

CAMILA BARROS COSTA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Litopenaeus vannamei* ALIMENTADOS
COM RAÇÕES FORMULADAS COM DIFERENTES SUBSTITUIÇÕES
DA FARINHA DE PEIXE POR HIDROLISADO PROTEICO DE PEIXE**

Recife, 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Litopenaeus vannamei* ALIMENTADOS
COM RAÇÕES FORMULADAS COM DIFERENTES SUBSTITUIÇÕES
DA FARINHA DE PEIXE POR HIDROLISADO PROTEICO DE PEIXE**

Camila Barros Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Silvio Ricardo Maurano Peixoto
Orientador

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Co-orientador

Profa. Dra. Roberta Borda Soares
Co-orientador

Recife,

Fevereiro/2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C837 Costa, Camila Barros

Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com rações formuladas com diferentes substituições da farinha de peixe por hidrolisado proteico de peixe / Camila Barros Costa. – 2018.

57 f. : il.

Orientador: Silvio Ricardo Maurano Peixoto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências e anexo (s).

1. Camarão marinho 2. Hidrolisado proteico 3. Carcaça de *Oreochromis niloticus* I. Peixoto, Silvio Ricardo Maurano, oriente.
II. Título

CDD 639

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *Litopenaeus vannamei* ALIMENTADOS
COM RAÇÕES FORMULADAS COM DIFERENTES SUBSTITUIÇÕES
DA FARINHA DE PEIXE POR HIDROLISADO PROTEICO DE PEIXE**

Camila Barros Costa

Dissertação julgada adequada para
obtenção do título de mestre em Recursos
Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e
aprovada em 26/02/2018 pela seguinte
Banca Examinadora.

Prof. Dr. Silvio Ricardo Maurano Peixoto

Orientador

Departamento de Pesca e Aquicultura / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Janilson Felix da Silva

Membro externo

Departamento de Bioquímica/Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabrau da Silva

Membro Interno

Departamento de Pesca e Aquicultura / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

A memória do meu amado avô, Lourenço José de Barros, pois nenhuma linha do tempo será capaz de apagar a saudade e o amor que sinto.

A minha querida mãe, por subir comigo todos os degraus dessa escada, por mais íngreme que ela se parecesse.

Ao meu amado namorado, por sempre acertar as batidas do meu coração, e me apoiar incondicionalmente.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura e aos colegas do mestrado por toda experiência adquirida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Departamento de Pesca e Aquicultura por ser minha segunda casa.

Ao meu orientador, professor Dr. Silvio Peixoto, pela orientação durante esses anos, pela compreensão nos momentos mais difíceis e pelos conselhos ao longo dessa jornada.

Aos meus co-orientadores, a professora Dr. Roberta Borda, que esteve sempre disposta a dar sugestões, tirar dúvidas e por toda paciência, e ao professor Dr. Ranilson Bezerra pelo acolhimento no Laboratório de Enzimologia Aplicada e, por toda a assistência prestada.

A toda equipe do Laboratório de Enzimologia da Federal (LABENZ), por todo o auxílio, companheirismo, risadas e apoio durante todo o mestrado.

Ao Dr. Diego Buarque, por todo o apoio e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Janilson Felix, pela imensa paciência, pela grande ajuda, pelos conselhos, ou seja, por cada segundo de dedicação, direta ou indireta, para realização deste trabalho.

À equipe e família LTA que tem feito parte dos meus dias e, a cada manhã de sol, fez nascer um novo sorriso. A vocês: Bruna, Roberta, Camila, Karin, Flávio, João, Filipe, Paloma e Guilherme, e também a Luciano, que acabou por muitas vezes sendo um membro muito importante para equipe, meus sinceros agradecimentos.

As minhas queridas amoras, que são mais do que amigas, Isabelly, Priscilla e Ítala.

A minha família (os Barros) e a minha nova família (os Botelhos).

Ao meu avô Lourenço, que durante sua vida sempre acreditou no meu potencial e sempre me apoiou, sendo por diversas vezes mais do que um avô e sim um pai.

A Ericsson Botelho, não há palavras que sejam capazes de expressar meu amor e minha gratidão. Você foi parar na bancada para me ajudar, me emprestou por diversas vezes os ouvidos, além de todo o apoio nas situações mais difíceis, então não sou capaz de agradecer, a não ser amando-o mais.

A minha amada e querida mãe, que sempre foi mais do que só uma mãe. Descrever metade das funções e atributos dessa pessoa incrível que Deus pôs na minha vida seria impossível, devido ao limite de páginas... Na fila das escolhas da vida foi amor à primeira vista! Só posso mais uma vez tentar humildemente agradecer a honra que é ser sua filha.

E principalmente a Deus, pela existência, pelas bênçãos ao longo dessa vida, por sua infinita bondade, pelo amparo nos momentos difíceis, pela força, por encher minha vida de pessoas incríveis...

“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes. Isaac Newton”

Resumo

A busca por novas fontes proteicas, alternativas ao uso da farinha de peixe em rações para o camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, traz problemáticas como a qualidade nutricional e o efeito destas fontes sobre a digestão dos camarões. Com isso, ferramentas como a análise da atividade enzimática propicia informações sobre o desempenho digestivo e a dinâmica das enzimas do animal. Neste sentido, o presente estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes dietas formuladas com hidrolisado proteico de resíduos de *Oreochromis niloticus* obtidos com dois tempos de hidrolise (1 e 2 horas), em substituição a farinha de peixe, sobre a atividade enzimática digestória do camarão marinho, *L. vannamei*, cultivados em na fase de berçário. Para realização do experimento foram utilizadas, pós-larvas de *L. vannamei* (0,004g), cultivadas em sistema de água clara, em sistema de recirculação, durante 45 dias. Foram formuladas 7 dietas para a alimentação do animal, com a inclusão do H1 (1 hora de hidrolise) e H2 (2 horas de hidrolise) em níveis de substituição de 40g.kg⁻¹, 80g.kg⁻¹ e 120g.kg⁻¹ da farinha de peixe, compondo os tratamentos: controle (sem adição de nenhum dos hidrolisados), H1-40, H1-80, H1-120, H2-40, H2-80 e H2-120. As coletas de hepatopâncreas foram realizadas para determinação da atividade enzimática digestiva, ocorrendo no início do experimento e nos tempos 15, 30 e 45 dias de cultivo. As enzimas avaliadas foram: proteases totais, tripsina, quimotripsina, aminopeptidases, amilase e lipase. Aos 45 dias de cultivo o tratamento H1-80 apresentou a maior média de atividade proteolítica total (1,27± 0,01 mU/mg) diferindo dos demais tratamentos. Já para a tripsina os tratamentos que apresentaram diferença estatística no mesmo período, com médias superiores aos demais foram o H1-120 (32,53 ± 2,77mU/mg) e o H2-80 (28,18±3,20mU/mg). Para a quimotripsina, as maiores medias foram encontradas nos tratamentos H1-80 (16,61± 1,10 mU/mg) e H1-120 (15,69± 0,97mU/mg), que diferiram dos demais. A atividade amilolítica aos 45 dias foi maior no tratamento H1-120 com média de atividade 159,27± 2,05mU/mg. Já a atividade lipolítica o tratamento que apresentou maior valor de atividade foi o H2-120. A substituição da farinha de peixe pelos hidrolisados proteicos de resíduos de Tilápia em dietas para *L. vannamei*, na fase de berçário, influenciou a atividade enzimática digestiva desses animais durante os 45 dias de cultivo. Os resultados também sugerem, uma maior inclusão do hidrolisado com 2 horas de hidrolise, uma vez que os camarões alimentados com as substituições de 80 e 120 g.kg⁻¹, apresentaram maiores valores de atividade enzimática digestiva.

Palavras-chave: Camarão marinho; hidrolisado proteico; Carcaça de *Oreochromis niloti'cus*

Abstract

The search for new protein sources, alternatives to the use of fish meal in feeds for marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, brings problems such as the nutritional quality and the effect of these sources on the digestion of shrimps. Thus, tools such as the analysis of enzymatic activity provide information on the digestive performance and dynamics of the animal's enzymes. In this sense, the present study aimed to evaluate the effect of different diets formulated with protein hydrolyzate from *Oreochromis niloticus* residues obtained with two hydrolysis times (1 and 2 hours), replacing fishmeal, on the digestive enzymatic activity of marine shrimp, *L. vannamei*, grown in the nursery phase. Post-larvae of *L. vannamei* (0.004g) were reared in a clear water recirculation system for 45 days. A total of seven diets were formulated to feed the animal, with an inclusion of H1 (1 hour of hydrolysis) and H2 (2 hours of hydrolysis) at replacement levels of 40g.kg⁻¹, 80g.kg⁻¹ and 120g.kg⁻¹ of fishmeal, consisting of treatments: H1-40, H1-80, H1-120, H2-40, H2-80 and H2-120. The hepatopancreas were sampled to determine the digestive enzymatic activity, at the beginning of the experiment and 15, 30 and 45 days of culture. The enzymes evaluated were: total proteases, trypsin, chymotrypsin, aminopeptidases, amylase and lipase. At 45 days the treatment H1-80 presented the highest mean of total proteolytic activity (1.27 ± 0.01 mU / mg) differing from the other treatments. For trypsin, treatments with a statistical difference in the same period, with averages above the others, were H1-120 (32.53 ± 2.77 mU / mg) and H2-80 (28.18 ± 3.20 mU / mg). For chymotrypsin, the highest means were found in treatments H1-80 (16.61 ± 1.10 mU / mg) and H1-120 (15.69 ± 0.97 mU / mg), which differed from the others. The amylolytic activity at 45 days was higher in the H1-120 treatment with mean activity of 159.27 ± 2.05 mU / mg, whereas the lipolytic activity was higher for H2-120. The substitution of fishmeal by protein hydrolysates of *Tilapia* residues in diets for *L. vannamei* during the nursery phase influenced the digestive enzymatic activity of these animals during the 45 days of culture. The results also suggest a greater inclusion of the hydrolyzate with 2 hours of hydrolysis, since the shrimp fed the substitutions of 80 and 120 g.kg⁻¹, showed overall higher digestive enzymatic activity.

Key words: Marine shrimp; protein hydrolyzate; Carcass of *Oreochromis niloticus*

Lista de figuras**Página**

Figura 1- Curvas de regressão para as atividades de proteases totais (a), tripsina (b), quimotripsina (c), amilase (d) e lipase (e) do *Litopenaeus vannamei* em relação ao nível de substituição dos hidrolisados protéicos de resíduos de tilápia aos dias de cultivo. As equações das curvas e os valores ótimos de substituição dos hidrolisados estão inseridos nas caixas de texto com linha contínua para o H1(1hora de hidrolise) e tracejada para o H2 (2 horas de hidrolise).

33

Lista de tabelas

Página

Tabela 1- Valores (média $\pm$ DP) para as atividades de proteases totais, tripsina, quimotripsina, amilase e lipase expressas em mU/mg para <i>L. vannamei</i> nos tempos 0 (durante a aquisição dos camarões), 15, 30 e 45 dias de cultivo, com dietas contendo diferentes inclusões dos hidrolisado proteico de resíduos de tilápia, H1(1 hora de hidrolise) e H2 (2 horas de hidrolise) em substituição a farinha de peixe.	34
Tabela 2- Atividade das aminopeptidases do <i>L. vannamei</i> durante 0 e 45 dias de cultivo para os substratos alanina, arginina, histidina, isoleucina, leucina, prolina e tirosina expressas em mU/mg e cultivados com dietas formuladas com diferentes inclusões do hidrolisado proteico de resíduos de tilápia, H1(1 hora de hidrolise) e H2 (2 horas de hidrolise).	35

Sumário

	Página
Dedicatória	04
Agradecimento	05
Resumo	07
Abstract	08
Lista de figuras	09
Lista de tabelas	10
1. Introdução	12
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo geral	16
1.1.2 Objetivos Específicos	16
1.2 Hipótese	16
2. Artigo Científico - Padrão de atividade enzimática em juvenis de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados com dietas formuladas com hidrolisado protéico de resíduos de tilápia	17
3. Considerações finais	36
4. Referências	37
Anexos	51

1. Introdução

No ano de 2016, o Brasil produziu 52,12 mil toneladas de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (IBGE, 2016), uma grande produção de rações de alta qualidade para a carcinicultura nacional. No ano de 2014, a produção de ração para camarão foi de 83 mil toneladas e, em 2015 existiam 70 fabricantes de ração para aquicultura no país, dos quais oito produzem ração para camarão marinho (KUBITZA, 2015).

Embora os produtores tenham acesso a um produto de elevado padrão para o cultivo, a produção de ração para camarão é onerosa principalmente devido ao elevado custo dos ingredientes como óleo e farinha de peixe (HARDY, 2010). Além disso, durante o cultivo, os custos com a ração podem chegar a mais de 50% dos custos totais de produção do *L. vannamei* (SAMOCHA et al., 2004; REGO et al., 2017).

O óleo e a farinha de peixe são essenciais na formulação de dietas balanceadas e altamente proteicas, principalmente a farinha, que possui uma elevada palatabilidade e é rica em aminoácidos essenciais para diversas espécies cultivadas (FABREGAT et al., 2011; FRIES, 2011; NUNES, 2014). Embora a farinha de peixe apresente essas vantagens, há a necessidade de buscar novas fontes proteicas para sua substituição nas dietas (SAMOCHA et al., 2004; SUAREZ et al., 2009; OUJIFARD et al., 2012).

A farinha de peixe é um recurso caro com valores em torno de US\$2.400 dólares americanos a tonelada (FAO, 2016) e o déficit nos estoques pesqueiros causado pela sobrepesca, corrobora para seu encarecimento (HARDY, 2010; CRAIG, 2010; KIRON et al., 2012; PAKRAVAN et al., 2017). No entanto no mercado mundial, existe uma variedade de ingredientes alternativos utilizados como fonte de proteína, para substituição parcial ou total da farinha nas rações comerciais (SAMOCHA et al., 2004; NAYLOR et al., 2009; KUHN et al., 2009; SUAREZ, 2009; RAY et al., 2010; HARDY, 2010).

Estes ingredientes podem ser provenientes do abate de animais terrestres (farinhas de carne e ossos, pena, vísceras e sangue) (PASTORE et al., 2012), de subprodutos do processamento de grãos (farinhas de milho, soja e trigo) (PALMEGIANO, 2006, 2007; HARTE et al., 2011; LIU et al., 2012; OUJIFARD et al., 2012), ou ainda, oriundos da pesca e do cultivo de organismos aquáticos, como a farinha de bioflocos e o hidrolisado proteico de peixe (HPP) (HERNANDES et al., 2011; VALLE, 2015; DANTAS, 2016). No entanto, ingredientes de origem vegetal ou com baixo teor proteico costumam apresentar deficiência de aminoácidos essenciais, o que pode ocasionar um produto final com qualidade inferior e, assim, prejudicar o crescimento das espécies aquícolas cultivadas (JOBLING, 2016).

Dentre os ingredientes que podem compor as rações para camarão, na substituição da farinha de peixe, o hidrolisado proteico de pescado (HPP) é uma fonte de proteína de alta qualidade (VALLE et al., 2015). O HPP é o produto da hidrólise dos resíduos do pescado, ou

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

do próprio pescado sob ação química (que pode ser ácida ou alcalina) ou de enzimas digestivas (SKANDERBY, 1994; HE et al., 2013; SILVA et al., 2014). Este produto geralmente apresenta um alto teor proteico (até 90% de proteína bruta), riqueza em aminoácidos essenciais, como lisina e metionina (CHAMALALIAH et al., 2012), além de alta digestibilidade e palatabilidade para peixes e camarões (FOH et al., 2011; NGUYEN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014; XIE et al., 2016). O HPP também pode estimular as enzimas proteolíticas endógenas (CAVALHEIRO et al., 2007), contribuindo assim com o processo de digestão (SILVA et al., 2014).

Os estudos com hidrolisados protéicos iniciaram na década de 40 (TARR, 1948), quando também foram explorados os métodos para obtenção do HPP através da adição de enzimas (SILVA, 2014). Durante o processo de produção do HPP a hidrólise enzimática auxilia na manutenção das propriedades nutricionais, pois não desnatura os aminoácidos (HE et al., 2013), o que lhe confere o perfil de um produto com elevado padrão de qualidade e com características controladas pela adição de enzimas (FURLAN e OETTERER, 2002).

A hidrólise enzimática ocasiona uma alteração no sabor do produto hidrolisado, devido a racemização dos aminoácidos, principalmente, sob maior tempo de exposição a enzima, o que pode influenciar na atratabilidade da ração para os camarões (KRISTINSSON e RASCO, 2000; OETTERER, 2001; FURLAN e OETTERER, 2002;). Como alternativa, é feito o uso da Alcalase®, que é um pool enzimático obtido a partir da fermentação de cepas do *Bacillus licheniformis*, com capacidade de atenuar essa alteração no sabor (ZAVAREZE et al., 2009; GALLA et al., 2012; HE et al., 2013). O uso de enzimas exógenas ou ingredientes que possuam a capacidade de estimular as enzimas endógenas dos organismos aquáticos, auxiliando na digestão e absorção de nutrientes com baixa digestibilidade (SILVA, 2014).

Vários estudos utilizam diferentes fontes de pescado para produção do HPP, como exemplo o camarão (*Litopenaeus vannamei*); o salmão (*Salmo salar*), matrinxã (*Brycon amazonicus*), tambaqui (*Colossoma macropomun*), pescada-do-pacífico (*Merluccius productus*); a sardinha (*Sardinella sp.*), mexilhão (*Perna perna*); a tilápia (*Oreochromis niloticus*), entre outros (PLASCENCIA-JATOMEA et al., 2002; REFSTIE et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2008; HO et al., 2014; BROGGI et al., 2017; SILVA et al., 2017), embora ainda tenha sido apontado qual o organismo aquático atuaria como melhor fonte para produção do hidrolisado proteico e aplicação na aquicultura (SILVA et al., 2010).

Considerando que atualmente a tilápia é a espécie de peixe mais cultivada no Brasil e o investimento no processamento do filé, que é o item de maior valor econômico, vem proporcionando maior investimento nas indústrias de processamento nacional (SUSSEL, 2013), surge a preocupação com os resíduos gerados nestes processos industriais, que podem representar até 70% da matéria-prima (AMORIM, 2014). Esses resíduos não possuem valor comercial e são indevidamente descartados sem tratamento preliminar no ambiente, causando

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

graves prejuízos ao meio ambiente (SILVA et al., 2014). Assim, sob esse prisma econômico e sustentável, utilizar esses resíduos da tilápia para produção do HPP, acarretaria em diversos benefícios para aquicultura (SILVA et al., 2017; QUINTO et al., 2017).

A avaliação das enzimas digestórias pode contribuir para determinar qual a melhor concentração e inclusão do hidrolisado protéico, através da avaliação do desempenho zootécnico de organismos submetidos a estas dietas (SANTOS et al., 2013), uma vez que a análise das enzimas digestivas é a ferramenta utilizada para compreender as exigências nutricionais das espécies cultivadas e o efeito dos ingredientes fornecidos nas dietas sobre a atividade enzimática. Alguns estudos afirmam que a mudança na quantidade ou no tipo de ingrediente utilizado na formulação de rações, pode influenciar a atividade das enzimas, desde sua concentração até o perfil enzimático no trato digestório dos camarões (LUNDSTED et al., 2004; FOUNTOULAKI et al., 2005).

A qualidade e quantidade de proteína pode limitar o crescimento, caso não atenda às necessidades da espécie alvo do cultivo (FERNÁNDEZ GIMENEZ et al., 2002; OUJIFARD et al., 2012; SILVA, 2014). De maneira geral, os peneídeos apresentam comportamento alimentar onívoro (DALL et al., 1990), o que lhes permite uma alimentação balanceada, portanto, há uma grande variedade enzimática no seu trato digestivo, como as proteases, carboidrases e lipases (BUARQUE et al., 2009). Dentre as enzimas digestivas de peneídeos, as mais estudadas são as proteases, por serem responsáveis pela digestão da proteína, o qual é um nutriente muito importante para o desenvolvimento dos camarões (HERNÁNDEZ & MURUETA, 2009).

Dentre as proteases mais importantes para os peneídeos se destacam as endoproteases (tripsina e quimotripsina) e as exoproteases (aminopeptidases) (GARCIA-CARREÑO et al., 2011; RANDRIAMAHATODY et al., 2011; PEREA et al., 2012; SILVA, 2014). Vários estudos têm demonstrado a variação da quimotripsina e tripsina no processo de desenvolvimento do *L. vannamei* e do perfil destas enzimas quando submetidos a diferentes dietas (SAINZ et al., 2004 a, b, 2005; SAINZ- HERNÁNDEZ e MURUETA, 2009; DEL TORO et al., 2011). A tripsina é responsável por mais de 60% da digestão dos peneídeos, o que a torna associada com a quimotripsina, as proteases mais abundantes nos camarões (MUHLIA-ALMAZÁN et al., 2008; CHISTY et al., 2009).

Outras enzimas importantes do *L. vannamei*, assim como para outros peneídeos são as amilases, responsáveis pela digestão dos carboidratos, na forma de amido ou glicogênio presentes nas dietas comerciais formuladas (CRUZ-SUAREZ et al., 2000). Essas enzimas auxiliam na digestão da quitina do próprio exoesqueleto ou de microcrustáceos que fazem parte de sua dieta em ambientes naturais (PEREA et al., 2008; CASTRO et al., 2012). Já as lipases têm papel fundamental no catabolismo de triacilglicérides, que são depósitos de gordura ou de lipídeos, e funcionam como fonte de energia armazenada para estes organismos

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

(PEREA et al., 2008; OUJIFARD et al., 2012; ALMEIDA NETO, 2014). Entretanto, uma parte dos lipídeos são melhores catabolizados durante o jejum do camarão enquanto outra é armazenada como fonte estrutural das membranas celulares (HERVANT et al., 1999).

De maneira geral, o arranjo das enzimas metabólicas influencia diretamente a fisiologia do camarão (ANAND et al., 2017) e, é conhecido, que a resposta das enzimas pode variar sobre a influência de fatores exógenos (como variáveis de qualidade de água, frequência de alimentação, qualidade e quantidade da proteína ofertada, sistema de cultivo, entre outros) e endógenos (alterações ontogênicas, estágio de muda, os processos fisiológicos e ritmo circadiano) (LOVETT & FELDER; 1990; CRUZ-SUÁREZ, 2000; LEMOS et al., 2000; ANAND et al., 2017) e, portanto, indicando o estado de saúde do camarão (PAN et al., 2003; MURRAY et al., 2010).

Estudos que avaliam a nutrição de camarões em conjunto com análises bioquímicas da dieta e do tecido destes animais, podem fornecer informações importantes, que vão além do desempenho zootécnico dos animais alimentados com dietas substituindo a farinha de peixe (SANTOS, et al., 2013). Dentre as análises bioquímicas, a avaliação das enzimas digestivas é uma ferramenta para auxiliar nestes estudos de nutrição na carcinicultura.

Neste sentido, o objetivo do presente estudo é avaliar a atividade enzimática digestória do camarão marinho *L. vannamei*, alimentado com dietas com diferentes níveis de substituição da farinha de peixe por hidrolisados protéicos de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de diferentes inclusões dos hidrolisados proteicos de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), com diferentes tempos de hidrólise, sobre a atividade enzimática do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, na fase juvenil.

1.1.2 Objetivo específicos

- Quantificar a atividade das principais proteases digestivas para *L. vannamei*;
- Avaliar a influência do tempo de hidrólise (1 ou 2 horas) e nível de substituição do hidrolisado de resíduos de Tilápia sobre a atividade enzimática do *L. vannamei*.

1.2 Hipótese

Rações com até 120g.Kg⁻¹ de inclusão do hidrolisado proteico de resíduos (carcaça) de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) com duas horas de hidrólise, em substituição a farinha de peixe, são capazes de aumentar a atividade enzimática do camarão *L. vannamei* sem prejudicar seu desempenho zootécnico.

2. Artigo Científico

Artigo científico a ser submetido para publicação na Revista *Aquaculture Nutrition*.

PADRÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM JUVENIS DE *Litopenaeus vannamei* ALIMENTADOS COM DIETAS FORMULADAS COM HIDROLISADO PROTÉICO DE RESÍDUOS DE TILÁPIA

Camila Barros Costa^{1*}, Bruna Paula Torres Quinto¹, Flavio Guilherme Floro Rodrigues¹, Janilson Felix da Silva², Roberta Borda Soares¹, Ranilson de Souza Bezerra², Silvio Peixoto¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Tecnologia em Aquicultura, 52171-900, Recife, PE, Brasil

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de bioquímica, Laboratório de Enzimologia, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil

*Autor correspondente – contato:

Fone: 81 3320- 6519

Email: camilabc17@yahoo.com.br

PADRÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM JUVENIS DE *Litopenaeus vannamei*
ALIMENTADOS COM DIETAS FORMULADAS COM HIDROLISADO
PROTÉICO DE RESÍDUOS DE TILÁPIA

Camila Barros Costa^{1*}, Bruna Paula Torres Quinto¹, Flavio Guilherme Floro Rodrigues¹, Janilson Felix da Silva², Roberta Borda Soares¹, Ranilson de Souza Bezerra², Silvio Peixoto¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Tecnologia em Aquicultura, 52171-900, Recife, PE, Brasil

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de bioquímica, Laboratório de Enzimologia, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil

*email: camilabc17@yahoo.com.br

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes dietas formuladas com hidrolisado proteico de resíduos de *Oreochromis niloticus* obtidos com dois tempos de hidrolise (1 e 2 horas), em substituição a farinha de peixe, sobre a atividade enzimática digestória do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, cultivados na fase de berçário. Para realização do experimento foram utilizadas pós-larvas (0,004g), cultivadas em sistema de recirculação e água clara, durante 45 dias. Foram formuladas 7 dietas para a alimentação do animal, com a inclusão do H1 (1 hora de hidrolise) e H2 (2 horas de hidrolise) em níveis de substituição de 40g.kg⁻¹, 80g.kg⁻¹ e 120g.kg⁻¹ da farinha de peixe, compondo os tratamentos: controle (sem adição de nenhum dos hidrolisados), H1-40, H1-80, H1-120, H2-40, H2-80 e H2-120. Foram realizadas coletas dos hepatopancrêas durante a recepção dos camarões e nos tempos 15, 30 e 45 dias de cultivo, para a análise das principais enzimas digestivas (proteases totais, tripsina, quimotripsina, aminopeptidases, amilase e lipase). Aos 45 dias de cultivo o tratamento H1-80 apresentou a maior média de atividade proteolítica total (1,27± 0,01 mU/mg) diferindo dos demais tratamentos. Já para a tripsina e os tratamentos que apresentaram diferença estatística no mesmo período, com médias superiores aos demais foram o H1-120 (32,53 ± 2,77mU/mg) e o H2-80 (28,18±3,20mU/mg), enquanto que para a quimotripsina, as maiores medias foram nos tratamentos H1-80 (16,61± 1,10 mU/mg) e H1-120 (15,69± 0,97mU/mg), que diferiram dos demais. Já atividade amilolítica aos 45 dias foi maior no tratamento H1-120 com média de atividade 159,27± 2,05mU/mg e para a atividade lipolítica o tratamento com maior valor médio foi o H2-120 (3,14± 0,1 mU/mg). Os resultados obtidos neste estudo revelam que a substituição da farinha de peixe por hidrolisados proteico de resíduos de *O. niloticus* influenciam a atividade enzimática do *L. vannamei* durante os 45 dias de cultivo, com a

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

possibilidade de maiores inclusões do hidrolisado com 2 horas de hidrólise, uma vez que, os camarões alimentados com as substituições de 80 e 120 g.kg⁻¹ acarretaram em maiores médias de atividade enzimática digestiva.

Palavra-chave: Camarão Marinho, hidrolisado proteico de peixe e atividade enzimática.

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de produzir uma ração com elevada qualidade e com baixos custos para a produção de camarões, promove a busca incessante por novos produtos que possam substituir a farinha de peixe (TACON, 2011). Vários estudos foram realizados para avaliar matérias-primas como farelo de soja (HU et al., 2008; TERRAZAS et al., 2010; SCOPEL et al., 2011), farinha de carne e vísceras (SCOPEL et al., 2011), farinha de spirulina (*Arthrospira sp.*) (SILVA-NETO et al., 2012), farinha de bioflocos (DANTAS et al., 2016) como potencial fonte de proteína para o cultivo do *Litopenaeus vannamei*.

A utilização de organismos ou resíduos de origem pesqueira e aquícola, para fabricação de novos produtos, apresenta vantagens, devido ao seu conteúdo corpóreo e teor de proteína que é similar ao encontrado na farinha de peixe (NAYLOR, 2009; NUNES et al., 2014), logo tais produtos, podem ser considerados seus substitutos, na produção de ração para o *L. vannamei*. Devido ao crescimento da tilapicultura (*Oreochromis niloticus*) no Brasil, há a preocupação com o aumento dos resíduos gerados pela indústria de beneficiamento do pescado (SILVA et al., 2014), e a utilização desses resíduos para a produção de hidrolisado proteico (HP) é uma maneira de valorizá-los e torná-los comercializáveis (FELTES et al., 2010; BENJAKUL et al., 2014).

Hidrolisados são concentrados protéicos obtidos a partir da quebra da proteína em unidades peptídicas menores (OGAWA e MAIA, 1999; VIOQUE et al., 2006), e de acordo com THIANSILAKUL et al. (2007) a hidrólise enzimática da proteína de resíduos de peixe é um método eficaz para obtenção de peptídeos bioativos. Considerando que o tamanho dos peptídeos influencia na absorção dos organismos, estudos realizados com peixes (NUNES et al., 2014) e camarões (CÓRDOVA-MURUETA e GARCÍA-CARREÑO, 2002) demonstram que di e tripeptídeos são melhores absorvidos, pois em elevadas quantidades podem estimular a atividade das enzimas digestórias (SRICHANUN et al., 2014). Portanto, é necessário controlar variáveis, como temperatura, pH, tempo de incubação, concentração da enzima, o tipo e o tempo de hidrólise, para garantir a estabilidade e qualidade do produto final (GUADIX et al., 2000; SANTOS et al., 2004; FOH et al., 2011).

A dinâmica das enzimas digestivas é importante para o estudo da nutrição de camarões marinhos, uma vez que a absorção de nutrientes ingeridos na dieta é decorrente da ação destas enzimas (TYMOCZKO et al., 2014). A síntese das enzimas digestivas em camarões ocorre

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

principalmente no hepatopancrêas, sendo assim a análise dessa glândula pode fornecer informações sobre a relação entre sua atividade digestiva e o crescimento do animal (RIOS, 2017).

O desempenho zootécnico de *L. vannamei* das dietas contendo hidrolisado proteico de resíduos de tilápia, com dois tempos de hidrólise (1 e 2 horas) e, diferentes níveis de substituições (40,80 e 120 g.kg⁻¹) já foi avaliado por Quinto et al. (2017). Sendo assim, no presente estudo buscou avaliar os padrões de atividade enzimática digestiva destes animais como forma de melhor caracterizar os efeitos da inclusão destes novos ingredientes na dieta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Hidrolisado proteico de peixe e dietas experimentais

Para produção do hidrolisado proteico foram utilizados resíduos congelados de carcaça de tilápia (*O. niloticus*), obtidos de indústrias de beneficiamento de pescado de acordo com Quinto et al. (2017). As dietas foram formuladas com um teor de 42% de proteína bruta de acordo com a necessidade nutricional dos camarões na fase de berçário. A farinha de peixe de salmão (*Salmo salar*) foi substituída pelos diferentes hidrolisados proteicos de resíduo de tilápia formulados, H1 (1 hora de hidrólise) e de H2 (2 horas de hidrólise), nas proporções de 0 g. Kg⁻¹ (controle), 40, 80 e 120 g. Kg⁻¹ de substituição, totalizando sete dietas formuladas conforme descritas por Quinto et al., 2017.

2.2 Desenho experimental

O experimento foi realizado e descrito por Quinto et al., (2017), cujo arranjo experimental foi composto por sete tratamentos, com três repetições cada, sendo estes: Controle (ração sem adição de hidrolisados), H1-40 (1 hora de hidrólise com 40g.kg⁻¹ de substituição), H1- 80 (1 hora de hidrólise com 80g.kg⁻¹ de substituição), H1-120 (1 hora de hidrólise com 120g.kg⁻¹ de substituição), H2-40 (2 horas de hidrólise com 40g.kg⁻¹ de substituição), H2-80 (2 horas de hidrólise com 80g.kg⁻¹ de substituição); H2-120 (2 horas de hidrólise com 120 g.kg⁻¹ de substituição). Os tanques experimentais (50 litros), forma dispostos em delineamento inteiramente casualizado em um sistema de recirculação de água salgada na salinidade de 27 g/L. Pós-larvas com 10 dias de vida (PL 10; 0,004g) de *L. vannamei* foram adquiridas da larvicultura comercial (Aquatec, Canguaretama, Rio Grande do Norte) e distribuídas nas parcelas experimentais com 150 animais cada, correspondendo a densidade de 3 camarões/m². A alimentação foi fornecida três vezes ao dia, iniciando-se com 50% da biomassa do tanque fracionada em 30% as 08:00 horas da manhã, 20% as 12:00 horas pela tarde e 50 % as 16:00 horas pela noite, e posteriormente ajustada de acordo com o peso dos animais. O experimento teve duração de 45 dias referente a fase de berçário, em ambiente fechado.

As variáveis físico-químicas foram avaliadas diariamente, através de Multiparâmetro

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com... modelo YSI 556 MPS (temperatura (°C), salinidade (g.L⁻¹), pH, oxigênio dissolvido (mg/L)) e espectrofotômetro Hach DR 3900 (amônia (NH₃ – mg/L) e nitrito (NO₂ – mg/L), sendo mantidos nos respectivos valores de 29,17 ± 0,8 °C, 28 ± 1,13 g L⁻¹, 7,6 ± 0,43, 5,3 ± 0,37 mg/L⁻¹, 0,25 ± 0,81 mg/L⁻¹, 0,8 ± 1,38 mg/L⁻¹, conforme descrito por Quinto et al. (2017).

2.3 Coleta dos camarões e determinação da atividade enzimática

Durante a recepção dos camarões, foi realizada coleta de uma amostra inicial de 1g dos animais (0,0017 g) para controle e ponto inicial de referência da atividade enzimática antes da exposição as diferentes dietas formuladas com o uso do hidrolisado proteico. Ao longo do cultivo foram realizadas coletas de 20 camarões de cada unidade experimental aos 15, 30 e 45 dias para posteriores análises enzimáticas. No momento da amostragem, os animais foram lavados com água destilada estéril, e de maneira asséptica, seus hepatopâncreas foram retirados e imediatamente congelados em ultrafreezer a -80 °C (ZHOU et. al., 2011). Estas amostras foram transportadas em gelo seco (-20°C) para o Laboratório de Enzimologia (LABENZ) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde foram analisadas as atividades enzimáticas das proteases totais, quimotripsina, tripsina, amilase e lipase.

Para determinação da atividade enzimática, os hepatopâncreas foram descongelados, pesados e homogeneizados em solução de salina na concentração de 0,9% na proporção de 40 mg de tecido/mL de tampão. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000g durante 25 min a 4 °C para eliminar os restos de tecido e lipídios. Os sobrenadantes obtidos (extratos brutos) foram filtrados em malha de 10µm e armazenados a -80°C para análise posterior. A dosagem de proteína total solúvel nos extratos brutos foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como proteína padrão.

2.4 Atividade proteolítica total, quimotripsina e tripsina

A atividade de protease total foi analisada por meio da hidrólise da azocaseína (1%) dissolvida em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8), no qual alíquotas (30 uL) dos extratos brutos foram incubados em microtubo com solução de substrato azocaseína (50 µL) por 60 minutos a 25 °C (BEZERRA et al., 2005). A reação foi interrompida com a adição de ácido tricloroacético a 10% (240 µL) e a mistura centrifugada a 8000 rpm por 5 minutos.

Posteriormente, 70 µL do sobrenadante foi retirado e adicionado numa microplaca com 130µL de hidróxido de sódio 1M (solução reveladora). A absorbância foi medida num espectrofotômetro (Bio-Rad680) a um comprimento de onda de 450 nm. Um controle negativo (branco) da atividade foi realizado em substituição do extrato bruto por solução salina a 9%. Todas as dosagens das atividades foram realizadas em triplicata. A unidade da

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar azocaseína e produzir uma mudança de 0,001 unidades de absorbância por minuto.

As atividades enzimáticas específicas de tripsina e quimotripsina foram determinadas em microplacas com a utilização dos substratos Na-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BApNA) e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SApNA), respectivamente (BEZERRA et al., 2005). Esses substratos foram utilizados a uma concentração de 4 mM.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, nos quais os extratos brutos (30 µL) foram incubados com 140 µL de solução tampão (Tris-HCl 0,1 M, pH 8) e 30 µL do substrato por um período de 15 minutos. Logo depois, as leituras de absorbância foram mensuradas e registradas por meio de um leitor de microplacas (Bio-Rad 680), no comprimento de onda de 405 nm. Foi adotado que uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima necessária para produzir um mol de p-nitroanilina por minuto, sendo a atividade específica expressa em unidades por miligrama de proteína, e calculadas com a fórmula: $\left(\frac{(A/T) * V * D}{C}\right) * 1000$) onde, A: Absorbância; T: tempo (min); V: volume; D: diluição; C: coeficiente de extinção molar do produto (9,1 mg. mL⁻¹); 1000: é o fator de conversão de U/mg para mU/mg.

2.5 Atividade das aminopeptidases

A atividade das aminopeptidases foram avaliadas usando o substrato aminoacyl-b-naphthylamine (sigma- Aldrich). Foram utilizados os substratos alanina, arginina, histidina, isoleucina, leucina, prolina e tirosina na concentração de 4,2 mM, onde 50 µl desses substratos foram incubados em um microtubo com tampão fosfato de sódio a 6,2 mM (pH 7.0) e 50 µl água destilada na temperatura de 37°C, durante 5 minutos. Após esse período de incubação 50 µl do extrato bruto foi adicionado e novamente incubado por 30 minutos, a 37 °C. A reação foi interrompida adicionando o reagente fresh Garnet, preparado com tampão acetato de sódio a 0,2M, pH 4,2 e Tween 20 (adaptado de BUARQUE et al., 2009). Os ensaios foram realizados em triplicata. A absorbância usada para leitura em espectrofotômetro foi de 525nm e a atividade foi determinada usando a curva de b-naphthylamina. A atividade foi expressa em mU/mg de proteína, na qual uma unidade (U) de enzima é definida como a quantidade necessária para hidrolisar 1mol de b-naphthylamida por minuto.

2.6 Atividade amilolítica

A atividade amilolítica das amostras foi determinada com o preparo de uma solução de amido a 2%, a qual foi adicionada (125 uL) a uma alíquota de 20uL do extrato bruto e mais 125 uL do tampão da amostra (salina 0,9%), em microtubos. Esta mistura foi incubada a 37 °C por 10 minutos e, posteriormente, por 20 minutos a temperatura ambiente, aproximadamente 27°C.

Em sequência, uma alíquota de 30uL desta mistura foi retirada e inoculada em um novo

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

microtubo com 300 uL de ácido dinitrosalicílico (DNSA), novamente incubado em banho seco a 100° C (Adaptado de BERNFELD, 1955). Após 10 minutos de resfriamento em temperatura ambiente (27°C), a coloração desenvolvida foi avaliada através de espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foi determinado que uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1mg de maltose por mg de proteína por minuto com o auxílio de uma curva de maltose na concentração de 1%.

2.7 Atividade Lipolítica

A atividade lipolítica foi realizada a partir da preparação da solução A de palmitato (3g de palmitato para 1mL de isopropanol) e da solução B de tritonX-100 (2g) e goma arábica (0,5g) adicionados a 10mL de tampão fosfato a 0,05 M. Após o preparo de ambas as soluções, estas foram homogeneizadas na proporção de 1mL da solução A para cada 10 mL da solução B, sob constante agitação para obtenção da solução C (Adaptado de LIMA, 2012; RODRIGUES et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2015).

O ensaio desta atividade foi realizado adicionando 900 uL da solução C e 100 uL dos extratos brutos em microtubos e, posteriormente, aquecendo-os a 37°C por 15 minutos. Destes microtubos foram retirados 200uL, adicionados em microplaca e submetidos a leitura em espectrofotômetro, na absorbância de 410nm. O controle é realizado com a solução C e o tampão salina 9%, e todos os ensaios também foram realizados em triplicatas. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 µmol de pNPP (palmitato de p-nitrofenol) por minuto, por 1 mL do sobrenadante, nas condições descritas (PEIXOTO, et al.; 2017).

2.8 Análise estatística

O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 3 repetições. Os dados de quantificação enzimática foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial após serem atendidas as premissas necessárias (normalidade e homocedasticidade). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey para determinar diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$), por meio do software Statistic, versão 7. Foi realizada uma regressão quadrática para avaliar a relação entre as dietas experimentais e as atividades enzimáticas avaliadas, usando o programa Assistat 7.7 ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Os resultados de atividade enzimática das pós-larvas no início do experimento para proteases totais, tripsina, quimotripsina, amilase e lipase foram de: $0,29 \pm 0,01$ mU/mg, $0,22 \pm 0,01$ mU/mg, $0,21 \pm 0,06$ mU/mg, $0,12 \pm 0,12$ mU/mg e $0,28 \pm 0,11$ mU/mg, respectivamente.

A atividade enzimática proteolítica total dos camarões variou entre os tratamentos testados ao longo do tempo (Tabela 1). Aos 15 dias de cultivo o tratamento H1-40 diferiu estatisticamente dos demais tratamentos com a maior média de atividade para proteases totais ($0,33 \pm 0,00$ mU/mg). Já aos 30 dias, os tratamentos H2-80 ($0,44 \pm 0,00$ mU/m) e H2-120 ($0,45 \pm 0,01$ mU/m) foram estatisticamente superiores aos outros tratamentos. Aos 45 dias o tratamento que obteve a maior atividade foi o H1-80 ($1,27 \pm 0,01$ mU/mg), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Os resultados para atividade de tripsina estão apresentados na tabela 4. Os tratamentos H1-40, H1-120 e o H2-120 obtiveram as maiores médias de atividade ($16,74 \pm 2,29$ mU/mg, $14,12 \pm 1,61$ mU/mg e $17,13 \pm 1,42$ mU/mg, respectivamente), diferindo dos demais tratamentos aos 15 dias de cultivo. Durante os 30 dias foi observado que os camarões pertencentes ao grupo H1-120 apresentaram valores estatisticamente superiores para atividade de tripsina ($30,82 \pm 2,78$ mU/mg), quando comparado aos demais tratamentos. Ao final dos 45 dias de cultivo os tratamentos H1-120 e H2-80 diferiram estatisticamente dos demais tratamentos, obtendo as maiores médias de $32,53 \pm 2,7$ mU/mg e $28,18 \pm 3,20$ mU/mg.

Com relação aos resultados da atividade de quimotripsina foi observado que o tratamento H2-120 aos 15 diferiu significativamente dos demais tratamentos, com média de $11,62 \pm 2,82$ mU/mg. Também aos 30 dias de cultivo, os camarões alimentados com H2-120 obtiveram a maior média de atividade ($13,98 \pm 1,78$ mU/mg), diferindo dos demais tratamentos, com exceção apenas, para o H2-80 ($11,34 \pm 1,89$ mU/mg). Já aos 45 dias de cultivo, os tratamentos H1-80 e H1-120 diferiram significativamente dos outros tratamentos com médias de $16,61 \pm 1,10$ mU/mg e $15,69 \pm 0,97$ mU/mg, respectivamente.

A atividade amilolítica variou ao longo do cultivo (Tabela 1). Aos 15 dias os camarões alimentados com a dieta H2-80, obtiveram as maiores médias de atividade amilolítica ($122,39 \pm 1,99$ mU/mg), diferindo significativamente dos demais tratamentos. Os maiores valores médios encontrados, aos 30 dias de cultivo, pertencem aos tratamentos H1-120 ($121,89 \pm 15,74$ mU/mg), H2-40 ($123,72 \pm 8,46$ mU/mg) e H2-80 ($142,04 \pm 4,13$ mU/mg), diferindo estatisticamente dos demais. Aos 45 dias, o tratamento que apresentou a maior média de atividade diferindo significativamente dos outros tratamentos, foi o H1-120 ($159,27 \pm 2,05$ mU/mg).

Com relação a atividade lipolítica aos 15 dias de cultivo não ocorreu diferença estatística

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

entre os tratamentos testados. Os camarões cultivados no tratamento H2-80, aos 30 dias apresentaram uma maior atividade lipolítica ($1,53 \pm 0,18 \text{ mU/mg}$), diferindo significativamente dos demais tratamentos. E ao final dos 45 dias, o tratamento que se destacou, apresentando diferença estatística dos demais foi o tratamento ($3,14 \pm 0,1 \text{ mU/mg}$).

Os resultados para atividade de leucinoaminopeptidase com substratos específicos estão apresentados na tabela 3. Com exceção da histidina, isoleucina e prolina que obtiveram as maiores atividades no tempo 0, as outras aminopeptidases ao final dos 45 dias de cultivo apresentaram um aumento significativo.

As curvas de regressão quadráticas demonstram uma correlação entre as atividades testadas e o nível de inclusão de hidrolisado proteico nas dietas experimentais (Figura 1). As curvas que apresentaram menor correlação foram as de proteases totais (63,11% para o H1 e 53,64 para o H2) e tripsina (66,08% para o H1 e 56,96% para o H2). Os níveis de substituição para cada atividade estão indicados na figura 1. Os valores de substituição recomendados para atividade proteolítica total para o H1 são de 85,08g/kg e 60,56 g/kg para o H2. Já para a atividade de tripsina e quimotripsina os valores são de 135,87g/Kg para o H1 e 127,57g/kg para o H2. Para a atividade amilolítica as substituições recomendadas para os H1 e H2 são de 73,21g/Kg e 50,30g/kg, respectivamente.

4 DISCUSSÃO

A proteína é um dos principais nutrientes responsáveis pelo crescimento do *L. vannamei* (TACON, 1990; BEZERRA, 2014), e sua qualidade pode influenciar na digestão e assimilação dos nutrientes presentes na dieta. De maneira geral, as características benéficas do hidrolisado proteico para camarões, podem ser associadas aos peptídeos e aos aminoácidos livres gerados pela hidrólise da proteína do pescado (AKSNES et al., 2006; BERGE AND STOREBAKKEN, 1996; NGUYEN et al. 2012; DE OLIVEIRA, 2017), que promovem a melhora da palatabilidade, propiciam uma alta digestibilidade da proteína e estimulam as enzimas digestivas (HEVROY et al., 2005; VALLE et al., 2015). No presente estudo, pode se observar o aumento das atividades enzimáticas digestórias avaliadas, nos tratamentos contendo os hidrolisados de resíduos de tilápia, quando comparados ao controle.

No presente estudo, a atividade proteolítica total aumentou ao longo dos 45 dias de cultivo para todos os tratamentos testados, assim como no estudo realizado por Peixoto et al. (2017), que avaliou a atividade enzimática do *L. vannamei* cultivado durante 35 dias na fase de berçário, em sistema de bioflocos. Além disso Peixoto et al. (2017) reportaram uma diminuição nesta atividade entre a fase inicial e o período de 15 dias de cultivo, o que também observado neste trabalho para todas as dietas testadas. Este fato pode estar associado a adaptação do animal a nova dieta, considerando que ao longo do seu desenvolvimento

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

ontogenético o esperado é que a atividade de proteases seja maior nas primeiras fases devido as mudanças e a necessidade protéica (GUALDEZI et al., 2014).

O sistema digestivo dos crustáceos apresenta alta concentração de endoproteases, destacando-se como principais, a tripsina e quimotripsina (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 1997; FERNÁNDEZ- GIMENEZ et al., 2002) e, a associação dessas enzimas, auxilia na digestão dos peneídeos (PEIXOTO et al., 2017). No presente estudo, a atividade da tripsina apresentou um aumento significativo para os tratamentos H1-120 e H2-80 ao final dos 45 dias de cultivo, já a quimotripsina, apresentou para o mesmo período, um aumento significativo para os tratamentos H1-80 e H1-120, principalmente em comparação com a dieta controle, esses resultados podem ser associados aos níveis de inclusão dos hidrolisados e seus tempos de hidrolise, uma vez que os peptideos gerados durante o processo de hidrolise enzimática podem ser mais facilmente absorvidos e com isso estimular a atividade enzimática (BENJAKUL et al., 2014).

No estudo realizado por Quinto et al. (2017), de onde foram coletadas as amostras para avaliação da atividade enzimática avaliadas no presente estudo, foi observado que os camarões alimentados com dietas contendo o H2 apresentam maior peso final (0,5g), enquanto aqueles que foram alimentados com o H1 alcançaram menor peso final (0,4g), fato que os autores associaram ao excesso de aminoácidos livres gerados pela hidrolise. A presença de alguns ingredientes pode estimular a atividade endógena melhorando o desempenho animal (DIVAKARAN e VELASCO, 1999; GAMBOA-DELGADO et al., 2003; YANG et al., 2009; XIA et al., 2010; YANG et al., 2017); contudo, estes mesmos ingredientes podem facilitar o processo de digestão, sem aumentar a atividade indígena do camarão ou afetar o desempenho do animal (SANTOS et al., 2014). Neste sentido, os resultados encontrados no presente estudo para as atividades proteolíticas totais e específicas corroboram com esta última hipótese, uma vez que indicam maiores valores médios de atividade enzimática proteolítica e amilolítica para os camarões alimentados com as dietas contendo o H1.

A atividade amilolítica do presente estudo, decresceu para todos os tratamentos aos 45 dias de cultivo, com exceção do H1-120, esta redução pode estar relacionada a dificuldades do animal de digerir o carboidrato presente na dieta, proveniente dos ingredientes de origem vegetal (farelo de trigo e farelo de soja) (GAMBOA-DELGADO, et al. 2003; ANAND et al., 2017; PEIXOTO et al., 2017). Os carboidratos representam a principal fonte de energia não proteica, presente nas rações formuladas para camarão (ROSAS et al., 2000; NIU et al. 2012; CYRINO e FRACALLOSSI, 2013), e a eficácia de sua absorção está associada à sua qualidade e quantidade na dieta, além dos fatores que regulam a atividade enzimática no animal (ROSAS et al., 2002).

Atividade Lipolítica neste estudo foi estatisticamente superior para os tratamentos que continham maiores substituições do H2 aos 30 (80g.kg^{-1}) e 45 (120 g.kg^{-1}) dias de cultivo.

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

Considerando que a lipase está relacionada a digestão de lipídios e no acúmulo de biomassa corpórea (BUARQUE et al., 2009; PEIXOTO et al., 2017), pode-se afirmar que camarões alimentados com hidrolisado com duas horas de hidrólise, podem atingir um maior ganho de peso, quando comparados aos alimentados com hidrolisado com tempo de hidrólise inferior, ou sem a sua adição deste ingrediente a dieta, assim como descrito por Quinto et al., 2017.

No presente estudo, os níveis de inclusão do hidrolisado nas dietas foram correlacionados proporcionalmente a atividade enzimática do *L. vannamei* e com exceção da atividade de amilase, no qual é recomendado uma inclusão de 73,21 g.kg⁻¹ para o H1 e 50,3 g. Kg⁻¹ para o H2 as maiores inclusões são sugeridas para o H2, com níveis máximos de 135,87 g. Kg⁻¹ para o H2 é de 127, 57g.Kg⁻¹ para o H1 com relação as atividades de tripsina e quimotripsina. Assim como no estudo realizado por Quinto et al. (2017), no qual os parâmetros de desempenho zootécnico de pós-larvas *L. vannamei* (peso final, taxa de crescimento específico e sobrevivência) foram correlacionados aos níveis de substituição da farinha de peixe por hidrolisados de resíduos de tilápia, sugerindo maiores níveis de inclusão para o H2, os níveis recomendados por estes autores foram de 60g.Kg⁻¹ e 86g.Kg⁻¹ para o H2 e 4,3 g. Kg⁻¹ e 44 g. Kg⁻¹ para o H1. O nível de inclusão do hidrolisado nas dietas é um fator importante, uma vez que HEVROY (2005), sugere que inclusões superiores a 50% podem diminuir a ingestão alimentar de peixes, devido a presença de peptídeos relacionados ao sabor capazes de modificar a palatabilidade da ração contendo o hidrolisado proteico de peixe. Esses resultados corroboram com o atual estudo para *L. vannamei*, uma vez que os níveis máximos sugeridos equivalem a 33,96% e 31,9% de inclusão de hidrolisado.

No estudo realizado por SANTOS et al. (2013) dietas com diferentes níveis de hidrolisado proteico de camarão foram ofertadas para juvenis de Tilápia com objetivo de determinar seu efeito sobre o crescimento, a composição centesimal e o perfil das enzimas, embora tenham aparecido diferença nas atividades enzimáticas os autores não conseguiram achar relação lógica entre as atividades e as substituições. Ao contrário do presente estudo, que apresentou correlação positiva entre a atividade enzimática e os níveis de substituição de hidrolisado proteico de peixe na alimentação de camarões.

A substituição dos hidrolisados proteicos de resíduos de Tilápia em dietas para *L. vannamei*, na fase de berçário, influenciou sua atividade enzimática ao longo do tempo de cultivo, principalmente para o hidrolisado com uma hora de hidrólise (H1) e os resultados sugerem que as maiores inclusões testadas (80 e 120 g.kg⁻¹) acarretaram em maiores médias de atividade enzimática digestiva, sendo possível fazer maiores substituições para o hidrolisado com umas duas horas de hidrólise (H2). No entanto, ao relacionar os resultados do presente estudo com o desempenho zootécnico avaliado por Quinto et al., 2017, podemos concluir que os valores de atividades enzimáticas do H2 revelam um aproveitamento positivo dos nutrientes pelos camarões cultivados, enquanto que o aumento da atividade nos

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com... tratamentos com H1 pode estar associado a dificuldade de assimilação dos nutrientes, uma vez que os animais deste tratamento não obtiveram o melhor desempenho.

5 REFERÊNCIAS

- Aksnes, A.; Hope, B.; Albrektsen, S. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. II: Flesh quality, absorption, retention and fillet levels of taurine and anserine. *Aquaculture*, v. 261, n. 1, p. 318-326, 2006.
- Anand, S.; Sudhayam, P.; Kumar, S.; Kohli, M. P. S.; Sundaray, J. K.; Sinha, A.; Dam roy, S. Dietary biofloc supplementation in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*: effects on immunity, antioxidant and metabolic enzyme activities. *Aquaculture Research*, v. 48, n. 8, p. 4512-4523, 2017.
- Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S. M., & Kristinsson, H. G. (2014). Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications. *Antioxidants and functional components in aquatic foods, 1st ed. Reykjavik, Iceland: Matil Ltd*, 237Á83.
- Berge, G. M., & Storebakken, T. (1996). Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture*, 145(1-4), 205-212,
- Bernfeld, P. Amylases, α and β . 149-158, 1955.
- Bezerra, A. J. M. (2014). Nível e fonte de proteína na alimentação do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado na presença de bioflocos.
- Bezerra, R. D. S., Santos, J. F. D., Lino, M. A. D. S., Vieira, V. L. A., & Carvalho, L. B. (2000). Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of food biochemistry*, 24(3), 189-199.
- Bezerra, R. S., Lins, E. J., Alencar, R. B., Paiva, P. M., Chaves, M. E., Coelho, L. C., & Carvalho Jr, L. B. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, 40(5), 1829-1834.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Buarque, D. S., Castro, P. F., Santos, F. M. S., Lemos, D., Júnior, L. B. C., & Bezerra, R. S. (2009). Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research*, 40(7), 861-870.
- Dantas, E. M., Valle, B. C. S., Brito, C. M. S., Calazans, N. K. F., Peixoto, S. R. M., & Soares, R. B. (2016). Partial replacement of fishmeal with biofloc meal in the diet of postlarvae

- COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...
of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 335-342.
- De Oliveira, N. S. (2017). Avaliação do hidrolisado proteico de sardinha (*Sardinella sp.*) e de probiótico comercial como promotores de crescimento para JUVENIS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*). Doctoral dissertation, Universidade do Estado de Santa Catarina.
- Dos Santos, J. C., Rueda, N., Torres, R., Barbosa, O., Goncalves, L. R., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. *Process Biochemistry*, 50(6), 918-927.
- Feltes, M., Correia, J. F., Beirão, L. H., Block, J. M., Ninow, J. L., & Spiller, V. R. (2010). Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, 14(6).
- Fernández-Gimenez, A. V., García-Carreño, F. L., Del Toro, M. N., & Fenucci, J. L. (2002). Digestive proteinases of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae) and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 132, 593–598.
- Fernández-López, M., Gómez-Pérez, A., & Juristo, N. (1997). Methontology: from ontological art towards ontological engineering.
- Foh, M. B. K., Kamara, M. T., Amadou, I., Foh, B. M., & Wenshui, X. (2011). Chemical and physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. *International journal of Biological chemistry*, 5(1), 21-36.
- Gamboa-delgado, J., Molina-poveda, C., & Cahu, C. (2003). Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture research*, v. 34, n. 15, p. 1403-1411, 2003.
- Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.
- Gualdezi, M. C. (2013). Efeito da concentração de amido de batata na expressão e distribuição de a-amilases no trato intestinal do camarão branco *Litopenaeus vannamei*.
- Hevroy, E. M., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M., & HEMRE, G. I. (2005). Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquaculture Nutrition*, 11(4), 301-313.
- Hu, Y., Tan, B., Mai, K., Ai, Q., Zheng, S., & Cheng, K. (2008). Growth and body composition of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed different ratios of dietary protein to energy. *Aquaculture Nutrition*, 14(6), 499-506.
- Lima, V. M. G. D. (2012). Produção e Purificação da Lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua Aplicação em Biocatálise em Solventes Orgânicos.

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

- Lovett, D. L., & Felder, D. L. (1990). Ontogenetic changes in enzyme distribution and midgut function in developmental stages of *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *The Biological bulletin*, 178(2), 160-174.
- Mendoza, R., De Dios, A., Vasquez, C., Cruz, E., Ricque, D., Aguilera, C., & Montemayor, J. (2001). Fishmeal replacement with feather-enzymatic hydrolyzates co-extruded with soya-bean meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, v. 7, n. 3, p. 143-152, 2001.
- Murueta, J. H. C., & Carreño, F. G. (2007). Concentrates of fish protein from bycatch species produced by various drying processes. *Food Chemistry*, 100(2), 705-711.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., & Nichols, P. D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15103-15110.
- Nguyen, H. T. M., Pérez-Gálvez, R., & Bergé, J. P. (2012). Effect of diets containing tuna head hydrolysates on the survival and growth of shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 324, 127-134.
- Nunes, A. J., Sá, M. V., Browdy, C. L., & Vazquez-Anon, M. (2014). Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. *Aquaculture*, 431, 20-27.
- Ogawa, M., & Maia, E. L. (1999). Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado. São Paulo: Varela, 1, 430.
- Peixoto, S., Silva, E., Costa, C. B., Nery, R. C., Rodrigues, F., Silva, J. F., ... & Soares, R. (2018). Effect of feeding frequency on growth and enzymatic activity of *Litopenaeus vannamei* during nursery phase in biofloc system. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 579-585.
- Quinto, B. P. T., Albuquerque, J. V., Bezerra, R. S., Peixoto, S., & Soares, R. (2018). Replacement of fishmeal by two types of fish protein hydrolysate in feed for postlarval shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 24(2), 768-776.
- Rios, C. (2017). Perfil de enzimas digestivas em juvenis do camarão-branco-do-pacífico *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas contendo diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por farinha das larvas do inseto *Tenebrio molitor*.
- Rodrigues, D. S., Mendes, A. A., Filice, M., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., & Palomo, J. M. (2009). Different derivatives of a lipase display different regioselectivity in the monohydrolysis of per-O-acetylated 1-O-substituted- β -galactopyranosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 36-40.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soye, C., & Van Wormhoudt, A. (2000). Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus*

- COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com... *stylirostris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 249(2), 181-198.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., & van Wormhoudt, A. (2002). An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 268(1), 47-67.
- Santos, J. F., Castro, P. F., Leal, A. L. G., de Freitas Júnior, A. C. V., Lemos, D., Carvalho, L. B., & Bezerra, R. S. (2013). Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate. *Aquaculture international*, 21(3), 563-577.
- Scopel, B. R., Schweitzer, R., Seiffert, W. Q., Pierri, V., da Fonseca Arantes, R., do Nascimento Vieira, F., & Vinatea, L. A. (2011). Substituição da farinha de peixe em dietas para camarões marinhos cultivados em sistema bioflocos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(8), 928-934.
- Silva, J. F. X.; Ribeiro, K.; Silva, J. F.; Cahú, T. B.; Bezerra, R. S. (2014). Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. *Animal feed science and technology*, 196, 96-106.
- Silva-Neto, J. F., Nunes, A. J. P., Sabry-Neto, H., & Sá, M. V. C. (2012). Spirulina meal has acted as a strong feeding attractant for *Litopenaeus vannamei* at a very low dietary inclusion level. *Aquaculture Research*, 43(3), 430-437.
- Srichanun, M., Tantikitti, C., Kortner, T. M., Krogdahl, Å., & Chotikachinda, R. (2014). Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer Bloch*) larvae. *Aquaculture*, 428, 195-202.
- Tacon, A. (1990). Standards methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Argent laboratories press.
- Tacon, A. G. J. (2000). Rendered animal by-products: a necessity in aquafeeds for the new millennium. *Global Aquaculture Advocate*, 3(4), 18-19.
- Terrazas, M., Civera, R., Ibarra, L., & Goytortúa, E. (2010). Coeficientes de utilización digestiva aparente de materia seca, proteína y aminoácidos esenciales de ingredientes terrestres para el camarón del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). *Revista de Biología Tropical*, 58(4), 1561-1576.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., & Shahidi, F. (2007). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103(4), 1385-1394.

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com...

Tymoczko, J. L., Berg, J. M., & Stryer, L. (2014). *Bioquímica: curso básico*. Reverté.

Valle, B. C. S., Dantas, E. M., Silva, J. F. X., Bezerra, R. S., Correia, E. S., Peixoto, S. R. M., & Soares, R. B. (2015). Replacement of fishmeal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Nutrition*, 21(1), 105-112.

Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., & Millán, F. (2000). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(4), 447-450.

Yang, J., Cui, C., Feng, W., Zhao, H., Wang, W., & Dong, K. Protein hydrolysates of salted duck egg white improve the quality of Jinga Shrimp (*Metapenaeus affinis*). *International Journal of Food Science & Technology*, v. 52, n. 7, p. 1623-1631, 2017. Lemos, D., Ezquerro, J. M., & García-Carreño, F. L. (2000). Protein digestion feed digestibility. *Aquaculture*, 186, 105.

Yang, Q., Zhou, X., Zhou, Q., Tan, B., Chi, S., & Dong, X. Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquaculture Research*, v. 41, n. 1, p. 78-86, 2009.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., ... & Musi, N. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation*, 108(8), 1167-1174.

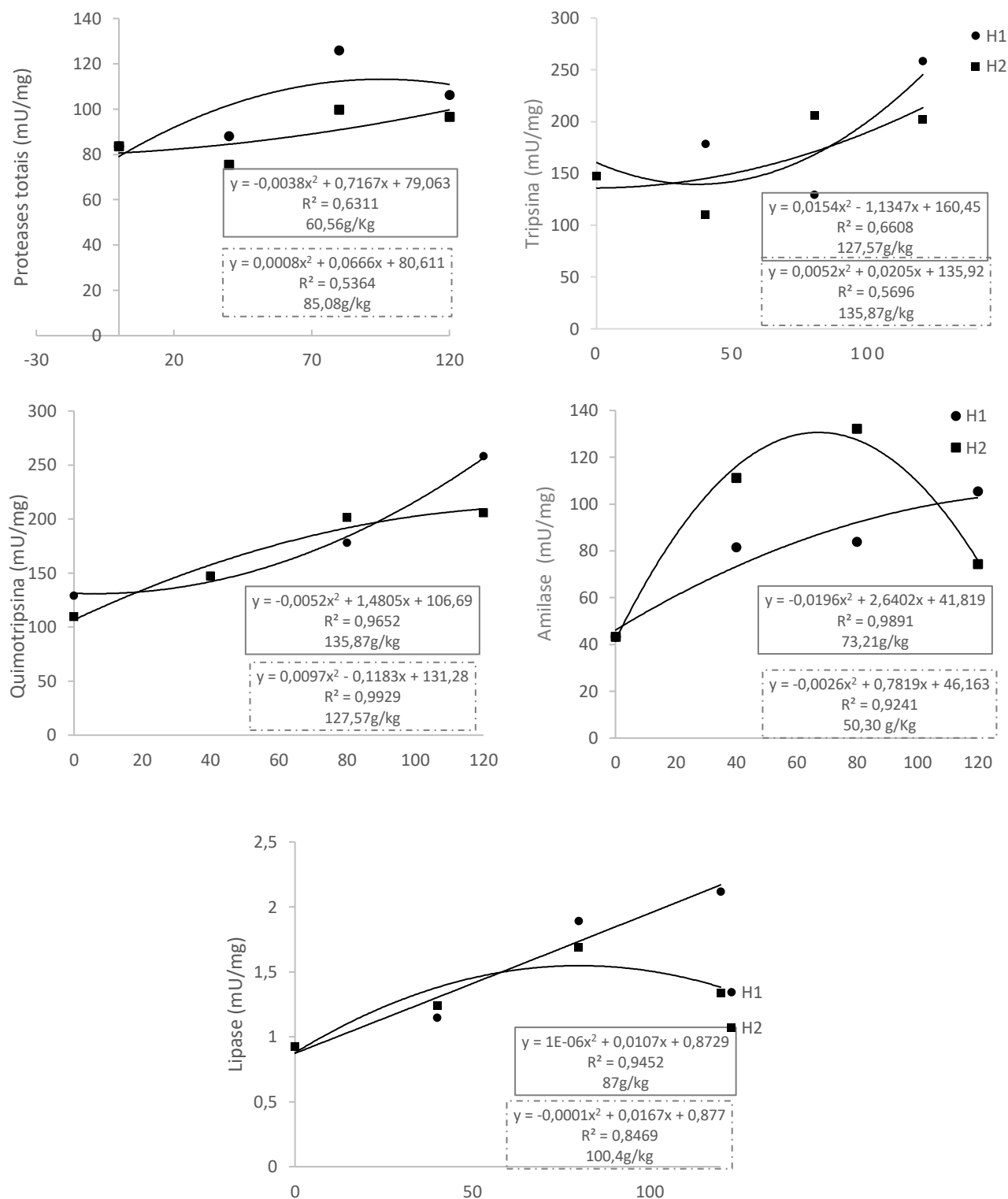


Figura 1- Curvas de regressão para as atividades de proteases totais (a), tripsina (b), quimotripsina (c), amilase (d) e lipase (e) do *Litopenaeus vannamei* em relação ao nível de substituição dos hidrolisados protéicos de resíduos de tilápia aos dias de cultivo. As equações das curvas e os valores ótimos de substituição dos hidrolisados estão inseridos nas caixas de texto com linha contínua para o H1(1hora de hidrolise) e tracejada para o H2 (2 horas de hidrolise).

Tabela 2- Valores (média $\pm$ DP) para as atividades de proteases totais, tripsina, quimotripsina, amilase e lipase expressas em mU/mg para *L. vannamei* nos tempos 0 (durante a aquisição dos camarões), 15, 30 e 45 dias de cultivo, com dietas contendo diferentes inclusões dos hidrolisado proteico de resíduos de tilápia, H1(1 hora de hidrolise) e H2 (2 horas de hidrolise) em substituição a farinha de peixe.

	Controle	H1 -40	H1-80	H1-120	H2-40	H2-80	H2-120
Proteases Totais							
0	0,29 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,07
15	0,21 $\pm$ 0,00 ^{Cd}	0,33 $\pm$ 0,00 ^{Ba}	0,29 $\pm$ 0,00 ^{Bb}	0,22 $\pm$ 0,01 ^{Bd}	0,18 $\pm$ 0,00 ^{Ce}	0,27 $\pm$ 0,00 ^{Cb}	0,24 $\pm$ 0,00 ^{Cc}
30	0,33 $\pm$ 0,00 ^{Bc}	0,11 $\pm$ 0,00 ^{Ce}	0,32 $\pm$ 0,01 ^{Bc}	0,24 $\pm$ 0,01 ^{Bd}	0,38 $\pm$ 0,01 ^{Bb}	0,44 $\pm$ 0,00 ^{Ba}	0,45 $\pm$ 0,01 ^{Ba}
45	0,69 $\pm$ 0,01 ^{Af}	0,88 $\pm$ 0,01 ^{Ac}	1,27 $\pm$ 0,01 ^{Aa}	1,12 $\pm$ 0,01 ^{Ab}	0,57 $\pm$ 0,02 ^{Af}	0,83 $\pm$ 0,01 ^{Ad}	0,82 $\pm$ 0,01 ^{Ad}
Tripsina							
0	0,22 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,06	0,22 $\pm$ 0,06
15	3,91 $\pm$ 0,72 ^{Bc}	16,74 $\pm$ 2,29 ^{Ba}	6,84 $\pm$ 1,07 ^{ABb}	14,12 $\pm$ 1,61 ^{Ba}	2,41 $\pm$ 0,550 ^{Bc}	6,48 $\pm$ 1,15 ^{Bb}	17,13 $\pm$ 1,42 ^{Ba}
30	17,50 $\pm$ 1,93 ^{Ac}	16,03 $\pm$ 1,56 ^{Ad}	10,39 $\pm$ 1,66 ^{Ad}	30,82 $\pm$ 2,78 ^{Aa}	13,83 $\pm$ 1,54 ^{Ac}	27,12 $\pm$ 3,30 ^{Aab}	20,74 $\pm$ 1,99 ^{Ab}
45	17,05 $\pm$ 1,41 ^{Ac}	22,98 $\pm$ 2,51 ^{Ab}	21,60 $\pm$ 3,31 ^{Ab}	32,53 $\pm$ 2,77 ^{Aa}	16,77 $\pm$ 2,17 ^{Ac}	28,18 $\pm$ 3,20 ^{Aa}	22,65 $\pm$ 2,04 ^{Ab}
Quimotripsina							
0	0,21 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,06
15	3,73 $\pm$ 0,25 ^{Cc}	5,84 $\pm$ 0,44 ^{Cb}	9,42 $\pm$ 0,45 ^{Bb}	10,17 $\pm$ 2,46 ^{Bb}	8,28 $\pm$ 1,05 ^{Bb}	8,56 $\pm$ 1,20 ^{Cb}	11,62 $\pm$ 2,82 ^a
30	5,13 $\pm$ 0,04 ^{Bc}	8,81 $\pm$ 0,54 ^{Bb}	9,49 $\pm$ 1,43 ^{Bb}	10,72 $\pm$ 0,79 ^{Bb}	8,63 $\pm$ 0,92 ^{Bb}	11,34 $\pm$ 1,89 ^{Bab}	13,98 $\pm$ 1,78 ^{Aa}
45	9,72 $\pm$ 2,65 ^{Ac}	12,81 $\pm$ 0,97 ^{Ab}	16,61 $\pm$ 1,10 ^{Aa}	15,69 $\pm$ 0,97 ^{Aa}	13,17 $\pm$ 0,57 ^{Ab}	13,95 $\pm$ 1,37 ^{Ab}	13,69 $\pm$ 1,51 ^{Bb}
Amilase							
0	0,12 $\pm$ 0,12	0,12 $\pm$ 0,12	0,12 $\pm$ 0,12	0,12 $\pm$ 0,12	0,12 $\pm$ 0,12	0,12 $\pm$ 0,12	0,12 $\pm$ 0,12
15	42,44 $\pm$ 3,84 ^{Bd}	83,60 $\pm$ 4,50 ^{Ac}	93,91 $\pm$ 4,11 ^{Bc}	89,04 $\pm$ 11,73 ^{Cc}	98,79 $\pm$ 6,74 ^{Bb}	122,39 $\pm$ 1,99 ^{Ba}	79,16 $\pm$ 5,63 ^{Bc}
30	44,38 $\pm$ 4,07 ^{Bc}	81,79 $\pm$ 4,091 ^{Ab}	73,88 $\pm$ 2,77 ^{Cbc}	121,89 $\pm$ 15,74 ^{Ba}	123,72 $\pm$ 8,46 ^{Aa}	142,04 $\pm$ 4,13 ^{Aa}	69,76 $\pm$ 4,49 ^{Cc}
45	48,68 $\pm$ 3,53 ^{Af}	57,55 $\pm$ 1,40 ^{Be}	129,66 $\pm$,62 ^{Ab}	159,27 $\pm$ 2,05 ^{Aa}	77,45 $\pm$ 0,58 ^{Cd}	72,87 $\pm$ 0,83 ^{Cd}	89,54 $\pm$ 3,21 ^{Ab}
Lipase							
0	0,28 $\pm$ 0,11	0,28 $\pm$ 0,11	0,28 $\pm$ 0,11	0,28 $\pm$ 0,11	0,28 $\pm$ 0,11	0,28 $\pm$ 0,11	0,28 $\pm$ 0,11
15	0,28 $\pm$ 0,06 ^{Ba}	0,38 $\pm$ 0,04 ^{Ca}	1,35 $\pm$ 0,70 ^{Ba}	2,04 $\pm$ 1,51 ^{Ba}	0,57 $\pm$ 0,15 ^{Ba}	1,43 $\pm$ 0,66 ^{Ba}	0,39 $\pm$ 0,04 ^{Ca}
30	0,92 $\pm$ 0,08 ^{Bc}	1,06 $\pm$ 0,09 ^{Bb}	1,13 $\pm$ 0,13 ^{Bb}	1,20 $\pm$ 0,13 ^{Cb}	1,44 $\pm$ 0,19 ^{Ab}	1,53 $\pm$ 0,18 ^{Ba}	1,01 $\pm$ 0,10 ^{Bb}
45	1,65 $\pm$ 0,25 ^{Ad}	1,97 $\pm$ 0,05 ^{Ac}	2,74 $\pm$ 0,84 ^{Ab}	2,63 $\pm$ 0,19 ^{Ab}	2,70 $\pm$ 0,24 ^{Ab}	2,92 $\pm$ 0,13 ^{Ab}	3,14 $\pm$ 0,1 ^{Aa}

*Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha representam diferença significativa entre os tratamentos. **Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna representam diferença significativa ao longo do cultivo. $p > 0,05$. ***a para as maiores médias.

Tabela 3- Atividade das aminopeptidases do *L. vannamei* durante 0 e 45 dias de cultivo para os substratos alanina, arginina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, prolina e tirosina expressas em mU/mg e cultivados com dietas formuladas com diferentes inclusões do hidrolisado proteico de resíduos de tilápia, H1(1 hora de hidrolise) e H2 (2 horas de hidrolise).

p-Nitroanilínide substratos	Alanina	Arginina	Glicina	Histidina	Isoleucina	Leucina	Prolina	Tirosina
Inicial	13,6 ±0,1 ^B	5,02 ±0,6 ^B	63,5±3,9 ^B	91,6 ±6,9 ^A	108,0 ±0,4 ^A	10,4±2,7 ^B	7,2 ±1,8 ^A	122,8±0,6 ^B
Comercial	57,4 ±3,6 ^{Ad}	51,7 ±0,7 ^{AcD}	47,1 ±3,3 ^{Bf}	28,8 ±2,5 ^{Ba}	30,1 ±0,8 ^{Bcd}	9,0 ±1,5 ^{Bcd}	4,8 ±1,1 ^{Aa}	295,5±10,17 ^{Abc}
Controle	31,0±2,0 ^{Ade}	40,2 ±2,6 ^{Ae}	96,6 ±2,6 ^{Ae}	37,0 ±9,4 ^{Ba}	36,2±1,3 ^{Bb}	10,4±3,1 ^{Bcd}	6,7±2,6 ^{Aa}	246,5±12,2 ^{Ab}
H1-40	158,0 ±5,6 ^{Aa}	69,5 ±1,8 ^{Ab}	173,0±16,7 ^{Ad}	39,0±4,2 ^{Ba}	36,3±0,9 ^{Bb}	26,9 ±1,7 ^{Aab}	9,1 ±2,0 ^{Aa}	212,8 ±53,1 ^{Ab}
H1-80	35,5±2,9 ^{Ae}	38,3±1,7 ^{Ae}	252,4±8,0 ^{Ac}	47,2±14,8 ^{Ba}	35,5±1,6 ^{Bbc}	3,5±1,6 ^{Bd}	10,4±1,6 ^{Aa}	351,2±42,6 ^{Aa}
H1-120	130,2 ±5,1 ^{Ab}	106,2 ±3,3 ^{Aa}	106,6 ±11,8 ^{Ae}	49,3±1,7 ^{Ba}	39,4±1,2 ^{Bb}	33,2 ±2,9 ^{Aa}	6,9 ±0,3 ^{Aa}	297,3 ±32,5 ^{Abc}
H2-40	32,5±5,6 ^{Ae}	44,5 ±0,9 ^{Ade}	171,7±4,6 ^{Ad}	23,6 ±23,6 ^{Ba}	22,5±0,6 ^{Be}	9,6±2,6 ^{Bcd}	4,3 ±2,0 ^{Aa}	250,6 ±5,0 ^{ABC}
H2-80	18,3 ±1,8 ^{Ae}	19,6 ±1,7 ^{Af}	287,0±4,1 ^{Ab}	30,7 ±3,3 ^{Ba}	35,4±2,6 ^{Bbc}	6,7 ±0,8 ^{Bd}	5,3 ±0,5 ^{Aa}	262,5±12,2 ^{Abc}
H2-120	83,8 ±2,0 ^{Ac}	58,9 ±1,2 ^{Ac}	408,6±14,2 ^{Aa}	24,8 ±2,9 ^{Ba}	28,7±0,6 ^{Bd}	19,9±2,5 ^{Bbc}	8,4 ±1,5 ^{Aa}	316,7±14,5 ^{Abc}

*Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna representam diferença significativa entre os tratamentos. **Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna representam diferença significativa ao longo do cultivo. $p > 0,05$. ***a para as maiores médias.

3. Considerações finais

O propósito principal deste trabalho foi de analisar a influência da adição de hidrolisados proteicos de resíduos de tilápia, sobre a atividade enzimática digestiva, do *L. vannamei*, para isso foram analisadas as principais enzimas digestórias, numa tentativa de trazer elucidação sobre a influência de ingredientes alternativos nas dietas para camarão.

Através das análises enzimáticas do hepatopancrêas dos camarões cultivados, conseguimos atingir o objetivo proposto, quantificando as atividades e determinando a influência com relação ao tipo do hidrolisado e os níveis de inclusão. E como ponto de relevância deste estudo, observamos que as maiores inclusões dos hidrolisados aumentaram as atividades enzimáticas, sendo possível com base nos resultados incluir maiores níveis do hidrolisado com duas horas de hidrolise. Porém é necessário avaliar *in vivo* o efeito destes hidrolisados sobre o desempenho zootécnico e se maiores inclusões não seriam prejudiciais ao desenvolvimento dos camarões.

4. Referências

AKSNES, A.; HOPE, B.; ALBREKTSEN, S. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. II: Flesh quality, absorption, retention and fillet levels of taurine and anserine. **Aquaculture**, v. 261, n. 1, p. 318-326, 2006.

ALMEIDA NETO, M.E.DE. Relação entre padrão comportamental, estágios do ciclo de muda e atividade de enzimas digestivas proteolíticas em juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). 2011. 110p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

AMORIM, R. G. O. D. Hidrolisado protéico dos resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*) como forma de agregar valor ao pescado e reduzir o passivo ambiental das indústrias de pesca no município de Itajaí-SC, **Tese (Doutorado)** - Itajaí-SC, 2014.

ANAND, S.; SUDHAYAM, P.; KUMAR, S.; KOHLI, M. P. S.; SUNDARAY, J. K.; SINHA, A.; DAM ROY, S. Dietary biofloc supplementation in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*: effects on immunity, antioxidant and metabolic enzyme activities. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 8, p. 4512-4523, 2017.

ARANTES, R.F.; VIEIRA, F.N; VINATEA, L.A. Substituição da farinha de peixe em dietas para camarões marinhos cultivados em sistema bioflocos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 928-934, 2011.

ARIAS-MOSCOSO, J. L. et al. Inclusion of two differently pH-autolysis hydrolysates of squid coproduct in diets of shrimp cultured under indoor and outdoor conditions. **Aquaculture nutrition**, v. 21, n. 5, p. 750-754, 2015.

BENJAKUL, S.; YARNPAKDEE, S.; SENPHAN, T.; HALLDORSDDOTTIR, S. M.; KRISTINSSON, H. G. Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications. **Antioxidants and functional components in aquatic foods**, 1st ed. Reykjavik, Iceland: Matil Ltd, p. 237 Á 83, 2014.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L.; GATTO Jr, G. J. **Bioquímica**. 12.ed. Rio

BERGE, G. M. e STOREBAKKEN, T. Fish protein hydrolyzate in starter diets for *Atlantic salmon* (*Salmo salar*) fry. **Aquaculture**, v. 145, n. 1-4, p. 205-212, 1996.

BERNFELD, P. Amylases a and b. In: Colowick SB, Kaplan NO, editor. Methods in Enzymology. **Academic Press**, v.1, p. 149-53, 1955.

BEZERRA, A. J. M. Nível e fonte de proteína na alimentação do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado na presença de bioflocos. 2014.

BEZERRA, R. D. S., SANTOS, J. F. D., LINO, M. A. D. S., VIEIRA, V. L. A., & CARVALHO, L. B. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of food biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 189-199, 2000.

BEZERRA, R. S. Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). **Aquaculture Research**, v. 40, p. 861-870, 2009.

BEZERRA, R. S., LINS, E. J., ALENCAR, R. B., PAIVA, P. M., CHAVES, M. E., COELHO, L. C., & CARVALHO JR, L. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v.40, p. 1829-1834, 2005.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**v.72, p. 248-254, 1976.

BROWDY, C. L.; HULATA, G.; LIU, Z.; ALLAN, G. L.; SOMMERVILLE, C.; PASSOS DE ANDRADE, T.; ROBINSON, S. Novel and emerging technologies: can they contribute to improving aquaculture sustainability. **Farming the waters for people and food**, p. 149-191, 2012.

BUARQUE, D. S., CASTRO, P. F., SANTOS, F. M. S., LEMOS, D., JÚNIOR, L. B. C., & BEZERRA, R. S. Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). **Aquaculture Research**, v. 40, n. 7, p. 861-870, 2009.

CASTRO, P. F., FREITAS JR, A. C., SANTANA, W. M., COSTA, H. M., CARVALHO JR,

L. B., & BEZERRA, R. S. Comparative study of amylases from the midgut gland of three species of penaeid shrimp. **Journal of Crustacean Biology**, v.32 (4), p. 607-613, 2012.

CAVALHEIRO, J. M. O.; SOUZA, E. O.; BORA, P. S. Utilization of shrimp industry waste in the formulation tilápia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Bioresource Technology**, v. 98, n.3, p. 602-606, 2007.

CHALAMAIAH, M.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. **Food chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020-3038, 2012.

CHISTY, M. A. H.; HASHIM, R.; CHONG, A. S. C. Identification and partial characterization of selected proteolytic enzymes in the digestive system of giant freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) Postlarvae. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 519- 525, 2009.

CHOTIKACHINDA, R.; TANTIKITTI, C.; BENJAKUL, S.; RUSTAD, T.; KUMARNSIT, E. Concentratemeal as potential dietary ingredient in practical diets for blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, p. 235–239, 2007.

CÓRDOVA-MURUETA, J. H. e GARCÍA-CARREÑO, F. L. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. **Aquaculture**, v. 210, n. 1-4, p. 371-384, 2002.

CRAIG, S.R.; SCHWARZ, M.H.; McLEAN, E. Juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) can utilize a wide range of protein and lipid levels without impacts on production characteristics. **Aquaculture**, v.261, p. 384-391, 2006.

CRUZ-SUÁREZ, LE, RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., OLVERA-NOVOA, MA Y CIVERA-CERECEDO, R, M., GUAJARDO-BARBOSA, C. E RICQUE-MARIE, D. Relaciones proteína/energía y proteína vegetal/animal optimas en alimentos de engorda para *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*. Avances en Nutrición Acuícola V. **Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**. Eds.: p. 19-22, 2000.

CYRINO, J. E. P.; FRACALOSSO, D. M. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, p. 375, 2013.

DANTAS, E. M., VALLE, B. C. S., BRITO, C. M. S., CALAZANS, N. K. F., PEIXOTO, S. R. M., & SOARES, R. B. Partial replacement of fishmeal with biofloc meal in the diet of postlarvae of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 335-342, 2016.

DEL TORO, M.A.N.; GARCÍA-CARREÑO. F.L.; CÓRDOVA-MURUETA, J.H. Comparison differentially regulates trypsin enzymes at the secretion and transcription level in *Panulirus argus* by distinct signaling pathways. **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 853- 862, 2012.

DIVAKARAN, S., VELASCO, M., BEYER, E., FORSTER, I., & TACON, A. G. (2000). Soybean meal apparent digestibility for *Litopenaeus vannamei*, including a critique of methodology. **Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola**, p. 19-22, 2000.

EGITO, A. S., GIRARDET, J. M., LAGUNA, L. E., POIRSON, C., MOLLÉ, D., MICLO, L., e GAILLARD, J. L. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. **International Dairy Journal**, v.17, p. 816–825, 2007.

EZQUERRA, J., GARCIA-CARREÑO, F. L., GUILLERMO, A. M., & HAARD, N. F. Effect of feed diet on aminopeptidase activities from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Journal of food biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 59-74, 1999.

FABREGAT, T. E. H. P.; PEREIRA, T. S.; BOSCOLO, C. N.; ALVARADO, J. D.; FERNANDES, J. B. K. Substituição da farinha de peixe pelo farelo de soja em dietas para juvenis de curimba. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 3, p. 289-294, 2011.

FABREGAT, T. E. H. P.; PEREIRA, T. S.; BOSCOLO, C. N.; ALVARADO, J. D.; Fabricação e formulação de rações para peixes. In: FRACALOSSI, D. M.; CYRINO, J. E. P. (Eds.). Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, p. 295– 346, 2012.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED. **The State of World** Fortaleza: Edições UFC, p. 218, 2012.

FELTES, M., CORREIA, J. F., BEIRÃO, L. H., BLOCK, J. M., NINOW, J. L., & SPILLER,

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com rações...

V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v.14, p.6, 2010.

FERNANDES, J. B. K. Substituição da farinha de peixe pelo farelo de soja em dietas para juvenis de curimba. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, p.289-294, 2011.

FERNANDEZ, I.; MOYANO, F. J.; DIAZ, M.; MARTINEZ, T. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (*Sparidae*, *Teleostei*). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, n. 1, p. 1-12, 2001.

FERNÁNDEZ-GIMENEZ, A. V.; GARCIA-CARREÑO, F. L.; DEL TORO, M. N.; FENUCCI. Fisheries and Aquaculture 2016. **Contributing to food security and nutrition for all. Rome**, 200 pp, 2016.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M., GÓMEZ-PÉREZ, A., & JURISTO, N. Methontology: from ontological art towards ontological engineering. 1997.

FITZSIMMON, K. The effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponária* on growth performance and enzymes activities of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured in low-salinity water. **Res. Lat. Am. J. Aquat**, v. 44, n.1, p. 121-128, 2016.

FOUNTOULAKI, E.; ALEXIS, M. N.; NENGAS, I.; VENOU, B. Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 13, p. 1243-1251, 2005.

FRIES, E. M., LUCHESI, J. D., COSTA, J. M., RESSEL, C., SIGNOR, A. A., BOSCOLO, W. R. FEIDEN. Hidrolisados cárneos proteicos em rações para alevinos de kinguios (*Carassius auratus*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 4, p. 401-407, 2011.

FRIES, E. M.; LUCHESI, J. D.; COSTA, J. M.; RESSEL, C.; SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v.32, p.1739-1743, 2009.

FURLAN, E. F. e OETTERER. M. Hidrolisado proteico de pescado. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v.10, p.79 -89, 2002.

GAMBOA-DELGADO, J., MOLINA-POVEDA, C., & CAHU, C. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. **Aquaculture research**, v. 34, n. 15, p. 1403-1411, 2003.

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com rações...

GARCÍA-CARREÑO, F. L., CÓRDOVA-MURUETA, J. H. Comparison of digestive proteinases in three penaeids. **Aquaculture**, v. 317, p.99–106, 2011.

GARCÍA-CARREÑO, F. L.; DIMES, L. E.; HAARD, N. F. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. **Analytical biochemistry**, v. 214, n. 1, p. 65-69, 1993.

GARCÍA-CARREÑO, F. L.; TORO, M. A. N.; FERNANDO, L. del.; CÓRDOVA-MURUETA, **Global Aquaculture Advocate**, v. 3, n. 4, p. 18-19, 2000.

GONZALES, T., e ROBERT-BAUDOUY, J. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. **FEMS microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 319-344, 1996.

GUADIX, A., GUADIX, E. M., PÁEZ-DUEÑAS, M. P., GONZÁLEZ-TELLO, P., & CAMACHO, F. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. **Ars Pharmaceutica**, v. 41, n. 1, p. 79-89, 2000.

GUALDEZI, M. C. Efeito da concentração de amido de batata na expressão e distribuição de α -amilases no trato intestinal do camarão branco *Litopenaeus vannamei*. 2013.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

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

HARTER, T., BUHRKE, F., KUMAR, V., FOCKEN, U., MAKKAR, H. P. S., & BECKER, K. Substitution of fishmeal by *Jatropha curcas* kernel meal: effects on growth performance and body composition of white leg shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p.542–548, 2011.

HARVEY, R.A. e FERRIER, D.R. Bioquímica ilustrada. **Artmed Editora**, 2015.

HE, S.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Functions, applications, and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP), Review. **Food Research International**, v.50, p.289-297, 2013.

HERNÁNDEZ, J.C.S. e MURUETA, J.H.C. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 290, n. 3-4, p. 190-195, 2009.

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com rações...

HERVANT, F., MATHIEU, J. e BARRE, H. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipod crustaceans to long-term starvation and subsequent refeeding. **J. Exp. Biology.**, v. 202, p. 3587-3595, 1999.

HEVROY, E. M., ESPE, M., WAAGBO, R., SANDNES, K., RUUD, M., & HEMRE, G. I. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 4, p. 301-313, 2005.

HU, Y.; TAN, B.; MAI, K.; AI, Q.; ZHENG, S.; CHENG, K. Growth and body composition of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vananmei* feed different ratios of dietary protein to energy. **Aquaculture Nutrition**, 2008. 14; 499–506.

IBGE- Pesquisa Pecuária Municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=74&z=t&o=24>>. Acesso em: 06 Mar. 2016.

JOBLING, M. Fish nutrition research: past, present and future. **Aquaculture international**, v.

KIRON, V., PHROMKUNTHONG, W., HUNTLEY, M., ARCHIBALD, I., & SCHEEMAKER, G. D. Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 521-531, 2012.

KRISTINSSON, H.G. e RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43-81, 2000.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: conquistas e desafios. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, n. 150, 2015.

KUHN, D. D., BOARDMAN, G. D., LAWRENCE, A. L., MARSH, L., & FLICK JR, G. J. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp meal with peanut meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 745–755, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEWANDOWSKI, Vanessa et al. Hidrolisados proteicos em dietas para larvas de peixes. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 12, n. 4, p. 277-282, 2017.

LIMA, V. M. G. D. Produção e Purificação da Lipase de *Bacillus megaterium* CCOC- P2637 e sua Aplicação em Biocatálise em Solventes Orgânicos. 2012.

MARICCHIOLO, G. e GENOVESE, L. Rice protein concentrate meal as potential dietary ingredient in practical diets for blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 91, n. 5-6, p. 235-239, 2007.

MENDOZA, R., DE DIOS, A., VASQUEZ, C., CRUZ, E., RICQUE, D., AGUILERA, C., & MONTEMAYOR, J. (2001). Fishmeal replacement with feather-enzymatic hydrolyzates co-extruded with soya-bean meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 143-152, 2001.

NASCIMENTO, J. H. P. do; VERRESCHI, D. C.; DE JESUS, R. S. Hidrolisados Protéicos de Peixe em Dietas para Alevinos de Surubim, *Pseudoplatystoma coruscans* (agassiz, 1829). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2008.

Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., ... & Nichols, P. D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 36, p. 15103-15110, 2009.

NGUYEN, H. T. M.; PÉREZ-GÁLVEZ, R.; BERGÉ, J. P. Enzymatic hydrolysis of yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using protamex protease. **Food Technology Biotechnology**, Nantes, v. 49, n. 1, p. 48-55, 2012.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of food Engineering**, v. 70, n. 4, p. 571-578, 2005.

NUNES, C. A. R. INGREDIENTES PROTEICOS NA ALIMENTAÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), 2014

OETTERER, M. Produtos obtidos por interferência na fração proteica do pescado. Piracicaba: ESALQ, 2001.

OETTERER, M. Química do pescado. In: OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, p. 353-359, 1999.

OLIVEIRA, M. S. R.; FRANZEN, F. L.; TERRA, N. N. Utilização da carne mecanicamente separada de frango para a produção de hidrolisados proteicos a partir de diferentes enzimas proteolíticas. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 35, n. 1, p. 291-302, 2014.

OUIJFARD, A.; SEYFABADI, J.; KENARI, A. A.; REZAEI, M. Growth and apparent Rev. **Aquaculture**, v. 290, p.190-195, 2009.

OUIJFARD, A.; SEYFABADI, J.; KENARI, A. A.; REZAEI, M. Growth and apparent digestibility of nutrients, fatty acids and amino acids in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with rice protein concentrate as total and partial replacement of fish meal. **Aquaculture**, 342, 56-61, 2012.

PAKRAVAN, S., AKBARZADEH, A., SAJJADI, M. M., HAJIMORADLOO, A., & NOORI, F. Partial and total replacement of fish meal by marine microalga *Spirulina platensis* in the diet of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Growth, digestive enzyme activities, fatty acid composition and responses to ammonia and hypoxia stress. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 11, p. 5576-5586, 2017.

PALMEGIANO, G. B., DAPRÀ, F., FORNERIS, G., GAI, F., GASCO, L., GUO, K., & ZOCCARATO, I. Rice protein concentrate meal as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 258(1-4), 357-367.

PALMEGIANO, G. B.; COSTANZO, M. T.; DAPRA, F.; GAI, F.; GALLETTA, M. G.; MARICCHIOLO, G.; GENOVESE, L. Rice protein concentrate meal as potential dietary ingredient in practical diets for blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 91, n. 5-6, p. 235-239, 2007.

PASTORE, S. M.; OLIVEIRA, WP de; MUNIZ, J. C. L. Panorama da coturnicultura no Brasil. **Revista eletrônica nutritime**, v. 9, n. 6, p. 2041-2049, 2012.

PEIXOTO, S., SILVA, E., COSTA, C. B., NERY, R. C., RODRIGUES, F., SILVA, J. F., & SOARES, R. Effect of feeding frequency on growth and enzymatic activity of *Litopenaeus vannamei* during nursery phase in biofloc system. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 579-585, 2018.

PEREIRA, B. H. S. Uso de complexo enzimático em dietas para tilápia do Nilo: digestibilidade, atividade enzimática, desempenho produtivo e parâmetros fisiológicos. **Dissertação (Mestrado) – FCAV, 2014.**

PERERA, E.; MOYANO, F. J.; DÍAZ, M.; PERDOMO-MORALES, R.; MONTERO-ALEJO, V.; ALONSO, E.; GALICH, G. S. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 3, p. 247-254, 2008.

ESKIN, M.; SHAHIDI, F. **Bioquímica de Alimentos**. Elsevier Brasil, 2017.

PERERA, E.; MOYANO, F. J.; DÍAZ, M.; PERDOMO-MORALES, R.; MONTERO-ALEJO, V.; ALONSO, E.; GALICH, G. S. Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 3, p. 247-254, 2008.

PERERA, E.; RODRÍGUEZ-VIERA, L.; RODRÍGUEZ-CASARIEGO, J.; FRAGA, I.; CARRILLO, O.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; MANCERA, J. M. Dietary protein quality physicochemical properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysates and concentrate. **International Journal of Biological Chemistry**, v.5, p.21–36, 2011.

PLASCENCIA-JATOMEA, M., OLVERA-NOVOA, M. A., ARREDONDO-FIGUEROA, J. L., HALL, G. M., & SHIRAI, K. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 7, p. 753-759, 2002.

PLASCENCIA-JATOMEA, M., OLVERA-NOVOA, M. A., ARREDONDO-FIGUEROA, J. potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). **Aquaculture Nutrition**, v. 19, n. 5, p. 773-784, 2013.

QUINTO, B. P. T., ALBUQUERQUE, J. V., BEZERRA, R. S., PEIXOTO, S., & SOARES, R. Replacement of fishmeal by two types of fish protein hydrolysate in feed for postlarvae shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, 2017.

RAY, A.J.; LEWIS, B.L.; BROWDY, C.L.; LEFFLER, J.W. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com rações...

in minimal-exchange, superintensive culture systems. **Aquaculture**, v.299, p.89-98, 2010.

REFSTIE, S.; OLLI, J.J.; STANDAL, H. Feed intake, growth, and protein utilization by postsmolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. **Aquaculture**, v.239, p.331-349, 2004.

REGO, M. A. S., SABBAG, O. J., SOARES, R. e PEIXOTO, S. Risk analysis of the insertion of biofloc technology in a marine shrimp *Litopenaeus vannamei* production in a farm in Pernambuco, Brazil: A case study. **Aquaculture**, v. 469, p. 67-71, 2017.

RIOS, C. Perfil de enzimas digestivas em juvenis do camarão-branco-do-pacífico *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas contendo diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por farinha das larvas do inseto *Tenebrio molitor*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

RODRIGUEZ, B. Enhancement of shrimp *Litopenaeus vannamei* diets based on terrestrial protein sources via the inclusion of tuna by-product protein hydrolysates. **Aquaculture**. V.317, p.117–123, 2011.

ROSAS, C.; CUZON, G.; Gaxiola, G.; Arena, L.; Lemaire, P.; Soye, C. e Van Wormhoudt, A. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 249, 181-198, 2000.

ROSAS, C.; Cuzon, G.; Gaxiola, G.; Pascual, C.; Taboada, G.; Arena, L. e van Wormhoudt, A. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 268, 47-67, 2002.

RUITER, A.; SIKORSKI, Z. E.; GILDBERG, A. Productos pesqueros. In: El pescado y los productos derivados de la pesca: composición, propiedades nutritivas y estabilidad. **Acribia**, p. 335-369, 1999.

SAINZ, J. C., GARCÍA-CARREÑO, F., SIERRA-BELTRÁN, A., & HERNÁNDEZ-CORTÉS, P. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Crustacean Biology**, v.24, n. 2, p.266-273, 2004b.

SAINZ-HERNÁNDEZ, J.C. e MURUETA, J.H.C. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 290, p.190–195, 2009.

SAMOCHA, T.M.; DAVIS, D.A.; SAOUD, I.P.; DEBAULT, K. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.231, p.197-203, 2004.

SÁNCHEZ-LOZANO, N. B., MARTÍNEZ-LLORENS, S., TOMÁS-VIDAL, A., & CERDÁ, M. J. Effect of high-level fish meal replacement by pea and rice concentrate protein on growth, nutrient utilization and fillet quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). **Aquaculture**, v. 298, p.83–89, 2009.

SANTOS, J. F.; CASTRO, P. F.; LEAL, A. L. G.; DE FREITAS JÚNIOR, A. C. V.; LEMOS, D.; CARVALHO, L. B.; BEZERRA, R. S. Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate. **Aquaculture International**, v. 21(3), p. 563-577, 2013.

SANTOS, J. F.; CASTRO, P. F.; LEAL, A. L. G.; DE FREITAS JÚNIOR, A. C. V.; LEMOS, D. Sardine waste protein hydrolysate as feeding stimulant for silver catfish juveniles. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 2, p. 505-512, 2017.

SILVA, C. P. Composição nutricional e análise microbiológica do hidrolisado proteico de subproduto de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*. 77p. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

SILVA, J. F. X.; RIBEIRO, K.; SILVA, J. F.; CAHÚ, T. B.; BEZERRA, R. S. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal feed science and technology**, v. 196, p. 96-106, 2014.

SILVA-NETO, J. F., NUNES, A. J. P., SABRY-NETO, H., & SÁ, M. V. C. Spirulina meal has acted as a strong feeding attractant for *Litopenaeus vannamei* at a very low dietary inclusion level. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 3, p. 430-437, 2012.

SKANDERBY, M. Protein hydrolysates: their functionality and applications. **Food Technology International Europe**, v. 10, p. 141-144, 1994.

SOARES, R. Effect of feeding frequency on growth and enzymatic activity of *Litopenaeus vannamei* during nursery phase in biofloc system. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 579-585, 2018.

SRICHANUN, M.; TANTIKITTI, C.; KORTNER, T. M.; KROGDAHL, Å.

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com rações...

CHOTIKACHINDA, R. Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in *Asian seabass (Lates calcarifer Bloch)* larvae. **Aquaculture**, v. 428, p. 195-202, 2014.

SUAREZ, A. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for White shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boon, 1931). **Aquaculture**, v. 289, p.118–123, 2009.

SUSSEL, Fábio Rosa. Tilapicultura no Brasil e entraves na produção. **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios-Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de**, v. 8510, 2013.

TACON, A. G. J. Rendered animal by-products: a necessity in aquafeeds for the new millennium Tacon, A. Standards methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. **Argent laboratories press**, 1990.

TACON, A. G. J. Rendered animal by-products: a necessity in aquafeeds for the new millennium. **Global Aquaculture Advocate**, v. 3, n. 4, p. 18-19, 2000.

TANG, H. G. WU, T. X., ZHAO, Z. Y., e PAN, X. D. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea R.*). **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 9, p. 684-690, 2008.

TARR, H. L. A. Possibilities in developing fisheries by-products. **Food Technology**, v. 2, n. 3, p. 268-277, 1948.

TERRAZAS, M.; CIVERA, R.; IBARRA, L.; GOYTORTUA, E. Coeficientes de utilization digestiva aparente de matéria seca, proteína y aminoácidos esenciales de ingredientes terrestres para el camarón del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). **Revista Biología Tropical**.V 58(4):1516-1576, 2010.

THIANSILAKUL, Y., BENJAKUL, S., & SHAHIDI, F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1385-1394, 2007.

VALLE, B. C. S., DANTAS, E. M., SILVA, J. F. X., BEZERRA, R. S., CORREIA, E. S., PEIXOTO, S. R. M., & SOARES, R. B. Replacement of fishmeal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 105-112, 2015.

COSTA, CB. Atividade enzimática de *Litopenaeus vannamei* alimentados com rações...

VIOQUE, J., SÁNCHEZ-VIOQUE, R., CLEMENTE, A., PEDROCHE, J., & MILLÁN, F. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 4, p. 447-450, 2000.

WANG, L.; LI, F.; WANG, B. Xiang, J. Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol**, 33, 1285-1291, 2012.

XIE, S. W.; LIU, Y. J.; ZENG, S.; NIU, J.; TIAN, L. X. Partial replacement of fish-meal by soy protein concentrate and soybean meal based protein blend for bjuvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 464, p. 296-302, 2016.

YANG, J., CUI, C., FENG, W., ZHAO, H., WANG, W., & DONG, K. Protein hydrolysates of salted duck egg white improve the quality of Jinga Shrimp (*Metapenaeus affinis*). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 7, p. 1623-1631, 2017.

Lemos, D., Ezquerro, J. M., & García-Carreño, F. L. (2000). Protein digestion feed digestibility. **Aquaculture**, 186, 105.

YANG, Q., ZHOU, X., ZHOU, Q., TAN, B., CHI, S., & DONG, X. Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 1, p. 78-86, 2009.

ZHOU, G., MYERS, R., LI, Y., CHEN, Y., SHEN, X., FENYK-MELODY, J., ... & MUSI, N. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **The Journal of clinical investigation**, v. 108, n. 8, p. 1167-1174, 2001.

ANEXOS: Normas da Revista Aquaculture Nutrition

Periódico: Aquaculture Nutrition

Site: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2095](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2095)

ISSN: 1365-2095 Fator de impacto: 1.511

Author Guidelines

Effective with the 2014 volume, this journal will be published in an online-only format. No printed issue of this title will be produced but authors will still be able to order offprints of their own articles.

Manuscript Submission

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/anu>. Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. Support can be contacted by phone (+1 434 817 2040 ext. 167), e-mail (support@scholarone.com) or at <http://mcv3support.custhelp.com>. If you cannot submit online, please contact Anette Hatland in the Editorial Office by telephone (+47 55905200) or by e-mail (an@nifes.no).

A covering letter must be included, signed by the corresponding author (i.e., the author to whom correspondence should be addressed), and stating on behalf of all the authors that the work has not been published and is not being considered for publication elsewhere. Authors are encouraged to suggest four potential referees for their manuscripts. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve its grammar, spelling, punctuation, and clarity. Please visit the following website <http://wileyeditingservices.com/en/> to learn about the options. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs--- copyright-_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html)

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA): Creative Commons Attribution License OAA; Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA. Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA; To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.

New Online-only format

Effective with the 2014 volume, this journal will be published in an online-only format. No printed edition will be published. Your article will therefore appear online- only. All normal author benefits and services remain in place e.g. authors will continue to be able to order print reprints of articles if required. Furthermore, there will be no cost to authors for the publication of colour images in the online-only edition.

Page Charges

Original research articles exceeding 8 pages when in proof will be subject to a page charge of GBP 100 per additional page. The first 8 pages will be published free of charge. An average 8-page article will have approximately 6200 words in manuscript, with approximately 5 figures or tables and 50 references. An invoice will be sent to authors for these charges upon publishing online in an issue of their article. Invited and review articles are excluded from this rule. Download Page Charge Form.

Preparation of the Manuscript

All sections of the manuscript should be double-spaced and with 30mm margins. Articles are accepted for publication only at the discretion of the editor (s). Authors will receive prompt acknowledgement of receipt of their paper and a decision will be reached within 3 months of receipt. A manuscript should consist of the following sections:

Title page

This should include: the full title of the paper; the full names of all the authors; the name (s) and address (es) of the institution(s) at which the work was carried out (the present addresses of the authors, if different from the above, should appear in a footnote); the name, address, and telephone and fax numbers of the author to whom all correspondence and proofs should be sent; a suggested running title of not more than fifty characters, including spaces; and six key words to aid indexing.

Main text

Generally, all papers should be divided into the following sections and appear in the order: (1) Abstract or Summary, not exceeding 150-200 words, (2) Introduction, (3) Materials and Methods, (4) Results, (5) Discussion, (6) Acknowledgements, (7) References, (8) legends, (9) Tables, (10) figures.

The Results and Discussion sections may be combined and may contain subheadings. The Materials and Methods section should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. Trade names should be capitalized and the manufacturer's name and address given. All pages must be numbered consecutively from the title page, and include the acknowledgements, references and figure legends, which should be submitted on separate sheets following the main text. The preferred position of tables and figures in the text should be indicated in the left-hand margin.

Units and spellings

Système International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as g L⁻¹. Use the form g mL⁻¹ not g/mL. Avoid the use of g per 100g, for example in food composition, use g kg⁻¹. If other units are used, these should be defined on first appearance in terms of SI units, e.g. mmHg. Spelling should conform to that used in the Concise Oxford Dictionary published by Oxford University Press. Abbreviations of chemical and other names should be defined when first mentioned in the text unless they are commonly used and internationally known and accepted.

Scientific names and statistics

Complete scientific names should be given when organisms are first mentioned in the text and in tables, figures and key words. The generic name may subsequently be abbreviated to the initial, e.g. *Gadus morhua* L., otherwise *G. morhua*. Carry out and describe all appropriate statistical analyses.

References

List all sources in the reference list alphabetically by name. In text citations should

follow the author-date method. This means that the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998), and a complete reference should appear in the reference list at the end of the paper. References are styled according to the sixth edition of the Publication Manual of the American Psychological Association.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one. Journal article: Phelps, L. (1996). Discriminative validity of the WRAML with ADHD and LD children. *Psychology in the Schools*, 33, 5-12.

Book edition: Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed. References should refer only to material listed within the text.

References in Articles we recommend the use of a tool such as EndNote (<http://www.endnote.com/>) or Referenc Manage (<http://www.refman.com/>) for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Illustrations and tables

These should be referred to in the text as figures using Arabic numbers, e.g. Fig. 1, Fig. 2, etc., in order of appearance. Three copies of each figure should be submitted and each figure should be marked on the back with its appropriate number, together with the name (s) of the author (s) and the title of the paper. Where there is doubt as to the orientation of an illustration the top should be marked with an arrow.

Photographs and photomicrographs should be unmounted glossy prints and should not be retouched. Labelling should be clearly indicated on an overlay or photocopy. Colour illustrations are acceptable when found necessary by the Editor. Line drawings should be on separate sheets of white paper in black indelible ink (dot matrix illustrations are not permitted); lettering should be on an overlay or photocopy and should be no less than 4 mm high for a 50% reduction. Please note, each figure should have a separate legend; these should be grouped on a separate page at the end of the manuscript.

All symbols and abbreviations should be clearly explained. Tables should be self-explanatory and include only essential data. Each table must be typewritten on a separate sheet and should be numbered consecutively with Arabic numerals, e.g. Table 1, and given a short caption. No vertical rules should be used. Units should appear in parentheses in the column

headings and not in the body of the table. All abbreviations should be defined in a footnote. All tables and figures that are reproduced from a previously published source must be accompanied by a letter of permission from the Publisher or copyright owner.

Supporting Information

Supporting material that is too lengthy for inclusion in the full text of the manuscript, but would nevertheless benefit the reader, can be hosted as online-only content, linked to the online manuscript. The material should not be essential to understanding the conclusions of the paper, but should contain data that is additional or complementary and directly relevant to the article content. Such information might include the study protocols, more detailed methods, extended data sets/data analysis, or additional figures.

The materials considered as supporting data must be uploaded separately as such with the manuscript files during submission. Please indicate clearly the material intended as Supplementary Data upon submission. Also ensure that the Supplementary Data is referred to in the main manuscript. Label these supplementary figures/tables as S1, S2, S3, etc. Full details on how to submit supporting data, can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>. Please note that these data will not be edited or altered from its original format during the Production process. Although a proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published

Acknowledgements

These should be brief and must include references to sources of financial and logistical support.

Page Proofs and Reprints

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: <http://www.adobe.com/prodindex/acrobat/main.html>. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Editor within 3 days of receipt, ideally by fax. Only typographical errors can be corrected at this stage. Major alterations to the text cannot be accepted.

Author Services

NEW: Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Offprints

Offprints of articles may be ordered at the proof stage. The corresponding author will be provided with five free copies of the published issue. Where there are more than two authors, the corresponding author will receive two free copies for distribution to each author. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields. <http://offprint.cosprinters.com/blackwell>. If you have queries about offprints please email offprint@cosprinters.com Early View Aquaculture Nutrition is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in Online issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled Online issue.

Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After Online publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires

grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any author wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available here. Prior to acceptance there is no requirement to inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.