47
40 dias	135,28 ± 33,49	131,60 ± 63,24	161,13 ± 16,89B	117,10 ± 21,04	134,72 ± 25,19
Camada Muscular (µm)					
20 dias	153,16 ± 16,32a	142,14 ± 5,58	144,17 ± 13,38	104,07 ± 4,49Bb	139,09 ± 39,09
40 dias	77,99 ± 44,63a	123,03 ± 9,03	122,97 ± 40,61	122,77 ± 6,79A	181,93 ± 33,40b
Total de Células Caliciformes					
20 dias	31,00 ± 5,48a	29,88 ± 3,33	15,77 ± 1,83Bb	15,88 ± 1,83Bb	27,00 ± 5,04
40 dias	32,55 ± 4,72a	28,00 ± 4,16	45,22 ± 1,34Ab	36,66 ± 3,84A	30,22 ± 3,23

Tabela 9. - continuação

Parâmetros	FAL				FAM			
	25	50	75	100	25	50	75	100
Altura da dobra (µm)								
20 dias	387,50 ± 38,31	317,01 ± 38,31	320,51 ± 116,63	246,43 ± 19,36b	377,26 ± 37,98	355,80 ± 39,09	355,08 ± 39,09	368,89 ± 51,55
40 dias	467,30 ± 110,15	382,86 ± 90,46	360,92 ± 106,68	460,50 ± 112,67	357,07 ± 38,87	457,30 ± 32,96	482,75 ± 56,22	381,53 ± 71,42
Lâmina-própria (µm)								
20 dias	138,60 ± 38,10	186,18 ± 76,16	148,08 ± 34,62	207,11 ± 35,76	143,86 ± 44,61	143,79 ± 16,05	114,40 ± 50,15	185,85 ± 23,79
40 dias	141,44 ± 16,10	114,16 ± 17,06	150,78 ± 28,11	145,33 ± 47,53	154,72 ± 14,27	125,91 ± 21,73	137,81 ± 15,31	142,99 ± 41,43
Camada Muscular (µm)								
20 dias	115,61 ± 8,73B	149,93 ± 1,74	169,67 ± 23,71	111,82 ± 6,06Ab	78,83 ± 39,91	131,86 ± 17,50A	124,17 ± 14,60	146,79 ± 14,07
40 dias	148,75 ± 5,13A	155,05 ± 12,60	90,16 ± 32,05	84,17 ± 8,41B	108,55 ± 12,85	66,87 ± 7,55B	146,30 ± 6,89	145,41 ± 18,99
Total de Células Caliciformes								
20 dias	23,66 ± 1,45	32,55 ± 8,19	33,33 ± 0,57	24,66 ± 3,17	28,11 ± 5,92	36,11 ± 11,01	27,00 ± 8,08	24,00 ± 0,57
40 dias	22,44 ± 1,53b	29,11 ± 4,19	30,77 ± 1,71	37,00 ± 7,96	35,66 ± 4,66	36,66 ± 6,06	35,66 ± 6,65	29,44 ± 5,33

GP – ganho de peso (g)

TCE – taxa de crescimento específico (% dia⁻¹)

CAA – Conversão alimentar aparente

TEP – taxa de eficiência proteica

Letras maiúscula indicam diferença significativa comparando entre dia de abate (20 Vs 40 dia), contraste ortogonal de médias (p=0.05)

Letra minúscula indica diferença significativa entre cada tratamento (fonte*inclusão) vs control, contraste ortogonal de médias (p=0.05)

4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura

A mucosa intestinal apresenta dobras também denominadas de pregas, que podem estar dispostas em formas e disposições diferentes aumentando a superfície de absorção do órgão (Genten et al., 2009; Wilson e Castro, 2011). Baldisseroto e Val. (2002), trabalhando com peixes carnívoros e onívoros, relataram que as dobras intestinais são mais desenvolvidas em peixes com hábito alimentar carnívoro.

Avaliando a morfologia da dobra de dourado, constatou-se que o intestino posterior é caracterizado pelas dobras digitiformes, desorganizadas e altas com protuberância na superfície apical, e os sulcos que determinam o aspecto rochoso das dobras. A partir desta observação não foram verificadas diferenças estruturais em todos os tratamentos. O arranjo das dobras pode estar relacionado com a quantidade e velocidade do transporte do alimento pelo intestino, sendo que a presença de anastomose longitudinal retarda o avanço do alimento em sentido aboral, contribuindo para melhor aproveitamento e digestão dos nutrientes (Seixas Filho et al., 2001).

Figura 5. Formato das dobras no intestino posterior de dourado. A: Sulcos longitudinais na porção apical das dobras; B: Estrutura da dobra no intestino posterior. Barra: 100 μ m.

Zonas de extrusão celular estavam presentes em todas as dobras. Este processo é um indicativo de perdas de células para a renovação celular ao longo das dobras intestinais. A multiplicação mitótica das células para o crescimento e renovação é um processo rápido de grande importância para as funções normais dos organismos. Desta forma, durante este processo, a célula e seu núcleo se tornam compactos e diminuem de tamanho, sendo identificadas no microscópio óptico por apresentar a cromatina condensada. Já no microscópio eletrônico, o citoplasma das células apresenta saliências que se separam da superfície celular

(Junqueira e Carneiro, 2011). Neste processo as células epiteliais migram para o topo das vilosidades onde sofrem apoptose e são extrusadas para o lúmen intestinal (Simpson- Morgan e Smeaton, 1985). Aos 20 e 40 dias o tratamento FP não apresentou alterações no epitélio, sinais de morte celular e apoptose estavam presentes, e as microvilosidades com diminuição da incidência de fissuras.. As células intestinais presentes aparentaram estar em atividade normal (Figura 6).

Figura 6. Epitélio intestinal dos juvenis de dourado alimentados com dietas formuladas à base de farinha de peixe.

O epitélio intestinal além de atuar como absorção de nutrientes também age como a primeira linha de defesa. Entre as células absorptivas e enterocíticas, encontram-se as células caliciformes, responsáveis pela produção de muco. O muco do epitélio intestinal confere proteção e pode inibir a colonização de agentes bacterianos (Deplancke e Gaskins, 2001). As células caliciformes geralmente estão localizadas na porção apical dos enterócitos, secretam muco e estão ladeadas por células absorptivas. Neste trabalho a presença das células caliciformes foi notória mostrando sua atividade de secreção de muco e a presença de vacúolos de absorção (Figura 7). As células bastonetes estavam presentes entre os enterócitos, assim como as células de defesa, indicativo de processo inflamatório (Figura 8).

Figura 7. Epitélio intestinal com secreção de muco pelas células caliciformes e presença de vacúolos. Seta: Células caliciformes; *: vacúolo de absorção. Barra: 20 μ m.

Figura 8. Reação inflamatória no intestino posterior com a presença das células de defesa. Células de defesa (*). Barra: 20 μ m.

Quando a microvilosidade involui ou é alterada, a absorção de nutrientes pode estar comprometida. Fato justificado pela presença de fissuras entre os enterócitos, seguido de epitélio exposto sem microvilosidades, resultando em um processo de “enrugamento” dos enterócitos. De maneira geral, os juvenis de dourado alimentados com fontes proteicas vegetais apresentaram estas alterações na mucosa, embora fosse mais acentuada nos peixes alimentados com dietas contendo FSO (Figura 9). A presença de fissuras no epitélio intestinal também foi registrada em carpa cruciana em todas as dobras do segmento intestinal quando alimentados com farelo de soja (Cai et al., 2012). A enterite é reconhecida como um processo inflamatório no segmento intestinal. Merrifield et al. (2009) relata que trutas arco-íris alimentadas com fontes proteicas vegetais apresentaram microvilosidades menores no intestino posterior em relação ao anterior, sugerindo que a enterite aumenta a susceptibilidade a infecções e mudanças na célula absorptiva, aumentando a presença de células inflamatórias e encurtando as microvilosidades.

Efeitos com sinal de erosão, e diminuição da presença de microvilosidades, foram identificados em experimento in vitro com cultura de células intestinais em resposta aos efeitos tóxicos do dióxido de titânio (TiO₂) por Fisichella et al. (2012).

Figura 9. Alterações causadas no epitélio intestinal de juvenis alimentados com fontes vegetais. A: barra 20 μm ; B: barra 10 μm .

O uso de fontes proteicas vegetais como o farelo de soja na alimentação pode induzir a enterite em algumas espécies de peixes principalmente os salmonídeos. Entretanto em carpas, conforme Cai et al. (2012), a ausência de enterite induzida por agentes causadores contidos no farelo de soja pode ser uma adaptação da espécie a estes ingredientes.

Provavelmente, a enterite identificada nos juvenis de dourado tenha diminuído a eficiência da absorção dos nutrientes e das macromoléculas proteicas no intestino posterior, estado no qual o peixe aumenta a produção de caliciformes estando mais susceptível a infecções, caso a bactéria adentre o epitélio. A fonte proteica utilizada na alimentação dos alevinos foi a farinha de peixe, fonte de proteína animal mais utilizada na alimentação dos teleósteos, com alto teor proteico e perfil balanceado de aminoácidos essenciais, pouca fibra e alta digestibilidade. Trabalhos indicam que sua inclusão não afeta as características morfológicas do intestino (Cai et al., 2012; Merrifield et al., 2009). Sua qualidade é considerada ótima em comparação com outras fontes vegetais que deveriam ser mais econômicas, ter uma proteína de qualidade, e induzir um bom desempenho aos peixes (Cai et al., 2012).

5. CONCLUSÕES

O uso da farinha de peixe esteve dentro dos parâmetros esperados para as variáveis de desempenho e de digestibilidade. A morfologia do epitélio intestinal estava com as microvilosidades preservadas e atividade celular normal, reafirmando seu uso padrão como fonte de proteína na alimentação de dourado e outras espécies carnívoras, como salmonídeos e resultados semelhantes encontrados por Ringo et al. (2006). Os melhores índices de consumo de ração e conversão alimentar foram registrados para os juvenis alimentados com farelo de algodão e farinha de peixe. O farelo de amendoim embora tenha bons índices de conversão alimentar e aproveitamento da proteína, seguido de menores alterações na histologia do intestino posterior pode ser considerado como substituto na alimentação dos juvenis. A palatabilidade do farelo de algodão e amendoim deve ser levada em conta na escolha dos ingredientes para a formulação da ração.

O uso do farelo de soja, fonte proteica vegetal amplamente utilizada na alimentação animal, nas dietas do dourado induziu processos inflamatórios no epitélio intestinal, e diminuiu o desempenho dos peixes nos níveis de inclusão de 50 e 75%, caracterizando uma enterite. Tais alterações podem ser justificadas pela presença dos fatores antinutricionais no farelo de soja: inibidores de protease, saponinas, lectina entre outros. Os demais ingredientes também induziram reações inflamatórias, no entanto, os efeitos não interferiram no desempenho zootécnico do dourado. Estudos que caracterizem o FAN e sua dosagem no ingrediente associados alterações histológicas e hematológicas devem ser considerados para melhor entendimento da fisiologia da nutrição do dourado.

REFERÊNCIAS

- AGBO, N. W.; ADJEI-BOATENG, D. e JAUNCEY, K. 2011. The potential of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) by-products as alternative protein sources in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Aquaculture* 23: 367-378.
- ALARCON, F. J.; DIAZ, M. e MOYANO, F.J. 2001. Studies on digestive enzymes of fish: Characterization and practical applications. *CIHEAM-Options Mediterranean* 113-121.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – International [AOAC]. 2000. *Official Methods of Analysis*. 17th AOAC; Gaithersburg, MD, USA.
- BAEVERFORD, G. e KROGDAHL A. 1996. 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 diseases* 19: 375-387.
- BAI, S. C.; GATLIN, D. M. 1994. Effects of L-lysine supplementation of diets with different protein levels and sources on channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Aquaculture and Fisheries Management*. 25: 465-474.
- BAKKE-MCKELLEP, A.M.; PEN, M.; CHIKWATI, E.; HAGE, E.; CHUNGANG, C. E KROGDAHL, A. 2008. In vitro effects of various antinutritional factors on intestinal glucose absorption and histology in Atlantic salmon. Abstract. XIII International Symposium on Fish Nutrition and feeding. Florianópolis, Brazil.
- BALDISSEROTTO, B.; VAL, A.L. 2002. Ion fluxes of *Metynnis hypsauchen*, a teleost from the Rio Negro, Amazon, exposed to an increase of temperature. *Brazilian Journal of Biology*, 62: 749-752.
- BARBIERI, R.L.; HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ, F. J. 2008. Análise ultra-estrutural da absorção intestinal de macromolécula protéica com o uso de peixe como modelo experimental. *Conscientiae saúde. Rev. Cient.* 1: 21-30.
- BICUDO, A.J.A. Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos. 2008. 123 p. Tese (Doutorado Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- BLAUFUSS, P. E TRUSHENSKI, J. 2011. Exploring soy-derived alternatives to fish meal: using soy protein concentrate and soy protein isolate in hybrid striped bass feeds. *North American Journal of Aquaculture* 74 (1): 8-19.
- BRAGA, L. G. T.; BORGHESE, R.; DAIRIKI, J. K.; CYRINO, J. E. P. 2008. Apparent digestibility of ingredients in diets for *Salminus brasiliensis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*. 43 (n.2): 271-274.

- BREMER NETO, H.; GRANER, C.A.F; PEZZATO, L.E; PADOVANI, C.R. E CANTELMO, O.A.. 2003. Diminuição do teor de óxido de crômio (III) usado como marcador externo. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32 (2): 249-255.
- BUREL, C., BOUJARD, T.; ESCAFFRE, A.M.; KAUSHIK, S.J.; BOEUF, G.; MOL, K.A.; VAN DER GEYTEN, S E KUHN, E.R. 2000. Dietary low glucosinolate rapeseed meal affect thyroid status and nutrient utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Britanic Journal Nutrition* 83: 653-664.
- BUTOLO, J.E. 2002. Ingredientes de origem vegetal. Páginas 93-238 in *Qualidade de ingredientes na alimentação animal*. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, Campinas, SP, Brasil.
- BUTTLE, L.G.; BURRELLS, A.C.; GOOD, J.E.; WILLIAMS, P.D.; SOUTHGATE, P.J.E BURRELS, C. 2001. The binding of soybean agglutin (SBA) to the intestinal epithelium of Atlantic salmon, *Salmo salar* and rainwbow trout *Oncorhynchus mykiss*, fed high levels of soybean meal. *Vet. Immunol. Immunop.* 80:237-244.
- CAI, C.; SONG, L.; WANG, Y.; WU, P.; YE, Y.; ZHANG, Z. E YANG, C. 2013. Assessment of the feasibility of including high levels of rapeseed meal and peanut meal in diets of juvenile crucian carp (*Carassius auratus gibelio*♀ × *Cyprinus carpio*♂): Growth, immunity,intestinal morphology, and microflora. *Aquaculture* 410-411: 203-215.
- CAI, C.F.; WANG, W.J.; YE, Y.T.; KROGDAHL, A.; WANG, Y.L.; XIA, Y.M. E YANG, C.G. 2012. 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* 43: 128-138.
- CAO, X.J E WANG, W.M. 2009. Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Journal of Veterinay Medicine. Anatom. Hist. Embyol.*38.254-261.
- CARDOSO, E. W. Morfologia e ultraestrutura do intestino do peixe antártico *Notothenia rossii* Richardson, 1844 e sua relação com o hábito alimentar. 2005. 124 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- CHIKWATI E.M.; VENOLD, F.F.; PENN, M.H.; ROHLOFF, J.; REFSTIE, S. 2012. Interaction of soya saponins with plant ingredients in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Br J Nutr.* 107: 1570–1590
- COLLINGS, S. A. 2014. Antinutritional factors in modeling plant-based rainbow trout diets. Tese de doutorado. University of Saskatchewan. Saskatoon, Saskatchewan. Canadá. 215 p.

- CORREA, ROSELANY OLIVEIRA. Substituição da farinha de peixe pelo concentrado proteico de soja em dietas para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e dourados (*Salminus brasiliensis*). 2016.104 p. Tese de doutorado. Ciência Animal e Pastagens. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.
- COUTO, A.; KORTNER, T.M.; PENN, M.; BAKKE, A.M.E KROGDAHL, A. 2015. Dietary saponins and phytosterols do not affect growth , intestinal morphology and immune responses of on-growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture Nutrition doi: 10.1111/anu.12220.
- CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. 2010. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. Revista Brasileira de Zootecnia. 39 (supl. especial): 68-87.
- CYRINO, J.E.P.; D.M. FRACALLOSSI; R. ROUBACH. 2013. Avanços na alimentação e nutrição de peixes carnívoros de água doce. In: D.M. Fracalossi; J.E.P. Cyrino (Editores). Nutriaqua. Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1ª edição ampliada. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013, xxiii, 375 pp.
- DAIRIKI, J. K. 2009. Exigência em amino ácidos e farelo de soja na nutrição de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816). Tese de doutorado. Curso de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, Brasil.
- DARIKI, J.K.; R. BORGHESI, C.T.S. DIAS e J.E.P. CYRINO. 2013. Lysine and arginine requirements of *Salminus brasiliensis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 48(8): 1012-1020.
- DEPLANCKE, B.; GASKINS, E.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. American Journal of Clinical Nutrition, Houston, v. 73, n. 6, p. 1131-1141, 2001.
- EL-SAYED, A.F.M. 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* spp. Aquaculture Research 179:149-168.
- EVANS, J, J.; PASNIK, D.J.; PERES, H.; LIM, C. E KLESIOUS, P.H. 2005. No apparent differences in intestinal histology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed head-treated and non-head-treated raw soybean meal. Aquaculture nutrition 11:123-129.
- FAO. The state of world fisheries and aquaculture. 2016. 218 p.
- FERNANDEZ , I.; DIAZ,M.; MARTINEZ, T. E MOYANO, F.J. 2001. A quick method for the assessment of activity and inhibition of fish amylases. Aquaculture Nutrition 7: 19-23.
- FETTER, E.; BAULDAUF, DA FONTE, D. F.; ORTMANN, J. E SCHOLZ , S. 2015. Comparative analysis of goitrogenic effect of phenylthiourea and methimazole in zebrafish embryos. Reproductive Toxicology 57: 10-20.

- FIERTAK, A.; KILARSKI, W.M. Glycoconjugates of the intestinal goblet cells of four cyprinids. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 59, p. 1724-1733, 2002.
- FISHICHELLA, M; BERENGUER, F.; STEINMETZ, G.; AUFFAN, M.; ROSE, JEROME E PRAT, O. Intestinal toxicity evaluation of TiO₂ degraded surface-treated nanoparticles: a combined physico-chemical and toxicogenomics approach in caco-2 cells. *Particle and fibre toxicology*. 2012. Vol. 9. 1-18.
- FRANCIS, G.; MAKAR, H.P.S. E BECKER, K. 2001. Antinutritional factors in plant-derived alternate fish ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199:197-227.
- FRANK SCHAARSCHMIDT AND LEA VAAS. Analysis of Trials with Complex Treatment Structure Using Multiple Contrast Tests *HORTSCIENCE* 44(1):188–195. 2009.
- GAITAN, E. 1990. Goitrogens in food and water. *Annu. Rev. Nutr.* 10:21-39.
- GALDIOLI, E.M.; HAYASHI, C.; FARIA, A.C.E.A.; SOARES, C.M. Substituição parcial e total da proteína do farelo de soja pela proteína dos farelos de canola e algodão em dietas para alevinos de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). *Acta Scientiarum, Animal Science*, v.23, n.4, p.841-847, 2001.
- GENTEN, F.; TERWINGHE, E. E DANGUY, A. 2009. Atlas of fish histology. Editora Enfield: Science Publ. 215 p.
- GLENCROSS, B.; HAWKINS, W. E CURNOW, J. 2004. Nutritional assessment of Australian canola meal. Part I-Evaluation of canola oil extracted methods and meal processing conditions on the digestible value of canola meal fed to the red seabream (*Pagrus auratus*, Paulin). *Aquaculture Research* 35:15-24.
- GONÇALVES, L.U.; RODRIGUES, A.P.O.; MORO, G.V.; FERREIRA, E.C; CYRINO, J. E.P. 2013. Morfologia e fisiologia do sistema digestório de peixes. In: D.M. Fracalossi; J.E.P. Cyrino (Editores). *Nutriaqua. Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. 1ª edição ampliada. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013, xxiii, 375 pp.
- GU, M.; GU, J.N.; PENN, M.; BAKKE, A.M.; LEIN, I. E KROGDAHL, A. 2015. Effects on diet supplementation of soya-saponins, isoflavones and phytoesters on Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) fry fed from starting-feeding. *Aquaculture Nutrition* 21: 604-613.
- HANSEN, A. C.; ROSELUND, G.; KARLSEN, O.; KOPPE, W. E HENRE, G.I. 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I- Effects on growth and protein retention. *Aquaculture* 272: 559-611.
- HASAN M. R.; MACINTOSH, D. J. E JAUNCEY, K. 1997. Evaluation of some plant ingredients as dietary protein sources for common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry. *Aquaculture* 151:55-70.

- HEIKKINEN, J. VIELMA, J., KEMILÄINEN, O., TIIROLA, M., ESKELINEN, P., KIURU, T. E. E VON WRIGHT, A. 2006. Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261: 259-268.
- HENDRIKS, H.G.C.J.M.; VAN DER INGHI, T.S.G.A.M.; KROGDAHL, A.; OLLI, J. E KONINKX, J.F.J.G. 1990. Binding of soybean agglutinin to small intestinal brush border membranes and brush border membrane enzyme activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 91:163-170.
- HENRY, R.J. E H.S. SAINI. 1989. Characterization of cereal sugars and oligosaccharides. *Cereal Chemistry* 66: 362–365.
- HERBERICH E, SIKORSKI J, HOTHORN T. 2010. A Robust Procedure for Comparing Multiple Means under Heteroscedasticity in Unbalanced Designs. *PLoS ONE* 5(3): e9788. doi:10.1371/journal.pone.0009788
- HERTRAMPF, J.W., AND F. PIEDAD-PASCUAL. 2000. Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Germany.
- HONORATO, C.A.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D.J. E MACHADO, M.R.F. 2011. Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta contendo silagem de peixe. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 48 (4): 281-288.
- IBGE, 2015. Produção da pecuária municipal. Instituto Brasileiro de geografia e estatística. 47 p. vol. 43.
- IWASHITA, Y.; SUZUKI, N.; MATSUNARI, H.; SUGITA, T. E YAMAMOTO, T. 2009. Influence of soya saponin, soya lectin, and cholytaurine supplemented to a casein-based semipurified diet on intestinal morphology and biliary bile status in fingerling rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.* 75:1307-1315.
- IWASHITA, Y.; YAMAMOTO, T.; FURUITA, H.; SUGITA, T. E SUZUKI, N. 2008. Influence of certain soybean antinutritional factors supplemented to a casein-based semipurified diet on intestinal and liver morphology in fingerling rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.* 74:1075-1082.
- JACKSON, A. J.; APPER, R. S. E MATTY, A. S. 1982. Evaluation of some plant proteins in complete diets for the tilapia *Sarotherodon mossambicus*. *Aquaculture* 27:97-109.
- Junqueira, L.C. e Carneiro, J. *Histologia Básica*. 11ª Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 524 p. 2011
- KASHEIF, M.; S.GABER, H.A. E IBRAHIM, S. 2013. Histological and biochemical Studies of *Oreochromis niloticus* fed on Cottonseed Meal. *The International Conference of Environmental Sciences (ICES)* 21- 22: 233- 243.

- KLEEMANN, G. K.; PAI, M. DAL; PEZZATO, L. E.; TEIXEIRA, C. P.; PADOVANI, C. R.; BARROS, M. M. 2011. Cottonseed meal as a substitute for soybean meal in Nile tilapia diet. *Rev. Bras. Saude Prod. Anim.*, 12 (3): 805-818.
- KNUDSEN, D.; JUTFELT, F.; SUNDH, H.; SUNDELL, K.; KOPPE, W. E FROKIAER, H. 2008. Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soybean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Britanic Journal Nutrition* 100:120-129.
- KROGDAHL, A.; BAKKE-MCKELLEP, A.M. E BAEVERFJORD, G. 2003. Effects of graded levels os standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzymes activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture Nutrition* 9:361-371.
- KROGDAHL, A.; BAKKE-MCKELLEP, A.M; ROED, K.H. E BAEVERFJORD, G. 2000. Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquaculture nutrition* 6:77-84.
- KROGDAHL, A.; BERG-LEA, T. E OLLI, J.J. 1994. Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Phys A*. 107:215-219.
- KROGDAHL, A.; GAJARDO, K.; KORTNER, T.M.; PENN, M.; GU, M.; BERGE, G.M.; E BAKKE, A.M. 2015. Soya saponins induce enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Journal of agricultural and food quemistry*. Doi: 10.1021/jf506242t.
- LI , D. F.; NELSSSEN, J. L.; REDDY, P. G.; BLECHA, F. R. D.; KLEMM, D. W.;GIESTING, J. D.; HANCOCK, G. L. ALLEE.; GOODBAND, R. D. Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs with immunological criteria. *Journal Animal Science*, n. 69, p. 3299-3307. 1991.
- LIDDLE, R. A., GOLDFINE, I. D., E WILLIAMS, J. A. 1984. Bioassay of Plasma Cholecystokinin in Rats: Effects of Food, Trypsifi Inhibitor, and Alcohol.circulation, 14, 23.
- MACHADO, C. C. Exigência proteica na dieta de alevinos de dourado, *Salminus brasiliensis*. 2004. 44 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- MAKINO, L.C. 2010. Estrutura, ultraestrutura e histoquímica do aparelho digestório do *Prochilodus lineatus*. Análise da diversidade da microbiota intestinal de *Prochilodus lineatus* e *Pterygoplichthys anisitsi*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Aquicultura, Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Jaboticabal, SP, Brasil.
- MBAHINZIREKI, G.B.; DABROWSKI, K; LEE, K.J.; EL-SAIDY, D. E WISNER, E.R. 2001. Growth, feed utilization and body composition of tilápia (*Oreochromis sp.*) fed with cottonseed meal-based diets in a recirculating system. *Aquaculture Nutrition* 7:189-200.

- MERRIFIELD, D.L.; DIMITROGLOU, A.; BRADLEY, G.; BAKER, R.T.M.; DAVIES, S.V. 2009. Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*. 32, 755-766.
- MORO, G.V.; T.S.C. SILVA, AND J.E.P. CYRINO. 2017. Feed processing affected the digestibility of carbohydrate sources for dourado *Salminus brasiliensis*. *Aquaculture Nutrition* 23: 40-45.
- MORO, G.V.; T.S.C. SILVA, R.B. ZANON, AND J.E.P. CYRINO. 2016. Starch and lipids in diets for dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier 1816): Growth, nutrient utilization and digestive enzymes. *Aquaculture Nutrition* 22: 890-898.
- NAKATAMI K., AGOSTINHO A. A. E BAUMGARTNER G. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Eduem, Maringá, Paraná, Brazil.
- NRC. 2011. Nutrients Requirements of Fish and Shrimps. In: Cap. 11. Antinutritional factors and adventitious toxins in feeds. 232-252.
- OLIVA-TELES, A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of fish diseases* 35: 83-108.
- OLSEN, R.E.; HANSEN, A.C.; ROSEN LUND, G.; HEMRE, G.I., MAYHEW, T.M., KNUDSEN, D.L. and KARLSEN, O. 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua*) II—Health aspects. *Aquaculture* 272 (1): 612-624.
- OSTAZWEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; PALACIOS, M.E.; OLEJNICZAK, M. e WIECZOREK, M. 2005. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. *Aquaculture* 245: 273-286.
- PINTO, L.G.Q.; PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M. 2001. Desempenho do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) arraçoado com dietas contendo diferentes teores de tanino. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30(4):1164-1171.
- PORTZ, L. e J.E.P. CYRINO. 2004. Digestibility of nutrients and amino acids of different protein sources in practical diets by largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepède, 1802). *Aquaculture Research* 35: 312-320.
- POTEMPA, J. KORZUS, E. e TRAVIS, J. 1994. The Serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* 269: 15957-15960.
- RASKOVIC BOZIDAR S.; STANKOVIĆ MARKO B.; MARKOVIĆ ZORAN Z. e POLEKSIĆ VESNA. 2011. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *D. Journal of Agricultural Sciences* 56(1):87-100.
- REFSTIE, S., SAHLSTROM, S.; BRÅTHEN, E.; BAEVERFJORD, G. E KROGDAHL, A. 2005. Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 246: 331-345.

- RINGO, E.; SPERSTAD, S.; MYKLEBUST, R.; REFSTIE, S.; KROGDAHL, A. 2006. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 261: 829-841.
- RINGO, E; OLSEN, R. E.; MAYHEW, T.M.; MYKLEBUST, R. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*. Vol 227. 395-415. 2003.
- RODRIGUES, S.S.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestivo de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). *Biotemas*, v. 21, n. 2, p. 65-75, 2008.
- RUMSEY, G.L.; SWIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P. e BOWSER, P.R. 1994. Effect of soybean meal protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunop.* 41:323-339.
- SALARO, A.L.; PEZZATO, L.E.; VICENTINI, C.A. E BARROS, M.M. 1999. Efeito da inclusão do farelo e da farinha de semente de algodão em rações para reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 28(6): 1169-1176.
- SANTIGOSA, E.; I. GARCIA-MEILAN; J.M. VALENTIN; J. PÉREZ-SANCHEZ; F. MEDALE; S. KAUSHIK; M.A. GALLARDO. 2011. Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture*, 317: 146-15
- SANTOS, C.M.; DUARTE, S.; SOUZA, T.G.L. E RIBEIRO, T.P. 2007. Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrintestinal de *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil. *Série Zoologia* 97(4): 411-417.
- SEGNER, H.; SUNDH, H.; BUCHMANN, K.; DOUXFILS, J.; SUNDELL, K. S.; MATHIEU C. 2012. Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish. Physiol. Biochem.* ... 2012. 38(1):85-105.
- SHEP, L.J.; TUCKER, I.G.; YOUNG, G.; LEDGER, R.; BUTT, A.G. 1999. Controlled release opportunities for oral peptide delivery in aquaculture. *Journal of Controlled Release*, v. 59, p. 1-14.
- SILVA, M.R. E SILVA, M. A. A. P. 2000. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. *Ver. Nutr.* 13 (1): 3-9.
- SILVA, P.F.; MCGURK, C.; KNUDSEN, D.; ADAMS, A.; THOMPSON, K. D E BRON, J. E. 2015. Histological evaluation of soya bean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Quantitative image analysis vs. semi-quantitative visual scoring. *Aquaculture* 445: 42-56.
- SIMPSON-MORGAN; M.W. E SMEATON T.C. Epithelial cell renewal and antibody transfer in the intestine of the foetal and neonatal Lamb. *Australian Journal Experimental Biology Medical Science*, v. 63, p. 41-51, 1985.

- SITJÁ-BOBADILLA, A.; MINGARRO, M.; PUJALTE, M.J.; GARAY, E.; ALVAREZ-PELLITERO, P. E PÉREZ-SANCHES, J. 2003. Immunological and pathological status of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different long-term feeding regimes. *Aquaculture* 220: 707-724.
- STROBAND, H.W.J.; VAN DER VEEN, F.H. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grasscarp *Ctenopharyngodon idella* (VAL.). *Journal of Experimental Zoology*, v. 218, p. 149-56, 1981.
- URAN, P.A.; GONÇALVES, A.A.; TAVERNE-THIELE, J.J.; SCHRAMA, J.W.; VERRETH, J.A.J. E ROMBOUT, H.W.M. 2008. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunology* 25:751-760.
- VAN DEN INGH, T.S.A.M.; A. KROGDAHL; J.J.OLLI; H.G.C.J.M. HENDRIKS; J.G.J.F. KONINKX. 1991. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture*, 94: 297 – 305.
- WANG, W. E MEJIA, E.G. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 4: 63-77.
- WANG, X.F.; LI, X.Q.; LENG, X.J.; SHAN, L.L.; ZHAO, J.X. E WANG, Y. 2014. Effects of dietary cottonseed meal level on the growth, hematological indices, liver and gonadal histology of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 428-429: 79-87.
- WILSON, J.M. E CASTRO, L.F.C. 2011. Morphology diversity of the gastrointestinal tract in fishes. Páginas 2-56 in: Crossel, M.; Farrell, A. P.; Braner, C.J., editores. *Fish physiology: the multifunctional gut of fish*. Elsevier, London, England.
- YI HU, D.H.; GONG, S.Y.; LIN, Y.C. E YUAN, Y.C. 2014. Partial replacement of fish meal by several plant proteins with or without iron and lysine supplemented in diets for juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Aquaculture nutrition* 20: 205-212. 2014.
- YILDIRIM, M.; LIM, C.; WAN, P.J. E KLESIOUS, P.H. 2003. Growth performance and immune response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing graded levels of gossypol-acetic acid. *Aquaculture* 219:751-768.
- YILDIRIM, Ö.; ACAR, Ü.; TÜRKER, A.; SUNAR, M.C. E KESBIÇ, O.S. 2014. Effects of Replacing Fish Meal with Peanut Meal (*Arachis hypogaea*) on Growth, Feed Utilization and Body Composition of Mozambique Tilapia Fries (*Oreochromis mossambicus*). *Pakistan J. Zool.*, 46(2):497-205.

ANEXO**ANEXO A.****Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Fone: (19) 3429-4400
www4.esalq.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

PROTCCO N. 2015 03

PARECER

O projeto "Epitélio intestinal e microbiota do juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* e dourado *Salminus brasiliensis* alimentados com diferentes fontes proteicas vegetais" que tem como responsável o Prof. José Eurico Possebon Cyrino, foi examinado pela CEUA desta Escola em reunião de 23 de março de 2015.

Com base no protocolo experimental apresentado, a CEUA entende que os procedimentos serão realizados de forma a não ferir os princípios éticos na experimentação com animais.

Piracicaba, 23 de março de 2015.

Prof. Dr. José Fernando Machado Mendes
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - ESALQ/USP