

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Altas concentrações de proteínas em dietas de matrizes
de tilápia-do-nilo e seus efeitos na atividade de enzimas
digestivas durante o desenvolvimento inicial**

Mayara de Moura Pereira

Jaboticabal, São Paulo

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Altas concentrações de proteínas em dietas de matrizes
de tilápia-do-nilo e seus efeitos na atividade de enzimas
digestivas durante o desenvolvimento inicial**

Mayara de Moura Pereira

Orientadora: Dra. Elizabeth Romagosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2015

P436a Pereira, Mayara de Moura
Altas concentrações de proteínas em dietas de matrizes de tilápia-do-Nilo e seus efeitos na atividade de enzimas digestivas durante o desenvolvimento inicial / Mayara de Moura Pereira. – – Jaboticabal, 2016
iii, 52 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2016
Orientadora: Elizabeth Romagosa
Banca examinadora: Maria Célia Portella, Jaqueline Dalbello Biller-Takahashi
Bibliografia

1. Ciclídeo. 2. Embriogênese. 3. Fisiologia digestiva. 4. Reprodução. I. Título. II. Jaboticabal- Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

REITORIA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Altas concentrações de proteínas em dietas de matrizes de tilápia-do-Nilo e seus efeitos na atividade de enzimas digestivas durante o desenvolvimento inicial

AUTORA: MAYARA DE MOURA PEREIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura , Área: AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA

Centro de Pesquisa Em Peixes Ornamentais / Instituto de Pesca de São Paulo

Profa. Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA

Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER TAKAHASHI

UNESP, Campus de Dracena, Dracena-SP

Data da realização: 16 de dezembro de 2015.

Sumário

Dedicatória	1
Agradecimentos	2
1. Resumo	3
2. Abstract	4
3. Introdução	5
3.1 Aquicultura e tilápia-do-nilo, Oreochromis niloticus	5
3.2 Nutrição aliada à reprodução	6
3.3 Enzimas digestivas	7
4. Objetivo	9
5. Referências bibliográficas.....	10
6. A 1.....	13
Anexo 1	29
Anexo 2	30
Anexo 3	31

Dedicatória

Dedico à minha avó *Iracema* que está no céu e com toda certeza

está olhando por mim e guiando meus passos

**Lute com determinação, abrace a vida com
paixão, perca com classe e vença com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve e a
vida é muito bela para ser insignificante**

(Charles Chaplin)

Agradecimentos

A Deus por me conceder a vida, por sempre me guiar em minhas decisões e por estar olhando por mim em todas as horas.

À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela oportunidade de estudo me concedendo as bolsas de pesquisa no país no exterior (Processo 2013/22570-3 e BEPE – Processo 2014/15194-8)

À minha orientadora, Dra. Elizabeth Romagosa, que desde o início confiou em mim e sempre esteve à disposição para me ajudar no que fosse necessário, a ela todo meu respeito e gratidão.

À UNESP- Caunesp pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Dr. Fábio Sussel por ter aberto as portas da APTA-UPD, Pirassununga, SP, para a realização do meu experimento.

Aos amigos que conquistei em Pirassununga, levarei todos comigo sempre e sou eternamente grata aos ótimos momentos que passamos e toda ajuda ofertada, Ednara, Mariana, Thais, Guilherme, Manoel, Eliana, Raissa, muito obrigada.

Aos meus pais, Daisy Moura e Paulo Pereira e ao meu irmão, Pedro Moura, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem nas decisões tomadas, me ensinando a lutar pelos meus sonhos. Eu amo vocês e a minha gratidão não conseguiria expressar com palavras.

A minha família que nunca deixou de me apoiar, em especial minha madrinha Gláucia, meu tio Luiz e minha prima Lia.

Ao meu namorado Francisco que está ao meu lado desde a fase final do mestrado me dando apoio e sempre com muita paciência. Obrigada por tudo.

Ao Dr. Enric Gisbert Casas e a Marta Sastre IRTA, Espanha, que me receberam no instituto e colaboraram com minha pesquisa e ensinamentos.

Aos meus amigos, que estão ao meu lado em momentos bons e ruins, mesmo a longas distâncias. Eles permitem superar qualquer obstáculo ou dificuldade que exista. Larissa Carrion, Tonny Takigawa, Natália Trevizan, Mariana Trevizan, Mariana Nagata, Francisco Kodel, Daniel Watanabe, André Nagatani, Rafael Ono, Eduardo Cação, Ana Carolina Pinto, Lidiane Sandre, Lucas Rebeschini, Stefanie Reith, Marcos Sudano e Amanda Affonso, eu amo vocês e obrigada sempre.

1. Resumo

O presente estudo avaliou a atividade de enzimas gástrica (pepsina), intestinal (aminopeptidase e fosfatase alcalina) e pancreas (tripsina, amilase, lipase, protease) no desenvolvimento embrionário e larval de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* obtido a partir de reprodutores alimentados com dietas contendo quatro níveis de proteína bruta. O experimento foi realizado no período de janeiro a junho/2014, utilizando 144 fêmeas e 48 machos (3: 1) distribuídas em 16 hapas (12 peixes/hapa). Foram utilizados quatro tratamentos, composto pelos seguintes níveis de proteína bruta (PB): 32, 38, 44 e 50%, com quatro repetições. Os ovos foram pesados (mg), quantificados, mantidos em incubadoras (2,0 L), e separadas de acordo com o tratamento. Vinte e quatro (24) amostras (300,0 mg) por tratamento e quatro (4) amostras por estágio de desenvolvimento embrionário e larval [clivagem S0-, S1- blastula, S2- gastrula, S3- eclosão, S4- sete dias após o nascimento e S5- 10 dias após o nascimento] foram recolhidos, mantidos em tubos criogênicos e colocados em azoto líquido (-196.0°C) até ao momento em que as enzimas digestivas foram analisadas. Não houve diferenças entre os valores ($P > 0,05$) de pepsina, aminopeptidase, tripsina e amilase. No entanto, observaram-se valores diferentes ($P < 0,05$) para a fosfatase alcalina (7 dias pós-nascimento), da lipase (blastula) e protease (blastula e incubação) no que diz respeito aos quatro tratamentos. Os resultados mostraram que dietas com níveis de proteína bruta oferecida a reprodutores de tilápia do Nilo influenciaram a atividade de enzimas digestivas durante períodos embrionário e larval, enfatizando que os nutrientes ingeridos pela mãe foram transferidos para a prole. Assim, mais estudos sobre dietas de reprodutores devem ser conduzidos a fim de fornecer informações adicionais, não só no que diz respeito aos níveis de proteína, mas também de energia, vitaminas e minerais, bem como, a interação entre eles e a utilização desses como biomarcadores fisiológicos para uma piscicultura bem sucedida.

Palavra-chave: ciclídeo, embriogênese, fisiologia digestiva, reprodução

2. Abstract

The present study assessed the activity of gastric (pepsin), intestinal (aminopeptidase and alkaline phosphatase) and pancreatic (trypsin, amylase, lipase, protease) enzymes on the embryonic and larval development of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, obtained from broodstock fed diets with four levels of crude protein. The experiment was carried out from January to June/2014, using 144 females and 48 males (3:1) distributed in 16 hapas (12 fish/hapa). Four treatments were used, composed of the following levels of crude protein (CP): 32, 38, 44 and 50 %, with four replications. The eggs were weighed (*mg*), quantified, kept in hatcheries (2.0 L), and separated according to treatment. Twenty-four (24) samples (300.0 mg) per treatment and four (4) samples per stage of embryonic and larval development [S0- cleavage, S1- blastula, S2- gastrula, S3- hatching, S4- 7 days posthatch and S5- 10 days posthatch] were collected, kept in cryogenic tubes and placed in liquid nitrogen (-196.0°C) until the moment the digestive enzymes were analyzed. There were no differences between the values ($P>0.05$) of pepsin, aminopeptidase, trypsin, and amylase. However, different values were observed ($P<0.05$) for alkaline phosphatase (7 days posthatch), lipase (blastula), and protease (blastula and hatching) with regard to the four treatments. The results showed that diets with levels of crude protein offered to Nile tilapia broodstock influenced the activity of digestive enzymes during embryonic and larval periods, emphasizing that the nutrients ingested by the broodfish were transferred to the progeny. Thus, more studies on diets of broodstock should be conducted in order to provide additional information, not only with regard to levels of protein, but also energy, vitamins and minerals, as well as the interaction between them, and the use of physiological biomarkers for a successful fish farming.

Keywords: cichlids, embryogenesis, digestive physiology, reproduction

3. Introdução

3.1 Aquicultura e tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*

A produção de pescado mundial tem crescido constantemente nas últimas cinco décadas, com uma taxa média anual de 3,2 %, alcançando 158 milhões de toneladas em 2012, na qual 136,2 milhões de toneladas (69,9 milhões de toneladas da pesca e 66,6 milhões de toneladas da aquicultura) foram destinados ao consumo humano. Dos peixes comestíveis cultivados em 2012, 92 % são oriundos de 12 países produtores, destacando-se a China (41 milhões de toneladas) e a Índia (4,2 milhões de toneladas). O Brasil se encontra classificado mundialmente na 12ª posição do ranking com 1,1 % (707.462 mil toneladas), representando 611.343 toneladas de peixes, 74.415 toneladas crustáceos, 20.699 toneladas moluscos e 1.005 toneladas de outras espécies (FAO, 2014), sendo que em 2013 a produção de pescado foi de 1.241.807 toneladas (765.287 mil toneladas da pesca e 476.512 mil toneladas da aquicultura), tornando-se o país que mais cresceu no mercado nacional de carnes no período (MPA/IBGE, 2013). Baseado nesses dados, nota-se que esse desenvolvimento deve continuar até 2030 estimando que a aquicultura será responsável por mais de 60 % da produção mundial de pescado para consumo humano (MPA, 2015).

Esse desenvolvimento em curto prazo deve-se ao Brasil se destacar como um país com capacidade para expansão da aquicultura, apresentando potencial hídrico, diversidades de espécies, microclimas e áreas adequadas ao desenvolvimento da atividade, além de apresentar condições favoráveis para o mercado consumidor interno e externo (Borghetti et al., 2003). As maiores produtividades aquícolas estão nas regiões nordeste e sul e dentre as espécies mais cultivadas, destaca-se a tilápia-do-nilo.

As tilápias dos gêneros *Oreochromis*, são nativas da África, Israel e Jordânia (Hempel, 2002) e constitui o segundo grupo de peixes de maior importância em termos de produtividade na aquicultura mundial, precedido pelos ciprinídeos (Atwood et al., 2003). Sua produção concentra-se em países que apresentam climas tropical e subtropical (Ramos et al., 2003). Com isso, o destaque desta espécie na piscicultura é notado a presença de inúmeras características zootécnicas favoráveis como rusticidade, crescimento rápido, boa adaptação a alimentos artificiais, conversão alimentar e ganho em peso, além de apresentar saborosa carne branco com excepcional aceitação no mercado consumidor e principalmente devido à ausência de espinhos (Cyrino & Conte, 2006).

O progresso da tilapicultura tem induzido a intensificação dos cultivos, provocado principalmente pela maior demanda desse alimento no mercado. Com isso, as tilápias tailandesas que foram introduzidas no Brasil, em 1996, vem sofrendo processo de melhoramento genético, afim de selecionar características que favoreçam a produção. Segundo Zimmerman (2003), o programa de melhoramento

genético, o Genetic Improved Farmed tilápia (GIFT) envolveu quatro linhagens silvestres e quatro linhagens confinadas e, estudos realizados em Bangladesh comparando o crescimento da linhagem GIFT com as linhagens não selecionadas, constataram que o ganho médio de peso foi de 40 a 57 % superior para a linhagem GIFT (Kubtiza et al, 2006).

3.2 Nutrição aliada à reprodução

Segundo Carter e Houlihan (2001) a nutrição de peixes é um ramo da fisiologia que se destina ao estabelecimento da relação entre ração e crescimento, à comparação entre possíveis ingredientes alimentares e à determinação das exigências nutricionais das espécies. Além disso, tem-se dado bastante atenção à avaliação do significado das respostas obtidas, pois a nutrição fornece matérias primas para a manutenção da vida. A dieta ofertada aos animais deve conter os nutrientes e recursos energéticos essenciais ao crescimento, reprodução e saúde e, seu valor nutricional é avaliado, em primeira instância, pela presença dos elementos necessários e catalíticos (minerais e vitaminas), suprimento em alimentos auxiliares (água) e balanço adequado entre alimentos energéticos e construtores (proteínas, carboidratos e lipídeos).

Aliada a nutrição é sabido que a reprodução é o processo biológico importante dos organismos, já que dela depende a sobrevivência e perpetuação das espécies, por isso, a possibilidade e controlar o ciclo reprodutivo dos organismos submetidos a condições de confinamento é um dos fatores de maior importância para assegurar o êxito da piscicultura (Romagosa et al., 2003). Além disso, sabe-se que a interrelação entre a nutrição e a reprodução é um ponto complexo, uma vez que, segundo Takeuchi et al. (1981) estudando *Oncorhynchus mykiss* mostraram os efeitos positivos e negativos nas desovas em função da dieta ofertada aos reprodutores.

A nutrição por sua vez pode influenciar diretamente a reprodução por meio de nutrientes específicos necessários para os processos do desenvolvimento dos folículos ovarianos, ovulação, maturação oocitária, fertilização, sobrevivência embrionária e, indiretamente, nas concentrações circulantes de hormônios e outros metabólitos sensíveis aos nutrientes que são requeridos para o êxito destes processos (Robinson et al, 2006). Esses fatos estão de acordo com Bromage et al. (1998) que evidenciaram o conhecimento nutricional como requisito para reprodutores, pois afeta significativamente as taxas de fecundidade, sobrevivência, tamanho dos ovos e larvas.

Em estudo realizado por Gunasekera et al. (1996) avaliando os três níveis de proteína bruta (10, 20 e 35 % PB) em *Oreochromis niloticus* constaram que os níveis de proteína influenciam o intervalo de desovas e a taxa de fecundidade, porém, essa significância só pode ser observada após longo período

de alimentação. Da mesma forma, De Silva & Radampola (1990) mostraram que com o aumento do nível de proteína bruta (20 a 35 %) na dieta de tilápia-do-nylo houve redução no número de desovas.

Os nutrientes ofertados aos reprodutores de peixes sofrem degradação até serem absorvidos por meio de rotas metabólicas pela digestão. Logo, trata-se de um conjunto de processos físicos (pulsionamento e esmagamento do alimento), químicos (secretam substâncias como ácido clorídrico no estômago) e enzimáticos que hidrolisam as proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, envolvendo um grande número de enzimas, as quais disponibilizam menores partículas para melhor aproveitamento da célula (Halver & Hardy, 2002).

3.3 Enzimas digestivas

Enzimas compõem uma classe de moléculas sintetizadas pelas células capazes de realizar bio-transformações nos organismos vivos. Além disso, são responsáveis pelas reações bioquímicas que propiciam o crescimento e desenvolvimento da célula (Law, 2002). As mesmas possuem poder catalítico, alto grau de especificidade com substratos, aceleram as reações químicas eficientemente e agem em soluções aquosas em condições adequadas de temperatura e pH, possibilitando que essas bio-transformações ocorram (Nelson & Cox, 2002). Essas ainda refletem as características do sistema digestório dos peixes, e influenciam a capacidade de digerir e absorver o alimento e o meio que a energia é adquirida através dos nutrientes (Gao et al., 2006). Durante a abundância de alimentos, os peixes utilizam enzimas digestivas de forma eficiente para nutrição e obtenção de energia no trato gastrointestinal (Lemieux et al., 1999). A digestão em conjunto com a absorção é um processo chave no metabolismo dos peixes, sendo que determina a disponibilidade de nutrientes necessários para as funções biológicas.

Nas fases iniciais do desenvolvimento a digestão de proteínas baseia-se, principalmente, na presença de proteases, sendo as principais: pepsina e tripsina, ambas proteases de serina, com posição chave nesse processo. As proteases são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases, catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, sendo a pepsina, tripsina e a quimiotripsina, as três enzimas proteolíticas de relevância no trato gastrintestinal dos peixes (Hsu & Wu, 1979). A digestão de proteínas é iniciada pela ação da pepsina, a qual é responsável pela hidrólise inicial e parcial de proteínas no estômago.

No início do processo de digestão de proteínas no estômago de peixes, a pepsina se encontra em sua forma inativa, pepsinogênio sendo esse ativado apenas na presença de alimento por meio do HCl, mantendo o pH ácido. Em seguida, o alimento segue para o intestino delgado entrando em contato com o bicarbonato de sódio, provindo do pâncreas, regulando o pH (Nelson & Cox, 2002).

No intestino o processo de digestão da proteína é finalizado através de enzimas peptídicas, sendo a principal enzima a tripsina (Sabapathy & Teo, 1993), encontrada no pâncreas na forma inativa como

tripsinogênio, o qual é ativado em tripsina no intestino delgado pela ação da enteroquinase (enzima intestinal que realiza quebra de ligações peptídicas) (Nelson & Cox, 2002). Além disso, a tripsina é a única protease que pode ativar a sua própria forma de precursor, bem como, as de outras proteases pancreáticas, uma vez que ativa o quimiotripsinogênio (pâncreas) em quimiotripsina (intestino) e propeptidases (intestinal) em peptidase (intestino) (Cooring, 1980). Deste modo, a tripsina possui posição chave no controle da atividade de proteases, sendo considerado um indicador nutricional (Baldisseroto et al., 2014). Isso pode ser confirmado por meio de estudos realizados por Tong et al. (2013) que notaram atividade da pepsina nas fases de segmentação, porém dissipou-se na fase de eclosão, deste modo, confirmando a degradação alcalina de proteínas para as larvas dessa espécie.

A digestão de carboidratos (polissacarídeos) é realizada por um conjunto de enzimas, como a maltase, lactase, porém, a principal delas é α -amilase, presente no suco pancreático que atua no início do intestino, a qual quebra as ligações glicosídicas α -1,4, resultando em uma variedade de oligossacarídeos. A amilase é considerada a principal amilohidrolase pela ampla presença e distribuição entre os organismos, encontrada em todos os peixes, até mesmo em carnívoros marinhos que naturalmente nunca se alimentam de amido. Esta enzima, α -1,4-glicosidase, hidrolisa ligações glicosil- α -1,4-glicose em fragmentos de maltose, maltotriose, glicose, dextrinas, amilopectina, fragmentos ramificados de amilose ou de glicogênio (GUILLAUME, 2001).

Em estudo realizado com turbot, *Scophthalmus maximus* não foi constatada a atividade de amilase durante o desenvolvimento embrionário, mostrando que o carboidrato é menos essencial como fonte de energia nessa fase. Entretanto, em relação à atividade das enzimas tripsina e alcalina fosfatase na qual se verificou uma baixa atividade nas fases de blástula e gástrula, porém em seguida verificou-se um aumento dessas atividades da fase de gástrula até eclosão indicando a demanda de energia necessária durante esse período (Tong et al., 2013).

A digestão de lipídeos ocorre no intestino delgado por meio da ação das lipases pancreáticas, que possuem a função de romperem as ligações triacilgliceróis transformando-os em ácidos graxos livres e glicerol, os quais são absorvidos e utilizados em processos biossintéticos ou catabolizados para obtenção de energia (Nelson & Cox, 2014). O processo de digestão de lipídeos no início é facilitado pelo auxílio da bile, que tem como função a emulsificação de gordura, essa por sua vez age no alimento na parte inicial do intestino quebrando o lipídeo em partículas menores (emulsificando) e e por consequência aumenta a superfície de contato para melhorar ação das lipases pancreáticas.

Além das principais enzimas digestivas, existem as enzimas acessórias, que ajudam no processo digestório em geral, como as fosfatases alcalinas e as aminopeptidases. Ambas são enzimas que atuam principalmente na raiz e comunicação das células epiteliais na porção anterior do intestino e

promove a absorção de nutrientes. A atividade da fosfatase alcalina está envolvida na absorção e transporte de lipídeos e carboidratos (Fraisse, 1981) e a aminopeptidase são exopeptidases que age na extremidade amina de peptídeos de baixo peso molecular que são formados por endopeptidases (Guillaume et al., 2001).

De acordo com Gisbert et al. (2009), em *Dentex dentex* ressaltaram que a presença da atividade de tripsina em larvas recém-eclodidas foi superior a atividade da amilase e lipase, indicando a importância desta enzima no decorrer da embriogênese até o momento da eclosão. Porém, pós-eclosão, a atividade da tripsina diminuiu drasticamente e a amilase o oposto, provavelmente o observado esteja associado as alterações no catabolismo das reservas do vitelo durante este período, sendo o mesmo descrito para *Gadus morhua* (Sveinsdótti et al., 2006) e em *Pseudosciaena crocea* (Ma et al., 2005). Gisbert et al. (2009) também constataram o aumento da atividade da pepsina no momento em que houve a diminuição das enzimas pancreáticas alcalinas aos 50 dias pós-eclosão (tripsina), indicando uma mudança fisiológica do animal, principalmente no desenvolvimento do estômago e das vilosidades do intestino.

Galaviz et al. (2011), estudando *Atractoscion nobilis*, constataram que a tripsina foi detectada pela primeira vez na incubação e o aumento nos 3-4º dias pós-eclosão, corroborando com as observações descritas para *Pagrus pagrus* (Suzer et al., 2007) e *Seriola lalandi* (Chen et al., 2006) concluíram que antes da absorção do vitelo a maioria da tripsina é enzimaticamente inativa (tripsinogênio) e só se tornará ativa após a abertura da boca (Alvarez-Gonzales et al., 2006). Os autores afirmam que a pepsina foi detectada 10 dias pós-eclosão, sendo o primeiro aumento visto em 20 dias, quatro dias após o aparecimento da primeira glândula gástrica, o que em alguns casos, sugere um estômago funcional precoce e, em relação, à amilase foi observado um máximo de atividade 16 dias pós-eclosão.

Logo, o desenvolvimento ontogenético de enzimas digestivas reflete a evolução funcional do trato digestivo e a capacidade de enzimas digestivas do organismo e, conseqüentemente, tem sido usado como biomarcadores fisiológicos para avaliar o estado nutricional de peixes nas fases iniciais de vida (Pradhan et al., 2013).

4. Objetivo

Avaliar dietas com níveis de proteína bruta (32; 38; 44; 50 % PB) ofertadas para matrizes de tilápia-do-nilo e seus efeitos na atividade de enzimas digestivas (pepsina, aminopeptidase, fosfatase alcalina, tripsina, lipase, amilase e protease) nas fases embrionárias e larvais.

5. Referências bibliográficas

- ALVAREZ-GONZÁLEZ, C.A.; CERVANTES-TRUJANO, M.; TOVAR-RAMÍREZ, D. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. **Fish Physiology Biochemistry** 31: 83-93, 2006.
- ATWOOD, H. L. et al. Low temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of environmental and dietary factors. **Aquaculture Research** v.34, n.3, p. 241-251, 2003.
- BALDISSEROTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C. Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: Funep, 2014.
- BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo integrado de Aquicultura e Estudos ambientais, 2003.
- BROMAGE, N. Broodstock management and the optimisation of seed supplies. *Suisan Zoshoku* 46, 395– 401, 1998.
- CARTER, C.G.; HOULIHAN, D.F. Protein Synthesis. In: Wright, P., Anderson, P. (Ed.). Nitrogen excretion, **San Diego: Academic Press**, p. 31-75, 2001.
- CHEN, B.N.; QIN, J.G.; KUMAR, S.M.; HUTCHINSON, W.G.; CLARKE, S.M. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. **Aquaculture** 260, 264–271, 2006.
- COORING, T. The adaptation of digestive enzymes to the diet: its physiological significance. **Reproduction Nutrition Dev.** 20, 1217–1235, 1980.
- CYRINO, J.E.; CONTE, L.; Tilapicultura em gaiolas: produção e economia. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (Ed.). **AquaCiência 2004: tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, cap.12, p.151-17, 2006.
- DE SILVA, S.S., RADAMPOLA, K. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of *Oreochromis niloticus*. In: Hirano, R., Hanyu, I. (Eds.), 2nd Asian Fish. Forum, **Asian Fish. Society**, Manila, Philippines, pp. 559– 563, 1990.
- FRAISSE, M.; WOO, N.Y.S.; NOAILLAC-DEPEYRE, J.; MURAT, J.C. Distribution pattern of digestive enzyme activities in the intestine of the catfish (*Ameiurus nebulosus* L.) and of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 70:443-446, 1981.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2014.

GALAVIZ, M. A.; GASCA, A.G.; DRAWBRIDGE, M.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C.A.; LÓPEZ, L.M. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. **Aquaculture**, p.162-168, 2011.

GAO, M.; LUO, Y.P.; CAO, Z.D. Effect of dietary carbohydrate on digestive enzyme activities in southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) juveniles. **Journal of Southwest China Normal University** (Nat. Sci.) 31, 119–123, 2006.

GISBERT, E.; GIMENEZ, G.; FERNANDEZ, I.; KOTZAMANIS, Y.; ESTEVEZ, A. Development of digestive enzymes in common dentex, *Dentex dentex* during early ontogeny. **Aquaculture** 287, 381–387, 2009.

GUILLAUME, J.; KAUSHIK, S.; BERGOT, P. METAILLER, R. Nutrition and Feeding of fish and Crustaceans. **Chichester UK: Springer Praxis Publishing**, p. 408, 2001.

GUNASEKERA, R.M.; SHIM, K.F.; LAM, T.J. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture** 146, 121-134, 1996.

HALVER, J.E.; HARDY, R.W. Nutrient flow and retention. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Ed.). *Fish Nutrition*: Academic Press, p. 755-770, 2002.

HEMPEL, E. Tilapia, the new whitefish. **Seafood International**, v.17, n.10, p.16-20, 2002.

HSU, Y.L.; WU, J.L. The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. **Bull. Inst. Zool.**, v. 18, p. 45-53, 1979.

KUBITZA, F. Sistemas de recirculação: Sistemas fechados com tratamento e reuso da água. **Panorama da Aquicultura**. V.16: 95, p. 15-22, 2006.

LAW, B. A. The nature of enzymes and their action in foods. **Enzymes in food technology** 1-18, 2002.
LEMIEUX, H.; BLIER, P.; DUTIL, J.D. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Fish Physiology Biochemistry** v. 20, 293–303, 1999.

MA, H., CAHU, C., ZAMBONINO, J., YU, H., DUAN, Q., LE GALL, M.M., MAI, K. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. **Aquaculture** v. 245, 239–248, 2005.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura** – Brasil 2013.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura** – Brasil 2015.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 6ª edição. New York: Artmed, p. 1298, 2014.

PRADHAN, P.K.; JENA, J.; MITRA, G.; SOAD, N.; GISBERT, E. Ontogeny of the digestive enzymes in butter catfish *Ompokbi maculatus* (Bloch) larvae. **Aquaculture** 372-375, 62 – 69, 2013.

RAMOS, R. C. et al. An investigation of sex determination in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, using synaptonemal complex analysis, FISH, sex reversal and gynogenesis. **Aquaculture** v.221, p.125-140, 2003.

ROBINSON, J.J., ASHWORTH, C.J., ROOKE, J.A., MITCHELL, L.M. & MCEVOY, T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology** 126, 259–76, 2006.

ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H.M.; TALMELLI, E.F.A. Características morfológicas e crescimento do cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* em cativeiro. **Acta Scientiarum** 2: 277-283, 2003.

SABAPATHY, U. Bull. Inst. Zoo TEO, L.H. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganess canaliculatus* and the seabass, *Lates calcarifer*. **Journal of Fish Biology**, v. 42, n. 4, p. 585-602, 1993.

SUZER, C.; KAMACI, H.O.; ÇOBAN, D.; SAKA, Ş.; FIRAT, K.; OZKARA, B.; OZKARA, A. Digestive enzyme activity of the red porgy (*Pagrus pagrus*, L.) during larval development under culture conditions. **Aquaculture Research** 38, 1178–1785, 2007.

SVEINSDÓTTIR, S., THORARENSEN, H., GUDMUNSDÓTTIR, A. Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in Atlantic cod (*Gadus morhua*) embryogenesis. **Aquaculture** v. 260, p. 307–314, 2006.

TAKEUCHI, T.; WATANABE, T.; OGINO, C.; SATIO, M.; NISHIMURA, K.; NOSE, T. Effects of low protein-high calory diets and deletion of trace elements from a fishmeal diet on reproduction of rainbow trout. Bull. **Jpn. Sot. Sci. Fish**, 47: 645-654, 1981

TONG, X. H.; XU, S. H.; LIU et al. Stages of embryonic development and changes in enzyme activities in embryogenesis of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture International** p.129-142, 2013.

ZIMMERMANN, S. Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 76, p. 69, mar./abr, 2003.

1 **6. Artigo 1** – O artigo será enviado a revista Aquaculture para publicação, no qual as normas dessa
 2 revista estão presentes ao final do mesmo.

3
 4 **INFLUENCE OF HIGH-PROTEIN DIETS ON DIGESTIVE ENZYMES OF NILE TILAPIA**
 5 **EGGS AND LARVAE**

6
 7 **ABSTRACT**

8 The present study assessed the activity of gastric (pepsin), intestinal (aminopeptidase and
 9 alkaline phosphatase) and pancreatic (trypsin, amylase, lipase, protease) enzymes on the embryonic and
 10 larval development of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, obtained from broodstock fed diets with four
 11 levels of crude protein. The experiment was carried out from January to June/2014, using 144 females
 12 and 48 males (3:1) distributed in 16 hapas (12 fish/hapa). Four treatments were used, composed of the
 13 following levels of crude protein (CP): 32, 38, 44 and 50 %, with four replications. The eggs were
 14 weighed (mg), quantified, kept in hatcheries (2.0 L), and separated according to treatment. Twenty-four
 15 (24) samples (300.0 mg) per treatment and four (4) samples per stage of embryonic and larval
 16 development [S0- cleavage, S1- blastula, S2- gastrula, S3- hatching, S4- 7 days posthatch and S5- 10
 17 days posthatch] were collected, kept in cryogenic tubes and placed in liquid nitrogen (-196.0°C) until
 18 the moment the digestive enzymes were analyzed. There were no differences between the values ($P>0.05$)
 19 of pepsin, aminopeptidase, trypsin, and amylase. However, different values were observed ($P<0.05$) for
 20 alkaline phosphatase (7 days posthatch), lipase (blastula), and protease (blastula and hatching) with
 21 regard to the four treatments. The results showed that diets with levels of crude protein offered to Nile
 22 tilapia broodstock influenced the activity of digestive enzymes during embryonic and larval
 23 periods, emphasizing that the nutrients ingested by the broodfish were transferred to the progeny. Thus,
 24 more studies on diets of broodstock should be conducted in order to provide additional information, not
 25 only with regard to levels of protein, but also energy, vitamins and minerals, as well as the interaction
 26 between them, and the use of physiological biomarkers for a successful fish farming.

27
 28
 29 **Keywords:** cichlids, embryogenesis, digestive physiology, reproduction
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38

39 Introduction

40 At the adult stage, special attention should be given to the diet during the reproductive period,
41 since the nutrition of broodfish may affect the quality of gametes, as well as the survival and perpetua-
42 tion of the larvae (Izquierdo et al., 2001). Those nutrients are absorbed after the activity of digestive
43 enzymes (Gisbert et al., 2009), which varies according to their catalytic role (Baldisseroto et al., 2014).

44 In general, digestive enzymes reflect the characteristics of the digestive system of the fish and
45 directly influence the capacity to digest and absorb the food (Gao et al., 2006), depending
46 on the amount, specificity and adequate conditions (pH and temperature) for the reaction of those en-
47 zymes (Kuz'mina, 1996). Thus, those enzymes are used to evaluate the nutritional state at any stage of
48 embryonic (Tong et al., 2013), larval (Pradhan et al., 2013) and juvenile (Asgari et al., 2013) develop-
49 ment of the fish.

50 Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* is one of the most commonly cultured fish species in Brazil.
51 Due to the growth of this species, fish farming has been intensified, creating the need for new rearing
52 techniques that could make the process more efficient and viable (EMBRAPA, 2013). In this context, it
53 is known that fish feeding is fundamental, and is responsible for more than 60 % of the total cost of fish
54 farming (Teixeira et al., 2008). Therefore, diets have to be more efficient, with lower cost and low envi-
55 ronmental impact, and should be developed in order to meet the requirements of the fish at different
56 stages of development (larvae, fry, juvenile and adult).

57 In view of that, the present study assessed the activity of gastric (pepsin), intestinal (aminopep-
58 tidase and alkaline phosphatase) and pancreatic (trypsin, amylase, lipase, protease) enzymes during the
59 process of embryonic (cleavage, blastula, gastrula and hatching) and larval (7 and 10 days posthatch)
60 development of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* obtained from broodfish fed diets with four levels of
61 crude protein (32; 38; 44; 50 % CP).

62

63 Material and Methods

64 Place and equipment

65 The experiment was carried out at the *Agência Paulista de Tecnologia dos*
66 *Agronegócios* (APTA) – Research and Development Unit (UPD) in the town of Pirassununga, São
67 Paulo, Brazil (21°55'37,4''S 47°22'10'' O), from January to June 2014. The Nile tilapia broodstock
68 GIFT strain Aqua America® 1 had been bought from *Peixe Vivo*® Fish farm, located in Santa Fé do Sul
69 – São Paulo/Brazil. During the experiment, 144 females and 48 males (350.5 ± 55.0 g) were used, placed
70 in 16 hapas (1.5 x 3.0 x 1.0 m³) installed in two masonry ponds with earthen bottom (200.0 m²) at a
71 stocking density of 12 fish per hapa, and a proportion of 3:1 (three males for each female). The fish were

72 electronically identified, weighed (mg) and measured (cm) (Attachment 1). During the mating period (7
73 days), males and females were kept in the hapas for reproduction. After that, the fish were separated for
74 the resting period (15 days).

75

76 **Diets and experimental design**

77 The experimental design was completely randomized with four treatments: 32, 38, 44 and 50 %
78 Crude Protein (CP), and four replications. The diets were processed at the Fishery Institute, APTA, in
79 São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. The raw material was weighed, homogenized, ground (0.7
80 mm), extruded in 4.0 mm pellets (Ferraz E-62[®] extruder) and dried in a forced ventilation oven at 55.0 °C
81 for 24 hours (Tables 1 and 2). The period of adaptation of the broodfish to the diet lasted 30 days prior
82 to the beginning of sampling (December 2013). The feed was offered twice a day (9:00am and 4:00pm),
83 at a proportion of 1 %/fish weight/day during the experimental period.

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

Table 1
Ingredients of the experimental feed offered to the Nile tilapia broodfish during the experiment.

Ingredientes (%)	Diets (% PB)			
	32%	38%	44%	50%
Feather meal	1,00	1,50	2,50	2,80
Viscera meal	11,00	12,00	15,00	16,50
Soy protein concentrate	20,00	24,00	29,00	32,50
Corn Gluten Meal	2,00	3,00	4,50	5,52
Wheat meal	8,77	8,20	4,58	3,20
Wheat flour	0,00	1,00	4,00	5,00
Macrogard ¹	0,03	0,03	0,03	0,03
Active MOS ²	0,50	0,50	0,50	0,50
Broken rice	34,75	27,06	18,45	11,50
Meat and Bone Meal	2,06	4,00	0,68	0,00
Fish meal	10,00	12,00	13,50	15,00
Blood Meal	1,50	2,00	3,50	4,00
Salt	0,30	0,30	0,30	0,30
Dicalcium phosphate	1,50	0,89	0,82	0,57
Fish oil	4,00	1,00	0,47	0,00
Vitamin C monophosphate	0,48	0,17	0,17	0,17
Choline Chloride	0,20	0,20	0,20	0,20
L-Lysine	0,10	0,20	0,20	0,19
L-Threonine	0,12	0,20	0,06	0,23
Taurine	0,10	0,10	0,10	0,10
DL-Methionine	0,24	0,40	0,19	0,44
Antioxidant ³	0,10	0,10	0,10	0,10
Mycotoxin adsorbent	0,20	0,20	0,20	0,20
Fungistatic ⁴	0,30	0,20	0,20	0,20
Orego-Stim ⁵	0,05	0,05	0,05	0,05
Vit. and Min. Supplement ⁶	0,70	0,70	0,70	0,70
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

¹β- Glucan (Biorigin®), ²Mannan oligosaccharide (Biorigin®), ³Oxynyl Dry, ⁴Fylax, ⁵Essential oils (Meriden Animal Health®), ⁶Vitamin and Mineral Supplement (In Vivo®) – levels of guarantee per kg of the product: Vitamin A=12,000.00 IU/kg; Vitamin D3= 3,000.00 IU/kg; Vitamin E = 150.0 mg; Vitamin K3 = 15.00 mg; Vitamin B1 = 20.00 mg; Vitamin B2 = 20.00 mg; Vitamin B6 = 17.50 mg; Vitamin B12 = 40.00 mcg; Vitamin C = 300.00 mg; Nicotinic Acid= 100.00 mg; Pantothenic Acid= 50.00 mg; Biotin = 1.00 mg; Folic Acid= 6.00 mg; Antioxidant = 25.00 mg; Copper Sulphate= 17.50 mg; Iron Sulphate = 100.00 mg; Manganese Sulphate= 50.00 mg; Zinc Sulphate= 120.00 mg; Calcium Iodide= 0.80 mg; Sodium Sulphate= 0.50 mg; Cobalt Sulphate= 0.40 mg; Inositol = 125.00 mg; Choline = 500.00.

109 Table 2
 110 Centesimal composition of the experimental feed offered to the Nile tilapia broodfish during
 111 the experiment.

Composition (%)	Diet (CP)			
	32%	38%	44%	50%
Humidity	5,65	7,15	6,11	5,26
Crude protein	32,21	38,34	44,61	50,78
Digestible Energy*	3550,61	3454,79	3523,41	3546,36
Digestible Protein*	27,03	32,00	37,08	40,93
Ethereal Extract	7,78	4,00	5,31	4,90
Crude Fiber	2,40	2,57	2,46	2,49
Calcium	2,69	3,13	3,64	3,10
Phosphorus	1,50	1,63	1,96	1,63
Starch	30,00	25,27	20,50	16,00
Arginine	2,10	2,44	2,77	3,00
Lysine	2,00	2,51	2,85	3,20
Methionine+Cysteine*	1,08	1,26	1,26	1,59
Threonine	1,44	1,82	2,09	2,36
Tryptophan	0,34	0,40	0,48	0,52
Methionine	0,86	1,13	1,03	1,41

112 *Calculated value

113
 114

115 Eggs and larvae sampling

116 The eggs were collected from the oral cavity of the female broodfish, and then kept in hatcher-
 117 ies (2.0 L) with water recirculation. The stages of embryonic development (S0- cleavage, S1- blastula,
 118 S2- gastrula, S3- hatching) and larval development (S4- 7 days posthatch and S5- 10 days posthatch,
 119 dph) were identified (Attachment 2) according to Fujimura & Okada (2007), with the aid of a stereomi-
 120 croscope with an integrated digital camera (BEL – 40 X). After hatching (7 and 10 dph), 750 larvae per
 121 treatment were transferred to 12 tanks (50 L) and kept fasting. Eggs and larvae samples (300.0 mg) (24
 122 per treatment and 4 samples per stage of development) were kept in cryogenic tubes and placed in liquid
 123 nitrogen (-196.0 °C) until the gastric (pepsin), pancreatic (trypsin, amylase, lipase, protease) and intesti-
 124 nal (aminopeptidase and alkaline phosphatase) digestive enzymes were analyzed.

125

126 Analysis of enzyme activity

127 The analysis of enzyme activity of the Nile tilapia eggs and larvae was conducted at the Aqua-
 128 culture Centre of the Institute of Research in Agriculture and Food Technology, IRTA, em Sant Carles de La Ràpita,
 129 Tarragona, Spain. In order to determine the activity of gastric (pepsin) and pancreatic (trypsin, amylase,
 130 lipase and protease) enzymes at the three initial stages (cleavage, blastula and gastrula), the samples

131 were homogenized (Ultra-Turrax T25 basic, IKA© - Werke) in 5 volumes of ice-cold milli-Q water (4.0
132 °C), centrifuged at 3300 ^xg for 3 min at 4.0 °C, and then aliquots of supernatant were removed and kept
133 at – 80.0 °C for later quantification (Attachment 3). At the other stages (hatching, 7 and 10 days post-
134 hatch), the gastric (pepsin), pancreatic (trypsin, amylase, lipase and protease) and intestinal (aminopep-
135 tidase and alkaline phosphatase) enzymes were quantified. The samples were homogenized in 50.0 mM
136 mannitol at 4.0 °C, 2.0 mM Tris-HCl buffer and pH 7.0. One mL (1.0 mL) of the supernatant was placed
137 in a microtube and stored at -20.0 °C for gastric and pancreatic enzyme quantification. For the intestinal
138 enzymes, the supernatant was centrifuged twice, 9000 ^xg, 10 min, 4.0 °C and 23929 ^xg, 25 min at 4.0 °C,
139 respectively, for purification of the intestinal brush border membrane (Crane et al., 1979) (Attachment
140 3). The samples were then removed and kept at -80.0 °C for later quantification. Pepsin (E.C.3.4.23.1)
141 was quantified at 37.0 °C using 2 % hemoglobin as substrate in 1N HCl buffer. Pepsin activity (U) was
142 defined as µmol of hemoglobin released per minute at 37.0 °C per mL of eggs and larvae homogenate
143 at 280 nm (Woithington, 1972).

144 Trypsin (E.C.3.4.21.4) was analyzed at 25.0 °C using BAPNA (N- α - benzoyl-dl-arginine p-ni-
145 troanilide) as substrate in 50.0 mM Tris-HCl, 20.0 mM CaCl₂ buffer, with pH 8.2. One unit of trypsin
146 per mL (U) was defined as 1 µmol BAPNA hydrolyzed per min per mL of enzyme extract at 407 nm
147 (Gisbert et al., 2009). Amylase activity (E.C.3.2.1.1) was measured according to Métais & Bieth (1968),
148 using 0.3 % soluble starch dissolved in Na₂HPO₄ buffer pH 7.4 as substrate. Amylase activity (U) was
149 defined as the mg of starch hydrolyzed during 30 min per mL of tissue homogenate at 37.0° C at 580
150 nm. Lipase activity (E.C.3.1.1) was assessed for 30 min at 30.0°C using p- nitrophenyl myristate as
151 substrate, dissolved in 0.25 mM Tris- HCl, 0.25 mM 2- methoxyethanol and 5mM sodium cholate buffer,
152 with pH 9.0. The reaction was interrupted with a solution of acetone: n- heptane (5:2); the homogenate
153 was centrifuged for 2 minutes at 6080^xg, at 4.0°C and read at 405 nm. Lipase activity (U/mL) was de-
154 fined as the µmol of substrate hydrolyzed per minute per mL of enzyme extract (Iijima et al, 1998).
155 Protease activity (E.C.3.4) was quantified at 30.0 °C using 0.5 % azocasein as substrate in Tris – HCl 50
156 mM buffer with pH 8.0. The activity (U) was defined as 1.0 µmol azocasein hydrolyzed at 30.0 °C per
157 minute per mL of homogenate at 366 nm (Hidalgo et al, 1999).

158 Aminopeptidase N (E.C.3.4.11.2) was determined according to Maroux et al (1973) at 25.0 °C,
159 using 80.0 mM sodium phosphate buffer solution, with pH 7.0 and L-leucine p-nitroanilide as substrate
160 in 0.1 mM DMSO. One unit of enzyme activity (U) was defined as 1.0 µg nitroanilide released per
161 minute per mL of brush border homogenate at 410 nm. Alkaline phosphatase (E.C.3.1.3.1) was quanti-
162 fied at 37.0 °C, using 4-nitrophenyl phosphate (PNPP) as substrate in 30.0 mM Na₂CO₃ buffer, with pH
163 9.8. One unit (U) was defined as 1.0 µg PNPP released per minute per mL of brush border homogenate

164 at 407 nm (Bessey et al, 1946). The specific activities were expressed as unit per milligram of protein
 165 (U/mg protein). The soluble protein of the crude extract of eggs and larvae samples was quantified ac-
 166 cording to the Bradford's method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as standard. All the
 167 assays were made in triplicate.

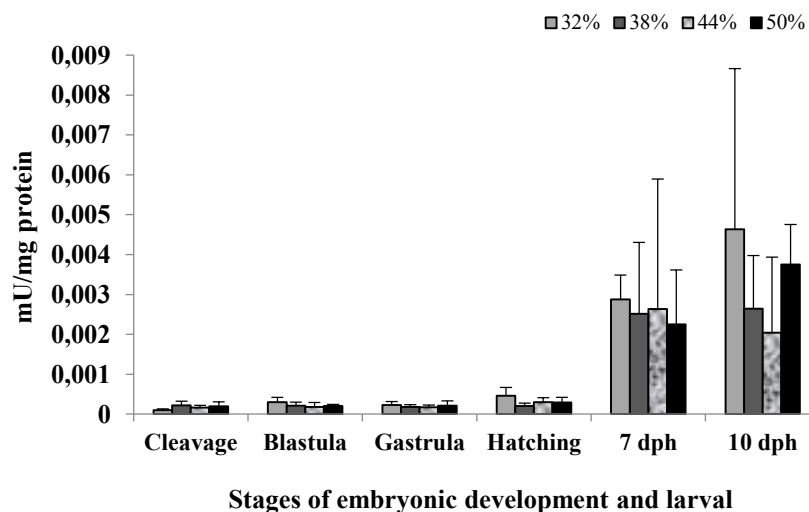
169 **Statistical analysis**

170 The enzyme activity (specific) in the eggs and larvae was compared at the different stages of
 171 embryonic and larval development, in the four treatments, by means of the one-way ANOVA (normally
 172 distributed data, Kolmogorov–Smirnov test), using the software SigmaStat (SPSS, Richmond, USA),
 173 followed by a post hoc Holm–Sidak multiple-comparison test. The level of significance was set at
 174 $P < 0.05$.

176 **Results**

177 **Gastric enzyme**

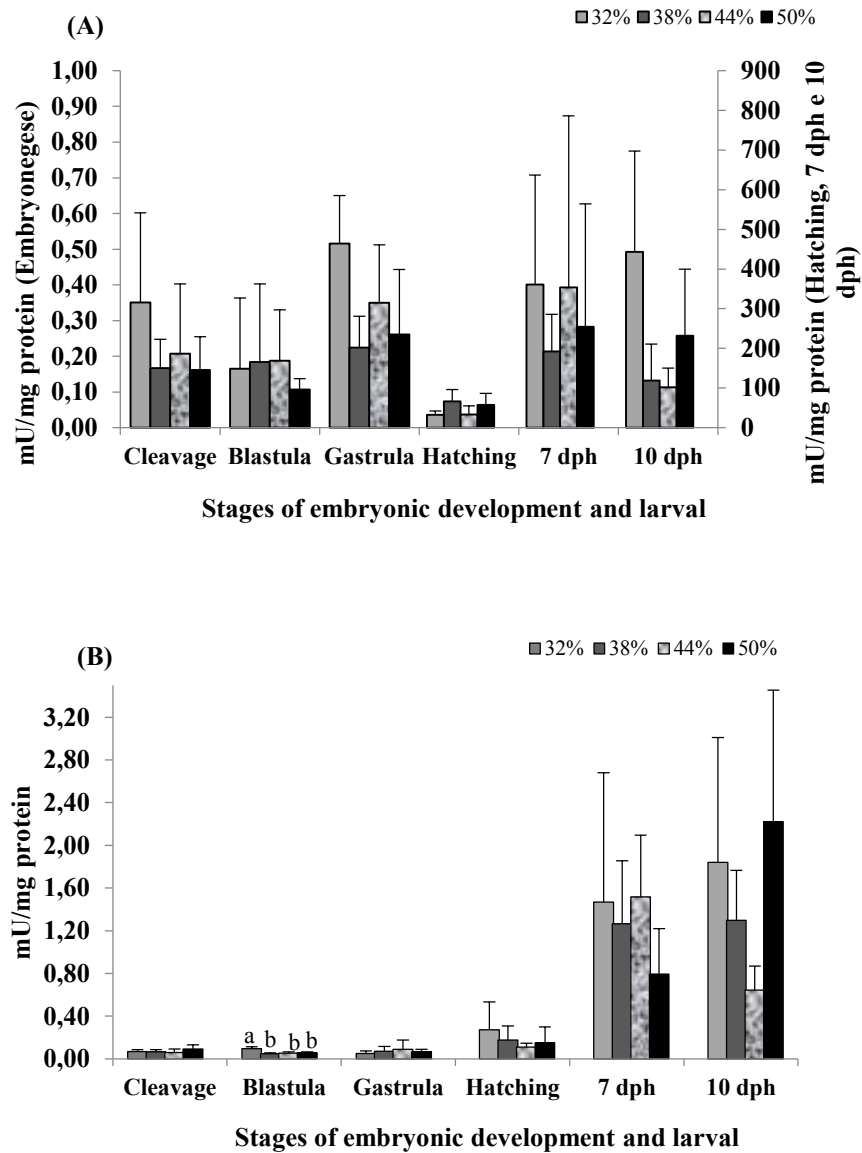
178 Pepsin activity was very low during embryonic development, but there was a slight increase in
 179 the values of the activity of this enzyme from hatching until the end of the experiment. However, did
 180 not exhibit difference between the treatments ($P > 0.05$). The pepsin values in treatment 32% practically
 181 doubled from 7 dph (0.0028 mU/mg protein) to 10 dph (0.0046 mU/mg protein) ($P > 0.05$). For
 182 the other treatments (38%, 44% and 50%), the values remained similar ($P > 0.05$) at those stages (**Fig**
 183 **1.**)



195 **Fig 1.** Specific activity of pepsin during embryonic and larval development (7 and 10 days posthatch)
 196 of Nile tilapia obtained from broodfish fed diets with four levels of crude protein (CP) (32, 38, 44
 197 and 50 %) (mean \pm SD, n=8). Lower case letters identify statistical differences ($P < 0.05$) at each stage
 198 of development.

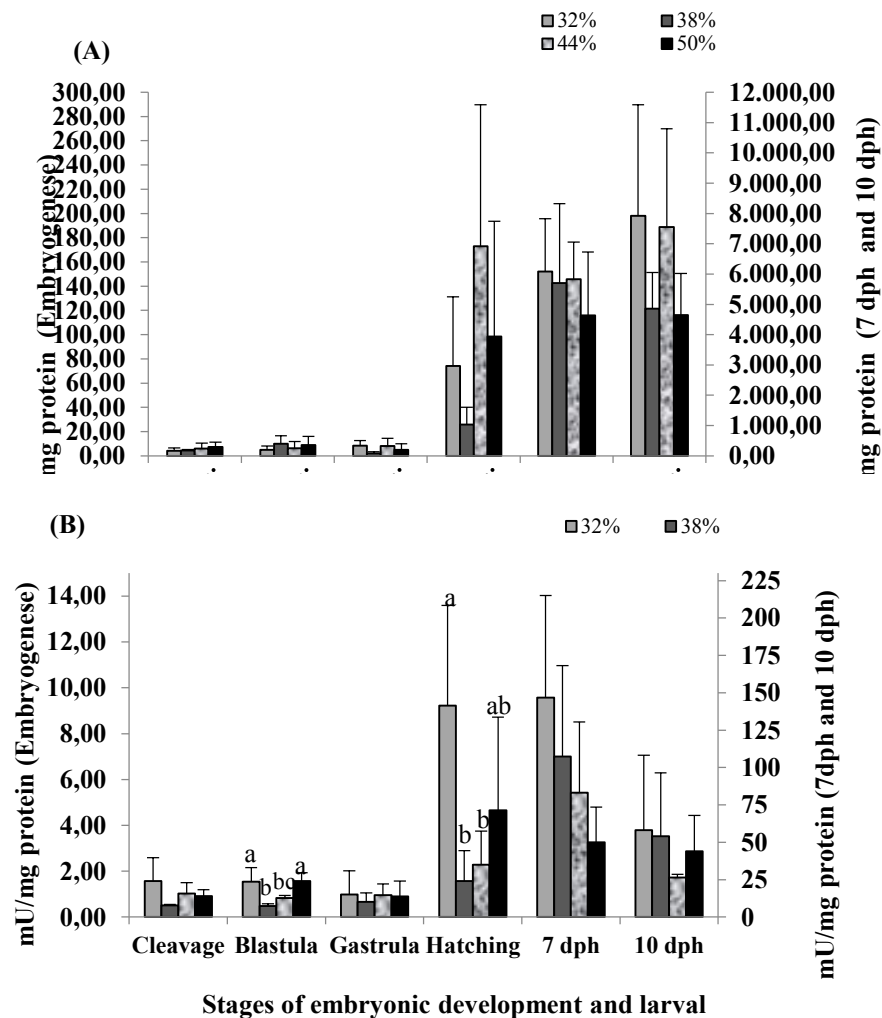
199 **Pancreatic enzymes**

200 There were no significant differences in trypsin activity at the different stages of embryonic and
 201 larval development with regard to the four treatments (**Fig 2A**). The values of lipase activity showed
 202 differences ($P>0.05$) at the blastula stage, and the highest values were observed in treatment 32% (0.09
 203 mU/mg protein), unlike treatments 38 %, 44 % and 50 % (0.048; 0.053; 0.056 mU/mg protein, respec-
 204 tively) (**Fig 2B**).



222 **Fig 2.** Specific activity of trypsin (**A**) and lipase (**B**) during embryonic and larval development (7 and
 223 10 days posthatch) of Nile tilapia obtained from broodfish fed diets with four levels of crude protein
 224 (CP) (32, 38, 44 and 50 %) (mean \pm SD, n=8). Lower case letters identify statistical differences
 225 ($P<0.05$) at each stage of development.
 226

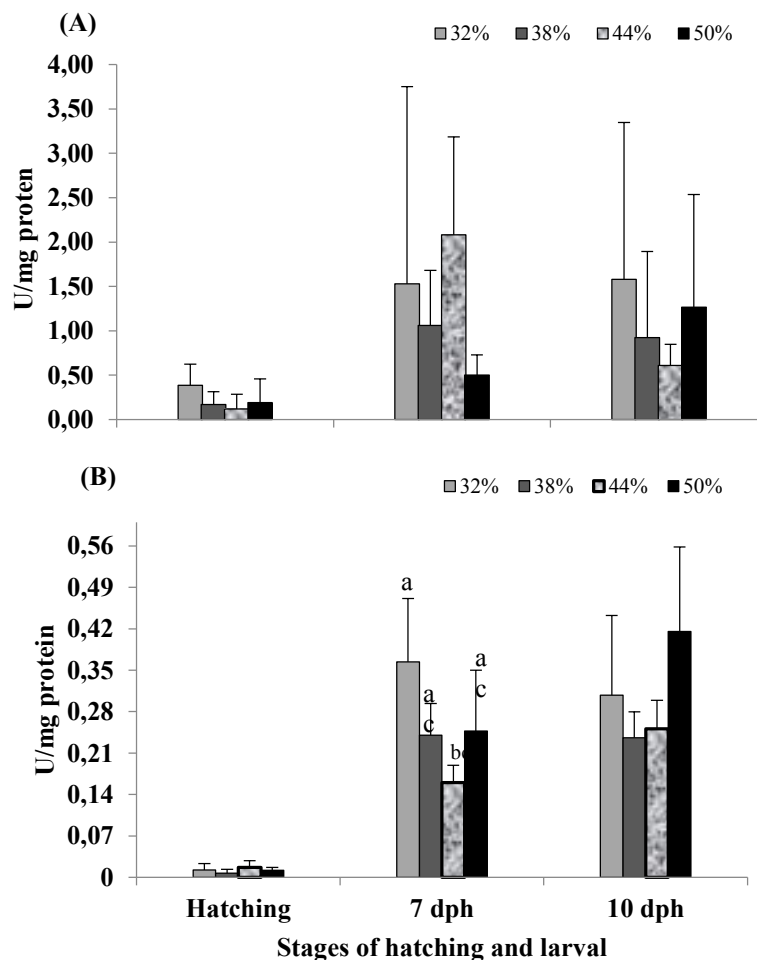
227 No differences were observed ($P>0.05$) in amylase activity between the treatments during em-
 228 bryogenesis and at larvae stage (**Fig 3A**). Significant differences were observed in protease activity at
 229 the stage of blastula and hatching. During blastula, the values of treatment 32 % (1.54 mU/mg protein)
 230 were similar to the ones found in treatment 50 % (1.57 mU/mg protein). On the other hand, treatment 38
 231 % (0.48 mU/mg protein) differed from treatments 32 % and 50 %; however, did not differ from treat-
 232 ment 44 % (0.82 mU/mg protein) (**Fig 3B**). As for protease, differences ($P<0.05$) were found between
 233 treatments at the stage of hatching: the values of treatment 32 % (9.22 mU/mg protein) were higher than
 234 treatments 38 %, 44 % and 50 % (**Fig 3B**).



255 **Fig 3.** Specific activity of amylase (**A**) and protease (**B**) during embryonic and larval development (7
 256 and 10 days posthatch) of Nile tilapia obtained from broodfish fed diets with four levels of crude
 257 protein (CP) (32, 38, 44 and 50 %) (mean \pm SD, n=8). Lower case letters identify statistical differences
 258 ($P<0.05$) at each stage of development.
 259
 260
 261

262 **Intestinal enzymes**

263 The specific activities of aminopeptidase and alkaline phosphatase were measured at the stages
 264 of hatching, 7 and 10 days posthatch. No difference ($P>0.05$) was observed between the four treatments
 265 for aminopeptidase (**Fig 4A**). Maximum values of this enzyme were observed in treatments 32 % (1.58
 266 U/mg protein) and 50 % (1.27 U/mg protein) at the three stages, respectively (**Fig 4A**). Differences
 267 ($P<0.05$) were verified between treatments 32 % (0.36 U/mg protein) and 38 % (0.16 U/mg protein) 7
 268 dph with regard to the specific activity of alkaline phosphatase. Nevertheless, there were no differences
 269 ($P>0.05$) between treatments 38 % (0.24 U/mg protein) and 50 % (0.25 U/mg protein) when compared
 270 with the other ones (**Fig 4B**). However, the maximum activity of this enzyme occurred in treatment 50
 271 %, 10 dph (0.42 U/mg protein) (**Fig 4B**).



291 **Fig 4.** Specific activity of aminopeptidase (A) and alkaline phosphatase (B) during embryonic and
 292 larval development (7 and 10 days posthatch) of Nile tilapia obtained from broodfish fed diets with
 293 four levels of crude protein (CP) (32, 38, 44 and 50 %) (mean \pm SD, n=8). Lower case letters identify
 294 statistical differences ($P<0.05$) at each stage of development.

297 **Discussion**

298 Although it is incipient, the research on the nutrition of broodstock has proven that the nutrients
299 of the diet offered to the broodfish are deposited in the yolk globules and are composed of proteins, free
300 amino acids (FAA), lipids, inorganic ions and glycogen (Falk & Holt, 2008). They influence the ac-
301 tion of digestive enzymes from the early embryonic stages, even before blastula (Finn & Fynh, 2010) un-
302 til larval formation (Jaroszevska & Dabrowski, 2011). According to Portella et al. (2012), Nile tilapia
303 exhibits direct development, with a long period of endogenous feeding, which gives the fish enough time
304 for the maturation of organic systems. Therefore, when the exotrophic phase begins, the digestive system
305 has already started differentiation, the stomach presents gastric glands and the activity of digestive en-
306 zymes is present. In the present study, seven digestive enzymes were detected at embryonic and larval
307 stages of Nile tilapia. However, with only three of them (lipase, protease and alkaline phosphatase) sig-
308 nificant action was observed.

309 The species used in the present study showed traces of gastric pepsin activity from cleavage until
310 hatching, reflecting the immaturity of the digestive tract and rudimentary enzyme complex (Walfor e
311 Lam, 1993). However, the noticeable activity of pepsin in Nile tilapia larvae 7 and 10 dph suggests the
312 formation of the stomach itself. On the other hand, in studies conducted with *Sparus aurata*, proteolytic
313 activity was noticed before the opening of the mouth (4 dph) and onset of exogenous feeding (3
314 dph) (Moyano et al., 1996). In studies with *Atractoscion nobilis* and *Dentex dentex*, the differentiation
315 of gastric glands occurred only 16 and 19 days posthatch, respectively (Galaviz et al., 2011; Gisbert et
316 al., 2009). Comparatively, considering the four treatments, there was no change in the activity of this
317 enzyme, but treatment 32 % exhibited higher proteolytic capability 7 and 10 dph.

318 According to Hjelmeland (1995) trypsin, the enzyme produced by the pancreas, in its inactive
319 form (trypsinogen) is activated by enterokinase in the anterior section of the intestine of fish. Drossou et
320 al. (2006) monitored trypsin activity in Nile tilapia as an indicator of the quality of diets and nutritional
321 condition of the larvae. In that study, trypsin activity did not show significant differences between the
322 four treatments.

323 Lipase (pancreatic enzyme) acts on the initial section of the intestine of fish, promoting the hy-
324 drolysis of triacylglycerols forming fatty acids and glycerol, generating energy for the cell (Nelson &
325 Cox, 2014). At blastula, treatment 32 % showed the most relevant value, probably due to the highest
326 level of ethereal extract (7.8 %) present in the diet offered to the Nile tilapia broodfish when compared
327 with the other three treatments. On the other hand, with *Dentex dentex*, the activity of this enzyme started
328 at the moment of hatching, and then maintained a steady growth (Gisbert et al., 2009), whereas

329 with *Paralichthys californicus* (Alvarez-González et al., 2006) and *Seriola lalandi* (Chen et al., 2006)
330 lipase activity was detected only at the moment of mouth opening and beginning of exogenous feeding.

331 Pancreatic amylase acts on the anterior section of the intestine, playing an important role in the
332 digestion of polysaccharides, producing oligosaccharides that will be absorbed by the cell (Lovell, 1988).
333 In the present study it had been expected that amylase would exhibit higher activity in treatment 32 %,
334 because the diet offered to the broodfish contained 30 % starch. Nevertheless, no significant differences
335 were observed between the treatments, although 7 and 10 dph there was an increase in those values,
336 probably because of the need of the larvae to use carbohydrates as energy reserves. Galaviz et al. (2011),
337 in a study conducted with *Atractoscion nobilis* observed low amylase activity during embryonic devel-
338 opment, and the same occurred for Nile tilapia. In contrast, no amylase activity was noticed in *Scoph-*
339 *thalmus maximus* during embryonic development, demonstrating that carbohydrates are less essential
340 for this species as energy source for the maintenance of metabolism (Tong et al., 2013).

341 According to Zambonino-Infante & Cahu (2007), the proteases include the enzymes that partic-
342 ipate in the digestion of proteins, especially the alkaline ones, represented mainly by trypsin (pancreas)
343 and aminopeptidase (intestine). In addition, there are acid proteases, of which pepsin is the best-known
344 representative. In this context, the present study showed differences in protease activity at the stages of
345 blastula and hatching between treatments 32 and 50 %, though with similar values, which suggests that
346 the amount of protein supplied indirectly affects the activity of that enzyme. Besides, the increase in
347 protease activity for Nile tilapia throughout larval development may be related to the progressive ap-
348 pearance of organs of the digestive system, corroborating what had been previously reported by Martínez
349 et al. (1999) when studying *Solea senegalensis*.

350 The activity of the enzyme aminopeptidase for Nile tilapia in treatments 32 and 50 % was similar,
351 showing increased activity from hatching until 10 dph, suggesting the formation of intestinal brush bor-
352 der. In a study conducted with *Chanos chanos* analysing aminopeptidase, the authors detected its ap-
353 pearance only 21 dph, revealing the late development of intestinal cells (Ferraris et al., 1987).

354 The enzyme alkaline phosphatase also acts on the intestinal brush border of fish, and is directly
355 involved in the absorption and transport of lipids and carbohydrates (Guillaume and Choubert, 2001). In
356 the present study, the significant values of treatment 32 % 7 dph probably suggest that the concentration
357 of starch found in this diet directly influenced the activity of alkaline phosphatase. Tengaroenkul et al.
358 (2002), studying Nile tilapia observed the presence of alkaline phosphatase at the moment of hatching,
359 increasing during the larval phase, suggesting that the intensity of the activity of this enzyme in the

360 intestinal tract might be responsible for the digestion of peptides and absorption of nutrients, corroborating the results of this study. However, according to Almeida et al. (2010), the enzymatic capacity of the intestinal brush border of the fish species used requires detailed studies.

363 Diets with levels of crude protein offered to Nile tilapia broodfish influenced the activity of digestive enzymes during embryonic and larval stages, emphasizing that the nutrients ingested by the broodfish were transferred to the progeny. Thus, more studies on diets for broodfish should be conducted in order to provide additional information not only with regard to the levels of protein, but also energy, vitamins and minerals, as well as the interaction between them, and the use of physiological biomarkers for a successful fish farming.

369

370 **Acknowledgments**

371 The authors would like to thank *Leonardo Tachibana*, *Maria José Tavares Ranzani-Paiva*, and *Danielle de Carla Dias* – Fishery Institute, APTA, SP/Brazil and *Fabio Rosa Sussel* – APTA, UPD, Pirassununga, SP/Brazil for their collaboration. The authors express sincere gratitude to the Dr *Fabio Bittencourt* - UNIOESTE, Toledo, PR/Brazil and Post-doctoral *Tais Silva Lopes*, Fishery Institute, APTA, SP/Brazil, for helpful comments that significantly contributed to the improvement of the paper. Thanks Marta S. Arrufat for the help during laboratory analysis in the IRTA, Spain. The funding was provided by *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*- FAPESP (n° 2013/24.474-1; 2013/22.570-3 and BEPE 2014/15.194-8).

379

380 **References**

381 ALMEIDA, L.C., 2010. Desempenho produtivo, eficiência digestiva e perfil metabólico de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818), alimentados com diferentes taxas carboidrato/lipídio. Tese de Doutorado, p. 103.

384

385 ALVAREZ-GONZÁLEZ, C.A.; CERVANTES-TRUJANO, M.; TOVAR-RAMÍREZ, D. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiology Biochemistry* 31: 83-93, 2006.

388

389 ASGARI, R.; RAFIEE, G.; EAGDERI, S.; NOORI, F.; AGH, N.; POORBAGHER, H.; GISBERT, E., 2013. Ontogeny of the digestive enzyme activities in hatchery produced beluga (*Huso huso*). *Aquaculture* 416 - 417, 33 - 40.

392

393 BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C., 2014. *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: Funep, p. 336.

395

- 396 BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H.; BROCK, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alka-
397 line phosphatase in five cubic millimeters of serum. *Journal Biology Chemistry* 164, 321 – 329.
398
- 399 BRADFORD, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
400 protein using the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248 – 254.
401
- 402 CHEN, B.N.; QIN, J.G.; KUMAR, S.M.; HUTCHINSON, W.G.; CLARKE, S.M., 2006. Ontogenetic
403 development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 260, 264–
404 271.
405
- 406 DROSSOU, A.; UEBERSCHÄR, B.; ROSENTHAL, H.; HERZIG, K.H., 2006. Ontogenetic deve-
407 lopment of the proteolytic digestion activities in larvae of *Oreochromis niloticus* fed with different diets.
408 *Aquaculture* 256, 479–488.
409
- 410 EMBRAPA, 2013. *Piscicultura de água doce: Multiplicando Conhecimentos*. Palmas: Embrapa, 440 p.
411
- 412 FAULK, C.K. & HOLT, G.J.; 2008. Biochemical composition and quality of captive-spawned cobia
413 *Rachycentron canadum* eggs. *Aquaculture* 279,70 - 76.
414
- 415 FERRARIS, R.P.; TAN, J.D.; DE LA CRUZ, M.C.; 1987. Development of the digestive tract of Milk-
416 fish, *Chanos chanos* (Forsskal): histology and histochemistry. *Aquaculture* 61, 241– 257.
417
- 418 FINN, R.N. & FYHN, H.J., 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquaculture Rese-*
419 *arch*, 41, 684-716.
420
- 421 FUJIMURA, K.; OKADA, N., 2007. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia
422 *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Development staging system. *Development Growth*
423 *Differentiation* 49, 301 - 324.
424
- 425 GALAVIZ, M.A.; GASCA, A.G.; DRAWBRIDGE, M.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, C.A.; LÓPEZ, L.M.,
426 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*,
427 larvae. *Aquaculture* 318, 162 - 168.
428
- 429 GAO, M.; LUO, Y.P.; CAO, Z.D. Effect of dietary carbohydrate on digestive enzyme activities in
430 southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) juveniles. *Journal of Southwest China Normal University*
431 (Nat. Sci.) 31, 119–123, 2006.
432
- 433 GISBERT, E.; GIMENEZ, G.; FERNANDEZ, I.; KOTZAMANIS, Y.; ESTEVEZ, A. Development of
434 digestive enzymes in common dentex, *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* 287, 381–387,
435 2009.
436
- 437 GUILLAUME, J.; CHOUBERT, G., 2001. Digestive physiology and nutrient digestibility in fishes. In
438 Guillaume, J.; Kaushik, S.; Bergot, P. and Métailler, R., editors. *Nutrition and Feeding of Fish and Crus-*
439 *taceans*. Springer Praxis Books Series. Springer & Praxis Publishing, Chichester, UK. 27-58.

- 440
441 HIDALGO, M.C.; UREA, E.; SANZ, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with
442 different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267 - 283.
443
- 444 HJELMELAND, K., 1995. Trypsin in fish. Studies of the enzyme and its inhibitors in the digestive
445 system and epidermis of fish. Dissertation, The Norwegian College of Fishery Science, University of
446 Tromsø, Norway, 168 pp.
447
- 448 IZQUIERDO, M.S.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A.G.J., 2001. Effect of broodstock
449 nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25 - 42.
450
- 451 JAROSZEWSKA, M.; DABROWSKI, K., 2011. Utilization of yolk: transition from endogenous to
452 exogenous nutrition in fish in J. Holt, editor. *Larval Fish Nutrition*. Wiley-Blackwell. UK.
453
- 454 KUZ'MINA, V.V., 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some fresh water teleosts.
455 *Aquaculture* 148, 27 - 37.
456
- 457 LOVELL, T., 1988. *Nutrition and Feeding of Fish*. 2ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht,
458 London.
459
- 460 MAROUX, S.; LOUWARD, D.; BARATTI, J., 1973. The aminopetidase from hog intestinal brush border.
461 *Biochimica et Biophysical* 321, 282 - 295.
462
- 463 MARTÍNEZ, I.; MOYANO, F.J.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; YÚFERA, M., 1999. Digestive enzyme
464 activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiology and Bio-*
465 *chemistry* 21, 317 - 323.
466
- 467 MÉTAIS, P.; BIETH, J., 1968. Détermination de l' α -amylase. *Analytical and Biology Chemistry* 26,
468 133 - 142.
469
- 470 MOYANO, F.J.; DIAZ, M.; ALARCON, F.J.; SARAQUESTE, M.C., 1996. Characterization of diges-
471 tive enzyme activity during larval development of gilthead seabream *Spaurus aurata*. *Fish Physiology*
472 *Biochemistry* 15, 121 - 130.
473
- 474 NELSON, D.L.; COX, M.M., 2014. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ª edição. New York: Ar-
475 tmed, p.1298.
476
- 477 PORTELLA, M.C.; LEITÃO, N.J.; TAKATA, R., and LOPES, T.S., 2012. Alimentação e Nutrição de
478 Larvas. *Nutriaqua – Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*.
479 Ministério da Pesca e Aquicultura. p. 185-216.
480
- 481 PRADHAN, P.K.; JENA, J.; MITRA, G.; SOAD, N.; GISBERT, E. Ontogeny of the digestive enzymes
482 in butter catfish *Ompokbi maculatus* (Bloch) larvae. *Aquaculture* 372-375, 62 - 69, 2013.
483

- 484 TEIXEIRA, E.A.; CREPALDI, D.V.; FARIA, P.M.C.; RIBEIRO, L.P.; MELO, D.C.; CASTRO, A.C.,
485 2008. Composição corporal e exigências nutricionais de aminoácidos para alevinos de tilápia
486 (*Oreochromis sp.*). Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal 9, 239 - 246.
487
- 488 TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; SMITH, S.A.; CHATREEWONGSIN, U., 2002. Ontogenic de-
489 velopment of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture 211,
490 241–251.
491
- 492 TONG, X. H.; XU, S. H.; LIU et al. Stages of embryonic development and changes in enzyme activities
493 in embryogenesis of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture International p.129-142, 2013.
494
- 495 WALFORD, J.; LAM, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in
496 seabass (*lates calcarifer*) larvae and juveniles. Aquaculture 109, 187 - 205.
497
- 498 WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION, 1972. Worthington Enzyme Manual: Enzymes,
499 Enzymes Reagents, Related Biochemicals. Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N.J.
500
- 501 ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; CAHU, C., 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and
502 metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. Aquaculture 268, 98 -
503 105.
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520

521 **Anexo 1**

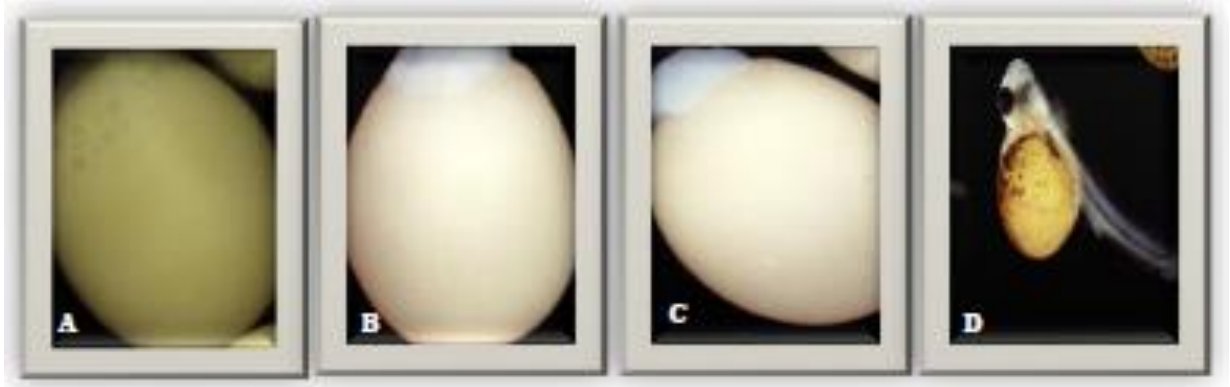
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565



Anexo 1. Hapas para realização do experimento (A); Identificação dos animais (B); Retirada dos ovos da cavidade orofaríngea da fêmea (C); Contagem, pesagem e separação dos ovócitos para incubação (D); Incubadoras para manutenção dos embriões e das larvas (E); estereomicroscópio para identificação das fases do desenvolvimento embrionário (F).

566 **Anexo 2**

567



568

569

570 **Anexo 2.** Estágios do desenvolvimento embrionário; Estágio de clivagem (A); Estágio de blástula (B);

571 Estágio de gástrula (C) e Estágio de eclosão (D)

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

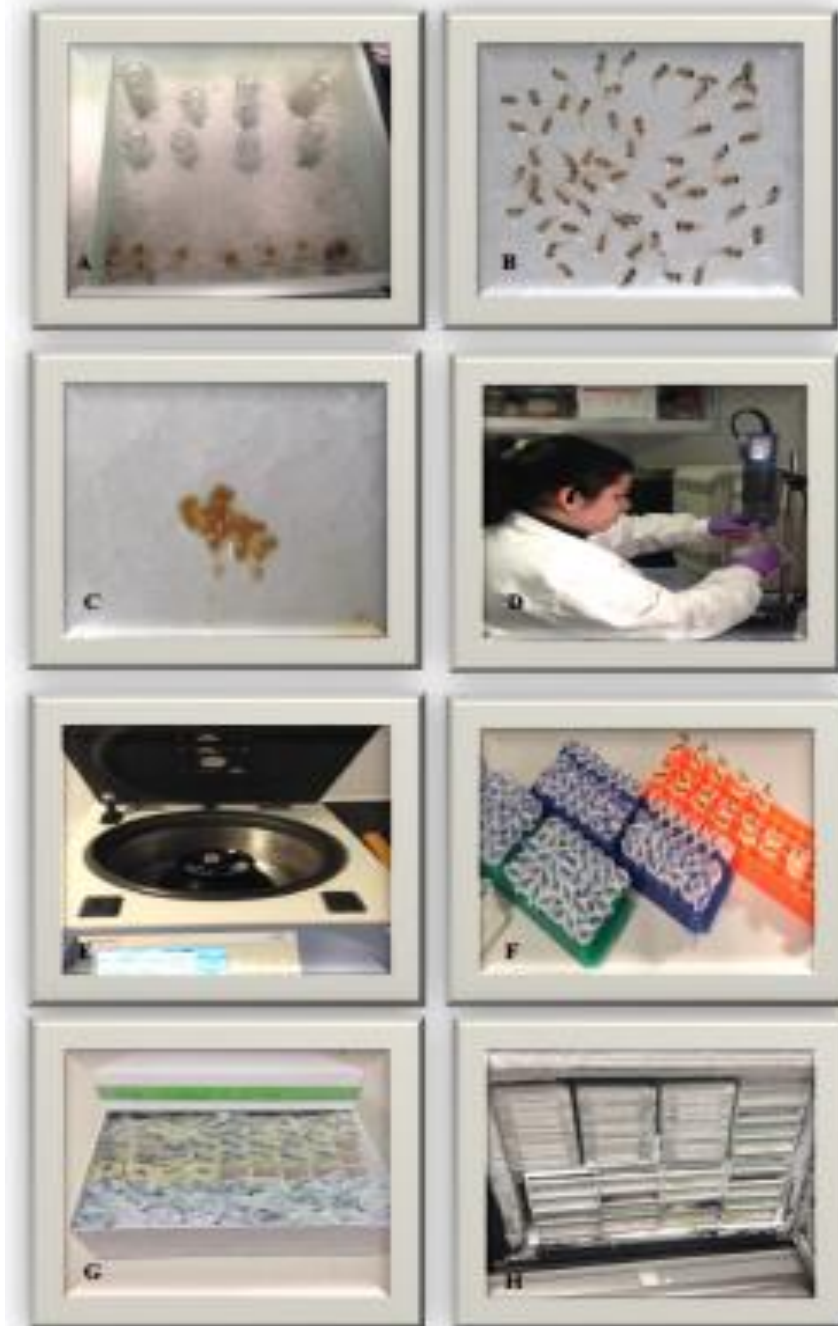
596

597

598

599 **Anexo 3**

600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639



640 Anexo 3. Descongelamento das amostras para início da homogeneização (A); Amostra de larvas
641 descongeladas para contagem (B); Amostras de ovos descongelados para contagem (C);
642 Homogeneização das amostras no Turrax (D); Centrifugação das amostras (E); Microtubos identificados
643 para separação das alíquotas das amostras (F); Amostras acondicionadas em caixas de papelão para
644 congelamento (G) e Freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para manutenção das amostras até as análises (H).