

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE
POLYPEPTÍDEOS DE SILAGENS DE PEIXE

Ligia Maria Neira
Zootecnista

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE
POLIPEPTÍDEOS DE SILAGENS DE PEIXE

Ligia Maria Neira

Orientador: Prof. Dr. Dalton José Carneiro

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Campus de Jaboticabal,
como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em
Zootecnia

2016

Neira, Ligia Maria
N415c Caracterização e avaliação nutricional de polipeptídeos de
 silagens de peixe / Ligia Maria Neira. – – Jaboticabal, 2016
 vi, 69 p. : il. ; 29 cm

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
 Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
 Orientador: Dalton José Carneiro
 Banca examinadora: João Pizauro Martins Jr., Luciano Hauschild,
 Rose Meire Vidotti, Eduardo Gianini Abimorad.
 Bibliografia

 1. Fracionamento. 2. Nutrição. 3. *Oreochromis niloticus*. 4.
 Peptídeos. 5. Proteína. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
 Agrárias e Veterinárias.

 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.

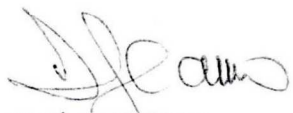
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE POLIPEPTÍDEOS DE
SILAGENS DE PEIXE

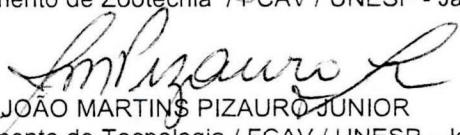
AUTORA: LIGIA MARIA NEIRA

ORIENTADOR: DALTON JOSÉ CARNEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA,
pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DALTON JOSÉ CARNEIRO
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURRO JUNIOR
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. LUCIANO HAUSCHILD
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora Dra. ROSE MEIRE VIDOTTI
APTA - Pólo Regional Centro Norte - São José do Rio Preto/SP



Pesquisador Dr. EDUARDO GIANINI ABIMORAD
APTA / Votuporanga/SP

Jaboticabal, 30 de novembro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LIGIA MARIA NEIRA – nascida em 2 de junho de 1986, na cidade de Taquaral (SP), filha de Rodolfo Neira *in memorian* e Rosa Maria Trindade Neira, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras/UFLA em agosto de 2004, onde foi bolsista de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), graduando-se em julho de 2009. Em março de 2011 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, a nível de mestrado, no Centro de Aquicultura da UNESP – Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Dalton José Carneiro, onde foi bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); obteve o título de mestre em fevereiro de 2013. Em março do mesmo ano iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia, a nível de doutorado, Área de Concentração Nutrição e Alimentação, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP – Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Dalton José Carneiro, onde também foi bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, proteção, força e conforto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp, pela concessão da bolsa de estudos, processo FAPESP 2013/16773-9 .

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e ao Centro de Aquicultura da Unesp, por toda estrutura disponibilizada.

Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro pela orientação, ensinamentos, apoio, conselhos profissionais e pessoais, que o tornou, acima de tudo, um amigo.

As minhas “Irmãs” e companheiras Hellen e Lidiane que juntamente com nosso “Irmão” Thiago formam minha equipe de Laboratório, Pesquisa, Publicações e de Aprendizado.

Aos amigos do Laboratório de nutrição e amigos do CAUNESP: Bruna, Jesaías, Natália, Juliano, Thiago (Nogento), Juliana (Tomys), Thyssia, Amanda, Ivan, Thalys, Silvia, Suerli, Valdecir e Márcio (Perereca) que sempre colaboraram e conviveram comigo durante os ensaios experimentais.

Ao Prof. Dr. José Otávio proprietário da Piscicultura Tuiuiu que forneceu os resíduos para produção das silagens estudados.

Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Jr. por me acolher no laboratório e auxiliar na realização das análises.

Aos amigos do LEA: Adriano (bigola), Luiz Flávio (pudendo), Rafael (dopamina), Caroline (frígida), Gabriela (prima) e todos os estagiários que me acolheram, ensinaram e nunca desistiram de me ajudar a alcançar ótimos resultados.

A Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa (UFLA) pelo auxílio nas análises histológicas e Amizade de longa data.

Ao Prof. Dr. Emmanoel Vieira da Silva Filho (UFF) pelo empréstimo da coluna de filtração em gel.

Ao Prof. Dr. Celso Beneditti (LNBio - CNPEM) e sua técnica Jackeline Zanella por todo treinamento e parceria durante as cromatografias.

Aos membros das comissões examinadoras do exame geral de qualificação e defesa pelas contribuições e tempo dedicado.

À minha família por sempre estarem presente, pelo amor incondicional e ensinamentos, vocês são o verdadeiro valor da vida.

Ao Caio, meu noivo, companheiro e porto seguro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
CAPÍTULO 2 -PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO PEPTÍDICA DAS SILAGENS DE RESÍDUOS DE FILETAGEM DA TILÁPIA DO NILO	12
1. INTRODUÇÃO.	13
2. OBJETIVO	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	19
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 3 - DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E ENERGIA DE SILAGENS DE RESÍDUOS DE TILÁPIA DO NILO.	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. OBJETIVO	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4. RESULTADOS.....	39
5. DISCUSSÕES	40
6. CONCLUSÃO	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPÍTULO4 -SUBSTITUIÇÃO PARCIAL OU TOTAL DA PROTEÍNA DA FARINHA DE TILÁPIA PELA DE SILAGEM DE RESÍDUO, ISOLADO PROTEICO DE SOJA OU AMINOÁCIDOS CRISTALINOS EM DIETAS PARA JUVENIS DA TILÁPIA DO NILO.	47
1. INTRODUÇÃO	48
2. OBJETIVO	50
3. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4. RESULTADOS.....	56
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÃO	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 018777/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Produção de polipeptídeos de hidrolisados proteicos e sua eficiência na nutrição de juvenis de Tilápia-do-nilo"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Dalton José Carneiro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de setembro de 2013.

Jaboticabal, 06 de setembro de 2013.

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE POLIPEPTÍDEOS DE SILAGENS DE PEIXE

RESUMO – Na aquicultura, o aproveitamento dos resíduos para produção de silagens torna a produção mais sustentável. Foram realizados três experimentos para estudar a viabilidade de fracionamento da proteína da silagem de resíduos de tilápia por meio de avaliações dos processos da hidrólise da proteína e da eficiência de sua utilização de seus polipeptídeos em dietas práticas sobre o desempenho produtivo, nutricional e morfologia intestinal. O primeiro experimento, teve os objetivos de produzir e avaliar as silagens dos resíduos da filetagem de tilápia do Nilo. Foram utilizados dois tipos de matéria-prima, vísceras ou resíduos totais (cabeça, espinha, nadadeiras e vísceras, sem pele), dois processos de hidrólise, ácida e fermentada, com três metodologias para interrupção dos processos, aquecimento, congelamento ou neutralização. Os resultados experimentais mostraram que a hidrólise ocorreu em tempos diferentes para as diferentes matérias-primas e processos de hidrólise. A produção das silagens foram viáveis e apresentaram características favoráveis para utilização deste produto em dietas para peixes. Realizou-se o segundo experimento, para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente de proteína bruta (CDA_{PB}), energia bruta (CDA_{EB}), lisina (CDA_{Lys}) e metionina (CDA_{Met}) das silagens com diferentes tempos de interrupção da hidrólise em dietas para juvenis de tilápia do Nilo. Foram utilizados 720 juvenis ($9,36 \pm 0,74$ g). Foram formuladas 12 dietas-teste, constituídas de 69,5% de uma dieta referência, 0,5% de óxido de cromo III e 30% de uma silagem, ácida ou fermentada, produzido com vísceras ou com resíduos totais, em tempos diferentes de hidrólises (SVA 24, 72 e 144 horas, SVF 24, 48 e 120 horas, STA e STF 24, 96 e 192 horas de hidrólise). As médias dos CDA da proteína, lisina e metionina das silagens variaram de 91,75 a 95,80%. Os menores valores de CDA foram determinados para energia bruta e variaram de 79,30% a 83,62%. Estes resultados mostraram que só as silagens de resíduos totais apresentam altos valores de PB e de CDA_{PB} . Portanto, foram selecionados os tempos de 96 e 192 horas de hidrólise para a ácida e fermentada, respectivamente, para serem utilizados como ingredientes em dietas práticas para a tilápia do Nilo. O terceiro experimento teve como objetivo a avaliação do desempenho e da eficiência nutricional de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com oito dietas diferentes, contendo farinha de tilápia e sua substituição parcial ou total por silagens, ácida (SA) ou fermentada (SF), isolado proteico de soja (IPS) ou aminoácidos livres (AAS). Foram utilizados 640 juvenis ($7,18 \pm 5,43$ g). Os resultados mostraram que os peixes alimentados com dietas contendo FT, sua substituição parcial (SA_{50} , ST_{50} e IPS_{50}) e substituição total por SA, apresentaram os melhores resultados de eficiência alimentar, e o seu crescimento foi significativamente maior quando comparado aos peixes que receberam as dietas contendo SF e AAS. Estes resultados mostram que a substituição da FT pelas silagens foi possível.

Palavras-chave: fracionamento, nutrição, *Oreochromis niloticus*, peptídeos e proteína

CHARACTERIZATION AND NUTRITIONAL EVALUATION OF POLYPEPTIDES FROM FISH SILAGE

Abstract – In Aquaculture, to be sustainable should use of the waste to produce fish silages. Three experiments were conducted to study the feasibility of fractionation protein from tilapia waste hydrolysate through evaluations of the hydrolysis processes of protein and the efficient use of their polypeptides in practical diets on performance, nutrition and intestinal morphology. The experiment 1, aimed to produce and evaluate the silages of Nile tilapia filleting waste. Two types of raw materials, viscera or total residues were used (head, spine, fins and viscera), two processes of hydrolysis, acid and fermented with three methodologies to interrupt the processes, heating, freezing or neutralization. The experimental results showed that the hydrolysis took place at different times for different raw materials and hydrolysis processes. The silage production was viable and showed favorable characteristics for this product use in fish diets. The second experiment was carried out to determinate the apparent digestibility of crude protein (ADCCP), gross energy (ADCGE), lysine (ADCLys) and methionine (ADCMet) of fish silages with different time of hydrolysis in diets for Nile tilapia juvenile. 720 juveniles were used (9.36 ± 0.74 g). 12 test diets were formulated, constituted 69.5% of a reference diet, 0.5% chromium III oxide and 30% of an acid or fermented silage, produced with viscera or total residues at different times of hydrolysis (SVA 24, 72 and 144 hours SVF 24, 48 and 120 hours, and STA STF 24, 96 and 192 hours of hydrolysis). The ADC mean of protein, lysine and methionine silages ranged from 91.75 to 95.80%. The lowest ADC values were determined for crude energy and ranged from 79.30% to 83.62%. These results showed that only total waste silage have high levels of CP and ADCCP. The times 96 and 192 hours of hydrolysis were selected to the acid and fermented, respectively, for use as ingredients in practical diets for Nile tilapia. The third experiment was aimed to evaluate the performance and nutritional efficiency of Nile tilapia juvenile fed with eight different diets containing tilapia meal and partial or total replacement for acid (SA) or fermented (SF) fish silage, soybean protein isolate (SPI) or free amino acid (FAA). 640 juveniles were used (7.18 ± 5.43 g). The results showed that the fish fed diets containing TM, partial replacement (SA₅₀, ST₅₀ and IPS₅₀) and total replacement by SA showed the best results of feed efficiency, and their growth was significantly higher when compared to fish that received the diets containing SF and FAA. These results show that the substitution of FT by hydrolyzed was possible.

Keywords: fractionation, nutrition, *Oreochromis niloticus*, peptides and protein

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução geral

A aquicultura moderna embasada em pilares como a produção lucrativa, a preservação do ambiente e o desenvolvimento social (MCCAUSLAND et al., 2006) apresenta o desafio de moldar-se ao conceito de sustentabilidade, que implica em agregar valores à produção de conhecimento e novas técnicas (ELER; MILLANI, 2007). Entre estas técnicas, evidencia-se a otimização do uso dos recursos naturais, das instalações e da mão-de-obra, a introdução de sistemas integrados de produção (como os policultivos), a racionalização do uso de insumos, principalmente na elaboração de dietas, e o aproveitamento dos resíduos do beneficiamento (TURECK; OLIVEIRA, 2003). A tilapicultura está em grande expansão no Brasil (IBGE, 2014), tendo sua produção concentrada no sistema intensivo (ZANIBONI FILHO et al, 2005), necessitando exclusivamente de alimento exógeno de alta qualidade e que atenda suas exigências para o crescimento.

Na produção comercial de dietas para peixes é comumente utilizada a farinha de pescado, ingrediente oneroso e de baixa disponibilidade na cadeia produtiva (FAO, 2009). Considerando que o aumento da produção mundial da aquicultura atinge 6,2% ao ano (FAO, 2013) e que a farinha de pescados capturados permanece constante (FAO, 2009), os estudos atuais visam a sua substituição por outros ingredientes de maior disponibilidade e que proporcionem o mesmo desempenho produtivo (NAYLOR et al.,2009). A maioria dos resultados encontrados nestes estudos mostra que as fontes vegetais não atendem nutricionalmente as exigências da espécie, e o principal problema está no provimento dos aminoácidos limitantes como os sulfurados, necessitando assim da suplementação com aminoácidos cristalinos (HU et al.,2008; ABIMORAD et al.,2009; BODIN et al.,2012).

A suplementação com aminoácidos cristalinos, muito empregado em nutrição de aves e suínos, não tem mostrado eficiência em nutrição de peixes, principalmente pela grande facilidade em sua excreção através das brânquias, além de ocupar a maioria dos sítios de absorção com a oferta contínua de grandes proporções destes nutrientes disponíveis. Grande parte dos trabalhos conduzidos nesta linha de pesquisa mostram que o aumento da suplementação

por aminoácidos cristalinos promove diminuição no desempenho, na eficiência de retenção de proteína e no consumo (AOE et al., 1970; ZHANG et al., 2006; NEIRA, 2013). A própria silagem de resíduos de pescado apresenta o mesmo problema, quando usada como principal concentrado proteico em dietas, por conter elevadíssima proporção de aminoácidos livres. De acordo com Zarate e Lovell (1997), esta resposta baixa nos resultados pode ocorrer também pela perda por lixiviação dos aminoácidos cristalinos, por serem altamente solúveis no meio aquático, em relação aos proteicos.

Um ingrediente de origem vegetal que vem recebendo atenção nas formulações de dietas para animais é o isolado proteico de soja, por apresentar adequado balanceamento em aminoácidos. É obtido a partir dos flocos ou farinha de soja desengordurada e contém, no mínimo, 90% de proteína (MARTINS, 2005). Mas sua utilização em alimentos para peixes geralmente tem sido limitada pelo seu alto custo (RICHIE et al., 2001), sendo uma alternativa pouco viável.

Segundo Sharp e Mariojouis (2012), as indústrias da pesca e da aquicultura produzem mundialmente 130 milhões de toneladas de resíduos de pescado por ano, consistindo de capturas em excesso, de resíduos de bordo e industriais, e de desperdício doméstico. No Brasil, a situação é semelhante, pois a tilápia é a espécie de peixe de água doce mais industrializada, com produção de 198 mil toneladas (IBGE, 2014) tendo seu rendimento médio dos filés de aproximadamente 30%, e os 70% restantes são considerados resíduos, incluindo cabeça, esqueleto com carne aderida, vísceras, pele e escamas (VIDOTTI; GONÇALVES, 2006).

Muitas são as opções de uso para os resíduos de pescado, mas a grande maioria delas não se mostra economicamente viável, em vista do elevado investimento inicial. Por outro lado, os aterros sanitários e lagoas de tratamento de efluentes não são alternativas recomendáveis, devido aos altos riscos de contaminação que podem provocar nas áreas costeiras ou água doce e pelo odor desagradável que produzem (FERRAZ DE ARRUDA, 2004). Uma opção viável para minimizar os problemas ambientais gerado pela quantidade elevada de resíduos de pescado é a sua transformação em produtos para serem incorporados como ingredientes nas dietas para animais (RISTIC et al.,

2002), colaborando desta forma, com um aumento correspondente no volume de alimento para o avanço da aquicultura.

Os três métodos mais comuns para processamento e utilização dos resíduos de organismos aquáticos são: fabricação de farinha de peixe e/ou óleo, fabricação de fertilizantes orgânicos ou a produção de silagens (FAO, 2010). A tecnologia de produção de silagem, mesmo em larga escala, é simples, o investimento é pequeno, os efluentes e odores são reduzidos, não sendo necessário o armazenamento refrigerado, o processo de obtenção é rápido em climas tropicais e pode ser utilizado de imediato (BEERLI et al., 2002). A produção de silagens pode ser por ação de ácidos (silagem química), fermentação microbiana induzida por carboidratos (silagem biológica) e consequente ação de enzimas proteolíticas naturalmente presente nos peixes, principalmente nas vísceras, ou adicionadas (silagem enzimática) na forma purificada (KOMPIANG, 1981), que realizam o processo de forma controlada, porém sendo mais onerosa (VIEGAS, 2002).

A silagem ácida de pescado, com pH entre 3,9 e 4,2, após a adição de ácidos minerais e orgânicos, liquefaz-se suficientemente em quatro dias, à temperatura ambiente de 27°C a 30°C, conservando a atividade enzimática por muitos meses. Já as silagens biológicas são produzidas pelo processo de fermentação anaeróbica, utilizando micro-organismos como os *Lactobacillus* e uma fonte de carboidratos. A produção de ácido láctico é importante por causar diminuição do pH (em torno de 4,0) (VIDOTTI; GONÇALVES, 2006). O pH baixo propicia a ação das enzimas naturalmente presentes no pescado e/ou adicionadas, que são responsáveis pela hidrólise proteica, originando produto rico em proteínas, peptídeos de cadeia curta e principalmente aminoácidos livres (KOMPIANG, 1981; STONE; HARDY, 1986; GODDARD; PERRET, 2005). Além da acidez, acredita-se que a habilidade de certas bactérias ácido-láticas em produzir compostos antibacterianos (chamados bacteriocinas), colaboram na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos (BORRENSSEN, 1990).

A silagem de pescado é um ingrediente proteico de alta qualidade e pode ser utilizado como suplemento na dieta de vários animais, e os peixes não são exceção (HAARD et al., 1985). Entre as vantagens, pode-se citar que este produto apresenta maior digestibilidade quando comparado à farinha de

peixe (HASSAN; HEATH, 1987), mas, por apresentar alto grau de hidrólise, seus aminoácidos estão prontamente disponíveis, não sendo muito aproveitados quando utilizados em grandes quantidades em dietas para peixes. Muitos autores acreditam que a silagem apresenta elevado potencial para a utilização na aquicultura pela sua semelhança com a matéria-prima em sua composição de aminoácidos (FAGBENRO, 1994; FAGBENRO; JAUNCEY, 1995a, 1995b; GODDARD; AL-YAHYAI, 2001; VIDOTTI et al., 2003).

As silagens são utilizadas na nutrição animal como substitutos de leite para bezerros (RITCHIE; MACKIE, 1982), leitões (NØRGAARD et al., 2012), suplemento proteico para aves de postura (OPHEIM et al., 2016) e utilizados no *weaning* de larvas de peixes (CAHU; INFANTE, 2001; KOTZAMANIS et al., 2007). Apresentam alta digestibilidade da proteína, são palatáveis e mais facilmente absorvidos do que a proteína intacta, pois não necessitam de digestão prévia por proteases pancreáticas (GILBERT et al., 2008). Como a proteína é o nutriente mais importante para o crescimento dos peixes (LOVEL, 1989), seu aproveitamento poderá implicar em um melhor desenvolvimento dos animais.

Durante o desenvolvimento dos peixes, o aparelho digestivo desempenha um papel importante na manutenção da homeostase do organismo. Os enterócitos são os locais do primeiro contato com os alimentos, onde é absorvido, digerido e transportado para a circulação sanguínea. Uma composição inadequada da dieta pode induzir perturbações no desenvolvimento e função, que pode resultar em redução do crescimento (OSTASZEWSKA et al., 2005)

A mucosa intestinal dos peixes teleósteos tem inúmeras projeções denominadas vilos, possuindo células indiferenciadas que sofrem sucessivas mitoses para formação das células epiteliais do vilo (JOBILING, 1995). A distribuição e frequência destas células são diferentes e dependem das espécies de peixe e da alimentação (ANDREOZZI et al., 1997). A substituição da proteína animal pela da soja ou de seus coprodutos em dietas de peixe pode induzir a uma inflamação no intestino, chamada enterite (BAKKE-MCKELLEP et al., 2000; URÁN et al., 2008). Os sintomas mais encontrados são: redução das vilosidades da mucosa e redução na área de absorção do enterócito, redução nos vacúolos supranuclear do enterócito, alargamento da

lâmina própria e mucosa subepitelial com uma severa infiltração de células inflamatórias, e um aumento no número de células caliciformes intestinais (BAKKE-MCKELLEP et al., 2000)

Nutricionalmente, para melhorar a qualidade da silagem, alguns autores (STONE et al., 1989; GODDARD; AL-YAHYAI, 2001) observaram que, controlando a hidrólise proteica, o valor nutricional do produto final poderia ser superior ao excessivamente hidrolisado. Convencionalmente, o nitrogênio atribuído aos peptídeos era determinado pela subtração do nitrogênio amoniacal e aminoácidos livres do total de nitrogênio medido pelo método de titulação formal de Sorrensen, tratando-se de uma análise pouco precisa, uma vez que, esta é passível de erros acumulativos devido à manipulação, durante as inúmeras fases desta metodologia.

O conceito de que os peptídeos menores são absorvidos pelo intestino dos vertebrados tem sido revisado (WEBB et al., 1992; ADIBI, 1997; BIER, 2003). Mas há evidências de que, em peixes, um único peptídeo pode ser mais eficientemente absorvido que uma mistura de aminoácidos idênticos (BOGE et al., 1981; RESHKIN; AHEARN, 1991). Porém, a importância nutricional e metabólica da mistura de peptídeos ainda é inconclusiva pois os estudos para peixes são escassos (HAARD et al., 1985; STONE; HARDY, 1986; STONE et al., 1989).

O material autolisado caracteriza-se por uma degradação da proteína original do produto da pesca a condição de peptídeos e aminoácidos, em maior ou menor grau, dependendo da técnica empregada na sua elaboração (MEINKE; MATIL, 1973). No caso deste estudo, com a técnica empregada pretende-se interromper o processo de hidrólise para obtenção de maior proporção de peptídeos em relação à proteína original e/ou aminoácidos livres. Para interromper a ação das enzimas sobre a matéria-prima, será estudada a eficiência do uso de variações extremas de temperaturas (-196 e 100°C), e também da neutralização com hidróxido de sódio.

A influência da temperatura sobre a reação enzimática é geralmente representada em termos de atividade ou velocidade de reação, ou seja, a maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior, à medida que a temperatura aumenta ocorrendo a perda da atividade biológica da enzima no processo de desnaturação térmica. As enzimas, quando sujeitas a

baixas temperaturas, ficam inativas devido à falta de energia de ativação para provocar o choque entre as moléculas enzimáticas e as do substrato. No entanto, com o aumento gradual da temperatura, verifica-se também o aumento da atividade enzimática até se atingir um máximo de atividade na temperatura ótima. A partir desse valor, verifica-se uma diminuição da atividade até atingir um valor em que a enzima deixa de atuar devido à desnaturação da proteína que a constitui, perdendo sua configuração espacial e, por consequência, o centro ativo (LEHNINGER et al., 2004).

Neste âmbito, o presente estudo sobre avaliação de processamento das silagens poderá contribuir para obtenção de um produto que apresente maior eficiência nutricional, proporcionando melhor desempenho das tilápia, além da padronização de uma metodologia, que possa ser usada em escala comercial pelas processadoras de pescado e utilizada nas indústrias de rações.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar a viabilidade de obtenção de silagens com maior proporção de peptídeos compostos de dois a seis aminoácidos em suas cadeias e com esse resultado, avaliar o desempenho produtivo, nutricional e morfologia intestinal através da substituição parcial ou total por farinha de tilápia ou isolado proteico de soja em dietas para a fase de crescimento da tilápia do Nilo.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Interromper os processos da hidrólise das proteínas nas silagens, ácida e fermentada para obtenção de maior proporção de peptídeos compostos por dois a seis aminoácidos em suas cadeias;
- ✓ Analisar quimicamente os compostos obtidos com estes processos de hidrólise;
- ✓ Determinar os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e energia destes novos ingredientes obtidos por meio de hidrólise ácida ou fermentada, utilizando duas matérias-primas, resíduos da filetagem de tilápia ou somente de vísceras de tilápia.

- ✓ Avaliar a utilização de dietas com substituição parcial ou total da farinha de tilápia pela silagem de resíduo de tilápia com a melhor composição peptídica obtida no primeiro estudo, e também pelo isolado proteico de soja, analisando os resultados de desempenho zootécnico, eficiência nutricional e composição corporal em juvenis de tilápia do Nilo;
- ✓ Avaliar a morfologia intestinal por meio do estudo histológico das vilosidades e enterócitos do intestino das tilápias submetidas a diferentes dietas experimentais.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMORAD, E.G.; FAVERO, G.C.; CASTELLANI, D.; GARCIA, F.; CARNEIRO, D. J. Dietary supplementation of lysine and/or methionine on performance, nitrogen retention and excretion in pacu *Piaractus mesopotamicus* reared in cages. **Aquaculture**, Amsterdam, v.295, p.266-270, 2009.
- ADIBI, S. A. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. **Gastroenterology**, New York, v.113, p.332–340, 1997.
- ANDREOZZI, G.; DE GIROLAMO, P.; AFFATATO, C.; RUSSO, P.; GARGIULO, G. VIP-like immunoreactivity in the intestinal tract of fish with different feeding habits. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v.41, p.57-64, 1997.
- AOE, H.; MASUDA, I.; ABE, I.; SAITO, T.; TOYODA, T.; KITAMURA, S. Nutrition of protein in Young carp. 1. Nutritive value of free amino acids. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v.36, p.407-413, 1970.
- BEERLI, E.L.; LOGATO, P.V.R.; BEERLI, K.M.C. Silagem ácida de resíduos de filetagem de trutas (*Oncorhynchus mykiss*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA SIMBRAQ, 12., 2002, Goiânia. **Anais...**Goiânia: UFG, 2002, v.1. p.6.
- BAKKE-MCKELLEP, A.M.; MCL PRESS, C.; BAEVERFJORD, G.; KROGDAHL, Å.; LANDSVERK, T. Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal induced enteritis. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v.23, p.115–127, 2000.
- BIER, D.M. Amino acid pharmacokinetics and safety assessment. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.133, p.2034S–2039S, 2003.

BODIN, N.; DELFOSSE, G.; THU, T.T.N.; BOULNGÉ, E.L.; ABBOUDI, T.; LARONDELLE, Y.; ROLLIN, X. Effects of fish size and diets adaptation on growth performance and nitrogen utilization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) juveniles given diets based on free and/or protein-bound amino acids. **Aquaculture**, Amsterdam, v.356-357, p.105-115, 2012.

BOGE, G.; RIGAL, A.; PERES, G. Rates of in vivo intestinal absorption of glycine and glycyglycine by rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Philadelphia, v. 69A, p. 455–459, 1981.

BORRENSSEN, T. Biotechnology, by products and aquaculture. In: BLIGH, E.G. (Ed.). **Seafood science and technology**. Surrey: Fishing News Books, 1990. p.278-287.

CAHU, C.; INFANTE, J. Z. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v.200, p.161–180, 2001.

ELER, M.N.; MILLANI, T.J. Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados a aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.36, p.33-44, 2007.

FAGBENRO, O. Dried fermented fish silage in diets for *Oreochromis niloticus*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, Israel, v.46, n.3, p.140-147, 1994.

FAGBENRO, O.; JAUNCEY, K. Water stability, nutrient leaching and nutritional properties of moist fermented fish silage diets. **Aquaculture Engineering**, New York, v.14, p.143-153, 1995a.

FAGBENRO, O.; JAUNCEY, K. Growth and protein utilization by juvenile catfish (*Clarias gariepinus*) fed dry diets containing co-dried lactic-acid-fermented fish-silage and protein feedstuffs. **BioResource Technology**, New York, v.51, p. 59-35, 1995b.

FAO - Food and Agriculture Organization. **The state of world fisheries and aquaculture 2008**. Rome: FAO, 2009. 196p.

FAO. **Fisheries Global Information System (FAO-FIGIS)**. Rome, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/figis/en>>.

FAO. **Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011**. Rome, 2013. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/FI/news/GlobalAquacultureProductionStatistics2011.pdf>>

FERRAZ DE ARRUDA, L. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. 2004. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz De Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GILBERT, E.R.; WONG, E.A.; WEBB Jr.; K.E. Board-invited review: peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86, p.2135–2155, 2008.

GODDARD, J.S.; AL-YAHYAI, D.S.S. Chemical and nutritional characteristics of dried sardine silage. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, Binghamton, v.10, n.4, p. 39-50, 2001.

GODDARD, J.S.; PERRET, J.S.M. Co-drying fish silage for use in aquafeeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.118, p.337-342, 2005.

HAARD, N.F.; KARIEL, N.; HERZBERG, G.; FELTHAM, L.A.W.; WINTER, K. Stabilization of protein and oil in fish silage for use as a ruminante feed supplement. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v.36, n. 1, p. 229-241. 1985.

HASSAN, T.E.; HEATH, J.L. Chemical and nutritive characteristics of fish silage produced by biological fermentation. **Biological Wastes**, London, v.20, n.3, p. 187-201, 1987.

HU, M.; WANG, Y.; WANG, Q.; ZHAO, M.; XIONG, B.; QIAN, X.; ZHAO, Y.; LUO, Z. Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients with lysine and methionine supplementation to practical diets for gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.275, p.260-265, 2008.

IBGE. Produção da pecuária municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. v.42, p.1-39.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. London: Chapman & Hall. 1995. 455 p. (Fish and Fisheries Series, 16)

KOMPIANG, I.P. Fish silage, its prospect and future in Indonesia. **Indonesian Agricultural Research & Development Journal**, Jakarta Selatan, v.3, n.1, p.9-12, 1981.

KOTZAMANIS, Y.P.; GISBERT, E.; GATESOUBE, F.J.; ZAMBONINO INFANTE, J.; CAHU, C. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Comparative Biochemistry Physiology**, London, v.147a, p.205–214, 2007.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2004.

LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. p.260.

MARTINS, M.T.S. Caracterização química e nutricional de plasteína produzida a partir de silagem pancreático de isolado proteico de soja. **Food Science and Technology**, Campinas, v.25, n.4, p.683-690, 2005.

MCCAUSLAND, W.D.; MENTE, E.; PIERCE, G.J. THEODOSSIOU, I. A simulation model of sustainability of coastal communities: aquaculture, fishing, environment and labour markets. **Ecological Modelling**, New York, v.193, p.271-294, 2006.

MEINKE, W.M.; MATTIL, K.F. Autolysis as a factor in the production of protein isolates from whole fish. **Journal of Food and Science**, Chicago, v.38, p. 864-867, 1973.

NAYLOR, R.L.; HARDY, R.W.; BUREAU, D.P.; CHIAU, A.; ELLIOT, M.; FARREL, A.P.; FORSTER, I.; GATLIN, D.; GOLDBURG, R.; HUA, K.; NICHOLAS, P. Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.106, p.15103-15110, 2009.

NEIRA, L. M. **Fontes de lisina e metionina em dietas para tilápia do Nilo na fase de recria**. 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

NØRGAARD, J.V.; BLAABJERG, K.; POULSEN, H.D. Salmon protein hydrolysate as a protein source in feed for young pigs. **Animal Feed Science and Technology**, New York, v.177, p.124-129, 2012.

OPHEIM, M.; STERTEN, H.; ØVERLAND, M.; KJOS, N.P. Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate – Effect on growth performance and intestinal morphometry in broiler chickens. **Livestock Science**, Amsterdam, v.187, p.138–145, 2016.

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

RESHKIN, S.J.; AHEARN, G.A. Intestinal glycyl-L-phenylalanine and L-phenylalanine transport in a euryhaline teleost. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.260, p. R563– R569, 1991.

RITCHIE, A.H.; MACKIE, I.M. Preparation of fish protein hydrolysates *Anita*. **Feed Science and Technology**, New York, v.7, p.125-133, 1982.

RICHE, M.; TROTTIER, N.L.; KU, P.K.; GARLING, D.L. Apparent digestibility of crude protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v.25, p.181–194, 2001.

RISTIC, M.D.; FILIPOVIC, S.S.; SAKAC, M.L.J. Liquid protein feedstuffs from freshwater fish byproducts as a component of animal feed. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v.7, p.729-736, 2002.

SHARP, M.; MARIOJOULS, C. Waste not, want not: Better utilization of fish waste in the Pacific How is value added to fish waste? **SPC Fisheries Newsletter**, Noustrea, v.138, may/aug., 2012.

STONE, F.E.; HARDY, R.W. Nutritional value of acid stabilized silage and liquefied fish protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v.37, p.797-803, 1986.

STONE, F.E.; HARDY, R.W.; SHEARER, K. D.; SCOTT, T.M. Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdineri*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.76, p. 109-118, 1989.

TURECK, C.R.; OLIVEIRA, T.N.D.E. Sustentabilidade ambiental e maricultura. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 4, n. 2, 2003.

VIDOTTI, R. M.; CARNEIRO, D. J, VIEGAS, E.M.M. Acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.33, n.1, p. 57-62, 2003.

VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES. G.S. **Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal**. São Paulo: Instituto de Pesca, 2005.

VIEGAS, E.M.M. Processamento de pescados e aproveitamento de resíduos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA Simbraq, 12., 2002, Goiânia. **Conferências e palestras...** Goiânia, 2002. p.79.

ZANIBONI FILHO, E.; NUÑER, A.P.O.; GUERESCHI, R.M.; SILVA, S.H. Cultivo de peixes em tanques-rede e impactos ambientais. In: EPAMIG. **Cultivo de peixes em tanques-rede: desafios e oportunidades para um desenvolvimento sustentável**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2005. 104 p.

ZARATE, D.D.; LOVELL, R.T. Free lysine (L-lysine.HCl) is utilized for growth less efficiently than protein-bound lysine (soybean meal) in practical diets by young channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.159, p.87-100, 1997.

ZHANG, Y.; DABROWSKI, K.; HLIWA, P.; GOMULKA, P. Indispensable amino acid concentrations decrease in tissues of stomachless fish, common carp in response to free amino acid- or peptide-based diets. **Amino Acids**, New York, v.31, p.165–172, 2006.

WEBB, K.E.; MATTEWS, J.C.; DIRIENZO, D.B. Peptide absorption: a review of current concept and future perspectives. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, p.3248–3257, 1992.

CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO PEPTÍDICA DAS SILAGENS DE RESÍDUOS DE FILETAGEM DA TILÁPIA DO NILO

RESUMO – Atualmente a aquicultura necessita de um ingrediente sustentável que seja viável e possa competir nutricionalmente com a farinha de peixe. Os objetivos deste trabalho foram produzir, avaliar e caracterizar as silagens dos resíduos da filetagem de tilápia do Nilo. O experimento foi realizado segundo um delineamento inteiramente casualizado com doze tratamentos em esquema fatorial 2x2x3 com três repetições. Foram utilizados dois tipos de matéria-prima (vísceras ou resíduos totais: cabeça, espinha, nadadeiras e vísceras), dois processos de hidrólise (ácida e fermentada), com três metodologias para interrupção dos processos (aquecimento, congelamento ou neutralização). As amostras de cada silagem; nos diferentes tipos de matérias-primas e diferentes processos de hidrólise, foram coletadas durante 636 horas. Os resultados experimentais mostraram que a hidrólise ocorreu em tempos diferentes para as diferentes matérias-primas e processos de hidrólise. Portanto, após caracterização das bandas proteicas nos géis (SDS-PAGE), cromatografia em papel, grau de hidrólise e grupamentos amino livres das silagens produzidos por diferentes matérias-primas, processamentos e métodos de interrupção apresentaram fracionamento proteico diferente com o aumento do tempo de hidrólise. A produção das silagens foram viáveis e apresentaram características nutricionais favoráveis para serem incorporados em dietas para peixes.

Palavras-chave: grau de hidrólise, grupamento amino livres, peptídeos, SDS-PAGE e tilápia

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento mundial na demanda por alimentos e a crescente produção da aquicultura, espera-se também o aumento na disponibilidade de dietas comerciais de alta qualidade para acompanhar esse desenvolvimento. Uma alternativa para o aumento na disponibilidade de alimentos é o aproveitamento de resíduos ou utilização de subprodutos.

A utilização de resíduos de peixe tem sido de interesse crescente nos últimos anos (ROSLAN et al., 2014; SILVA et al., 2014; SRICHANUN et al., 2014). Este subproduto é considerado um material seguro, apresentando alto teor de proteína e valor biológico, além de muitos benefícios nutricionais, devido ao padrão de aminoácidos essenciais (VENUGOPAL et al., 1996; GUERARD et al., 2001). A maioria dos resíduos da aquicultura são ricos em proteínas e enzimas proteolíticas. A proteólise da carne aderida ao esqueleto de tilápia é um processo alternativo para obtenção de silagens, utilizados como fontes de proteína animal (SILVA et al., 2010) que podem ser utilizados como ingredientes em dietas.

A hidrólise pode ocorrer por meio de enzimas proteolíticas já presentes nos peixes. As proteases digestivas são as principais enzimas das vísceras e do trato digestivo. As enzimas presentes nas células musculares também contribuem para a quebra proteolítica. Não há necessidade de adição de enzimas exógenas, e a produção da silagem de resíduo de peixe não requer equipamentos para o processamento, sendo uma operação simples (SHAHIDI et al., 1995).

A produção de silagens também pode empregar um processo autolítico utilizando ácidos ou bases. Na hidrólise ácida, o ácido clorídrico e o fosfórico acidificam a mistura de resíduos moído para um pH menor que 4 e reagem com as proteínas dos peixes (RAA; GILDBERG, 1982), que são completamente hidrolisadas à diferentes graus, em diferentes temperaturas. A silagem é então neutralizada no pH 7,0, concentrando-se como um líquido viscoso; sua propriedade principal é a elevada solubilidade (THAKAR et al., 1991).

A produção de silagens pode ocorrer, também por meio de bactérias ácidas lácticas como agentes da hidrólise (DONG et al., 1983; VAN WYK; HEYDENRYCH, 1985). A fermentação bacteriana é iniciada após a moagem

dos resíduos e a adição de um açúcar fermentável à mistura, que favorece o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, o que é vantajoso porque essas bactérias produzem fatores antimicrobianos que inibem bactérias concorrentes (RAA; GILDBERG; 1982).

A massa molecular da proteína hidrolisada é um dos fatores mais importantes na produção de silagens (ROSSI et. al., 2009). Acompanhar a hidrólise e interromper os processos antes de obter maior proporção de aminoácidos livres, pode aumentar o aproveitamento das silagens pelos peixes e viabilizar a utilização deste produto em dietas práticas. Portanto, faz-se necessário analisar suas características nutricionais e metabólicas, e várias técnicas podem ser aplicadas na obtenção destas informações.

O grau de hidrólise (GH) indica a porcentagem de ligações peptídicas clivadas (ADLER-NISSEN, 1979), um dos parâmetros básicos que descreve as propriedades das silagens e auxilia no controle durante hidrólise de proteínas. Isto é essencial porque várias propriedades das silagens são relacionadas com GH. A hidrólise de ligações peptídicas causa várias alterações, tais como aumento dos grupos amino livres, que afetam certas propriedades do produto, como a viscosidade, a solubilidade e a partição de proteínas (NIELSEN, 1997).

O grupamento amino livre é um método para determinação de aminoácidos livres totais, proposto por Spackman et al. (1958). Este método emprega a ninidrina, produto químico utilizado para a detecção de aminas primárias, principalmente de aminoácidos. A ninidrina reage com grupo amino livre dos α -aminoácidos, entre pH 4 e 8, originando um composto púrpura, que não apresenta sempre a mesma intensidade de coloração. Os aminoácidos prolina e hidroxiprolina são exceções, pois apresentam coloração amarela (MOORE; STEIN, 1948; KAISER et al., 1970).

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos (por comparação com padrões previamente existentes), para a purificação de compostos e para a separação dos componentes de uma mistura. A cromatografia em papel é uma técnica de partição líquido-líquido que se baseia na diferença de solubilidade das substâncias em questão entre duas fases imiscíveis sendo a água, geralmente, um dos líquidos. O solvente é saturado em água e a partição ocorre devido à presença de água em celulose

(papel de filtro). Este método é muito útil para a separação de compostos polares, sendo largamente usado em bioquímica (COLLINS et al., 1993).

O estudo da viabilidade do fracionamento da proteína de silagens de resíduos da filetagem de tilápias para produção de um ingrediente sustentável, com potencial nutricionais a ser incorporado em dietas para peixes está sendo proposto.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi produzir, avaliar e caracterizar a composição física e química das silagens dos resíduos da filetagem de tilápia do Nilo, com diferentes graus de hidrólise.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista e no Laboratório de Enzimologia Aplicada do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil no período de setembro de 2013 a setembro de 2015.

3.1. Produção das silagens

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com doze tratamentos em esquema fatorial 2x2x3, correspondendo a dois tipos de matéria-prima (somente vísceras ou resíduo total da filetagem de tilápia: cabeça, vísceras, restos de musculatura, espinhas e nadadeiras, sem a pele), dois processos de hidrólise (ácida ou fermentada), e três metodologias para interromper os processos de hidrólise (aquecimento, congelamento ou neutralização), com três repetições.

As matérias-primas foram adquiridas *in natura* diretamente de um abatedouro, para obter maior representatividade e uniformidade e foram transportadas em caixas térmicas com gelo. Após serem moídas em moinho de carne e homogeneizadas, foram destinadas aos dois processos de hidrólise. Foram utilizados 36 recipientes plásticos com tampa e capacidade de três litros, cada um compondo uma parcela experimental. A silagem ácida, para as duas matérias-primas, foi produzida pela adição de 2% (p/v) de ácido fosfórico

e 3% (p/v) de ácido acético. Para a produção da silagem fermentada, foram adicionados 15% (p/p) de melaço de cana-de-açúcar, 5% (p/p) de *Lactobacillus* sp., e foram armazenados à temperatura ambiente (28 – 32°C).

Vários pilotos experimentais foram realizados para acompanhar as hidrólises e os métodos utilizados, como também para padronização na preparação das amostras e repetibilidade na caracterização de peptídeos.

Três amostras (de cinco ml) de cada silagem foram coletadas diariamente, de 30 em 30 minutos; cada uma delas foi interrompida por meio de aquecimento, congelamento ou neutralização. O aquecimento dos tubos das amostras coletadas ocorreu por meio de imersão (banho-maria) em água fervente a 100°C durante 15 minutos (ROJAS-GARCIA; RONNESTAD, 2003). O congelamento foi realizado em nitrogênio líquido (-196°C) e a neutralização ocorreu com adição de hidróxido de sódio (NaOH) 1M. Todas as amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C) para posteriores análises laboratoriais.

3.2. Avaliação e caracterização das silagens

A determinação da massa molecular das cadeias proteicas e peptídicas das duas matérias-primas e das amostras das silagens foram realizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis* - NaDodSO₄), Laemmli (1970).

Na preparação, todas as amostras foram liofilizadas, desengorduradas e homogeneizadas em homogeneizador tipo Potter® com tampão TRIS.HCl 0,13M pH 6,8, (1:10 fermentadas e 1:5 ácidas) e foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos, à 4°C. As amostras das silagens ácidas que foram interrompidas por aquecimento e congelamento foram neutralizadas antes da aplicação em SDS-PAGE, pois o ácido interfere no sistema. Para retirada do sal, formado após a neutralização, as amostras foram dialisadas em membrana de diálise *cut off* 2.000 Da, por 24 horas a 8°C e os sobrenadantes foram armazenados em ultrafreezer (-80°C).

Os sobrenadantes foram padronizados nas mesmas concentrações proteicas de 257,18 µg, após quantificação, segundo Hartree (1972), para que fossem aplicadas no gel as mesmas quantidades de proteína de cada silagem.

A migração na eletroforese ocorre de acordo com tamanho, carga ou massa molecular das amostras utilizadas. Com o intuito de separar as proteínas somente por sua massa molecular foi utilizado o β - mercaptoetanol, que reduz as pontes de dissulfeto que mantém a estrutura terciária das proteínas e o SDS (detergente aniônico) que se liga fortemente à proteína desnaturando-a.

Os sobrenadantes das amostras foram totalmente desnaturados por aquecimento na presença do tampão da amostra (TRIS.HCl $0,125\text{mol.L}^{-1}$, pH 6,8, β -mercaptoetanol 100g.L^{-1} , glicerol 100g.L^{-1} , azul de bromofenol 2g.L^{-1} e SDS 15g.L^{-1}). Neste tratamento, as cadeias proteicas adquiriram uma forma alongada cercada de várias moléculas de SDS ao longo da cadeia. Estas estruturas são mantidas pelas repulsões entre as cargas negativas que rodeiam a cadeia polipeptídica, o que impede qualquer dobra da proteína de volta à sua estrutura tridimensional.

O gel de SDS-PAGE foi preparado com 15% de acrilamida, e durante o processo foi utilizada uma corrente elétrica de 120V (LAEMMLI, 1970). A separação no gel ocorre pela diferença das massas moleculares das cadeias proteicas (ALFENAS et al., 1999).

3.3. Cromatografia em papel

Baseado nos SDS-PAGE realizados anteriormente, as amostras em diferentes tempos de hidrólise foram comparadas as migrações de aminoácidos e peptídeos de baixa massa molecular. As amostras das silagens de vísceras e de resíduos totais, ácida e fermentada, em diferentes tempos de hidrólise, juntamente com os padrões leucina 1%, lisina 1% e triptofano 1%, foram aplicados na parte inferior do papel de cromatografia (parte estacionária), que posteriormente foi mergulhado no solvente metanol, ácido acético e n-butanol (parte móvel).

3.4. Grupamento amino livres - Método da ninidrina.

Esse método, segundo Moore (1968), consiste na reação colorimétrica do reagente ninidrina ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$) com os grupos funcionais amino dos aminoácidos. Foi utilizada uma solução padrão contendo $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de nitrogênio com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) em água destilada. A partir desta solução, por diluição, foram utilizadas sete alíquotas, sendo a inicial de 0mL e a final de 1mL, representando concentrações que variaram de 0,5 a $5\mu\text{g}$ de

nitrogênio, a fim de compor a reta padrão para o cálculo de concentração de grupamentos amino livres. Os volumes das alíquotas foram completados para 1mL com água destilada e adicionou-se 1mL de solução de ninidrina.

Para a análise das silagens adicionou-se em cada tubo, 1mL da amostra (400 vezes diluídas) e 1mL de solução de ninidrina. Os tubos foram colocados em banho-maria à 100°C por 15min, e a reação de todos os tubos foi interrompida com a adição de 8mL de etanol 50%. Em seguida, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente, e a absorbância foi determinada a 570nm, para construção da reta padrão e valores de grupamento amino livre.

3.5. Grau de hidrólise - Método TNBS (ácida trinitrobenzenosulfônico)

O grau de hidrólise (GH) é definido como a porcentagem de ligações peptídicas clivadas (ADLER-NIESEN, 1979). Para calcular o grau de hidrólise, foi utilizado o método do TNBS segundo Adler-Niessen (1979), modificado por Benjakul e Morrissey (1997). O GH foi calculado como a proporção (%) de grupamento amino livres liberados após hidrólise com relação ao grupamento amino total em cada amostra.

$$GH = [(Lt - L0) / (Lmax - L0)] \times 100$$

Sendo:

Lt = quantidade de grupamento amino liberado no tempo t

L0 = quantidade de grupamento amino na amostra inicial

Lmax = quantidade de grupamento amino obtido após hidrólise total

As reações da solução padrão ocorreram com a substituição da amostra por L-leucina $1,5 \times 10^{-3}$ M em SDS 1% e do branco por SDS 1% (dodecil sulfato de sódio - NaDodSO₄). Foram utilizados 125 µL de amostra 150 vezes diluída. As amostras das silagens de vísceras e total ácidas (SVA e STA) foram padronizadas com 9,81µg de proteína e as amostras das silagens de vísceras e total fermentadas (SVF e STF) com 11,0 µg de proteína. Foram adicionados 2mL de tampão fosfato 0,2125M pH 8,2 e 1mL de TNBS 0,01%. As amostras e solução padrão foram levadas ao banho-maria a 50°C por 30 minutos, no escuro, pois a reação é fotossensível. Posteriormente, foram adicionados 2mL de sulfito de sódio 0,1M para interromper a reação, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos, e a absorbância foi determinada a 420 nm.

3.6. Análises laboratoriais

As amostras das silagens foram analisadas segundo AOAC (2000) para determinação dos teores de umidade, pelo método gravimétrico, em estufa a 105°C até peso constante, de cinza pelo método gravimétrico em mufla a 550°C, de extrato etéreo pelo método de Soxhlet no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do CAUNESP.

As análises de energia bruta foram realizadas em bomba calorimétrica de Parr e de proteína bruta pelo analisador de nitrogênio LECO FP-428 no Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

As análises de aminoácidos totais foram realizadas por hidrólise ácida e cromatografia de troca iônica (HPLC), no Laboratório de Fontes Proteicas do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP/ Campinas.

4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os resultados experimentais, foi avaliada a normalidade dos erros e também a homogeneidade da variância; atendida as pressuposições, foi realizada análise de variância (ANOVA). Encontrando interação significativa entre os efeitos dos fatores estudados, foi realizado o desdobramento dos tratamentos. Observando diferenças significativas entre as variáveis analisadas, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistical Analyses System (SAS) versão 9.2.

5. RESULTADOS

5.1. Análise das silagens

Dentre as características organolépticas das silagens, as colorações apresentaram-se bem distintas entre os processamentos ácida e fermentada, nos quais o primeiro apresentou coloração cinza e o segundo, marrom (Figura 1). O odor ácido, principalmente do ácido acético (característico do vinagre) foi predominante dos SVA e STA. Nos SVF e STF o odor de melaço foi o predominante. Nas primeiras 24 horas a gordura dos SVA e SVF se liquefizeram totalmente. Nos STA e STF a gordura se liquefez a partir das 72

horas e terminou entre 120 e 152 horas. Os SVA e SVF apresentaram aspecto líquido em dois dias, enquanto os STA e STF apresentaram aspecto pastoso e ao longo do tempo se tornaram viscosos.

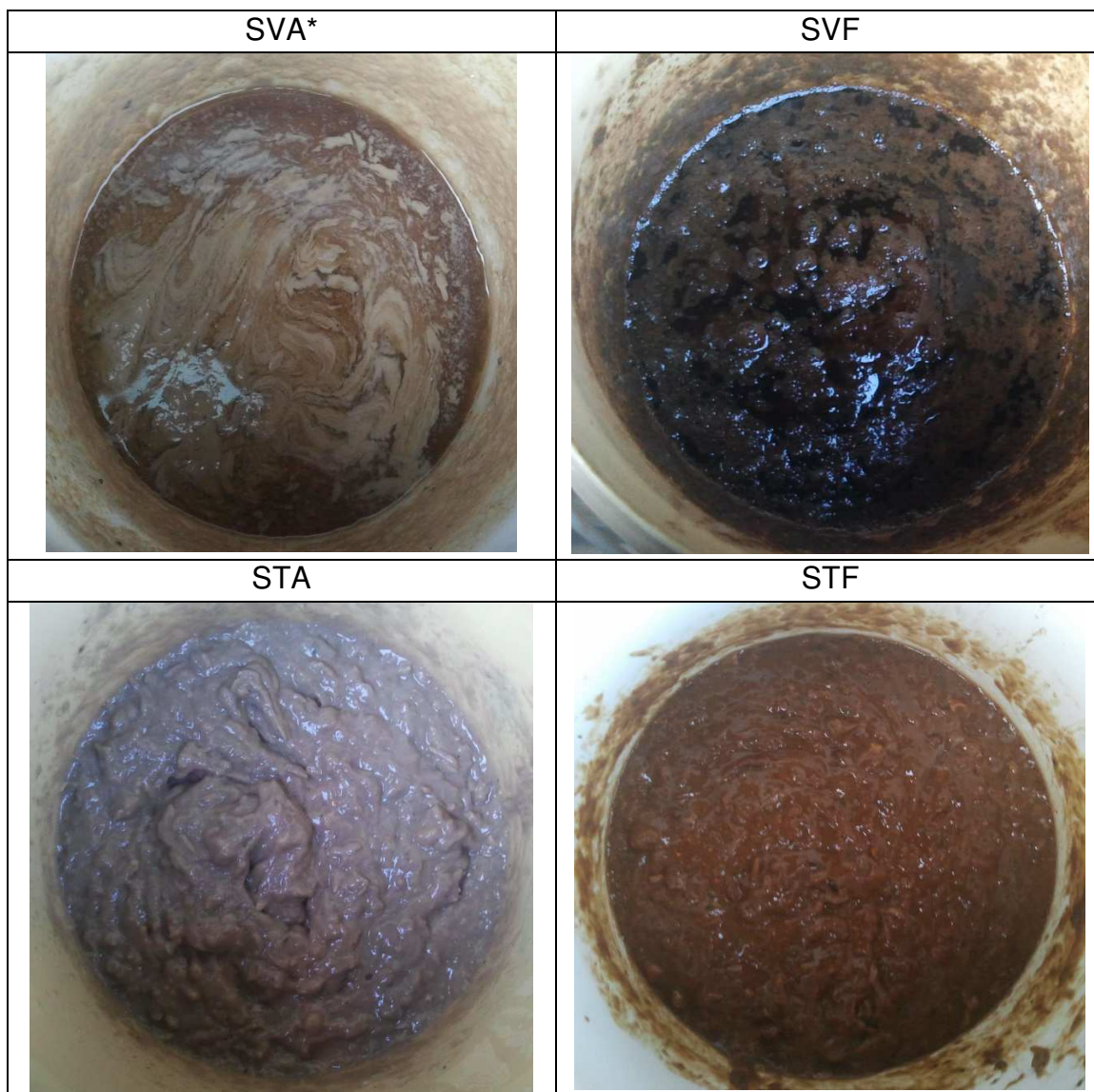


Figura 1. Silagens de resíduo de filetagem de tilápia.

*SVA = silagem de vísceras ácida, SVF = silagem de vísceras fermentada, STA = silagem total ácida e STF = silagem total fermentada.

Nas características químicas, pela composição bromatológica (Tabela 1), o teor de matéria seca (MS) do STF foi maior que das outras silagens. Para o teor de proteína bruta (PB), o STA apresentou o maior valor e os produtos SVA e SVF apresentaram os menores valores, sendo metade dos valores apresentados pelas silagens totais, STA e STF. O teor de extrato etéreo (EE) foi muito maior no SVA e os produtos STA e STF apresentaram os menores

valores, sendo metade das silagens de vísceras, SVA e SVF. Os teores de matéria mineral (MM) e energia bruta (EB) foram maiores nos SVA e SVF.

Tabela 1. Composição bromatológica das silagens dos resíduos de filetagem de tilápias.

Silagens	MS (%)	PB(%) ²	EE(%) ²	MM(%) ²	EB (kcal.kg ⁻¹)
¹ SVA	50,91±0,16 ^{ab*}	15,85±0,28 ^c	74,82±0,71 ^a	6,99±0,01 ^a	7700,26±43,91 ^a
SVF	48,53±0,39 ^c	15,45±0,54 ^c	64,17±0,95 ^b	6,96±0,04 ^a	6893,48±158,90 ^a
STA	50,07±0,29 ^{bc}	33,84±0,05 ^a	31,32±1,03 ^c	6,70±0,02 ^b	5348,63±153,62 ^b
STF	52,10±0,16 ^a	31,32±0,26 ^b	35,64±0,17 ^c	6,72±0,02 ^b	5215,29±10,78 ^b
Valor de p	0,005	<0,001	<0,001	0,004	0,001

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). (Média±erro padrão da média).

¹SVA = silagem de vísceras ácida, SVF = silagem de vísceras fermentada, STA = silagem total ácida e STF = silagem total fermentada

² % em relação a MS

Houve efeito dos tipos de matéria-prima, dos tipos de processamentos, e dos três métodos de interrupção dos processos de hidrólise (Tabela 2). Houve também a interação entre os três fatores, influenciando diretamente os teores de proteína bruta (PB) e energia bruta (EB) das silagens, apresentando diferentes características (Tabela 3).

Tabela 2. Resultados das análises de variância e dos testes de comparação das médias para os parâmetros de produção das silagens de resíduo de filetagem de tilápias.

Valores de F para:	PB (%)	EB(Kcal.kg ⁻¹)
Tipo de processamento (AF)	453,15*	2023,89*
Tipo de matéria-prima (VT)	11753,13*	12025,88*
Tipo de interrupção (ACN)	647,00*	1694,61*
AFxVT	39,98*	3486,67*
AFxACN	874,79*	3587,63*
VTxACN	279,95*	610,18*
AFxVTxACN	365,23*	988,34*
<i>Coefficiente de variação</i>	<i>8,28</i>	<i>22,49</i>
Processamento	Médias	
Ácido (A)	19,24	5619
Fermentado (F)	17,51	5985
Matéria-prima		
Vísceras (V)	13,97	6249
Total (T)	22,78	5355
Interrupção		
Aquecimento (A)	19,43	5564
Congelamento (C)	16,30	5717
Neutralizado (N)	19,39	6126

* - significativo ao nível de 5%

Tabela 3. Desdobramento dos tratamentos para as médias de proteína bruta (PB) e energia bruta (EB) das silagens de vísceras (V) ou total (T), ácida (A) ou fermentada (F), após interrupção dos processos de hidrólise por aquecimento, congelamento e neutralização (n=3).

Análise	Silagens	Interrupção ²		
		Aquecimento	Congelamento	Neutralização
PB	SVA	15,30±0,34 ^{Ac1}	14,85±0,13 ^{Bc}	13,78±0,11 ^{Bc}
	STA	28,84±0,34 ^{Aa}	20,63±0,12 ^{Ca}	22,26±0,11 ^{Ba}
	SVF	12,24±0,27 ^{Bd}	9,40±0,44 ^{Cd}	18,40±0,20 ^{Ab}
	STF	21,38±0,19 ^{Bb}	20,40±0,13 ^{Cb}	23,21±0,24 ^{Aa}
EB	SVA	5185±30,14 ^{Cc}	6507±12,06 ^{Ba}	7258±13,87 ^{Aa}
	STA	4613±48,58 ^{Cd}	5147±15,63 ^{Bd}	5227±11,37 ^{Ad}
	SVF	6559±13,01 ^{Aa}	5748±34,69 ^{Cc}	6303±12,53 ^{Bb}
	STF	5695±37,45 ^{Bb}	5917±14,05 ^{Ab}	5715±8,54 ^{Bb}

¹Médias seguidas de mesma letra (maiúscula na linha e minúscula na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0.05$). (Média±erro padrão da média).

²Tempo de 72 horas de hidrólise

As médias dos resultados de proteína bruta (PB) foram maiores nas silagens produzidas pelos resíduos totais da filetagem de tilápia (STA e STF). Comparando estas silagens, o maior teor de PB (28,84%) foi encontrado no STA, interrompido por aquecimento, e o menor teor (9,40%) no SVF. Nas médias dos resultados para energia bruta (EB), o maior teor foi encontrado no SVA (7258 kcal), interrompido pela neutralização, e o menor no STA (4613 kcal), interrompido pelo aquecimento. O STA interrompido por aquecimento apresentou o maior teor de PB e o menor de EB.

Os teores de aminoácidos totais das silagens são compatíveis com as matérias-primas utilizadas (Tabela 4). Dentre os métodos de processamento, os teores dos aminoácidos foram diferentes mesmo sendo produzidos com a mesma matéria-prima. As silagens que foram produzidos pelo processamento ácido apresentaram maiores teores de aminoácidos totais que os produzidos por processamento fermentado, independente da matéria-prima utilizada.

Tabela 4. Composição em aminoácidos das silagens de resíduos de vísceras ou total após processamento de hidrólise ácida ou fermentada (%).

Aminoácidos	HVA	HVF	HTA	HTF
ASP	1,15	0,86	2,04	0,98
GLU	1,60	1,52	2,84	1,95
SER	0,17	0,16	2,21	2,53
HPR	0,60	0,38	1,32	0,95
GLY	0,69	0,59	2,57	2,34
HIS	0,23	0,15	0,52	0,30
TAU	0,56	0,43	0,54	0,42
ARG	0,96	0,89	3,43	2,81
THR	0,48	0,37	0,86	0,69
ALA	0,71	0,61	2,05	1,92
PRO	0,57	0,49	2,30	2,17
TYR	0,44	0,32	0,76	0,57
VAL	0,61	0,53	1,27	1,09
MET	0,36	0,24	0,81	0,62
CYS	0,09	0,06	0,11	0,04
ILE	0,58	0,40	1,09	0,74
LEU	1,04	0,82	1,91	1,41
PHE	0,60	0,40	1,29	0,93
TRP	0,03	0,06	0,04	0,07
LIS	1,11	0,95	2,39	1,74
Total	12,58	10,23	30,35	24,27

SVA = silagem de vísceras ácida, SVF = silagem de vísceras fermentada, STA = silagem total ácida e STF = silagem total fermentada

5.2. Avaliação peptídica das silagens e tempos de interrupção

Foram produzidos quatro géis, um para cada tipo de silagem (SVA, SVF, STA e STF) nos três métodos de interrupção (Figura 2).

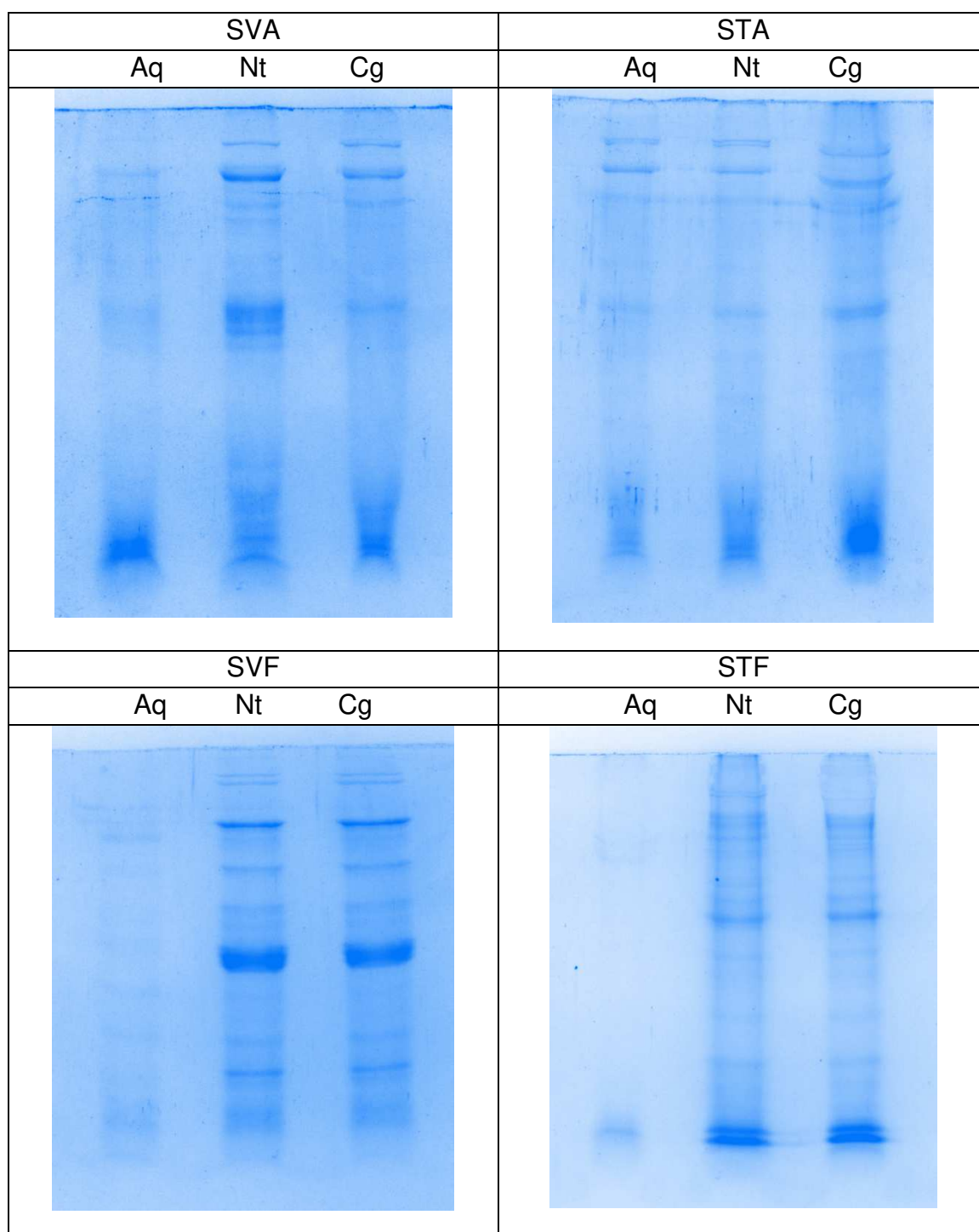


Figura 2. SDS-PAGE das amostras dos SVA, SVF, STA e STF após interrupção por aquecimento (Aq), neutralização (Nt) e congelamento (Cg).

Os diferentes tipos de matérias-primas, vísceras ou resíduos totais, e os processamentos, ácido ou fermentado, apresentaram diferentes padrões nas bandas proteicas nos diferentes métodos de interrupção nos processos de hidrólise. Estes resultados mostram que mesmo as silagens apresentando concentração proteica iguais (padronizadas 257,18µg) os métodos de

interrupção modificaram as proteínas das silagens e o aquecimento foi o que mais alterou o perfil das bandas proteicas.

Os resultados de SDS-PAGE das silagens em diferentes tempos de hidrólise são apresentados na Figura 3.

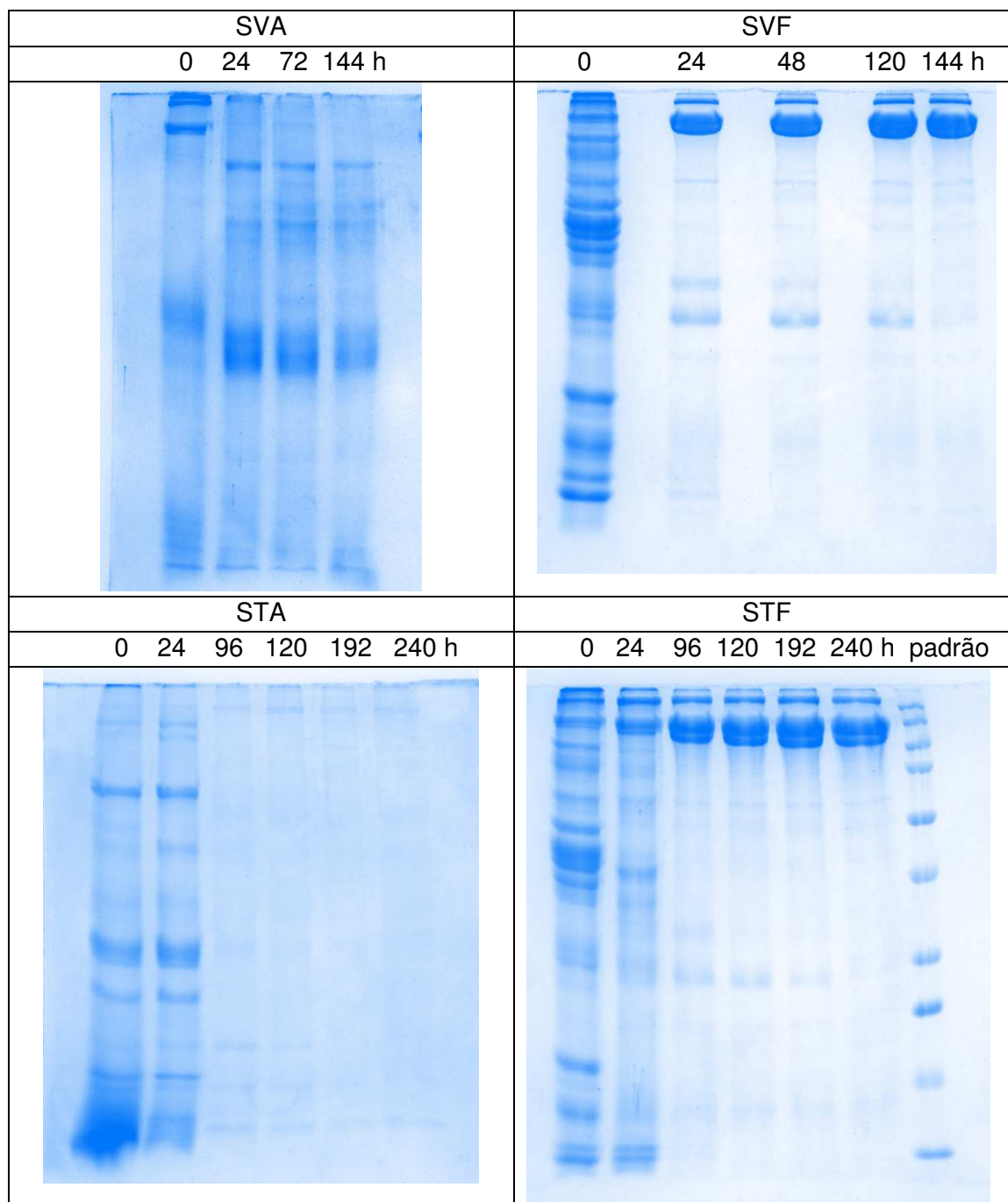


Figura 3. SDS-PAGE das amostras das silagens em diferentes tempos de hidrólise, sendo aplicados 136,36 µg de proteína em gel de 15% e voltagem de 120 V, e padrão proteico no ultimo poço do STF.

5.3. Cromatografia em papel

Os resultados das cromatografias em papel são apresentados na Figura 4.

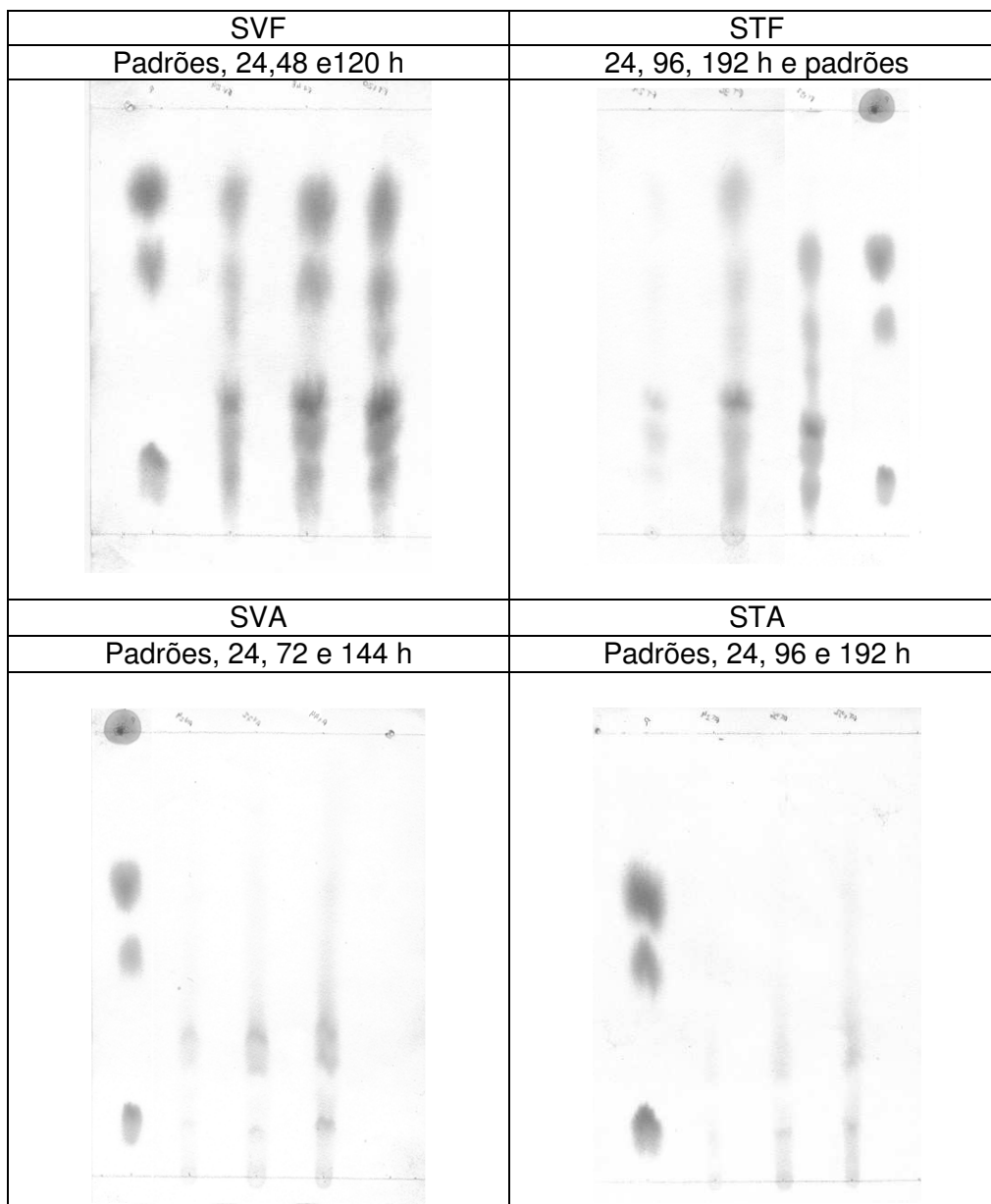


Figura 4. Cromatografia em papel das amostras SVF com 24, 48 e 120 horas de hidrólise, STF com 24, 96 e 192 horas de hidrólise, SVA com 24, 72 e 144 horas de hidrólise, STA com 24, 96 e 192 horas de hidrólise, padrões leucina 1%, lisina 1% e triptofano 1%).

Foi possível observar que o aumento no tempo de hidrólise promoveu também um aumento no halo de dispersão dos aminoácidos, mostrando que há maiores teores de aminoácidos livres nos maiores tempos de hidrólise.

5.4. Grupamento amino livres

Os resultados dos teores de grupamento amino livres foram quantificados pelo método da ninidrina e são observados na Tabela 5. Com o aumento no tempo de hidrólise, aumentou também a quantidade de grupamento amino livres, mostrando que a hidrólise foi maior conforme aumentou seu tempo.

Tabela 5. Grupamento amino livre (GAL) pelo método de ninidrina das silagens, ácida total (STA) ou fermentanda total (STF), em diferentes tempos de hidrólise (n=3).

Tempo de hidrólise Horas (h)	GAL	
	STA	STF
0	100,32±3,34 ¹	95,42±4,4
24	132,09±1,67	148,27±36,7
96	700,57±1,62	312,66±5,02
192	876,13±10,03	686,17±32,2
240	1007,14±12,89	1720,55±29,27
300	1678,33±9,35	5216,64±19,40
468	1956,57±9,02	6336,20±13,46
636	2325,75±12,99	6853,69±31,71

¹(Média±desvio padrão da média).

Estes resultados mostram que a hidrólise do STF ocorreu mais lentamente quando comparada a STA até cerca de 192 horas. Após este tempo de hidrólise o STA desacelerou seu processo de hidrólise e o STF apresentou mais grupamentos amino livres. O STA no tempo de 96 horas de hidrólise apresentou quantidades aproximadas de grupamento amino livre comparado com o STF no tempo de 192 horas de hidrólise.

5.5. Grau de hidrólise (GH)

Para o cálculo do grau de hidrólise, foi utilizado o método do TNBS. Os resultados do grau de hidrólise das amostras das silagens em diferentes tempos de hidrólise são apresentados na Tabela 6.

Estes resultados mostram que a hidrólise ácida do STA ocorreu mais rapidamente que a fermentada do STF. Os STA e STF apresentam cerca de 50% de grau de hidrólise nos tempos de 96 horas e 192 horas, respectivamente.

Tabela 6. Grau de hidrólise (GH) das silagens, ácida total (STA) ou fermentada total (STF), em diferentes tempos (horas – h) de hidrólise (n=3).

Tempo de hidrólise (h)	GH (%)	
	STA	STF
0	0	0
24	5,30	3,01
96	46,98	28,30
192	67,35	49,57
240	68,81	69,29
300	83,3	74,92
468	94,84	89,34
636	99,99	100,01

6. DISCUSSÃO

A produção das silagens por processamento ácido e fermentado foram viáveis e de fácil desenvolvimento. Nos diferentes pilotos experimentais executados anteriormente, foram confirmados a repetibilidade dos resultados dos teores de PB e aparecimento das mesmas bandas proteicas nos SDS-PAGE.

As análises de caracterização peptídica dos SDS-PAGE apresentaram resultados diferentes dos encontrados na análise do teor de proteína bruta. O maior teor de PB foi encontrado no STA (28,84%) após interrupção com aquecimento. Por outro lado, esta amostra no SDS-PAGE apresentou bandas proteicas menos evidentes, mesmo as amostras apresentando concentrações proteicas iguais (257,18µg). Esta diferença pode estar ligada aos diferentes métodos utilizados na interrupção das silagens. O método de dosagem de nitrogênio pelo LECO é baseado na quantidade de nitrogênio total. Portanto, as amostras deveriam apresentar teores de PB bruta similares quando utilizada a mesma matéria-prima no processamento.

Os resultados dos teores de aminoácidos totais foram diferentes entre as matérias-primas e ao tipo de processamento na produção da silagem. Os menores teores de aminoácidos presente nas silagens fermentadas podem ser devido a presença de microrganismos acidoláticos que provavelmente os utilizaram como fonte de energia.

As amostras que foram interrompidas pelo método de aquecimento apresentaram, em geral, valores maiores em relação ao método de congelamento. Contudo, o método da neutralização apresentou valores menores, o que provavelmente está ligado ao fato da mesma, possivelmente, interferir na dosagem de proteína bruta, pela formação de sais. O SDS-PAGE mostrou que quando ocorre interrupção da hidrólise por aquecimento, a desnaturação proteica fica bem evidente, pela menor quantidade de bandas proteicas em relação aos outros métodos de interrupção; certamente o aquecimento acelerou a hidrólise, resultando em moléculas muito pequenas.

A utilização do método de interrupção da hidrólise por congelamento com nitrogênio líquido apresentou os menores valores proteicos. Este método de interrupção foi descartado para os novos estudos de processamento por ser oneroso e menos eficiente.

Os resultados de GH e GAL mostraram que cerca de 50% da proteína está hidrolisada nos tempos de 96 e 192 horas para os STA e STF, respectivamente e seus teores de grupamento amino livres são equivalentes nestes tempos de hidrólise.

Com os resultados das análises dos teores de PB e SDS-PAGE, o melhor método para interrupção dos processos de hidrólise foi a neutralização das silagens com hidróxido de sódio (NaOH). O NaOH é um produto simples, facilmente adquirido, e viável, por apresentar baixo valor de comercialização.

7. CONCLUSÃO

A caracterização peptídica as silagens produzidas por diferentes matérias-primas, processamentos e métodos de interrupção apresentaram fracionamento proteico diferente com o aumento do tempo de hidrólise. A produção das silagens foram viáveis e apresentaram características favoráveis para utilização deste produto em dietas para peixes.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa (Processo 2013/16773-9). Ao Prof. Dr. José Otávio e piscicultura Tuiuiú pela doação dos resíduos para produção das silagens. Ao Prof. Dr. João Pizauro Jr. e aos alunos do laboratório de Enzimologia Aplicada a Agropecuária

pelo auxílio na realização das eletroforeses. Ao Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti e sua técnica Jackeline Zanella pelo auxílio na execução das cromatografias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food feed protein hydrolysates by trinitrobenzene sulfonic acid. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Washington, v.27, p.1256–1262, 1979.

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viosa, MG: SIF, 1999. 242 p.

AOAC. **Official Methods of Analysis**, 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 2000.

BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Washington, v.45, p.3423–3430, 1997.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

DONG, F.M.; FAIRGRIEVE, W.T.; SKONBERG, D.I.; RASCO, B.A. Preparation and nutrient analyses of lactic acid bacteria ensiled salmon viscera, **Aquaculture**, Amsterdam, v.109, p.351, 1993.

GUERARD, F.; DUFFOSE, L.; DE LA BROISE, D.; BINET, A. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.11, p.1051-1059, 2001.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v.48, p.422-427, 1972.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P.I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v.34, p.595, 1970.

KOTZAMANIS, Y.P.; GISBERT, E.; GATESOUBE, F.J.; ZAMBONINO INFANTE, J.; CAHU, C. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Comparative Biochemistry Physiology**, London, v.147A, p.205–214, 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 4.ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2004.

MOORE, S.; STEIN, W. H. Photometric Ninhydrin Method for use in the chromatography of amino acids. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v.136, p.367,1948.

MOORE, S. Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v.243, n.23, p.6281-6283,1968.

NIELSEN, P. M. Functionality of protein hydrolysates. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Ed.). **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1997.

RAA, J.; GILDBERG, A. Fish silage: a review. **Critical Review Food Science and Nutrition**, Malden, v.16, n.4, p.383-419, 1982

ROJAS-GARCÍA, C.R.; RØNNESTAD, I. Assimilation of dietary free amino acids, peptides and protein in post-larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Marine Biology**, Heidelberg, v.142, p.801-808, 2003.

ROSLAN, J.; YUNOS, K.F.M.D.; ABDULLAH, N.; KAMAL, S.M.M. Characterization of fish protein hydrolysate from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by- product. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, Amsterdam, v.2, p.312 – 319, 2014.

ROSSI, D.M.; FLÔRES, S.H.; HECK, J.X.; AYUB, M.A.Z. Production of high-protein hydrolysate from poultry industry residue and their molecular profiles. **Food Biotechnology**, London, v.23, n.3, p.229-242, 2009.

SHAHIDI, F.; HAN, X-Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, London, v.53, p.285, 1995.

SILVA, J.F.X.; RIBEIRO, K.; SILVA, J.F.; CAHÚ, T.B., BEZERRA, R. Utilization of tilápia processing waste for the production offish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, New York, v.196, p.96–106, 2014.

SILVA, V.M.; PARK, K.J.; HUBINGER, A. D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of mussel meat. **Journal of Food Science**, Oxford, v.75, n.1, p.36-42, 2010.

ŠLIŽYTĖ, R., DAUKŠAS, E., FALCH, E., STORRØ, I., RUSTAD, T. Characteristics of protein fractions generated from cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, Barking, v. 40, p. 2021-2033, 2005.

SPACKAM, D.H.; STEIN, W.H.; MOORE, S. “Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids”. **Analytical Chemistry**, Washington, v.30, p.1190, 1958.

SRICHANUN, M.; TANTIKITTI, C.; KORTNER, T.M.; KROGDAHL, A.; 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**, Amsterdam, v.428, p.195–202, 2014.

THAKAR, P.N.; PATEL, J.R.; JOSHI, N.S. Protein hydrolysates: a review, **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v.44, n.9, p.557, 1991.

VAN WYK, H.J.; HEYDENRYCH, C.M.S. The production of naturally fermented fish silage using various lactobacilli and different carbohydrate sources. **Journal of the Science and Food Agriculture**, Chichester, v.36, p.1093, 1985.

VENUGOPAL, V.; CHAWLA, S.P.; NAIR, P.M. Spray-dried protein powder from threadfin beam: preparation, properties and comparison with FPC type B. **Journal of Muscle Foods**, Malden, v.7, p.55-58, 1985.

CAPÍTULO 3 - DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E ENERGIA DE SILAGENS DE RESÍDUOS DE TILÁPIA DO NILO.

RESUMO - Os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes de um ingrediente dependem tanto de sua composição quanto da habilidade do animal para o seu aproveitamento. O objetivo deste trabalho foi determinar os coeficientes de digestibilidade aparente de proteína bruta (CDA_{PB}), energia bruta (CDA_{EB}), lisina (CDA_{Lys}) e metionina (CDA_{Met}) de silagens de resíduos de filetagem de tilápia do Nilo com diferentes tempos de interrupção da hidrólise em dietas para juvenis de tilápia do Nilo. Foram utilizados 720 juvenis de tilápia do Nilo ($9,36 \pm 0,74$ g) distribuídos em 36 caixas (150L). Foram formuladas 12 dietas-teste constituídas de 69,5% de uma dieta referência, 0,5% de óxido de cromo III e 30% de silagem (ácida ou fermentada), produzido com vísceras ou com resíduos totais, em tempos diferentes de hidrólises. Os peixes foram alimentados durante sete dias, e no oitavo, foi realizada a coleta das fezes a cada 30 minutos. As médias dos CDA da proteína, lisina e metionina das silagens variaram de 91,75% a 95,80%. Os menores valores de CDA foram encontrados para energia bruta que variaram de 79,30% a 83,62%. As silagens apresentam potencial como fonte de nutrientes para ser utilizado em dietas práticas para a tilápia do Nilo, podendo contribuir para melhorar o desempenho e seu crescimento.

Palavras-Chaves: energia bruta, lisina, metionina, proteína bruta e nutrição

1. INTRODUÇÃO

Para o aumento na produção sustentável de peixes torna-se necessária a utilização de dietas balanceadas e, principalmente, com nutrientes de alta digestibilidade. A produção de tilápia do Nilo no Brasil ultrapassou 198 mil toneladas (IBGE, 2014). As tilápias aproveitam bem os nutrientes disponíveis nas dietas, mas seu rendimento de filé é de 30% (RUTTEN et al., 2005; NGUYEN et al., 2010) gerando grande volume de resíduos. O aproveitamento de resíduos ou utilização de subprodutos da própria aquicultura pode elevar a produção de um ingrediente para ser adicionado as dietas comerciais.

Para utilização de um novo ingrediente na nutrição animal, é necessário conhecer suas características nutricionais e o aproveitamento de seus nutrientes pela espécie. Os coeficientes de digestibilidade aparente de um ingrediente estão altamente correlacionados ao seu aproveitamento dos nutrientes pelos peixes (OLIVEIRA FILHO; FRACALLOSSI, 2006). Além disso, a baixa digestibilidade dos ingredientes é um dos principais fatores que impactam os efluentes das pisciculturas; pequenas mudanças na formulação das dietas podem minimizar estes efeitos (CHO; BUREAU, 2001).

As silagens de resíduos de peixes têm sido utilizados como substitutos da farinha de peixe em dietas para peixes com o objetivo de melhorar o crescimento e a sobrevivência (HARDY, 1991; JEON et al., 2000; LIASET et al., 2000). O objetivo principal da produção das silagens de resíduos é recuperar o máximo possível dos nutrientes disponíveis, mantendo a alta qualidade pelo padrão de aminoácidos (TAHERI et al., 2011).

Atualmente, não são encontrados na literatura científica, trabalhos que envolvam análises de coeficientes de digestibilidade aparente, tipos de processamentos e matérias-primas ou produção de silagens com diferentes tempos de hidrólises, o que poderia contribuir com a viabilidade de seu uso como ingrediente na formulação de dietas para peixes.

2. OBJETIVO

Determinar os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDA_{PB}), energia bruta (CDA_{EB}), lisina (CDA_{Lys}) e metionina (CDA_{Met}) das silagens ácida ou fermentada, produzidas com dois resíduos de filetagem de tilápia do Nilo e diferentes tempos de hidrólise em dietas para juvenis de tilápia do Nilo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio experimental foi realizado na Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) e conduzido de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA), protocolo nº 018777/13.

3.1. Material biológico e manejo

O ensaio de digestibilidade foi realizado segundo um Delineamento Inteiramente Casualizado com doze tratamentos, correspondendo a quatro tipos de silagens (vísceras ácida – SVA / vísceras fermentada – SVF / resíduo total ácida – STA e resíduo total fermentada - STF) com três tempos de hidrólise (escolhidos previamente no ensaio de produção e de avaliação peptídica das silagens) e três repetições. Foram utilizados 720 alevinos de tilápia do Nilo ($9,36 \pm 0,74g$), distribuídos em 36 aquários de fibrocimento com capacidade de 150 litros submetidos a um período de adaptação com duração de 15 dias.

A água de cada aquário foi mantida sob aeração constante sendo os parâmetros físico-químicos, como oxigênio dissolvido (OD) e temperatura monitorados diariamente (oxímetro YSI 55). A condutividade e o pH foram mensurados semanalmente; todos apresentaram-se dentro dos parâmetros exigidos pela espécie (Tabela 1). A renovação de água dos aquários foi de aproximadamente 3,5 vezes ao dia com água proveniente de poço artesiano. À cada dois dias, foi realizada a sifonagem das unidades experimentais para retirada do excesso de excretas e manter a qualidade da água.

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários durante o período experimental.

PARÂMETROS	MÉDIA
Temperatura (°C)	29,33 ± 2,01*
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	5,14 ± 0,29
pH	8,03 ± 0,11
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	175,20 ± 0,47
Alcalinidade (µg L ⁻¹)	89,09 ± 0,33
Amônia (µg L ⁻¹)	44,86 ± 10,13
Nitrato (µg L ⁻¹)	7,39 ± 2,57
Nitrito (µg L ⁻¹)	105,95 ± 6,99
Fósforo Total (µg L ⁻¹)	25,79 ± 15,06

*Médias ± erro padrão da média

3.2. Dietas experimentais

Foram realizadas análises bromatológicas dos ingredientes e das silagens para a formulação de uma dieta referência com ingredientes práticos (Tabela 2), atendendo as exigências nutricionais para a tilápia do Nilo (NRC, 2011).

Tabela 2. Composição da dieta referência utilizada no ensaio de digestibilidade.

Ingredientes	% Inclusão
Farelo de soja	36,00
Quirera de arroz	20,00
Milho	15,00
Farelo de trigo	10,00
Glúten de milho	4,00
Farinha de tilápia	3,00
Ácido Glutâmico	3,10
Óleo de soja	3,00
Fosfato bicálcico	1,95
Calcário	1,95
Celulose	1,50
Sup. Vit e Min ¹	0,50

¹Suplemento vitamínico e mineral: ácido fólico (1.250 mg); pantotenato de cálcio (1.200 mg);cobre (2.500 mg); ferro (15 g); iodo (375 mg); manganês (12,5 g); selênio (87,5 mg); zinco (12,5 mg); cobalto (125 mg); Vit A (2.500 UI); Vit B12 (4.000 mg); Tiamina B1 (4.000 mg); Riboflavina B2 (4.000 mg); Piridoxina B6 (4.000 mg); Vit C (50.000 mg); Vit D3 (600.000 UI); Vit E (37.500); Vit K3 (3.750 mg); niacina (122.500 mg); biotina (15 mg)

Doze dietas-testes foram constituídas de 69,5% da dieta referência, acrescidas em 30% alternativamente para cada uma das 12 silagens, ácidas ou fermentadas, produzidos com vísceras ou resíduo total em três diferentes tempos de hidrólise (SVF 24, 48 e 120 horas, SVA 24, 72 e 144 horas, STA e

STF 24, 96 e 192 horas de hidrólise) e 0,5% de óxido de cromo III como marcador inerte (Tabela 3). Todas as dietas foram peletizadas em moinho de carne e secas em estufa de ventilação forçada (55°C), durante 24 horas. A alimentação ocorreu três vezes ao dia com fornecimento de dieta referência até saciedade aparente.

Tabela 3. Composição bromatológica e aminoacídica das dietas-teste e referência do ensaio de digestibilidade com juvenis de tilápia do Nilo

Dietas teste ¹	SVA			SVF			STA			STF			REF. ³
	Tempo (h) ²	24	72	144	24	48	120	24	96	192	24	96	
MS(%)	96,77	98,66	98,90	98,54	98,21	97,69	98,97	97,35	98,13	98,01	98,55	97,33	98,35
PB (%)	29,28	30,03	32,97	29,31	29,64	29,41	35,62	35,93	35,71	33,47	34,80	33,38	35,39
FB (%)	6,85	10,96	7,51	4,03	4,61	4,19	6,28	5,93	6,79	6,53	5,89	5,23	4,75
EE (%)	24,26	18,04	16,75	19,92	20,86	22,57	16,52	15,70	13,01	16,07	13,45	14,00	6,81
EB (kcal.kg-1)	5273	4962	4806	5116	5162	5260	4724	4787	4654	4868	4806	4722	4499
Composição aminoacídica na dieta (%)													
Aspartato	2,66	2,28	3,06	2,64	2,67	2,48	3,15	3,22	3,17	2,83	3,09	3,09	3,24
Glutamato	7,45	7,41	8,43	7,31	7,65	7,5	7,92	8,25	8,67	7,53	8,25	8,25	9,64
Hidroxiprolina	0,2	0,19	0,22	0,18	0,19	0,19	0,89	0,73	0,72	0,63	0,6	0,43	0,24
Serina	1,06	1,19	1,26	1,2	1,12	1,21	1,39	1,43	1,52	1,35	1,42	1,29	1,45
Glicina	1,27	1,33	1,37	1,29	1,27	1,31	2,39	2,25	2,23	2,03	2,13	1,81	1,57
Taurina	0,2	0,22	0,22	0,19	0,21	0,18	0,27	0,25	0,28	0,25	0,19	0,19	0
Alanina	1,49	1,52	1,69	1,52	1,54	1,57	2,05	2,01	2,12	1,93	1,79	1,7	1,56
Prolina	1,7	2,25	1,92	1,72	1,75	1,76	2,28	2,25	2,66	2,25	1,86	1,74	1,73
Tirosina	1,01	1,06	1,13	0,99	0,92	0,91	1,08	1,11	1,2	1,06	1,11	1,08	1,21
Cisteína	0,19	0,19	0,22	0,19	0,2	0,17	0,19	0,15	0,16	0,11	0,18	0,18	0,17
Arginina	1,79	1,9	2,03	1,83	1,8	1,77	2,37	2,36	2,49	2,09	2,34	2,06	2,33
Treonina	1,13	1,09	1,24	1,11	1,09	1,15	1,26	1,32	1,38	1,32	1,11	1,21	0,99
Histidina	0,51	0,58	0,57	0,56	0,52	0,58	0,59	0,67	0,7	0,62	0,65	0,56	0,57
Valina	1,38	1,43	1,51	1,38	1,39	1,42	1,54	1,6	1,69	1,51	1,63	1,58	1,66
Metinina	0,47	0,48	0,54	0,45	0,47	0,47	0,62	0,59	0,61	0,56	0,58	0,55	0,54
Isoleucina	1,18	1,17	1,29	1,14	1,16	1,16	1,25	1,29	1,32	1,21	1,37	1,31	1,46
Leucina	2,33	2,38	2,66	2,34	2,37	2,41	2,62	2,63	2,8	2,56	2,7	2,65	3,05
Phenilalanina	1,55	1,52	1,74	1,54	1,58	1,51	1,67	1,71	1,79	1,64	1,73	1,65	1,9
Lisina	1,55	1,64	1,67	1,56	1,52	1,48	1,89	1,94	2,01	1,78	1,89	1,84	1,91
Triptofano	0,17	0,2	0,21	0,17	0,2	0,19	0,2	0,17	0,19	0,2	0,18	0,2	0,18

¹Valores com base na MS.

²Tempo (h) = tempo de hidrólise (SVF 24, 48 e 120, SVA 24, 72 e 144, STA e STF 24, 96 e 192)

³REF. = Dieta Referência

3.3. Coleta de fezes

No período de adaptação, os peixes receberam a dieta referência durante seis dias, até a saciedade aparente, duas vezes ao dia (8h30min e 17h30min). No sétimo dia, os animais foram alimentados três vezes (8h30min, 17h30min e 22h30min), e no oitavo dia, foram utilizados 16 coletores de fibra de vidro, com aproximadamente 100 litros de água, construídos segundo o sistema de Ghelph modificado, descrito por Gonçalves e Carneiro (2003). Para

estes coletores dotados de um sistema de circulação contínua de água. Os peixes foram transferidos após a primeira alimentação (9h). As fezes foram coletadas durante oito horas, em intervalos de 30 minutos. Em seguida, os peixes voltaram aos aquários alimentadores, onde foi iniciado o arraçoamento com as dietas-teste. Foram realizadas coletas consecutivas de fezes até completar volume necessário para análise das amostras.

3.4. Análises laboratoriais

As amostras de ingredientes, silagens, dieta referência, dietas-teste e fezes foram analisadas segundo AOAC (2000) para determinação dos teores de umidade, pelo método gravimétrico, em estufa a 105°C até peso constante, de cinza pelo método gravimétrico em mufla a 550°C, de extrato etéreo pelo método de Soxhlet no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do CAUNESP.

As análises de energia bruta foram realizadas em bomba calorimétrica de Parr e de proteína bruta pelo analisador de nitrogênio LECO FP-428 no Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

As análises de aminoácidos totais foram realizadas por hidrólise ácida e cromatografia de troca iônica (HPLC), no Laboratório de Fontes Proteicas do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP/ Campinas.

As concentrações de óxido de crômio-III das fezes e das dietas foram determinadas por digestão nitro-perclórica, segundo a metodologia descrita por Furukawa e Tsukahara (1966). Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) das dietas referência e teste foram estimados segundo Nose (1966):

$$CDA = 100 - \left[100 \left(\frac{\% \text{ de marcador na dieta}}{\% \text{ de marcador nas fezes}} \times \frac{\% \text{ de nutrientes nas fezes}}{\% \text{ de nutrientes na dieta}} \right) \right]$$

O valor de CDA dos nutrientes das silagens foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Cho e Slinger (1979)

$$DAN (\%) = (100/30) \times [\text{Teste} - (70/100 \times \text{Referência})]$$

Nos quais:

Teste = Digestibilidade aparente da dieta contendo a silagem;

Referência = Digestibilidade aparente da dieta referência.

3.5. Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram avaliados quanto à normalidade dos erros e também à homogeneidade da variância; atendidas as pressuposições, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Observando diferenças significativas entre as variáveis analisadas, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas através do programa Statistical Analyses System (SAS) versão 9.2.

4. RESULTADOS

Os valores médios de digestibilidade da proteína, lisina e metionina das silagens variaram de 91,75% a 95,80% (Tabela 5). Os menores valores de CDA foram encontrados para energia bruta que variaram de 79,30% a 83,62%.

Tabela 5. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta (PB), lisina (Lys), metionina (Met) e energia bruta (EB) das silagens (S) de víscera (V) ou total (T), ácida (A) ou fermentada (F) em diferentes tempos (T) de hidrólise avaliados para a tilápia-do-Nilo.

Dietas-teste	CDA (%)				
	T (h) ²	PB	Lys	Met	EB
SVA¹ 24		95,73±0,16 ^a	95,8±0,13 ^a	95,45±0,42 ^a	83,57±1,25
SVA 72		94,53±0,10 ^b	94,5±0,23 ^c	93,85±0,39 ^b	81,96±1,05
SVA 144		94,47±0,08 ^b	94,47±0,03 ^c	93,01±0,23 ^{bc}	80,6±1,27
SVF 24		94,4±0,17 ^b	95,02±0,12 ^{bc}	92,57±0,54 ^c	82,3±1,01
SVF 48		93,75±0,23 ^c	95,31±0,36 ^{ab}	91,75±0,34 ^c	80,46±1,72
SVF 120		93,61±0,05 ^c	94,62±0,26 ^{bc}	92,29±0,22 ^c	81,41±1,43
Valor de p		<0,001	<0,001	<0,001	0,1045
STA 24		94,87±0,11 ^{ab}	95,14±0,32 ^{ab}	94,04±0,57 ^{ab}	80,9±0,92 ^{ab}
STA 96		95,13±0,07 ^{ab}	95,45±0,36 ^a	94,37±0,10 ^a	83,62±1,22 ^a
STA 192		94,65±0,13 ^b	94,73±0,25 ^{ab}	94,38±0,18 ^a	82,83±0,63 ^{ab}
STF 24		95,31±0,29 ^a	94,64±0,30 ^{ab}	94,58±0,27 ^a	83,54±1,33 ^a
STF 96		95,11±0,11 ^{ab}	94,32±0,26 ^{bc}	94,72±0,16 ^a	81,25±1,62 ^{ab}
STF 192		93,91±0,23 ^c	93,34±0,29 ^c	92,94±0,70 ^b	79,3±2,54 ^b
Valor de p		<0,001	<0,001	0,0102	0,0246

^a Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0.05$). (Média±erro padrão da média).

¹SVA= Silagem de vísceras ácida, SVF = Silagem de vísceras fermentada, STA = Silagem total ácida e STF = silagem total fermentada

²T(h)= tempo de hidrólise em horas

As médias de CDA dos nutrientes e da energia bruta das silagens, em geral, diminuiram significativamente com o aumento do tempo de hidrólise.

Entre as silagens produzidos com as vísceras dos peixes, o SVA apresentou os maiores CDA_{PB} (95,73%), CDA_{Lys} (95,80%) e CDA_{Met} (95,45%) no menor tempos de hidrólise, 24 horas. Entre as silagens produzidas com resíduos totais, o maior CDA_{PB} foi encontrado no fermentada com 24 horas de hidrólise (95,31%) e a maior média de CDA_{Lys} , no ácida com 96 horas de hidrólise (95,45%). O menor valor de CDA_{Met} foi encontrado no fermentada com 192 horas de hidrólise (92,94%).

Refletindo sobre a composição dos subprodutos utilizados (Tabela 2), as silagens produzidas com os resíduos totais da filetagem de tilápia apresentaram mais que o dobro do conteúdo proteico e praticamente metade do teor lipídico, em relação as silagens de vísceras. Os tempos de 96 horas de hidrólise do STA e 192 horas de hidrólise do STF apresentaram resultados (capítulo anterior) semelhantes de grupamento amino livre (GAL) e grau de hidrólise (GH).

5. DISCUSSÕES

Os valores dos resultados dos CDA das silagens produzidos com resíduos das vísceras ou com resíduo total são considerados altos, sendo maiores que 90%, são valores próximos aos encontrados em diferentes farinhas de peixes (MAINA et al., 2002). Apesar das diferenças significativas dos CDA da PB, Lys e Met, os valores não apresentam diferenças numéricas discrepantes.

De acordo com Stone et al. (1989), o aproveitamento da proteína intacta é melhor, pela liberação gradual dos aminoácidos que estão disponíveis para a digestão por um longo período. Em comparação, as silagens de peixes com maiores tempos de hidrólise podem apresentar um menor aproveitamento, uma vez que contém níveis elevados de aminoácidos essenciais na forma livre que estão disponíveis para a absorção imediata, e se não forem absorvidos no momento apropriado, estes serão metabolizados e podem não estar disponíveis para a síntese de proteínas (MADAGE et al., 2015). Por isso, neste estudo com o aumento do tempo de hidrólise houve diminuição nos CDA da PB e dos aminoácidos estudados.

Na literatura, são escassos os trabalhos que avaliaram os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) de silagens produzidos com resíduos ou

subprodutos de peixe para peixes. A maioria dos trabalhos encontrados atualmente avaliaram silagens na nutrição de aves de postura (KJOS et al., 2001) ou de corte (AL-MARZOOGI et al., 2010), codornas (RAMIREZ et al., 2013) e cordeiros (BARROGA et al., 2001).

Pesquisas com silagens enzimáticas são amplamente encontradas na literatura. São compostos, em sua maioria, de resíduos de peixes marinhos, e utilizados em dietas para peixes marinhos. Bui et al. (2014), trabalhando com três tipos de silagens com matérias-primas distintas (compostos de crustáceos, camarões e tilápia), em dietas para o peixe imperador (red sea bream, *Pagrus major*), não encontraram diferenças significativas entre as silagens, sendo que todos apresentaram CDA_{PB} em torno de 90%. Khosravi et al. (2015a) analisaram dois tipos de matérias-primas na produção das silagens (atum e crustáceos), e encontraram médias de CDA_{PB} de 91% e 91,9% respectivamente, para o peixe imperador (Red sea bream, *Pagrus major*), e de 95,1% e 95,5% para o linguado japonês (Olive ou Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*). Khosravi et al. (2015b) estudaram a silagem de camarão para o peixe imperador (Red sea bream, *Pagrus major*) e obtiveram CDA_{PB} de 91,8%. Apesar das espécies de peixes estudadas anteriormente apresentarem hábito alimentar carnívoro, os resultados médios de CDA_{PB} foram próximos ao encontrado para os diversos tipos de silagens para a tilápia, como neste trabalho, que variaram de 93,61% e 95,73%. Esses altos valores de digestibilidade, tanto para peixes onívoros como carnívoros, podem ser explicados pela alta qualidade da proteína destas silagens de pescado. De acordo com os resultados obtidos por Zheng et al. (2012), altos valores de CDA_{PB} suportam a teoria de que as proteínas das silagens são melhor absorvidas.

Por outro lado, estudos avaliando a digestibilidade de silagens em peixes carnívoros mostraram resultados contraditórios. Zheng et al. (2011) e Wei et al. (2015) analisaram os CDA_{PB} das silagens de resíduos de Pollock em dietas para o turbot (*Scophthalmus maximus*) e encontraram valores de 84,76% e de 86,63%, respectivamente. Khosravi et al. (2015b), trabalhando com dois tipos de matérias-primas nas silagens (tilápia e crustáceos), obtiveram médias de CDA_{PB} de 87,6% e 88,5% respectivamente, para o peixe imperador (Red sea bream, *Pagrus major*). Estes resultados encontrados na

literatura apresentaram valores menores dos CDA_{PB} que os encontrados neste trabalho com tilápia. Além da maioria das espécies estudadas anteriormente serem carnívoras, há uma grande variedade nos resultados encontrados. No entanto, estes resultados contraditórios são atribuídos a variações nos perfis de peptídeos das silagens, que são influenciados pelas matérias-primas, enzimas envolvidas e condições de hidrólise (KLOMPONG et al., 2009).

Llanes et al. (2010) estudaram dois tipos de processamento das silagens, ácida e fermentada, de resíduos de atum para tilápia vermelhas e encontraram médias de CDA_{PB} de 89,92% e 81,74%, respectivamente, e de CDA_{EB} de 85,10% e 86,28%. Os CDA_{PB} das silagens, ácida e fermentada foram bem menores que os encontrados neste estudo. Contudo, os resultados dos CDA_{EB} para ambas as silagens foram maiores. Neste estudo, os resultados médios de CDA_{EB} das silagens foram semelhantes, mesmo apresentando teores de energia bruta diferente entre as matérias-primas utilizadas para sua produção.

Wei et al. (2015) analisaram os aminoácidos das silagens de pollock para juvenis de turbot e encontraram médias de CDA_{Lys} 79,66% e de CDA_{Met} 21,37%. Valores médios bem abaixo, principalmente para os CDA_{Met} encontrados neste estudo com tilápias.

As silagens produzidas a partir das vísceras apresentaram valores proteicos baixos, sendo classificados como ingredientes energéticos ($PB < 20\%$). Mais estudos sobre o perfil lipídico destas silagens devem ser realizados, pois estas silagens podem ter um melhor aproveitamento por peixes que apresente uma exigência maior em ácidos graxos ou ácidos graxos específicos. Portanto, as silagens produzidas com os resíduos totais, ácidas e fermentadas, apresentaram os maiores teores de proteína bruta e os menores teores de extrato etéreo sendo mais compatíveis aos valores encontrados na farinha de peixe, podendo ser um substituto deste ingrediente em rações para organismos aquáticos.

6. CONCLUSÃO

As médias dos valores da digestibilidade da proteína, lisina e metionina das silagens produzidos com resíduos das vísceras ou com resíduo total são considerados altos, variaram de 91,75% a 95,80%. Estes resultados indicam

um ótimo aproveitamento da fração proteica, inclusive da lisina e metionina das silagens utilizados em dietas para tilápia. As silagens de resíduos totais analisados com tempos de hidrólise de 96 e 192 horas para o STA e STF, respectivamente, apresentaram resultados semelhantes de grau de hidrólise e grupamento amino livres e podem ser utilizados em dietas práticas para esta espécie. Tais resultados possibilitarão a substituição da farinha de peixe em formulação de dietas com qualidade nutritiva e ótimo desempenho produtivo.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa (Processo 2013/16773-9). Ao Prof. José Otávio e Piscicultura Tuiuiú pela doação dos resíduos da filetagem de tilápia para confecção das silagens.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MARZOOQI, W.; AL-FARSI, M.A.; KADIM, I.T.; MAHGOUB, O.; GODDARD, J. S. The effect of feeding different levels of sardine fish silage on broiler performance, meat quality and sensory characteristics under closed and open-sided housing systems. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, Suweon, v.23. n.12, p.1614-1625, 2010.

AOAC. **Official Methods of Analysis**, 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 2000.

BARROGA, A. J.; PRADHAN, R.; TOBIOKA, H. Evaluation of fish silage-sweet potato mixed diet with Italian ryegrass silage as basal ration on nitrogen utilization and energy balance in growing lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.72, n.3, p.189-197, 2001.

BUI, H.T.D.; KHOSRAVI, S.; FOURNIER, V.; HERAULT, M.; LEE, K.J. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red sea bream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. **Aquaculture**, Amsterdam, v.418-419, p.11-16, 2014.

CHO, C.Y.; BUREAU, D.P.A. Review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. **Aquaculture Research**, Chichester, v.32, p. 349-360, 2001. Supplement 1.

CHO, C.Y.; SLINGER, S.I. Apparent digestibility measurement in feedstuff for rainbow trout. In: WORLD SIMPOSIUM ON FINFISH NUTRITION AND FISHFEED TECHNOLOGY, Hamburg. **Proceedings Heeneman: 1979**. p.239-247, 1978.

FURUKAWA, A.; TSUKAHARA, H. On the acid digestion for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of fish feed. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v.32, n.6, p.502-506, 1966.

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

HARDY, R.W. Fish hydrolysates: production and use in aquaculture feeds. In: AQUACULTURE FEED PROCESSING AND NUTRITION WORKSHOP, 1991, Singapore. **Proceedings...** Singapore: American Soybean Association, 1991. p.109–115.

IBGE. Produção da pecuária municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. p.1-39

JEON, Y.J.; BYUN, H.G.; KIM, S. K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. **Process Biochemistry**, Barking, v.35, p.471–8, 2000.

KJOS NP, HERSTAD O, SKREDE A, ØVERLAD M. Effects of dietary fish silage and fish fat on performance and egg quality of laying hens. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v.80, n.4, p.245-261, 2001.

KHOSRAVI, S.; BUI, H.T.D.; RAHIMNEJAD, S.; HERAULT, M.; FOURNIER, V.; KIM, S.S.; JEONG, J. B.; LEE, K.J. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.435, p.371–376, 2015a.

KHOSRAVI, S.; RAHIMNEJAD, S., HERAULT, M.; FOURNIER, V.; LEE, C. R.; BUI, H. T. D.; JEONG, J. B.; LEE, K. J. Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus major*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.45, p.858-868, 2015b.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; YACHAI, M.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F.; HAYES, K.D. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*), **Journal of Food Science**, Champaign, v.74, n.2, p.C126-C133, 2009.

LIASET, B.; LIED, E.; ESPE, M. Enzymatic hydrolysis of by-products from fish filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v.80, p:581-589, 2000.

LLANES, J.E.; BÓRQUEZ, A.; TOLEDO, J.; LAZO DE LA VEJA, J. M. Digestibilidad aparente de los ensilajes de residuos pesqueros en tilapias rojas (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*). **Zootecnia Tropical**, Maracay, v28, n.4, p.499-505, 2010.

MADAGE, S.S.K.; MEDIS, W.U.D.; SULTANBAWA Y. Fish silage as replacement of fishmeal in red tilapia feeds. **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v.27, n.2, p.95-106, 2015.

MAINA, J.G.; BEAMES, R.M.; HIGGS, D.; MBUGUA, P.N.; KISIA, S.M. Digestibility and feeding value of some feed ingredients fed to tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, Oxford, v.33, p.853-86, 2002.

NGUYEN, N.H.; PONZONI, R.W.; ABU-BAKAR, K.R.; HAMZAH, A.; KHAW, H.L.; YEE, H.Y. Correlated response in fillet weight and yield to selection for increased harvest weight in genetically improved farmed tilapia (GIFT strain), *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.305, p.1–5, 2010.

NOSE, T. Recent advances in the study of fish digestion in Japan. In: SYMPOSIUM ON FEEDING TROUT AND SALMON CULTURE, 7., 1966, Belgrade. **Proceedings...** Belgrade: EIFAC, 1966. p.17.

NRC- National Research Council, **Nutrient requirement of fish and shrimp**. Washington: National Academy Press, 2011.

OLIVEIRA FILHO, P.R.C.; FRACALLOSSI, D.M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.35, n.4, 2006.

RAMÍREZ RAMÍREZ, J.C.; IBARRA, J.I.; ROMERO, F.A.; ULLOA, P.R.; ULLOA, J.A.; MATSUMOTO, K.S.; CORDOBA, B.V.; MAZORRA MANZANO, M. A.. Preparation of biological fish silage and its effect on the performance and meat quality characteristics of quails (*Coturnix coturnix japonica*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, São Paulo, v.56, n.6, p.1002-1010, 2013.

RUTTEN, M.J.M.; KOMEN, H.; BOVENHUIS, H. Longitudinal genetic analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) body weight using a random regression model. **Aquaculture**, Amsterdam, v.246, p.101–113, 2005.

STONE, F.E.; HARDY, R.W.; SHEARER, K.D.; SCOTT, T. M. Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.76, p.109-118, 1989.

TAHERI, A.; ABEDIAN KENARI, A.; MOTAMEDZADEGAN, A.; HABIBI-REZAEI, M. Poultry by-products and enzymatic hydrolysis: optimization by response surface methodology using alcalase® 2.4L. **International Journal of Food Engineering**, Berkeley, v.7, n.5, p.1-17, 2011.

ZHENG, K.; LIANG, M.; YAO, H.; WANG, J.; CHANG, Q. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I level of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v.18, p.297–303, 2011.

ZHENG, K.; LIANG, M.; YAO, H.; WANG, J.; CHANG, Q. Effect of size-fractionated fish protein hydrolysate on growth and feed utilization of turbot

(*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture Research**, Oxford, v.44, p.895–902, 2013.

WEI, Y.; LIANG, M.; MU, Y.; ZHENG, K.; XU, H. The effect of ultrafiltered fish protein hydrolysate level on growth performance, protein digestibility and mRNA expression of PepT1 in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/anu.12319>>.

CAPÍTULO 4 - SUBSTITUIÇÃO PARCIAL OU TOTAL DA PROTEÍNA DA FARINHA DE TILÁPIA PELA DE SILAGEM DE RESÍDUO, DE ISOLADO PROTEICO DE SOJA OU AMINOÁCIDOS CRISTALINOS EM DIETAS PARA JUVENIS DA TILÁPIA DO NILO.

RESUMO – Na aquicultura, o uso de seus subprodutos é visto como uma fonte sustentável de alimentos na alimentação animal. O objetivo foi estudar a possibilidade de substituição total ou parcial da proteína de farinha de tilápia pelas silagens de resíduos de filetagem de tilápia, isolado proteico de soja ou aminoácidos cristalinos. Foram avaliados o desempenho e a eficiência nutricional de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com oito dietas diferentes com farinha de tilápia (FT) ou com sua substituição parcial (50%) ou total (100%) por silagens ácida (SA) ou fermentada (SF) (interrompidos com 96 e 192 horas de hidrólise respectivamente), por isolado proteico de soja (IPS) ou aminoácidos cristalinos (AAS). Foram utilizados 480 juvenis de tilápia do Nilo ($7,18 \pm 5,43$ g), distribuídos em 32 tanques (430L), utilizando um Delineamento Inteiramente Casualizado com quatro repetições. As dietas eram isocalóricas ($3183 \text{ kcal kg}^{-1}$ ED) e isoproteicas (26% PD). Os juvenis foram arraçoados três vezes ao dia, durante 120 dias. Os resultados mostraram que os peixes alimentados com dietas com substituição total da FT por SF e AAS apresentaram piores resultados de eficiência alimentar e crescimento, quando comparados aos peixes que receberam as dietas contendo FT ou com substituição parcial (SA₅₀, ST₅₀ e IPS₅₀) ou substituição total por SA.

Palavras-chaves: eficiência nutricional, desempenho zootécnico, morfometria intestinal e resíduo de filetagem.

1. INTRODUÇÃO

A tilapicultura está em grande expansão (IBGE, 2014) e com ela também aumentam os resíduos de seu processamento. Com o aumento na produção, há a necessidade crescente de utilizar fontes vegetais e/ou fontes de proteína de origem animal mais econômicas e disponíveis para reduzir os custos de alimentação (NGUYEN et al., 2009).

Comumente, os resíduos da pesca são irregularmente descartados agravando problemas ambientais e perdas econômicas em todo o mundo (KJOS et al., 2000; BARROGA et al., 2001). Considerando que o principal objetivo da aquicultura é a produção de alimentos para o ser humano, o uso de seus resíduos é visto como uma fonte sustentável de alimentos na alimentação animal (HERNANDEZ et al., 2013).

Os resíduos de pescado podem ser transformados em farinhas de peixe. No entanto, sua produção é considerada de alto custo (RAMÍREZ et al., 2013). A produção de silagens de peixe é benéfica ao meio ambiente, segura e tecnologicamente mais simples, consumindo menos energia que a fabricação de farinha de peixe (GILDBERG, 1993).

Na literatura, as silagens de peixes foram estudadas como fonte de proteína com potencial para substituir a farinha de peixe (EL-HAKIM et al., 2007; OLIVEIRA CAVALHEIRO et al., 2007; LEAL et al., 2010), do farelo de soja (HERNÁNDEZ et al., 2013), como estimulante do sistema imune (GOOSEN et al., 2014) e também para determinar os efeitos de sua inclusão sobre a atividade de enzimas digestivas (SANTOS et al. 2013). Nos estudos de substituição da farinha de peixe, os resultados encontrados geralmente mostram que as silagens podem substituir parcialmente a farinha de peixe em dietas de tilápia, sem afetar negativamente o desempenho zootécnico (GOOSEN et al., 2015).

Madage et al. (2015) comprovaram que a silagem de peixe pode ser menos eficaz, por conter níveis elevados de aminoácidos livres, que estão prontamente disponíveis e se não forem absorvidos no momento apropriado, não estarão disponíveis para a síntese proteica. Na tentativa de aperfeiçoar o aproveitamento dos ingredientes ingeridos, os peixes apresentam capacidade adaptativa na absorção e transporte de nutrientes (HONORATO et al., 2011). O

estudo morfológico intestinal revela as diferentes adaptações em função da dieta ofertada (DOMENEGHINI et al., 2005; LIQUORI et al., 2007,).

Na produção das silagens, um dos fatores mais importantes é o conhecimento sobre massa molecular da proteína (ROSSI et. al., 2009). Portanto, para analisar suas características nutricionais e metabólicas, várias metodologias podem ser aplicadas na obtenção destas informações. A cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*) é uma técnica de altíssima resolução para peptídeos, sendo amplamente utilizada para a identificação e purificação de compostos e para a separação dos componentes de uma mistura (COLLINS et al., 1993). A cromatografia de exclusão por tamanho ou filtração em gel separa os compostos proteicos de acordo com seu tamanho. A matriz da coluna é composta por um polímero que contém ligações cruzadas com poros de tamanhos determinados. As proteínas maiores migram mais rapidamente que as menores, pois não passam por dentro dos poros das esferas durante a cromatografia, o que faz com que tenham um percurso mais rápido através da coluna. Os compostos menores penetram nos poros e passam mais lentamente devido ao caminho sinuoso que executam através da coluna (LEHNINGER et al., 2004). Assim, é possível separar as moléculas baseado em suas respectivas massas moleculares.

Para obter uma silagem com frações proteicas maiores, sem excesso de aminoácidos livres é necessário acompanhar a hidrólise proteica e interromper seu processo. A cromatografia por filtração em gel é uma ferramenta para auxiliar na separação dos constituintes das frações proteicas após a eletroforese. Pois, o menor tamanho das frações proteicas na eletroforese se limita a 10.000 Da e a cromatografia é capaz de elucidar o comportamento destas frações, quando os resultados da hidrólise são compostos menores, até aminoácidos livres. Sendo assim, o menor teor de aminoácidos livres nas silagens pode aumentar aproveitamento das frações proteicas pelos peixes e viabilizar a utilização deste produto em dietas práticas.

No entanto, são inéditos na literatura, estudos comparando a substituição parcial e total da farinha de peixe por silagens interrompidos antes da hidrólise total das proteínas e excesso de aminoácidos livres. A distribuição molecular dos peptídeos das silagens e, especialmente, o pequeno peso

molecular destas proteínas podem desempenhar um papel importante no crescimento, afetando o desempenho dos peixes (SKALLI et al., 2014) alimentados com alta proteína de origem vegetal (KOUSOULAKI et al., 2009; ZHENG et al., 2012). Portanto, o estudo histológico é essencial para a tomada de decisão quanto ao tipo de fonte proteica que pode ser recomendada para alimentação de peixes (EVANS et al., 2005; ROMARHEIN et al., 2008). Neste sentido, este estudo comparativo pode auxiliar na seleção adequada de ingredientes ideais para formulação de dietas práticas e mais econômicas.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da substituição parcial ou total da farinha de tilápia por silagens (ácida ou fermentada), isolado proteico de soja ou aminoácidos cristalinos no desempenho produtivo, a eficiência nutricional e a morfologia intestinal da tilápia do Nilo submetidas a dietas para o seu crescimento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no período de julho a novembro de 2014, na Universidade Estadual Paulista - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) e conduzido de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo colégio brasileiro de experimentação (COBEA) e aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA), protocolo nº 018777/13.

3.1. Material biológico e condições experimentais

Foram utilizados 480 juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT, distribuídos em 32 caixas de fibra de vidro com capacidade de 450 litros e abastecimento contínuo com água proveniente de poço artesiano e temperaturas constantes. Cada parcela experimental foi composta por 15 peixes masculinizados por hormônios, com peso inicial médio de $7,18 \pm 5,43$ gramas. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos e quatro repetições.

A água de cada aquário foi mantida sob aeração constante. Os parâmetros físico-químicos da água como oxigênio dissolvido (OD) e

temperatura foram monitorados diariamente (oxímetro YSI 55) e a condutividade e pH foram mensurados semanalmente e todos se apresentaram dentro dos parâmetros exigidos pela espécie (Tabela 1). A renovação de água dos aquários foi de aproximadamente 3,5 vezes ao dia. A cada dois dias, foi realizada a sifonagem dos aquários para retirada do excesso de excretas e manter a qualidade da água.

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água durante o período experimental.

PARÂMETROS	MÉDIA
Temperatura (°C)	29,71 ± 1,14*
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	5,89 ± 0,18
pH	7,33 ± 0,31
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	188,12 ± 0,66
Alcalinidade (µg L ⁻¹)	90,32 ± 0,43
Amônia (µg L ⁻¹)	45,09 ± 9,99
Nitrato (µg L ⁻¹)	7,16 ± 2,45
Nitrito (µg L ⁻¹)	106,10 ± 6,36
Fósforo Total (µg L ⁻¹)	26,65 ± 14,85

*Médias ± erro padrão da média

3.2. Dietas experimentais e manejo

As silagens ácidas das duas matérias-primas, vísceras ou total, foram produzidos pela adição de 2% de ácido fosfórico e 3% de ácido acético, interrompidos com 96 horas de hidrólise, por neutralização com NaOH 1M (pH 7). Para a produção da silagem fermentada, foram adicionados 15% (p/p) de melaço de cana-de-açúcar, 5% (p/p) de *Lactobacillus sp.*, e a interrupção da hidrólise foi realizada com 192 horas neutralizada com NaOH 1M (pH 7). Foram formuladas oito dietas isoproteicas e isoenergéticas de acordo com NRC (2011), substituindo parcial ou totalmente a proteína da farinha de tilápia (fonte de proteína original/intacta), por dois processamentos de silagens (ácida ou fermentada), uma fonte proteica de origem vegetal (isolado proteico de soja) e ainda aminoácidos cristalinos (livres), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Formulas e composição das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	FT	SA₅₀³	SA₁₀₀³	SF₅₀³	SF₁₀₀³	IPS₅₀³	IPS₁₀₀³	AAS³
FT¹	16,20	8,10	0,00	8,10	0,00	8,10	0,00	0,00
SA	0,00	10,60	21,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SF	0,00	0,00	0,00	11,57	23,15	0,00	0,00	0,00
IPS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,03	8,05	0,00
AAS²	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,79
Farelo de soja	36,72	36,72	36,72	36,72	36,72	36,72	36,72	36,72
Milho	10,80	10,90	10,90	10,90	9,00	10,08	6,80	10,56
Farelo de Trigo	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00
Quirera	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Farelo de arroz	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Caulim	0,00	1,38	1,66	1,11	1,49	2,22	6,12	4,98
Ácida glutâmico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	3,00
Óleo de soja	5,00	2,50	0,00	2,10	0,00	6,25	8,30	7,00
Fosfato bicálcico	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	1,90	2,40
Calcário	1,20	0,30	0,00	0,00	0,00	1,80	2,30	2,10
Suplemento vit mi⁴	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
L-lisina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22
DL-metionina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,16	0,23
L-treonina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,15	0,38
L-histidina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
L-fenilalanina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09
Composição analisada								
Proteína bruta	30,02	29,54	29,06	29,57	29,09	28,95	29,03	29,51
Proteína digestível	26,82	26,82	26,80	26,82	26,82	25,96	26,12	26,82
Extrato etéreo	10,21	10,40	10,58	10,61	11,74	10,65	11,80	10,67
Matéria mineral	7,02	7,07	7,11	7,28	7,52	5,88	4,71	4,51
Fibra bruta	3,85	4,66	4,63	4,45	4,46	5,27	7,88	7,17
ENN⁵	35,77	32,50	30,07	32,23	28,01	35,14	32,09	33,99
Energia bruta (Kcal.kg)	4303,11	4325,36	4302,00	4341,89	4351,25	4322,49	4385,82	4310,85
Energia digestível(Kcal.kg)	3173,83	3176,89	3177,73	3172,63	3182,39	3178,86	3180,63	3175,45
Cálcio	1,50	1,50	1,88	1,64	2,38	1,52	1,51	1,53
Fósforo	0,79	0,95	1,22	1,03	1,38	0,79	0,79	0,81
Lisina	1,89	2,13	2,37	2,16	2,42	1,78	1,65	1,54
Metionina	0,64	0,74	0,84	0,74	0,84	0,53	0,53	0,53
Threonina	1,28	1,54	1,80	1,58	1,89	1,19	1,19	1,19
Arginina	2,64	2,42	2,20	2,45	2,24	2,35	2,04	1,67
Isoleucina	1,33	1,72	2,12	1,78	2,22	1,27	1,21	0,95
Leucina	2,30	2,23	2,17	2,26	2,20	2,16	2,00	1,61
Valina	1,37	1,68	2,00	1,73	2,09	1,28	1,19	0,92
Histidina	0,85	0,95	1,04	0,97	1,09	0,74	0,63	0,54
Fenilalanina	1,35	1,36	1,37	1,37	1,40	1,33	1,30	1,10

¹FT = farinha de tilápia, SA= silagem ácida, SF= silagem fermentada, IPS= isolado proteico de soja, AAS=aminoácidos cristalinos.

²Mix de aminoácidos não essenciais. Glicina 14,89%, tirosina 4,02%, Cistina 3,63%, Ácido aspártico 2,51%, Alanina 1,98% e Serina 0,64%.

³50 ou 100% de substituição da PB da farinha de tilápia por uma das silagens, isolado proteico de soja ou aminoácidos livres.

⁴Suplemento vitamínico e mineral: ácido fólico (1.250 mg); pantotenato de cálcio (1.200 mg); cobre (2.500 mg); ferro (15 g); iodo (375 mg); manganês (12,5 g); selênio (87,5 mg); zinco (12,5 mg); cobalto (125 mg); Vit A (2.500 U l); Vit B12 (4.000 mg); Tiamina B1 (4.000 mg); Riboflavina B2 (4.000 mg); Piridoxina B6 (4.000 mg); Vit C (50.000 mg); Vit D3 (600.000 UI); Vit E (37.500); Vit K3 (3.750 mg); niacina (122.500 mg); biotina (15 mg)

⁵Extrato Não Nitrogenado (ENN) = MS – (PB + EE + MM + FB)

Para o processamento das dietas, todos os ingredientes foram finamente moídos em moinho martelo com peneira de porosidade padrão de 0,5 mm de diâmetro. Posteriormente, foram pesados, homogeneizados e umedecidos para a peletização em moinho de carne. As silagens foram incorporadas in natura, e o teor de umidade foi reduzido na quantidade de água adicionado no processamento das dietas. As dietas foram desidratadas em estufa de ventilação forçada a 55°C, durante 24 horas. Os peixes foram alimentados até saciedade aparente, quatro vezes ao dia às 08:00, 11:00, 14:00 e 17:00h, durante 120 dias.

3.3. Avaliação de desempenho e de eficiência nutricional

Na avaliação dos parâmetros de desempenho, todos os peixes de cada parcela foram coletados mensalmente para biometria. O desempenho produtivo foi avaliado pelo ganho em peso, conversão alimentar aparente, consumo de dieta, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência proteica, de acordo com as seguintes expressões:

$$\text{Ganho em peso (GP)} = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) \text{ (g)}$$

$$\text{Consumo de ração (CR)} = \text{consumo de alimento (g)}$$

$$\text{Conversão alimentar (CA)} = \frac{\text{consumo de alimento}}{\text{ganho em peso total}} \text{ (\%)}$$

$$\text{Taxa de crescimento específico (TCE)} = \frac{\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}}{\text{Tempo}} \times 100 \text{ (\%)}$$

$$\text{Taxa de eficiência proteica (TEP)} = \frac{\text{ganho em peso vivo}}{\text{proteína bruta consumida}} \text{ (\%)}$$

$$\text{Eficiência de retenção de proteína (ER}_{PB}) = \frac{(PB_f \times PF) - (PB_i \times PI) \times 100}{\text{consumo de PB}} \text{ (\%)}$$

$$\text{Eficiência de retenção de energia (ER}_{EB}) = \frac{(EB_f \times PF) - (EB_i \times PI) \times 100}{\text{consumo de EB}} \text{ (\%)}$$

Nos quais:

f = médias de teor do nutriente final na carcaça

i = médias do teor do nutriente inicial na carcaça

PF =peso final

PI =peso inicial

PB = proteína bruta

EB = energia bruta

3.4. Composição corporal

Para a determinação da composição corporal, foram utilizados vinte peixes para compor a amostra inicial. Ao final do ensaio foram coletados dois peixes de cada parcela experimental para análises da composição corporal. Estes peixes permaneceram em jejum por 24 horas para o esvaziamento gástrico e foram eutanaziados logo após, através do aprofundamento do plano anestésico com benzocaína (concentração de 1,0 g.L⁻¹), e em seguida congelados e moídos. Para a composição corporal da carcaça dos peixes coletados ($n=8$) foram determinados a umidade, cinzas, extrato etéreo, energia bruta, proteína bruta e aminoácidos.

3.5. Análises laboratoriais

As amostras dos ingredientes e das silagens foram analisadas segundo AOAC (2000) no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do CAUNESP para determinação dos teores de umidade, pelo método gravimétrico, em estufa a 105°C até peso constante, o de cinza pelo método gravimétrico em mufla a 550°C, de extrato etéreo realizado pelo método de Soxhlet.

As análises de energia bruta foram realizadas em bomba calorimétrica de Parr e de proteína bruta pelo analisador de nitrogênio LECO FP-528 nitrogen analyzer (LECO Instruments, St Joseph, Michigan, USA), no Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

As análises de aminoácidos totais foram realizadas por hidrólise ácida e cromatografia de troca iônica (HPLC), no Laboratório de Fontes Proteicas do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP/ Campinas.

3.6. Análises histológicas

As análises histológicas para avaliação morfométrica das vilosidades intestinais foram realizadas no Laboratório de Histologia e Imunohistoquímica do Laboratório Central de Pesquisa Animal (LCPA) no Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Lavras/UFLA. Durante as biometrias mensais do experimento, foram coletadas as amostras de intestino na porção proximal da primeira alça do intestino médio de dois peixes de cada

parcela experimental ($n=8$). Elas foram fixadas em solução Bouin por 24 horas e em seguida, submetidas a lavagens consecutivas com água destilada, sendo mantidas em solução alcoólica 70% até o processamento. Posteriormente, foram desidratadas em bateria com gradiente alcoólico crescente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (ponto de fusão de 56 a 58 °C). Os cortes histológicos com cerca de 4 mm de comprimento e 3 μ m de espessura, em secção transversal, foram colocados em lâminas histológicas e secos em estufa a 37 °C *overnight*. Após estes procedimentos, foram corados com Hematoxilina-Eosina segundo Humason (1979).

As lâminas dos segmentos intestinais dos peixes de cada tratamento experimental foram avaliadas quanto a altura e largura das vilosidades, em microscópio invertido motorizado ZI (Carl Zeiss, Alemanha) acoplado à câmera AxioCam HRc (Carl Zeiss, Alemanha) e programa Axiovision 4.8.2 (Carl Zeiss, Alemanha). Foram mensuradas todas as vilosidades presentes no perímetro dos cortes histológicos, sendo oito cortes para cada peixe.

3.7. Cromatografia de filtração em gel

As silagens foram liofilizados, desengordurados, dissolvidos em tampão TRIS.HCl 0,065M e NaCl 0,15M pH 6,8, centrifugados a 10.000 g durante 15 minutos e separados em uma coluna Superdex® Peptide 10/300 GE. As massas das frações moleculares peptídicas foram comparadas e calculadas segundo o perfil de eluição dos compostos padrão: ribonuclease (13.700 Da), vitamina B12 (1.355,37 Da), triptofano (204,22 Da) e glicina (75,06 Da).

As áreas relativas de cada fração foram dadas como porcentagem em relação à área total (ŠLIŽYTĖ et al., 2005). Cinco frações de peptídeos foram definidas com base em seus respectivos tempos de retenção e volumes de eluição (SRICHANUM et al, 2014), e de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). A nomenclatura das frações dos peptídeos se deu pelas classes, <200 Da, correspondendo principalmente a aminoácidos livres; 200-500 Da, correspondendo principalmente a di e tripeptídeos; 500-2500 Da, correspondendo principalmente a oligopeptídeos; 2500-5000 Da, correspondendo principalmente a polipeptídeos e >5000 correspondendo a proteínas de maior massa molecular (KOTZAMANIS et al., 2007).

3.8. Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram avaliados quanto a normalidade dos erros e também à homogeneidade da variância; atendida as pressuposições, foi realizada análise de variância (ANOVA). Observando diferenças significativas entre as variáveis analisadas, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas através do programa Statistical Analyses System (SAS) versão 9.2.

4.RESULTADOS

4.1. Desempenho zootécnico

Os melhores resultados (Tabela 3) para GP foram apresentados pelos peixes que receberam os tratamentos com farinha de tilápia (FT), sua substituição parcial (SA₅₀, SF₅₀ e IPS₅₀) e substituição total pela silagem ácida (SA₁₀₀). Os piores resultados foram encontrados nos peixes que receberam os tratamentos com a substituição total da FT pela silagem fermentada (SF₁₀₀) e aminoácidos livre (AAS).

Os peixes que receberam as dietas contendo FT e AAS apresentaram maior média de consumo, ao contrário dos peixes que receberam HF₁₀₀, apresentando o menor. A melhor média na CA foi observada para os peixes que receberam HA₅₀ sendo que os que receberam as dietas contendo HF₁₀₀ e AAS apresentaram os piores. As médias de TCE dos peixes que receberam as dietas FT, HA₅₀, HF₅₀, IPS₅₀ e HA₁₀₀ foram significativamente maiores, quando comparadas com o resultado dos peixes que receberam HF₁₀₀ e AAS.

Tabela 3. Médias dos parâmetros de desempenho produtivo e eficiências de retenção de proteína bruta (ER_{PB}) e de energia bruta (ER_{EB}), dos juvenis alimentados com dietas contendo substituição parcial ou total da farinha de tilápia por silagens, isolado proteico de soja ou aminoácidos cristalinos.

Tratamentos	GP (g) ²	Consumo (g)	CA	TCE (%)	TEP (%)	ER _{PB} (%)	ER _{EB} (%)
FT	299,59±7,98 ^{a*}	397,05±11,92 ^a	1,17±0,02 ^{ab}	2,38±0,03 ^a	2,98±0,06 ^c	33,33±1,29 ^a	32,35±0,63 ^{abc}
SA₅₀	283,55±6,42 ^a	341,72±13,19 ^{bc}	1,13±0,02 ^a	2,34±0,02 ^a	3,70±0,11 ^a	34,55±1,07 ^a	34,48±1,47 ^{ab}
SA₁₀₀	273,15±10,45 ^{ab}	352,91±8,30 ^{bc}	1,19±0,01 ^{ab}	2,30±0,03 ^{ab}	3,49±0,06 ^{ab}	29,10±0,98 ^{bc}	34,11±0,51 ^{ab}
SF₅₀	272,70±6,95 ^{ab}	348,70±2,94 ^{bc}	1,19±0,02 ^{ab}	2,30±0,02 ^{ab}	3,41±0,08 ^{ab}	31,23±0,92 ^{ab}	33,46±0,74 ^{abc}
SF₁₀₀	227,29±4,24 ^c	316,59±3,55 ^c	1,27±0,03 ^b	2,14±0,01 ^c	3,42±0,09 ^{ab}	24,07±0,77 ^{cd}	29,64±1,57 ^{bc}
IPS₅₀	266,37±7,70 ^{ab}	334,58±6,92 ^{bc}	1,18±0,02 ^{ab}	2,28±0,02 ^{ab}	3,22±0,06 ^{bc}	29,91±1,48 ^{ab}	31,78±0,96 ^{abc}
IPS₁₀₀	245,29±4,65 ^{bc}	333,86±9,49 ^{bc}	1,25±0,03 ^{ab}	2,21±0,02 ^{bc}	3,20±0,07 ^{bc}	28,09±0,47 ^{bcd}	35,57±1,09 ^a
AAS	227,17±6,55 ^c	363,18±22,37 ^{ab}	1,42±0,08 ^c	2,15±0,03 ^c	2,95±0,19 ^c	22,85±1,68 ^d	28,09±2,43 ^c
CV (%)	5,43	6,56	6,29	1,39	1,45	7,87	7,26
Valor de p	<0,001	0,003	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002

¹FT= farinha de tilápia, SA= silagem ácida, SF= silagem fermentada, IPS= isolado proteico de soja e AAS= aminoácidos. 50% ou 100% da substituição da proteína bruta da farinha de tilápia

²GP= ganho em peso, CA= conversão alimentar, TCE= taxa de crescimento específico, TEP= taxa de eficiência proteica, ER_{PB}= eficiência de retenção de proteína bruta e ER_{EB}= eficiência de retenção de energia bruta

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Média±erro padrão da média).

As médias do parâmetro de TEP foram melhores nos peixes que receberam a dieta HA₅₀ e os que receberam as dietas FT, IPS₅₀, IPS₁₀₀ e AAS foram as piores. As médias da ER_{PB} foram maiores nos peixes que receberam as dietas contendo FT e HA₅₀ e foram menores nos que receberam HF₁₀₀ e AAS. Para a ER_{EB}, o maior resultado foi observado nos peixes que receberam a dieta IPS₁₀₀ e menores nos que receberam HF₁₀₀ e AAS.

4.2. Composição corporal

Os resultados médios de composição corporal dos juvenis de tilápia do Nilo mostraram que a substituição parcial ou total da FT não influenciou nos teores de MS e PB no corpo dos juvenis analisados (Tabela 4). Os níveis médios de gordura (EE) e energia bruta (EB) corporal foram menores nos peixes que receberam HA₅₀ e maiores nos peixes que receberam IPS₁₀₀.

Tabela 4. Composição química corporal média dos juvenis de tilápia do Nilo com base na matéria seca.

Dietas	MS ² (%)	PB (%)	EE (%)	MM (%)	EB (Kcal)
Inicial	22,6±1,03	58,28±0,52	11,38±1,35	3,89±0,04	4873,25±13,77
¹ FT	30,27±0,43	48,83±1,35	35,01±1,18 ^{abc}	12,90±1,27 ^{ab*}	5790,75±23,95 ^{ab}
SA ₅₀	29,03±0,36	52,02±0,95	30,56±1,33 ^c	14,23±0,79 ^{ab}	5645,25±84,30 ^b
SA ₁₀₀	29,73±0,53	49,17±1,54	32,96±1,07 ^{bc}	15,52±1,06 ^a	5693,50±121,47 ^{ab}
SF ₅₀	29,30±0,49	49,25±1,80	34,48±1,81 ^{abc}	12,89±0,50 ^{ab}	5875,75±69,36 ^{ab}
SF ₁₀₀	28,04±0,91	46,56±3,98	37,87±2,93 ^{ab}	12,76±0,82 ^{ab}	5847,25±82,29 ^{ab}
IPS ₅₀	27,61±1,09	48,49±0,96	36,01±0,83 ^{abc}	12,72±0,39 ^{ab}	5836,75±97,31 ^{ab}
IPS ₁₀₀	30,04±1,14	48,04±1,06	39,57±1,56 ^a	10,65±0,84 ^{ab}	6053,00±81,37 ^a
AAS	28,78±0,87	51,45±4,89	34,49±2,93 ^{abc}	13,23±0,65 ^{ab}	5751,50±884,05 ^{ab}
CV	5,39	5,27	7,00	12,43	2,91
Valor de P	0,239	0,121	0,001	0,024	0,038

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Média±erro padrão da média).

¹FT= farinha de tilápia, silagens SA= ácida, SF= fermentada, IPS= isolado proteico de soja e AAS= aminoácidos. 50% ou 100% da substituição da proteína bruta da farinha de tilápia

²MS=matéria seca, PB= proteína bruta, EE=extrato etéreo, MM= matéria mineral e EB= energia bruta

4.3 Análise morfométrica

Não houve efeito significativo nas medidas morfométricas dos intestinos de juvenis de tilápia (Tabela 5) alimentados com as dietas contendo FT, sua substituição parcial (HA₅₀, HF₅₀ e IPS₅₀) e sua substituição total (HA₁₀₀, HF₁₀₀, IPS₁₀₀ e AAS). A Figura 1 mostra as medidas de mensuração da morfometria. Na figura 2 foi possível observar células caliciformes, muscular longitudinal, camada

muscular interna, membrana serosa e epitélio da mucosa. A altura dos vilos apresentaram diferença significativa nos diferentes tratamentos.

Tabela 5. Resultados médios de morfometria intestinal dos juvenis de tilápia do Nilo.

Dietas	Parâmetros (μm)		
	Altura (μm)	Largura (μm)	Número de vilos
FT	508,22 $\pm$ 8,28 ^a	114,08 $\pm$ 4,71	29,13 $\pm$ 1,81
SA₅₀	496,39 $\pm$ 10,21 ^{ab}	121,83 $\pm$ 6,02	29,13 $\pm$ 2,14
SA₁₀₀	518,86 $\pm$ 2,96 ^a	124,25 $\pm$ 3,63	28,50 $\pm$ 1,69
SF₅₀	454,86 $\pm$ 10,49 ^b	122,81 $\pm$ 5,54	27,00 $\pm$ 2,00
SF₁₀₀	478,26 $\pm$ 5,25 ^{ab}	118,53 $\pm$ 5,49	28,75 $\pm$ 2,10
IPS₅₀	466,01 $\pm$ 8,60 ^b	121,2 $\pm$ 3,70	28,75 $\pm$ 5,95
IPS₁₀₀	461,61 $\pm$ 12,01 ^b	134,87 $\pm$ 9,69	27,50 $\pm$ 6,50
AAS	509,95 $\pm$ 10,06 ^a	125,54 $\pm$ 7,60	26,62 $\pm$ 5,83
CV	3,67	9,84	21,08
Valor de P	0,001	0,463	0,979

¹FT= farinha de tilápia, HA= silagem ácida, HF= silagem fermentada, IPS= isolado proteico de soja e AAS= aminoácidos. 50% ou 100% da substituição da proteína bruta da farinha de tilápia (Média $\pm$ erro padrão da média).



Figura 1. Fotomicrografia para medidas de morfometria. Altura (a), largura (l), células caliciformes (*), muscular longitudinal (ml), camada muscular interna (mi), membrana serosa (ms) e epitélio da mucosa (em). Barras de escala de 25 μm .

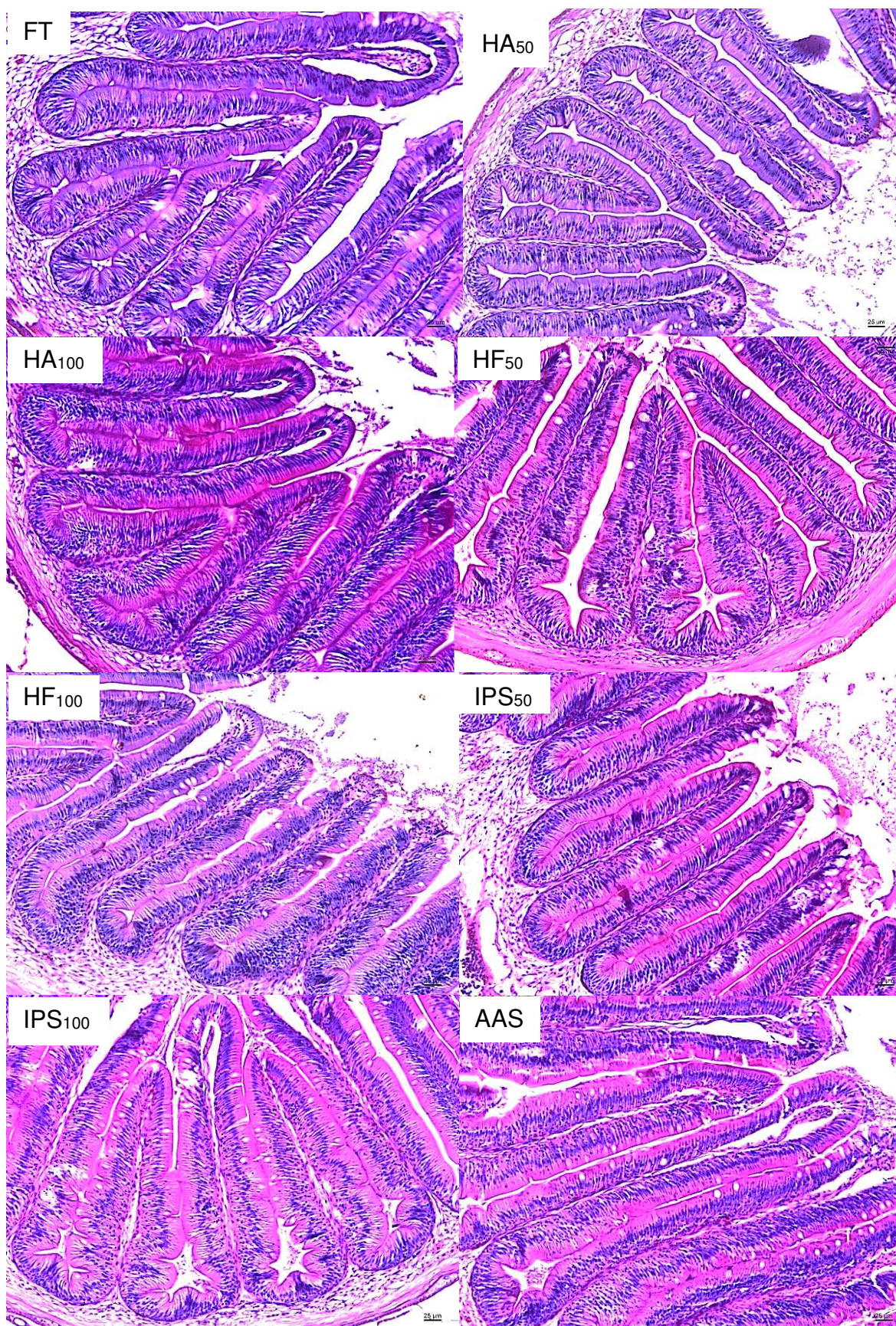
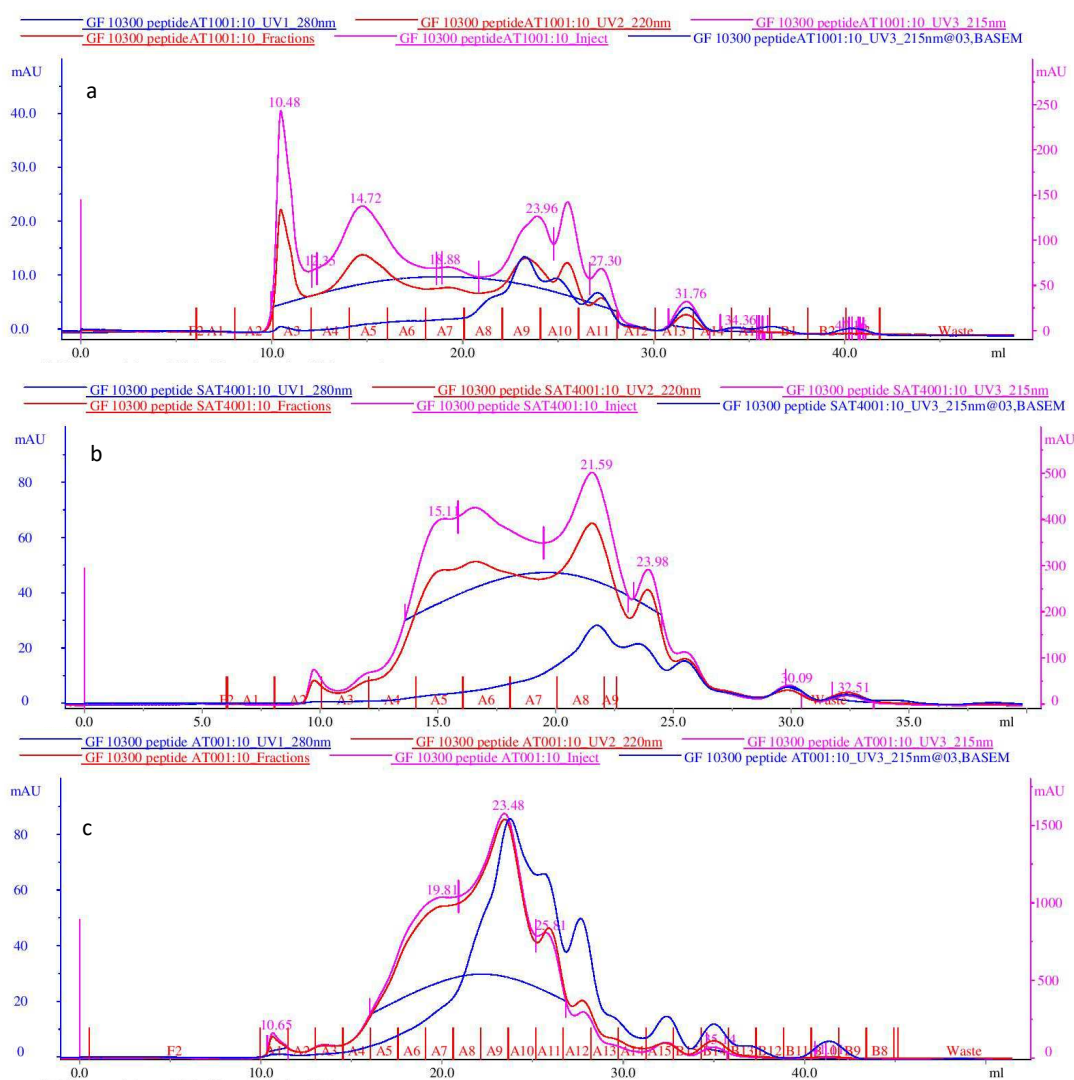


Figura 2. Fotomicrografias das vilosidades intestinais dos juvenis de tilápia do Nilo em corte transversal. Barras de escala de 25µm. Hematoxilina/Eosina (H/E).

A visualização dos cortes histológicos demonstrou que a largura e número das vilosidades intestinais não foram influenciados pelas fontes proteicas utilizadas nas diferentes dietas, como a farinha de peixe (proteína intacta), silagens ácida ou fermentada, isolado proteico de soja ou aminoácidos livres. Mas a altura dos vilos dos peixes que receberam os tratamentos FT, HA₁₀₀ e AAS foram maiores que a dos peixes que receberam os tratamentos HF₅₀, IPS₅₀ e IPS₁₀₀.

4.4. Cromatografia de filtração em gel

O perfil de eluição das silagens ácidas são apresentados na Figura 3 e a das silagens fermentada na Figura 4.



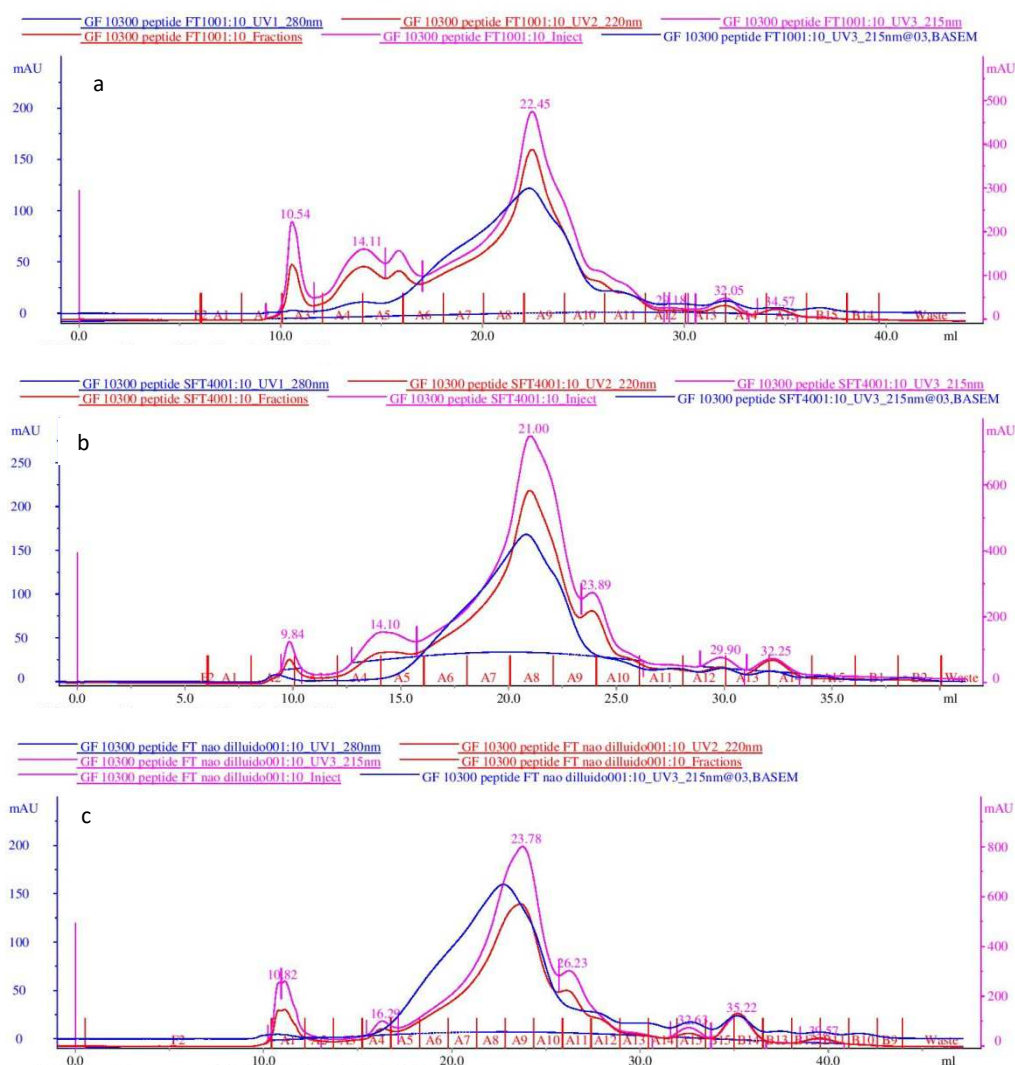


Figura 4. Cromatografia líquida rápida de proteína (HPLC) das silagens fermentada totais em diferentes tempos de hidrólise: a) 24 horas, b) 96 horas e c) 192 horas de hidrólise.

Com o aumento do tempo de hidrólise nas duas silagens (figuras 3 e 4 – a, b e c), nota-se que o perfil da absorbância desloca-se para a direita, apresentando volumes maiores de eluição, mostrando que ocorreu a hidrólise de moléculas proteicas em moléculas menores. Comparando as áreas dos picos de absorbância das frações proteicas entre as amostras das silagens com seus respectivos tempos de retenção e volumes de eluição, nota-se que as frações peptídicas apresentam volumes de eluição diferentes, nos diferentes tempos de hidrólise. A distribuição das massas moleculares dos peptídeos também diferiu entre as silagens nos diferentes tempos de hidrólise (Figura 5).

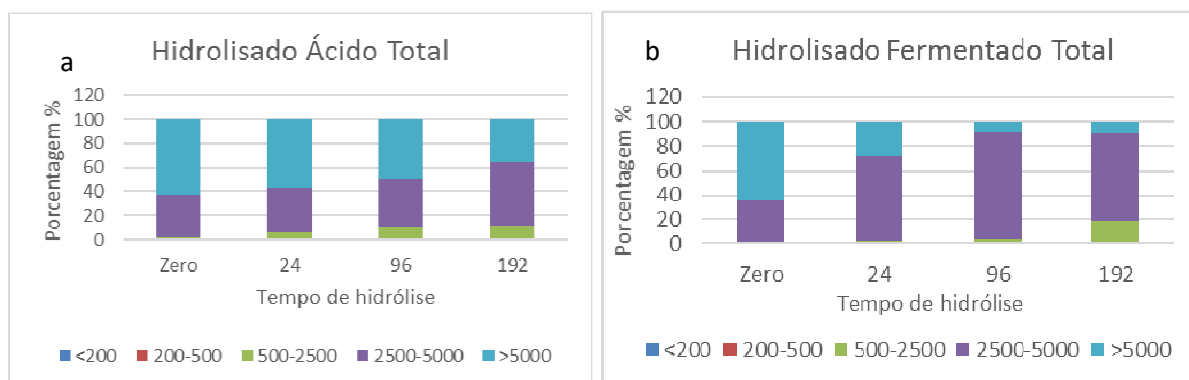


Figura 5. Distribuição das porcentagens das diversas frações de massa molecular (Da) dos peptídeos das silagens nos diferentes tempos de hidrólise.

Nas silagens com menor tempo de hidrólise, mais da metade dos aminoácidos estão organizados em polipeptídeos. Com o aumento no tempo de hidrólise nota-se também a diminuição de polipeptídeos e o aumento de oligopeptídeos, enquanto que as frações de tri e dipeptídeos e aminoácidos livres foram quase inexistentes.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, a substituição da FT pelas silagens de resíduos da filetagem de tilápia interrompidos com 96 horas e com 192 horas de hidrólise para ácida e fermentada, respectivamente, foi eficaz pois garantiram apresentação de menores teores de aminoácidos livres. Apesar das silagens serem produzidos pela mesma matéria-prima, resíduos totais de filetagem de tilápia, seu processamento, ácida ou fermentada, alterou o seu aproveitamento e o desempenho dos peixes.

Os peixes alimentados com as dietas contendo SF e AAS substituindo totalmente a FT apresentaram os piores resultados de eficiência alimentar e seu crescimento foi significativamente menor quando comparado com o de peixes que receberam as dietas contendo FT, sua substituição parcial (SA₅₀, SF₅₀ e IPS₅₀) e substituição total por HA. Isto mostra que a substituição total de FT por SF na dieta pode ter afetado a microbiota, uma vez que podem aumentar a proliferação bacteriana (KOTZAMANIS et al., 2007).

Os potenciais do uso dos diferentes tipos de silagens na alimentação de peixes têm sido demonstrado em vários estudos com diferentes espécies. Os resultados obtidos por Oliveira Cavaleiro et al. (2007) mostram que silagem

ácida de cabeça de camarão pode substituir totalmente a FP na alimentação de tilápias sem afetar a qualidade nutricional das dietas e ao mesmo tempo, ser econômica.

Diversos trabalhos mostraram que níveis baixos de inclusão de silagens de peixe podem substituir a farinha de peixe em dietas e que valores superiores, promoveram crescimento reduzido e baixa eficiência alimentar. Srour (2009), estudando dois tipos de silagens fermentadas (de resíduo de pescado ou de cabeça de camarão), sugeriram que a FP pode ser substituída em 60 e 30 %, respectivamente, sem interferir no crescimento e utilização dos alimentos para as tilápias. Majumdar et al. (2014), analisando a substituição da FP por silagem de resíduos de pescado também mostraram que a substituição de 50% da FP pela silagem não apresentou diferença significativa no crescimento e parâmetros alimentares em dietas para alevinos de carpa indiana (*Labeo rohita*), enquanto que a substituição de 75% e 100% diminuíram significativamente seu crescimento.

No presente estudo as alturas das vilosidades intestinais foram maiores nos peixes que receberam os tratamentos FT, SA₁₀₀ e AAS. Era esperado que os peixes que alimentados com a dieta AAS apresentassem vilosidades mais altas em comparação aos demais tratamentos por conter maiores teores de aminoácidos livres e aumento da superfície de contato para absorver-los. O tratamento FT apresenta proteínas intactas e o HA50 apresenta substituição de 50% farinha de tilápia por silagem ácida. Este último apresenta proteínas intactas e hidrolisadas.

Os tamanhos dos peptídeos nas silagens podem desempenhar papéis importantes na regulação de algumas atividades enzimáticas, modificando o metabolismo da digestão e absorção dos nutrientes pelos animais (ZAMBONINO-INFANTE et al., 1997). Nas silagens ácidas, as frações proteicas maiores (>5000 Da) foram hidrolisadas lentamente em proteínas menores (500-2500 e 2500-5000 Da). Já as proteínas de maior massa molecular (>5000 Da) das silagens fermentadas foram mais rapidamente hidrolisadas a polipeptídeos e oligopeptídeos (Figura 5 b). No entanto, nenhum dos efeitos sobre o crescimento, o desenvolvimento e a digestão devem ser considerados como uma relação direta entre nutrientes e o animal. A adição de silagens nas dietas também pode afetar a

microbiota intestinal dos peixes, podendo aumentar a proliferação bacteriana (KOTZAMANIS et al., 2007).

Os peixes alimentados com as dietas contendo a silagem ácida, com 96 horas de hidrólise, utilizaram os nutrientes e energia para o crescimento e apresentaram o melhor desempenho. Já os peixes alimentados com dietas contendo silagem fermentada total, com 192 horas de hidrólise, apresentaram um pior desempenho. Provavelmente, as bactérias fermentativas presentes nesta silagem podem ter interferido na hidrólise das frações proteicas e ter utilizado a maior parte dos nutrientes para sua manutenção, diminuindo a disponibilidade de nutrientes para os peixes, que não digerem essas bactérias.

Pelas classes de distribuição das frações proteicas (Figura 6) pode-se notar que as silagens fermentadas apresentaram compostos proteicos com maior hidrólise que as silagens ácidas. Evidências mostram que os peixes absorvem mais eficientemente um único peptídeo que uma mistura de aminoácidos idênticos (BOGE et al., 1981; RESHKIN; AHEARN, 1991) então, era esperado que os peixes que receberam as silagens fermentadas apresentassem um desempenho zootécnico melhor que os peixes que receberam dietas contendo as silagens ácidas. No entanto, os resultados deste estudo mostram o contrário.

De acordo com Stone et al. (1989), o crescimento dos peixes que são alimentados com dietas contendo farinha de peixe é melhor devido a proteína intacta que está disponível para a digestão por um longo período com liberação gradual de aminoácidos. Em comparação, a silagem de peixe pode ser menos eficaz, uma vez que pode conter níveis elevados de aminoácidos na forma livre, que estão disponíveis para a absorção imediata e, se não forem absorvidos no momento apropriado, serão metabolizados e podem não estar disponíveis para a síntese de proteínas (MADAGE et al., 2015). Portanto, a interrupção da hidrólise na produção das silagens favoreceu seu melhor aproveitamento pelos peixes, mostrando ainda que a silagem ácida beneficiou o desempenho dos animais.

O presente estudo fornece principalmente evidências da importância da distribuição da massa molecular de peptídeos em dietas para alimentação de juvenis de tilápia do Nilo. Mais pesquisas são necessárias para complementar o estudo sobre a relação do perfil peptídico ideal na dieta e suas frações bioativas,

a fim de desenvolver um procedimento de hidrólise ótimo para valorizar os subprodutos de peixes.

6. CONCLUSÕES

Os resultados de desempenho e eficiência nutricional dos peixes mostraram que a proteína da FT em dietas para juvenis de tilápia do Nilo pode ser substituída parcialmente por SA e SF, ou mesmo totalmente por SA quando seu processamento de hidrólise for interrompido antes de apresentarem altos teores de aminoácidos livres (96 horas para SA e 192 horas para SF), demonstrando um efeito positivo para a utilização destes compostos de proteína de pequena massa molecular. Já os resultados de IPS e AAS não foram tão eficientes e prejudicaram o desempenho dos peixes.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa (Processo 2013/16773-9). Ao Prof. José Otávio e piscicultura Tuiuiú pela doação dos resíduos da filetagem de tilápia para produção das silagens. A Profa. Dra. Priscila Viera Rosa pela supervisão das análises morfométricas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official Methods of Analysis**, 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 2000.

BARROGA, A. J.; PRADHAN, R.; TOBIOKA, H. Evaluation of fish silage-sweet potato mixed diet with Italian ryegrass silage as basal ration on nitrogen utilization and energy balance in growing lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.72, n.3, p.189-197, 2001.

DOMENEGHINI, C.; ARRIGHIA, S.; RADAELLI, G.; BOSIA, G.; VEGGETTI, A. Histochemical analysis of glycoconjugate secretion in the alimentary canal of *Anguilla anguilla* L. **Acta Histochemical**, Jena, v.106, n.6, p.477–487, 2005.

EL-HAKIM, N.F.A.; EL-GENDY, M.O.A.; SALEM, M.F.I. Effect of incorporation of fish silage into diets on growth performance and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Egyptian Journal of Aquatic Biology Fisheries**, Cairo, v.11, p.101–117, 2007.

EVANS, J.J.; PASNIK, D.J.; PERES, H.; LIM, C.; KLESIUS, P.H. No apparent differences in intestinal histology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed heat-treated and non-heat treated raw soybean meal. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v.11, n.2, p.123-129, 2005.

GILDBERG, A. Review: enzymic processing of marine raw materials. **Process Biochemistry**, Barking, v.28, p.1-15, 1993.

GOOSEN, N.J.; DE WET, L.F.; GÖRGENS, J. F. Rainbow trout silage as immune stimulant and feed ingrediente in diets for Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Aquaculture Research**, Amsterdam, v.47, n.1, p.329-340, 2016.

GOOSEN, N.J.; DE WET, L. F.; GÖRGENS, J.F. Comparison of hydrolysed proteins from different raw materials in diets for Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Aquaculture International**, London, v.23, p.1165–1178, 2015.

HERNÁNDEZ, C.; OLVERA-NOVOA, M.A.; VOLTOLINA, D.; HARDY, R.W.; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, B.; DOMINGUEZ-JIMENEZ, P.; VALVERDE-ROMERO, M.; AGRAMON-ROMERO, S. Use of tuna industry waste in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fingerlings: effect on digestibility and growth performance. **Latin American Journal Aquatic Research**, Valparaiso, Chile, v.41, p.468–478, 2013.

HONORATO, C.A.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D.J.; MACHADO, M.R.F. Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo silagem de peixe. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Sao Paulo, v. 48, n. 4, p. 281-288, 2011.

HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques**. San Francisco: WH Freeman, 1979. 641 p.

IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2014. v.42, p.1-39.

KJOS, N.P.; HERSTAD, O.; SKREDE, A.; ØVERLAD, M.; SKREDE, A. Effects of dietary fish silage and fish fat on performance and egg quality of laying hens. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v.80, n.4, p.245-261, 2001.

KOTZAMANIS, Y.P.; GISBERT, E.; GATESOUPÉ, F.J.; ZAMBONINO INFANTE, J.; CAHU, C. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Comparative Biochemistry Physiology**, London, v.147A, p.205–214, 2007.

KOUSOULAKI, K.; ALBREKTSSEN, S.; LANGMYHR, E.; OLSEN, H.J.; CAMPBELL, P.; AKSNES, A. The water soluble fraction in fish meal (stickwater) stimulates growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) given high plant protein diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v.289, p.74–83, 2009.

LEAL, A.L.G.; DE CASTRO, P.F.; DE LIMA, J.P.V.; CORREIA, E.S.; BEZERRA, R.S. Use of shrimp protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) feeds. **Aquaculture International**, London, v.18, p.635–646, 2010.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 4.ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2004.

LIQUORI, G.E.; MASTRODONATO, M.; ZIZZA, S.; FERRI, D. Glycoconjugate histochemistry of the digestive tract of *Triturus carnifex* (Amphibia, Caudata). **Journal of Molecular Histology**, Dordrecht, v.38, n.3, p.191-199, 2007.

MADAGE, S.S.K.; MEDIS, W.U.D.; SULTANBAWA Y. Fish Silage as Replacement of Fishmeal in Red Tilapia Feeds, **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v.27, n.2, p.95-106, 2015.

MAJUMDAR, R.K.; DEB, S.; NATH, K.C. Effect of co-dried silage from fish market waste as substitute for fish meal on the growth of the Indian major carp *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) fingerlings **Indian Journal Fisheries**, New Delhi, v.61, n.4, p.63-68, 2014.

NGUYEN, T.N.; DAVIS, D.A.; SAOUD. I.D. Evaluation of alternative protein sources to replace fish meal in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis* spp. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.40, p.113–121, 2009.

NRC - National Research Council. **Nutrient requirement of fish and shrimp**. Washington: National Academy Press, 2011.

OLIVEIRA CAVALHEIRO, J.M.; SOUZA, E.O.; BORA, P.S. Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) feed. **Bioresource Technology**, Essex, v.98, p.602–606, 2007.

RAMÍREZ, J.; IBARRA, J.; ARCE, F.; ROSAS, P.; ULLOA, J.; MATSUMOTO, K.; VALLEJO, B.; MAZORRA, M. Preparation of biological fish silage and its effect on the performance and meat quality characteristics of quails (*Coturnix coturnix japonica*). **Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal**, Curitiba, v.56, p.1002, 2003.

ROMARHEIM, O. H.; ZHANG, C.; PENN, M.; LIU, Y. J.; TIAN, L. X.; SKREDE, A.; KROGDAHL, A.; STOREBAKKEN, T. Growth and intestinal morphology in cobia (*Rachycentron canadum*) fed extruded diets with two types of soybean meal partly replacing fish meal. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v.14, n.2, p.174-180, 2008.

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

SKALLI, A.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; KOTZAMANIS, Y.; FABREGAT, R.; GISBERT, E. Peptide molecular weight distribution of soluble protein fraction affects growth performance and quality in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v.20, p.118–131, 2014.

ŠLIŽYTĖ, R., DAUKŠAS, E., FALCH, E., STORRØ, I., RUSTAD, T. Characteristics of protein fractions generated from cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 2021–2033, 2005.

SRICHANUN, M., TANTIKITTI, C., KORTNER, T. M., KROGDAHL, Å., 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**, Amsterdam, v. 428–429, p. 195–202, 2014.

SROUR, T.M. Fish waste and shrimp head silage as dietary protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Egyptian Journal of Animal Production**, Cairo, v.46, n.1, p.69-84, 2009.

STONE, F.E.; HARDY, R.W.; SHEARER, K.D.; SCOTT, T.M. Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.76, p.109–118, 1989.

ZAMBONINO-INFANTE, J. L., CAHU, C. L., PÉRES, A. Partial substitution of di and tripeptides for native proteins in seabass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 127, p. 608–614, 1997.

ZHENG, K.; LIANG, M.; YAO, H.; WANG, J.; CHANG, Q. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v.18, p.297–303, 2012.