



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

PEDRO ABÍLIO VIEIRA ROCHA JÚNIOR

**USO DAS PROTEASES DO LÁTEX DE *Calotropis procera* EM DIETAS PARA
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*): DESEMPENHO ZOOTÉCNICO,
DIGESTIBILIDADE E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS**

FORALEZA

2018

PEDRO ABÍLIO VIEIRA ROCHA JÚNIOR

USO DAS PROTEASES DO LÁTEX DE *Calotropis procera* EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*): DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, DIGESTIBILIDADE E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.
Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R575u Rocha Júnior, Pedro Abílio Vieira.
 Uso das proteases do látex de *Calotropis procera* em dietas para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): : desempenho zootécnico, digestibilidade e parâmetros hematológicos / Pedro Abílio Vieira Rocha Júnior. – 2018.
 103 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2018.
 Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.
 Coorientação: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
1. Aquicultura. 2. Enzimas. 3. Alimentação. I. Título.

CDD 639.2

PEDRO ABÍLIO VIEIRA ROCHA JÚNIOR

USO DAS PROTEASES DO LÁTEX DE *Calotropis procera* EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*): DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, DIGESTIBILIDADE E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas (Externo)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcelo Vinícius do Carmo e Sá
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha esposa, filhos, familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me amparar nas horas em que mais precisei, e ter me concedido as forças necessárias para continuar firme para a realização deste trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias (*in memorian*), por ter contribuído para minha formação por meio de sua dedicação, empenho e ensinamentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio, pela sua excelente orientação, integridade, humildade, humanidade e sempre disposto a ajudar.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Márcio Viana Ramos, por sua amizade, seus conselhos, incentivos e acolhimento em seu laboratório desde meus primeiros passos na universidade.

A Profa. Dra. Elenise Gonçalves, por sua generosidade em ter prontamente disponibilizado seu laboratório para realização deste trabalho.

Ao Prof. Msc. Oscar Pacheco Passos Neto pela confiança e o auxílio com o empréstimo de equipamentos de suma importância para o sucesso do experimento.

Ao Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza e sua equipe técnica pela contribuição na execução deste trabalho, cedendo o Laboratório de Tecnologia do Pescado – LATEPE para a realização das diversas análises experimentais.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas e Prof. Dr. Marcelo Vinícius do Carmo e Sá pelo tempo dedicado e pelas valiosas colaborações e sugestões.

A Coordenação da Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, em nome da coordenadora Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa e a ex-coordenadora Profa. Dra. Silvana Saker Sampaio.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao meu pai, Pedro Abilio Rocha (*in memorian*), obrigado pelo grande homem, amigo bondoso e generoso que o senhor foi.

A minha mãe Maria de Loudes Vieira Rocha, e a minha irmã Sandra Helena Vieira Rocha, pelo carinho e união.

A minha esposa Itala Tarciana Paiva Sombra, por todo amor, afeto, paciência, e por ter me dado forças nos momentos de desânimo.

Aos meus filhos amados Thales Sombra Rocha e Thais Sombra Rocha, pelo carinho e o afeto de ambos.

Aos meus sogros Tarciso Rodrigues Sombra e Iracy Paiva Sombra, por terem me acolhido no seio de sua família com amor e cuidado de verdadeiros pais, obrigado pelos conselhos e pela paciência frente às minhas dificuldades.

Aos meus cunhados Itarciane Paiva Sombra e Enio Tarsom Paiva Sombra pela alegria, ajuda e incentivo durante essa caminhada.

Ao meu amigo Paulo Sérgio, por sua bondade, humildade e desprendimento em contribuir de forma especial para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Plantas Laticíferas principalmente pela amizade e pelos momentos de descontração: Camila Freitas, Ayrles, Débora, Julianny, Beatriz Nishi, Carolina Viana, Camila Tauane, Bruna, Brena, Jackson, João Pedro, Eilton Sousa, Wallace Teixeira, Daniel de Brito, Francimauro Morais, Sandro Rios, Rafael Coelho, Maria Zelândia, Mirele Vasconcelos, obrigado meus amigos por tudo que passamos juntos.

Por fim a todos os meus familiares e amigos que indiretamente contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho com incentivos, palavras de carinho e motivação.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que eu era antes.”

Martin Luther King.

RESUMO

Dentre os custos produtivos envolvidos na aquicultura, a alimentação artificial é o mais expressivo, justificando a realização de diversos estudos priorizando o equilíbrio adequado de rações que aumente a produtividade e reduza o impacto ambiental. A utilização de enzimas é uma promissora estratégia para maximizar a eficiência de utilização das dietas, por que diminuem os custos de produção mantendo o desempenho dos animais, pois melhoram a digestibilidade e reduzem fatores antinutricionais. O presente trabalho teve como proposta avaliar o efeito da inclusão de diferentes concentrações das proteases do látex de *Calotropis procera* (LP) em rações para tilápia do Nilo, por meio do desempenho zootécnico, parâmetros hematológicos, digestibilidade, composição centesimal dos filés e rações, e aferição dos parâmetros de qualidade da água. O experimento teve duração de 60 dias com a utilização de 160 alevinos com peso inicial de $3,10 \pm 0,55$ g, distribuídos em 16 aquários, que receberam rações com três níveis de inclusão do (LP) (100, 200, 300 mg kg⁻¹) respectivamente (Lp-Cp 01; Lp-Cp 02; Lp-Cp 03) e um controle (sem LP). Os experimentos foram realizados com quatro repetições cada e os animais foram alimentados três vezes ao dia (8, 12, e 16 horas), variando de 10 a 5% de sua biomassa. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, com a realização do teste de comparação múltipla de médias Tukey ($p < 0,05$). Dentre os parâmetros de qualidade de água, o fósforo reativo foi o único parâmetro que atingiu valores acima do recomendado, os demais parâmetros se mantiveram estáveis e dentro dos limites recomendados para a espécie. Para o desempenho zootécnico, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Contudo houve uma tendência de melhora para o ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar aparente (CAA), biomassa final (BF) e índice de eficiência proteica (IEP) nos tratamentos com (LP), com destaque para o (Lp-Cp 03), que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para taxa de crescimento específico (TCE) e eficiência alimentar (EA) em relação ao controle. Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína bruta, matéria seca e lipídios, bem como os parâmetros da composição corporal não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Os parâmetros hematológicos não demonstraram diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Os níveis de inclusão testados das proteases de (LP), nas condições avaliadas, não promoveram uma melhoria na digestibilidade das dietas, contudo não houve comprometimento do desempenho produtivo e hematológico dos animais, podendo ser considerada uma alternativa promissora, mediante a realização de estudos adicionais.

Palavras-chaves: Aquicultura. Enzimas. Alimentação.

ABSTRACT

Among the productive costs involved in aquaculture, artificial feeding is the most expressive, justifying the performance of several studies prioritizing the appropriate balance of rations that increases productivity and reduces environmental impact. The use of enzymes is a promising strategy to maximize the efficiency of the use of diets, because they reduce the costs of production while maintaining the performance of the animals, as they improve the digestibility and reduce antinutritional factors. The objective of this work was to evaluate the effect of the inclusion of different concentrations of *Calotropis procera* latex (LP) proteases on Nile tilapia rations by means of zootechnical performance, hematological parameters, digestibility, centesimal composition of fillets and rations, and water quality parameters. The experiment lasted 60 days with the use of 160 fingerlings with initial weight of 3.10 ± 0.55 g, distributed in 16 aquariums, fed rations with three levels of inclusion (LP) (100, 200, 300 mg kg⁻¹) respectively (Lp-Cp 01; Lp-Cp 02; Lp-Cp 03) and a control (without LP). The experiments were performed with four replicates each and the animals were fed three times a day (8, 12, and 16 hours), ranging from 10 to 5% of their biomass. The obtained data were submitted to ANOVA, with the multiple comparison test of Tukey averages ($p < 0.05$). Among the parameters of water quality, the reactive phosphorus was the only parameter that reached values above the recommended, the other parameters were stable and within the limits recommended for the species. For zootechnical performance, no significant difference ($p > 0.05$) was observed between the treatments. However, there was a trend of improvement in weight gain (GP), daily weight gain (GPD), apparent feed conversion (CAA), final biomass (BF) and protein efficiency index (IEP) in treatments with (LP), (Lp-Cp 03), which presented a significant difference ($p < 0.05$) for specific growth rate (TCE) and feed efficiency (AE) in relation to the control. The apparent digestibility coefficients (CDA) of crude protein, dry matter and lipids, as well as body composition parameters did not present significant differences between treatments ($p > 0.05$). Hematological parameters did not show a significant difference between treatments ($p > 0.05$). The inclusion levels of the (LP) proteases under the conditions evaluated did not improve the digestibility of the diets, however, there was no compromise of the productive and hematological performance of the animals and could be considered a promising alternative, through additional studies.

Keywords: Aquaculture. Enzymes. Feeding.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Hidrólise de exopeptidases e endopeptidases sobre uma cadeia polipeptídica...	35
Figura 2- Aspectos gerais da planta <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.....	37
Figura 3- Sistema de cultivo (Aquários vista lateral e frontal).....	42
Figura 4- Coleta do látex de <i>Calotropis procera</i>	44
Figura 5- Esquema para obtenção da fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> (LP)	44
Figura 6- Látex, material após processamento, LP (<i>Calotropis procera</i>).....	45
Figura 7- Coleta de sangue dos alevinos de tilápia do Nilo.....	52
Figura 8- Biometria final do experimento.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Conversão alimentar aparente de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.....	61
Gráfico 2 - Eficiência alimentar dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.....	63
Gráfico 3 - Número de eritrócitos totais dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.....	70
Gráfico 4 - Hematócrito dos alevinos de tilápias do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.....	72
Gráfico 5 - Concentração de hemoglobina em alevinos de tilápias do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.....	73
Gráfico 6 - Volume corpuscular médio (VCM) em alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.....	74
Gráfico 7 - Hemoglobina corpuscular média (HCM) em alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.....	75
Gráfico 8 - Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em alevinos de tilápia do Nilo alimentados níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Enzimas, substratos e efeitos das enzimas utilizadas em dietas para monogástricos.....	31
Tabela 2 - Aplicações biotecnológicas das proteases de <i>Caloropsis procera</i>	39
Tabela 3 - Cronograma de atividades de limpeza, alimentação e coleta de fezes dos alevinos de tilápia do Nilo no ensaio de digestibilidade.....	46
Tabela 4 - Composição centesimal das rações utilizadas no cultivo de alevinos de tilápia do Nilo com níveis crescentes de (LP).....	54
Tabela 5 - Parâmetros de qualidade da água do cultivo de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.....	55
Tabela 6 - Parâmetros zootécnicos dos alevinos de tilápias do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.....	58
Tabela 7 - Sobrevivência e desempenho produtivo de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.....	60
Tabela 8 - Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína bruta(PB),extrato etéreo(EE) e matéria seca(MS) dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.....	65
Tabela 9 - Composição centesimal dos filés de alevinos da tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.....	68
Tabela 10- Contagem total e diferencial de leucócitos de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CAA	Conversão alimentar aparente
CDA	Coefficiente de digestibilidade aparente
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
EA	Eficiência alimentar
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FCA	Fator de conversão alimentar
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Ht	Hematócrito
IEP	Índice de eficiência proteica
LASIP	Laboratório de Aquicultura e Sistemas Integrados de Produção
LATEPE	Laboratório de Tecnologia do Pescado
LP	Proteínas do látex
LP-Cp	Proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i>
MS	Matéria seca
PB	Proteína bruta
TCE	Taxa de crescimento específico
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Aquicultura.....	19
2.2	Tilápia do Nilo.....	20
2.3	Alimentação artificial.....	22
2.4	Digestibilidade.....	24
2.5	Parâmetros hematológicos.....	25
2.6	Composição centesimal do pescado.....	28
2.7	Enzimas.....	29
2.8	Enzimas na nutrição animal.....	30
2.9	Enzimas vegetais.....	33
2.10	Látex e plantas laticíferas.....	35
2.11	<i>Calotropis procera</i> (Ait.) R.Br.....	36
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	Objetivo geral.....	41
3.2	Objetivos específicos.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1	Aquisição dos alevinos e aclimatação.....	42
4.2	Sistema de cultivo.....	42
4.3	Delineamento experimental e manejo de cultivo.....	43
4.4	Coleta e processamento do látex de <i>Calotropis procera</i>	43
4.5	Preparo das rações.....	45
4.6	Ensaio de digestibilidade.....	46
4.7	Parâmetros de Qualidade de água.....	47
4.8	Parâmetros zootécnicos.....	48
4.9	Composição centesimal da ração e do filé.....	50
4.9.1	<i>Umidade</i>	50
4.9.2	<i>Lipídios</i>	50
4.9.3	<i>Cinzas</i>	51
4.9.4	<i>Proteína</i>	51
4.10	Parâmetros hematológicos.....	52

4.10.1	<i>Coleta de sangue</i>	52
4.10.2	<i>Confecção das extensões sanguíneas</i>	52
4.10.3	<i>Eritograma</i>	53
4.10.4	<i>Leucograma</i>	53
4.10.5	<i>Contagem total e diferencial de leucócitos</i>	53
4.11	<i>Análises estatísticas</i>	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Composição centesimal das rações	54
5.2	Qualidade de água	55
5.3	Desempenho zootécnico	57
5.4	Ensaio de digestibilidade	65
5.5	Composição centesimal dos filés	68
5.6	Parâmetros hematológicos	70
5.6.1	<i>Eritograma</i>	70
5.6.2	<i>Leucograma</i>	76
6	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é definida como uma atividade multidisciplinar, referente ao cultivo de diversos organismos aquáticos, como plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes, cujo ciclo de vida, em condições naturais, ocorre total ou parcialmente em meio aquático (BRASIL, 2009; OLIVEIRA, 2009). Constituindo-se como a atividade agropecuária que mais cresce no Brasil, produzindo importantes fontes de proteína para consumo humano. Dentre os setores que fazem parte da aquicultura, um dos que mais se destacam é a piscicultura (TAVARES-DIAS; MARIANO, 2015).

O crescimento mundial acelerado dessa atividade é em decorrência da escassez de alimentos oriundos dos ambientes naturais. A crescente demanda por quantidade e qualidade de alimentos vem impulsionando o desenvolvimento da aquicultura, uma vez que sua simples captura na natureza depara-se com sinais evidentes de colapso do estoque dos recursos aquáticos, que pode ser comprovado pelas elevadas taxas de crescimento em sua oferta mundial (NATORI *et al.*, 2011).

A oferta e consumo de pescado no Brasil têm crescido graças à expansão da aquicultura e aumento nas importações. O país é conhecido por apresentar um grande potencial para aquicultura, graças ao forte mercado, indústria de rações estabelecida, e amplo território, em que grande parte está sob um clima tropical (KUBTIZA, 2015). Por fim, registra-se que a aquicultura no Brasil, em especial a criação de tilápias, é uma atividade do agronegócio com pacote tecnológico de produção estabelecido (SUSSEL, 2013).

Com a intensificação da produção, pela maior densidade de estocagem, diminuição do tempo de cultivo, e maior ganho em peso dos animais, exige que estes sejam alimentados com rações visando atender as exigências nutricionais que outrora eram supridas apenas com alimentação natural. Alguns fatores podem influenciar as exigências nutricionais do animal e a disponibilidade dos nutrientes presentes nas rações, tais como: a fase de crescimento, manejo, fisiologia do animal, aspectos físico-químicos da água e, principalmente, o tipo de alimento e a proporção em que este se encontra na ração (FURUYA, 2010).

As proteínas são os ingredientes de maior custo em dietas formuladas e, por isso, devem ser incluídas cuidadosamente, com o intuito de atender as necessidades nutricionais do organismo cultivado, melhorando a conversão alimentar, ao mesmo tempo em que reduz os gastos e o aporte de efluentes ricos em nutrientes nos ecossistemas aquáticos (ABDEL-TAWWAB; AHMAD, 2009).

O fornecimento de dietas deficientes em proteína pode resultar em diminuição no crescimento (NOGUEIRA *et al.*, 2005), enquanto que acima do exigido, o excedente é utilizado como fonte energética aumentando a excreção de resíduos nitrogenados, que são prejudiciais ao peixe e ambiente de criação (HAYASHI *et al.*, 2002; NRC, 2011).

A aquicultura moderna, assim como outras atividades produtivas, deve seguir os preceitos da sustentabilidade, o que inclui a utilização sustentável de recursos naturais para alimentação e exige a substituição da farinha e óleo de peixe nas rações comerciais por componentes de menor custo e maior abundância na natureza, como as proteínas vegetais. Tais ingredientes têm sido utilizados com certa restrição devido à presença de fatores antinutricionais, baixa qualidade proteica e digestibilidade reduzida (TUSCHE *et al.*, 2011).

A utilização de aditivos nas dietas de peixes é uma das estratégias para diminuir os custos de produção, visando melhorar as dietas tanto para um melhor desempenho produtivo, como possibilitando a utilização de alimentos substitutos, com o objetivo final de maior retorno econômico de forma sustentável. A utilização de enzimas exógenas se apresenta como uma estratégia importante, especialmente pelo fato destas eliminarem muitos dos fatores antinutricionais presentes nos ingredientes de origem vegetal (AYHAN *et al.*, 2008; DALSGAARD *et al.*, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas, o interesse em produtos naturais de plantas com aplicações biotecnológicas têm crescido rapidamente. Existe uma grande diversidade de enzimas que são utilizadas na indústria, incluindo enzimas proteolíticas de origem vegetal. (GONZÁLEZ; BADILLO; BARRADAS, 2011).

Enzimas como as proteases têm importante papel em processos biológicos de todos os seres vivos: digestão, sinalização, crescimento celular em animais, desenvolvimento e amadurecimento de frutos, degradação proteica, reconhecimento de patógenos e apoptose em plantas (ANRI; MAMBOYA, 2012; COSTA; LIMA, 2016).

Cerca de 10% das espécies de angiospermas libertam fluidos laticíferos quando seus tecidos são danificados (NASCIMENTO *et al.*, 2016). O látex é um fluido tipicamente

branco, armazenado em tecidos chamados laticíferos, contendo muitos compostos fitoquímicos, tais como: proteínas, alcaloides, esteróis, ácidos graxos, amidos, açúcares, óleos, taninos, proteases cisteínicas e serínicas, quitinases, oxidases, glucosidades, lipases, peroxidases, lectinas, inibidores de proteases (HELI *et al.*, 2008; SANTOS ; VAN, 2011).

O látex de *C. procera* é uma fonte rica de enzimas proteolíticas e muitas destas enzimas têm sido analisadas em termos moleculares, enzimáticos, funcionais e prospecção biotecnológica (RAMOS *et al.*, 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aquicultura

A aquicultura é considerada uma prática tradicional antiga, encontrada em várias culturas pelo mundo. Há registros históricos evidenciando a técnica em documentos e manuscritos chineses e até mesmo em hieróglifos egípcios. Por definição, a aquicultura é considerada uma atividade multidisciplinar, referente ao cultivo de diversos organismos aquáticos, como plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes, cujo ciclo de vida em condições naturais, ocorre total ou parcialmente em meio aquático (BRASIL, 2009; OLIVEIRA, 2009).

No período 2000/2012, a aquicultura cresceu 6,7% no mundo, enquanto no mesmo período a produção do milho cresceu 4,7%; a avicultura cresceu 3,3%; o trigo, 1,4%; a bovinocultura e o cultivo do arroz, 1,2%; a suinocultura, 1%; e a pesca decresceu 0,2%, ressaltando a importância dessa atividade. A aquicultura é a maior responsável por atender a crescente demanda de pescado em nível mundial, e isso tende a continuar nas próximas décadas, pois a pesca não será suficiente para atender essa demanda (BRASIL, 2015).

A aquicultura continental foi responsável por 65% do aumento da produção de peixes na década (2005-2014), com um crescimento de 5,8% por ano, uma percentagem inferior a década anterior (1995-2004) de 7,2%. A produção mundial de pescado em 2014 foi de 167,2 milhões de toneladas sendo que a aquicultura contribuiu com 73,8 milhões de toneladas, superando a produção em 2012, que foi de 158 milhões de toneladas e destas 66,6 milhões de toneladas foram provenientes da produção aquícola. O Brasil encontra-se na 14ª posição na produção mundial aquícola responsável por uma produção de 562.500 toneladas em 2014, sendo o segundo maior produtor da América do Sul, ficando atrás somente do Chile (FAO, 2016).

O Brasil destaca-se pelo grande potencial para a expansão da aquicultura, devido a disponibilidade de recursos hídricos, diversidade de espécies aquícolas, clima favorável, uma vasta extensão costeira de mais de 8 mil km, zona econômica exclusiva (ZEE) de 3,5 milhões de km² e sua dimensão territorial com aproximadamente 13% da água doce renovável do planeta (ROCHA *et al.*, 2013).

Na aquicultura, a alimentação é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento eficiente e saudável dos animais. Contudo, há grandes desafios com relação à nutrição, devido ao número de espécies com potencial para cultivo (BITTENCOURT *et al.*, 2010). Principalmente no que se refere à disponibilidade de proteína, pois tem sido um dos campos mais pesquisados na nutrição das dietas de peixes (COSTA *et al.*, 2009).

Com o aumento do custo de produção devido ao alto preço das matérias primas tradicionalmente utilizadas na formulação de rações comerciais para peixes, a busca por novas estratégias para diminuir o preço final destas rações é essencial. A eficiência produtiva associada a custos reduzidos só pode ser alcançada através do aumento na eficiência de utilização das dietas e na maior variedade de ingredientes que possam ser utilizados na formulação destas (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

As proteínas são ingredientes de alto custo em dietas formuladas e, por isso, devem ser incluídas cuidadosamente, com o intuito de atender as necessidades nutricionais do organismo cultivado, melhorando a conversão alimentar, ao mesmo tempo em que reduz os gastos e o aporte de efluentes ricos em nutrientes nos ecossistemas aquáticos (ABDEL-TAWWAB; AHMAD, 2009).

Portanto, as proteínas representam nutrientes de máxima importância para o organismo animal em crescimento, assim como em todas as fases da vida. É necessária uma ingestão regular de proteína, pois os aminoácidos são exigidos continuamente pelo organismo para a formação de novas proteínas, como para reposição das que foram degradadas no corpo (LIMA *et al.*, 2013; SAKOMURA *et al.*, 2014).

A aquicultura moderna, assim como outras atividades produtivas, deve seguir os preceitos da sustentabilidade, o que inclui a utilização sustentável de recursos naturais para alimentação e exige a substituição da farinha e óleo de peixe nas rações comerciais por componentes de menor custo e maior abundância na natureza, como as proteínas de origem vegetal. Tais ingredientes têm sido utilizados com certa restrição devido à presença de fatores antinutricionais, baixa qualidade proteica e digestibilidade reduzida (TUSCHE *et al.*, 2011).

Com o avanço da tecnologia e o aumento da demanda por proteína animal, a aquicultura tem ocupado cada vez mais um espaço no cenário mundial, se consolidando como a atividade que mais cresce no agronegócio (FAO, 2016). As condições sanitárias e nutricionais dos animais são importantes para os piscicultores assegurarem uma boa qualidade do pescado do ambiente de cultivo até chegar ao consumidor (FUCHS, *et al.*, 2015).

2.2 Tilápia do Nilo

Tilápia é o nome genérico de um grupo de ciclídeos endêmicos da África. É um peixe teleosteo, pertencente à família *Cichlidae*, da ordem Peciformes, a qual se constitui na maior ordem de animais vertebrados, contando com aproximadamente 70 espécies e 100 subespécies, com três gêneros que se sobressaem por sua importância para a aquicultura, *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia* (POPMA; MASSER, 1999; McANDREW, 2000).

Nativas da África, Israel e Jordânia, as tilápias apresentam carne branca de alta qualidade, ótima aceitação no mercado, qualidades nutritivas e organolépticas do seu filé, se adaptam aos mais diversos sistemas de cultivo, podendo ser cultivadas em águas com salinidades elevadas e temperaturas baixas. Apresentam hábitos alimentares que vão do herbívoro ao detritívoro (MEURER; HAYASHI; BOSCOLO, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi introduzida no Brasil, em 1971, pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS). É um peixe de hábito alimentar onívoro, planctófago, alta prolificidade e apresenta precocidade em sua reprodução (SILVA, 2009). É um dos peixes mais cultivados no mundo, sendo sua produção realizada em mais de 135 países e territórios em todos os continentes (FAO, 2014). O Brasil é considerado um dos países de maior potencial para aquicultura, sendo a tilápia a espécie mais cultivada (KUBTIZA, 2015).

É uma das espécies que possui crescimento rápido por se alimentarem de itens básicos da cadeia trófica e desenvolverem uma boa conversão alimentar, além de possuírem carne com boas características organolépticas, indicada para processamento industrial para obtenção de filés sem espinhas e de grande versatilidade industrial e culinária (FURUYA, 2010).

Outros fatores colaboraram para o aumento do cultivo da tilápia, tais como: desenvolvimento de tecnologia de reversão sexual, melhoramento genético, aceitação de alimento artificial desde a fase larval, adaptação ao manejo, resistência a baixos níveis de oxigênio, possibilidade de ser cultivada em diversos sistemas de produção, desde o semi-intensivo, como em cultivos intensivos, em *raceways* e tanques-rede, além de possuir um filé de boa qualidade e aceitação, pelo mercado consumidor (BHUJEL, 2000; KUBITZA, 2011).

É uma das principais espécies cultivadas na piscicultura continental destacando-se por sua resistência às doenças e tolerância a condições extremas de cultivo, como altas densidades em ambientes hostis que resultam em altos níveis de estresse (PONTES, 2011).

Pode ser cultivada tanto em água doce, estuarina ou salobra (DE OCA *et al.*, 2015; EL-ZAEEM *et al.*, 2013). Alguns fatores importantes para este crescimento foram a boa aceitação dos consumidores e preços estáveis no mercado (WANG; LU, 2015).

As exportações de tilápia no Brasil durante os primeiros três meses de 2016 alcançaram um total de 188,8 toneladas no valor de USD 1,5 milhão, enquanto no mesmo período em 2015 exportações totais foram de 5 toneladas no valor de USD 49.500 (+3.675% e 2.872%, respectivamente) (EMBRAPA, 2016).

Esse crescimento na produção de tilápias é devido a um aumento nas pesquisas da sua cadeia produtiva e ao desenvolvimento de variedades melhoradas (ALMEIDA *et al.*, 2014).

Mediante importância da espécie para a aquicultura, diversas pesquisas são realizadas no âmbito da nutrição de tilápias, como definição de exigências nutricionais (TEIXEIRA *et al.*, 2008), coeficiente de digestibilidade dos alimentos utilizados nas formulações de rações (TACHIBANA *et al.*, 2017), inclusão de aditivos alimentares como prebióticos e utilização da biotecnologia com a suplementação enzimática (MOURA *et al.*, 2012).

2.3 Alimentação artificial

Dentre os custos de produção envolvidos na aquicultura, a alimentação artificial é frequentemente citada como sendo o custo mais expressivo, representando mais de 50% dos custos operacionais da aquicultura intensiva. O preço das rações depende de diversos fatores, como teor proteico, origem da proteína, ingredientes específicos e métodos de fabricação (GLENCROSS; BOOTH; ALLAN, 2007).

As proteínas são os principais constituintes orgânicos nos peixes, correspondendo a 65 a 75% do total de matéria seca corporal. São responsáveis pela estrutura (músculo, colágeno e queratina), mecanismo de regulação do metabolismo (enzimas e hormônios), transporte de substâncias e defesa (anticorpos). Os peixes consomem proteínas na forma de alimento para obter aminoácidos pelo processo de hidrólise, os quais são absorvidos pelo trato intestinal e distribuídos pelo sangue para todos os órgãos e tecidos (PORTZ ; FURUYA, 2013).

As proteínas possuem importante papel nos processos biológicos, uma vez que as transformações moleculares que definem o metabolismo celular são mediadas pela catálise proteica. Proteínas são moléculas complexas e muito versáteis nos sistemas vivos, pois atuam em diversas funções essenciais como: catalisadoras no transporte e armazenamento de outras, e as que geram força mecânica e eletroquímica (VOET *et al.*, 2014).

Considerada o componente mais importante dos tecidos, a proteína é o macro nutriente essencial na dieta. Sua exigência é priorizada em estudos nutricionais por apresentar o mais alto custo alimentar, uma vez que o nível utilizado é significativamente alto em um sistema aquícola, comparado a animais terrestres. O preço da ração está relacionado principalmente ao teor de proteína, de modo que a alimentação dos peixes pode ter um custo de produção acima de 60% (FERREIRA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Vale salientar, que apesar da importância atribuída à concentração de proteína ideal, os peixes necessitam de uma alimentação equilibrada em aminoácidos indispensáveis, devendo estar presentes em adequadas proporções, obtidos pela combinação de ingredientes ou suplementados na forma industrial (ABIMORAD ; CASTELLANI 2011). Os constituintes básicos das proteínas são os aminoácidos, que estão covalentemente ligados por meio de ligações peptídicas (GUYTON; HALL, 2011; NELSON; COX, 2011).

De modo geral, os ingredientes utilizados na composição das rações para aquicultura são os mesmos utilizados para compor as rações de outros animais. Os ingredientes, em sua maioria, são produtos, ou subprodutos da pesca extrativista, de abatedouros animais ou da agricultura, refinados e processados (BOYD, 2015).

A farinha e o óleo de peixe constituem os dois principais ingredientes e as principais fontes aquáticas de proteína e lipídios no mercado de ração animal (TACON; HASAN; METIAN, 2011). A farinha de peixe é muito empregada na nutrição animal devido a sua alta concentração proteica em torno de 50% e excelente perfil de aminoácidos, cálcio, fósforo e outros minerais (BOYD, 2015), alta digestibilidade e por normalmente não possuir fatores antinutricionais (GATLIN III *et al.*, 2007).

Devido ao declínio da pesca extrativista, somada ao crescimento do consumo mundial de pescado e a expansão da indústria de rações, a aquicultura tem buscado por fontes alternativas proteicas e energéticas que não limitem o crescimento do setor (TROELL *et al.*, 2014).

A substituição da farinha de peixe por fontes de proteínas vegetais, sustentáveis e ambientalmente corretas, é uma forte tendência em nutrição na aquicultura que tem sido adotada para diferentes espécies. Além disso, é uma forma de reduzir os custos da ração, visto que a proteína de pescado é o nutriente de maior custo em dietas. (CABRAL *et al.*, 2013; KAUSHIK *et al.*, 2004; VALENTE *et al.*, 2016).

A adição de proteína vegetal, na dieta de organismos aquáticos, possibilitou a redução do uso da farinha de peixe principalmente nas rações de peixes herbívoros e onívoros, (BOSTOCK *et al.*, 2010; TACON & METIAN, 2008). Embora já se tenha demonstrado a capacidade de ingredientes vegetais em substituir parte da farinha de peixes, seu uso é limitado por fatores biológicos, ambientais e nutricionais (KAMALAM *et al.*, 2017).

Um dos mais importantes fatores negativos nos vegetais são os antinutricionais, tais como os inibidores de proteases, os carboidratos não digestíveis, as saponinas, lectinas, alcaloides, fitato, gossipol, oxalatos, toxinas e as possíveis proteínas alergênicas (KROGDAHL *et al.*, 2010).

Diante dos fatos, faz-se necessária uma busca constante por avanços em tecnologia de alimentos e de processamento eficazes para neutralização dos efeitos negativos de tais fatores antinutricionais, dentre os quais: métodos de extração e tratamento térmico, incorporação de enzimas e utilização de plantas geneticamente modificadas (TRUSHENSKI; KASPER; KOHLER, 2006).

O uso combinado de enzimas em dietas para peixes tem demonstrado melhoras na redução da presença dos fatores antinutricionais, que induzem o aumento da viscosidade na dieta (CASTILLO ; GATLIN, 2015), melhoria no crescimento corporal pela utilização da dieta (ZAMINI *et al.*, 2014), melhora na digestibilidade aparente de nutrientes (DALSGAARD *et al.*, 2012) e melhora no ganho de peso (GHOMI *et al.*, 2012).

2.4 Digestibilidade

O valor nutricional não está somente relacionado à composição química dos ingredientes, tendo relação direta com a quantidade do nutriente ou energia a ser absorvido ou utilizado pelo organismo animal. A composição química de um alimento pode dar a impressão deste ser excelente como fonte de nutrientes, mas será de baixo valor nutritivo se seus nutrientes não forem bem digeridos e absorvidos no trato gastrintestinal da espécie alvo (KOPRUCU ; OZDEMIR, 2005).

Vários são os fatores que influenciam os coeficientes de digestibilidade dos alimentos em peixes, tais como: a espécie do peixe, a salinidade, temperatura da água e outros. Os ingredientes proteicos ou energéticos de origem animal ou vegetal possuem diferentes coeficientes de digestibilidade, dependendo da capacidade digestiva dos peixes, a qual está diretamente relacionada ao seu hábito alimentar (BOMFIM ; LANNA, 2004).

O conhecimento dos valores de digestibilidade e da energia dos nutrientes admite o preparo de dietas que melhoram o equilíbrio orgânico do animal, aumentam as defesas contra doenças e resulta em maior produtividade nos sistemas intensivos de criação, sendo indispensável para atender as aspirações biológicas e econômicas do cultivo de organismos aquáticos (FURUYA, 2010). Além disso, é essencial para a elaboração de dietas que atendam o aspecto ambiental (PEZZATO *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2001).

A digestibilidade aparente pode ser determinada através de métodos *in vivo* e *in vitro*. Os métodos de coleta *in vivo* são os diretos e indiretos, carecem da coleta de material fecal, são utilizados para determinar a digestibilidade aparente do nutriente isoladamente ou de uma dieta utilizada para alimentar um determinado organismo aquático (NRC, 2011).

Utiliza-se o termo “aparente” por supor que o material fecal venha contaminado por fragmentos de alimento não consumido, células da mucosa estomacal, bactérias, enzimas digestivas (CÓRDOVA-MURUETA *et al.*, 2003).

O método *in vivo* direto ou gravimétrico consiste na quantificação de nutrientes ingeridos e excretados, através da coleta total de ração não ingerida e fezes dos organismos cultivados, sendo o grande desafio separar o material fecal do restante de excrementos que são gerados após a alimentação do animal (LEE ; LAWRENCE, 1997).

O método *in vivo* indireto baseia-se na coleta de uma amostra de fezes utilizando um marcador inerte adicionado à ração. A digestibilidade dos nutrientes é determinada comparando-se a concentração do marcador encontrado nas fezes em relação a concentração incorporada nas dietas (NRC, 2011).

Atualmente, se utiliza com maior frequência o método indireto que envolve o uso de marcadores inertes, sendo o mais usual o óxido de cromo (Cr_2O_3), de forma que a coleta total das fezes não é necessária, apenas uma amostra representativa (NRC, 2011). Este marcador de cor verde não altera as características organolépticas das dietas, é praticamente insolúvel em água, não é tóxico e pode ser facilmente quantificado nas fezes (HERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

Um bom marcador deve ser completamente indigestível, não absorvível, isento de ação farmacológica e passar uniformemente no aparelho digestório, ter fácil e rápida determinação química e de preferência ser incorporado à dieta de forma homogênea, ser higiênico e sem causar danos ao ser humano e ao ambiente (GODDARD ; McLEAN, 2001).

2.5 Parâmetros hematológicos

O sangue é um tecido conectivo de propriedades especiais, sua matriz extracelular é líquida (plasma), composta por 90% de água, 7% de proteínas (globulinas e albumina), e o restante, de solutos variados (eletrólitos, como íons carbonato, cloro, sódio, potássio, cálcio, fosfatos), além disso é composto por metabólitos, hormônios e enzimas (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Entre as funções desempenhadas pelo o sangue destaca-se: a distribuição de calor, o transporte de gases respiratórios, nutrientes e produtos da excreção, além da defesa do organismo, correspondendo a um volume de 1,5 a 3,0% do peso vivo em peixes teleósteos (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). A hematologia estuda as alterações dos padrões e dos distúrbios morfológicos do sangue, permitindo que seja estabelecida uma relação entre os parâmetros sanguíneos e a sanidade dos peixes (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Os estudos dos parâmetros hematológicos de peixes permitem o conhecimento da capacidade respiratória da espécie e auxiliam na compreensão de seu sistema imunológico pela análise do eritrograma e pela análise quantitativa e morfológica dos leucócitos. Os parâmetros eritro-leucocitários são reconhecidamente utilizados como indicadores no diagnóstico e prognóstico para avaliação de condições de estresse, tanto em animais no ambiente natural como em cativeiro (SANTOS; TAVARES-DIAS, 2011).

As células sanguíneas são divididas em vermelhas (eritrócitos) e brancas (leucócitos), o que pode ser visualmente constatado após a centrifugação do sangue, separando a série vermelha da série branca do sangue (DAMATTA *et al.*, 2009).

Os eritrócitos, são as células em maior quantidade na circulação sanguínea, são nucleados nos peixes e transportam oxigênio e gás carbônico. Podem-se notar variações morfológicas nestas células em diferentes espécies de peixes, geralmente os eritrócitos são elípticos com núcleo central, exibem cromatina compacta nas células maduras e nos eritroblastos a cromatina é frouxa (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1998; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Alterações hematológicas envolvendo os eritrócitos de peixes incluem, principalmente, policitemia, anemia e alterações morfológicas (CLAUSS *et al.*, 2008). A hemoglobina é o pigmento respiratório de peixes e trata-se de uma proteína conjugada formada de 96% de proteínas (globinas) e por um grupo prostético de coloração vermelha, chamado heme (4%), que por sua vez é formado por ferro e grupamentos porfirínicos (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2008).

As células do sistema imunológico são os leucócitos ou glóbulos brancos (LABH; SHAKYA, 2014). Os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos são leucócitos usualmente observados na circulação sanguínea dos peixes (SOUSA *et al.*, 2013). Os leucócitos podem ser utilizados para avaliar o sistema imunológico, já os trombócitos estão relacionados com a coagulação sanguínea, com a defesa orgânica e possuem função fagocitária (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Os trombócitos são células responsáveis pelo processo de coagulação sanguínea, são bastante abundantes, perdendo em quantidade apenas para os eritrócitos (SOUSA *et al.*, 2013).

Os linfócitos são células de formato arredondado, com citoplasma basofílico, sem granulações e núcleo arredondado com a cromatina bastante densa (SILVA, 2012). Os linfócitos são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, produzindo anticorpos que atuam no processo de memória imunológica, bem como promovem a liberação de fatores reguladores da função imune (FALCON, 2007).

Os neutrófilos possuem morfologia arredondada, núcleo em forma de bastonetes e granulações citoplasmáticas acidófilas. Essas células possuem propriedades fagocíticas com ação bactericida, além da atividade microbicida desencadeada pelo processo de explosão respiratória, caracterizado pela conversão do oxigênio molecular em compostos e metabólitos derivados do oxigênio (FALCON, 2007).

Os eosinófilos e basófilos são raramente encontrados no sangue periférico de peixes, mas também participam da resposta imune, sendo encontrados com mais frequência no trato intestinal e nas brânquias, bem como na corrente sanguínea em ocasiões de infestação parasitária (SILVA; LIMA; BLANCO, 2012; HINE, 1992).

Os monócitos são células de grande tamanho, e geralmente esféricas, podendo apresentar polimorfismo. Essas células são de grande importância no sistema imune dos peixes, pois possuem a capacidade de ingestão de material estranho ao organismo, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio, contribuindo com a destruição de diferentes patógenos (FALCON, 2007; SILVA, 2012).

Os trombócitos de peixes são células elípticas com núcleo fusiforme e com intensa vacuolização, diferem claramente de todas as outras populações de leucócitos porque possuem estruturas vesiculares e microtubulares em seu citoplasma (TAVARES-DIAS *et al.*, 2007). Em peixes marinhos quanto dulcícolas, os trombócitos auxiliam na coagulação sanguínea igual aos trombócitos dos mamíferos, e também possuem a função de defesa do organismo através da atividade fagocítica, podendo ser hemostática e homeostática (TAVARES-DIAS *et al.*, 2002).

Alterações na contagem relativa de células sanguíneas de defesa pode indicar a ocorrência de processos infecciosos, igualmente ao que acontecem com os mamíferos, os peixes portadores de infecção apresentam neutrofilia com linfopenia relativa, podendo também ser possível à mobilização dos trombócitos de seus compartimentos de reserva para contribuir com os mecanismos de defesa. O hematócrito, a concentração de hemoglobina e a contagem total do número de hemácias podem ser indicadores da capacidade de transporte de oxigênio no sistema circulatório dos peixes (SILVA; LIMA; BLANCO, 2012).

O volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média são índices hematimétricos calculados a partir da (hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos), sendo o volume corpuscular médio indicador da dinâmica cardíaca e fluxo sanguíneo, já a hemoglobina corpuscular média demonstra como está a função respiratória (HOUSTON, 1990).

Características hematológicas são parâmetros essenciais para a avaliação da saúde e estado fisiológico dos animais, refletem a capacidade de resposta fisiológica de um animal para o seu ambiente interno, que incluem alimentação e digestão (ETIM *et al.*, 2013).

A aplicação da hematologia em pesquisa com animais é bem aceita e considerada um procedimento de rotina em métodos de diagnóstico (SERIANI *et al.*, 2011). O monitoramento do estado de saúde dos peixes é indispensável para o manejo sanitário da produção, seja de grande ou pequeno porte (ISHIKAWA *et al.*, 2010).

2.6 Composição centesimal do pescado

O pescado é definido como todos os organismos aquáticos (animal e vegetal) de origem fluvial, marinha ou estuarina, destinados à alimentação humana, como os peixes, moluscos, crustáceos, anfíbios, quelônios, mamíferos, algas, dentre outros (GONÇALVES, 2011). O peixe é um dos alimentos mais importantes na dieta humana devido à alta qualidade da proteína e da grande quantidade de nutrientes, além de excelente digestibilidade. O consumo regular de pescado apresenta diversos benefícios (VIANA *et al.*, 2013).

Nos últimos anos o interesse pelo pescado cresceu bastante, devido às suas características nutricionais, e pelo fato de sua alta digestibilidade, já que possui fibras musculares curtas e com menor tecido conectivo. O conhecimento da composição corporal dos peixes se faz necessário para que haja um aumento de sua aceitação como um alimento alternativo e que possa competir com outras fontes proteicas largamente utilizadas, como as carnes bovina, suína e de aves (BRITTO *et al.*, 2014).

A composição química da carne do pescado depende de fatores bióticos e abióticos relacionados com a espécie e o cultivo, pois influenciam nas características físicas e organolépticas, e ainda no tempo de prateleira do peixe e seus derivados (BURKERT *et al.*, 2008). A determinação da composição química da carne do pescado é extremamente variável. O principal componente é a água, cuja proporção, na parte comestível, pode variar de 64 a 90%, seguido pelas proteínas, de 8 a 23%, e pela gordura, de 0,5 a 25%. Dentre os menores constituintes do pescado, encontram-se os sais minerais, cujo teor varia de 1,0 a 2,0%, os carboidratos, que no caso dos peixes não chegam a representar 1,0% da sua composição (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

As proteínas são as biomoléculas mais abundantes nos seres vivos e apresentam importantes funções fisiológicas, como a coagulação sanguínea, a nutrição dos tecidos, e outros processos que contribuem para a manutenção da homeostase (ALVES; WAITZBERG, 2009).

Quando comparada a outras carnes, a proteína proveniente do pescado apresenta alta digestibilidade atribuída à maior fração miofibrilar e ao menor comprimento das fibras musculares, o que resulta numa maior área de atuação das enzimas digestivas (GONÇALVES, 2011).

Para que uma dieta apresente um melhor aproveitamento nutricional e um menor poder poluente das excretas resultantes da alimentação, é importante que haja equilíbrio entre as proteínas e os aminoácidos digestíveis, com o correto balanceamento de forma a atender as exigências de todos os aminoácidos essenciais para manutenção e crescimento dos organismos (GONÇALVES *et al.*, 2009).

A proteína consumida pelos peixes é digerida ou hidrolisada liberando dipeptídeos, tripeptídeos e aminoácidos livres, que são absorvidos pelo epitélio intestinal e distribuídos por meio da corrente sanguínea para órgãos e tecidos (BICUDO, 2008; WU, 2013). Portanto, peixes consomem proteína para obter aminoácidos e, assim, não possuem exigência verdadeira em proteína, mas sim em suprimento equilibrado de aminoácidos essenciais e não essenciais (BICUDO; CYRINO, 2009; PEZZATO *et al.*, 2004).

Com relação à eficiência da produção é indispensável que os peixes produzidos apresentem bom rendimento à indústria e características atraentes ao consumidor. É importante avaliar a composição da carcaça dos animais submetidos a diferentes dietas, principalmente para verificar se estas proporcionam um aumento na massa proteica do peixe, a qual tende a aumentar o rendimento do filé, produto preconizado pelo consumidor (VIEIRA *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm comprovado a eficácia dos aditivos sintéticos e naturais para um melhor desempenho produtivo de peixes cultivados, apresentando melhorias no rendimento e na composição química do filé, aumento do teor proteico e de minerais, a diminuição do teor de gorduras, mudanças organolépticas relacionadas ao sabor e a coloração dos filés (FABREGAT, 2011; FABRICIO, 2013; MOREIRA, 2011).

2.7 Enzimas

As enzimas são, em sua maioria, proteínas indispensáveis para a realização dos processos metabólicos nos seres vivos, pois, as reações bioquímicas que acontecem no organismo são catalisadas por estas. As enzimas aumentam a velocidade das reações diminuindo a energia de ativação sem alterarem o equilíbrio químico; são específicas, atuam por meio de sítio ativo, em determinado substrato; sensíveis às mudanças de pH e temperatura do meio, com um limiar ótimo no qual ocorre máxima atividade (NELSON; COX, 2014).

A atividade enzimática geralmente ocorre em condições brandas de temperatura (30-60 °C), especificidade a substrato, reduzida formação de subprodutos, custo intermediário e podem ser recicladas ao final do processo. Estão entre as moléculas mais estudadas em biotecnologia, devido possuir diversas aplicações nas indústrias química, farmacêutica, têxtil, agroindustrial, cosmética e alimentícia (TAVANO, 2013).

Algumas das restrições quanto à utilização de enzimas em bioprocessos ocorrem pelo fato de apresentarem, ocasionalmente, desenvolvimento de características sensoriais indesejáveis, devido à ação hidrolítica. O controle das condições reacionais (pH, temperatura, tempo de hidrólise, concentração de substrato) é um importante passo para a obtenção de um produto com qualidade sensorial adequada ao consumidor final (CHOI; HAN; KIM, 2015; JEEWANTHI; LEE; PAIK, 2015).

O mercado de enzimas está dividido em enzimas industriais (enzimas aplicadas na indústria de alimentos e ração animal, por exemplo) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, química quiral e pesquisa). Com relação à nutrição animal, a biotecnologia moderna vem promovendo um impacto positivo, possibilitando atender de forma eficiente os requerimentos fisiológicos, originando um impulso significativo também na saúde e bem-estar dos animais (ROCHA, 2008).

Amilases (α -amilases e glicoamilases), proteases (quimosina, papaína, bromelaína e pepsina), lipases e pectinases são exemplos utilizados em grande escala. Dentre todas as enzimas com utilização industrial, as proteases representam cerca de 60% de todo o mercado. (GONZÁLEZ-RÁBADE *et al.*, 2011; VERMELHO *et al.*, 2015).

2.8 Enzimas na nutrição animal

Nos sistemas intensivos de criação de peixes, os animais não tem acesso ao alimento natural em quantidade e qualidade adequada às suas exigências nutricionais para o máximo desempenho produtivo, sendo dependentes de dietas artificiais. É essencial o conhecimento das exigências nutricionais para as diferentes espécies e fases de desenvolvimento, na formulação de dietas apropriadas, buscando a utilização dos nutrientes dos diversos alimentos de forma estratégica para diminuição de custos de produção e aumento da viabilidade econômica (PEZZATO *et al.*, 2001).

Uma importante alternativa para resolução do problema da baixa disponibilidade da farinha de peixe, resultante do crescimento da aquicultura e do elevado custo, é a substituição deste alimento por ingredientes proteicos de origem vegetal, como o farelo de soja, farelo de algodão, farelo de milho, entre outros.

Apesar do elevado teor proteico e valor nutricional destes ingredientes, os fatores antinutricionais podem comprometer a disponibilidade dos nutrientes nestes alimentos (AYHAN *et al.*, 2008; DALSGAARD *et al.*, 2012; GUIMARÃES *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2013).

O uso de enzimas em dietas viabiliza benefícios como a possibilidade de empregar ingredientes com nutrientes pouco disponíveis aos animais, a redução de alguns nutrientes como fósforo e nitrogênio nas fezes, diminuindo assim a quantidade desses elementos no meio, atenuando a contaminação do ambiente de cultivo (CAMPESTRINI; SILVA; APPET, 2005).

A produção industrial de enzimas ou complexos enzimáticos para utilização na nutrição animal é, geralmente, proveniente de leveduras, fungos ou bactérias em processos que envolvem meios líquidos ou pela fermentação em estágio sólido “SFF” (CAMPESTRINI; SILVA; APPET, 2005; ROBISON; NIGAN, 2003).

De acordo com a sua finalidade, as enzimas usadas em rações para monogástricos podem ser divididas em dois tipos: complementar às enzimas digestivas endógenas (proteases, lipases) e enzimas não sintetizadas, como as (β -glucanases, xilanases, celulases, fitases) dentre outras (Tabela 1). As enzimas digestivas exógenas atuam igualmente às endógenas, exibindo um sítio ativo capaz de atuar sobre os mesmos substratos específicos (HENN, 2002).

Tabela 1. Enzimas, substratos e efeitos das enzimas utilizadas em dietas para monogástricos.

Enzima	Substrato	Efeitos
Xilanases	Arabinoxilanas	Redução da viscosidade da digesta.
Glucanases	β -glucanos	Redução da viscosidade da digesta. Menor umidade na cama.
Pectinases	Pectinas	Redução da viscosidade da digesta.
Celulases	Celulose	Degradação da celulose e liberação de nutrientes.
Proteases	Proteínas	Suplementação das enzimas endógenas. Degradação mais eficiente de proteínas.
Amilases	Amido	Suplementação das enzimas endógenas. Degradação mais eficiente do amido.
Fitase	Ácido fítico	Melhora a utilização do fósforo dos vegetais. Remoção do ácido fítico.
Galactosidases	Galactosídios	Remoção de galactosídios.
Lipases	Lipídios e ácidos graxos	Melhora a utilização de gorduras animais e vegetais.

Fonte: Adaptado de Cleophas *et al.*(1995).

As proteases são enzimas que atuam sobre a proteína, quebrando ligações e liberando aminoácidos prontamente disponíveis. Estas podem atuar nas ligações das proteínas de armazenamento dos ingredientes de origem vegetal, liberando o amido para ser digerido, por sua vez, pela amilase (BEDFORD; PARTRIDGE, 2011).

A lipase e amilase são sintetizadas principalmente no pâncreas, no entanto, em algumas espécies de peixes onívoros ou herbívoros, essa síntese pode ocorrer na mucosa intestinal (FRACALOSSO; CYRINO, 2013). A lipase atua na degradação de lipídeos da alimentação, liberando ácidos graxos e glicerol no lúmen do intestino. Estes compostos desempenham importantes funções energéticas, estruturais e hormonais (MOURA *et al.*, 2012).

As fitases são responsáveis pela digestão dos fitatos (ácido fítico), complexos orgânicos de armazenagem de fósforo nas plantas, hidrolisam um ou mais grupos fosfato do fitato, reduzindo seus efeitos negativos (BARLETTA, 2010; CAMPESTRINI; SILVA; APPET, 2005).

A celulase é uma enzima que atua na degradação da celulose, componente estrutural da parede de celular vegetal. Tilápias não são capazes de sintetizar essa enzima, no entanto, quantificando a atividade da celulase no quimo de tilápias moçambicana (*Oreochromis mossambicus*), com hábito alimentar onívoro foi identificada atividade de enzimas celulolíticas provenientes da flora bacteriana anaeróbica destes animais (SAHA *et al.*, 2006).

A atividade das enzimas adicionadas em rações para animais pode ser afetada por vários fatores: produtos químicos, pH e sobretudo pelas variações de temperatura. Na piscicultura são utilizadas rações extrusadas, as quais envolvem altas temperaturas durante o processamento. Deste modo, a inclusão de enzimas nas rações deve ser feita de forma criteriosa, devido a sua natureza proteica, pode ocorrer perda parcial ou total da atividade biológica (CARLSON ; POULSEN, 2003).

É importante ressaltar que, nem sempre, a suplementação de enzimas exógenas proporciona resposta positiva no desempenho dos animais. Para uma enzima atuar, é necessário ter: o substrato específico na dieta, uma dosagem correta, a capacidade em ultrapassar barreiras encontradas no estômago (ex. baixo pH e ação de enzimas proteolíticas como a pepsina), além de observar a temperatura à qual a ração é submetida durante o processamento (HENN, 2002).

Alguns estudos comprovam que a utilização de enzimas ou complexos enzimáticos melhoram a digestibilidade de rações tanto a base de milho e soja (OLIVEIRA *et al.*, 2007) como também, de ingredientes alternativos com alta viscosidade, como o farelo de trigo (GUIMARÃES *et al.*, 2009) e o triticale (TACHIBANA *et al.*, 2010).

O uso de múltiplas enzimas (carboidrases, fitase e proteases), que atuam sobre diferentes efeitos antinutricionais, objetiva em ter maximização dos benefícios proporcionados pela suplementação enzimática (ADEOLA; COWIESON, 2011).

2.9 Enzimas vegetais

Nas últimas décadas, o interesse em produtos naturais de plantas com aplicações biotecnológicas têm crescido rapidamente. Entre estas moléculas naturais se destacam as enzimas, por sua especificidade, alta atividade e por não serem consumidas durante o processo. Existe uma grande diversidade de enzimas que são utilizadas na indústria, incluindo enzimas proteolíticas de origem vegetal. (GONZÁLEZ; BADILLO; BARRADAS, 2011).

Enzimas proteolíticas, ou proteases, também conhecidas como peptidases têm importante papel em processos biológicos de todos os seres vivos, estando envolvidas em processos de: síntese proteica, digestão, sinalização, crescimento celular, desenvolvimento e amadurecimento de frutos, degradação proteica, reconhecimento de patógenos e apoptose em plantas (AMRI; MAMBOYA, 2012; COSTA; LIMA, 2016).

As proteases podem ser obtidas de vegetais, animais, fungos e bactérias. As leveduras são microrganismos muito utilizados na indústria de alimentos, a maioria das espécies não se enquadra como patogênicas (RODRIGUES; SANT'ANNA, 2001).

Por muitos anos as proteases vegetais têm sido utilizadas na medicina, na fabricação de detergentes, na produção de insumos para laboratório e na ciência dos alimentos. Contudo o número de proteases vegetais utilizadas industrialmente ainda é baixo. Isso porque sua disponibilidade comercial é limitada, pois a aplicação industrial de enzimas requer altos custos para sua produção em larga escala, e nesse ponto, as enzimas de origem microbiana leva vantagem (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011).

Além dos papéis fisiológicos desempenhados pelas proteases, suas aplicações comerciais são de extrema importância, uma vez que estas representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais, constituindo cerca de 60% da totalidade mundial de vendas de enzimas (BADGUJAR *et al.*, 2014).

Na alimentação animal atualmente, a adição de proteases tem despertado interesse pelo fato de seu uso em vários ingredientes proteicos, contribuindo para uma variabilidade considerável na qualidade e disponibilidade de proteína, principalmente pelos ingredientes de origem vegetal, minimizando fatores antinutricionais que podem prejudicar a digestão dos nutrientes. Além disso, a adição de proteases pode aumentar a utilização das proteínas de armazenamento encontradas em farelos de origem vegetal (BARLETTA, 2010).

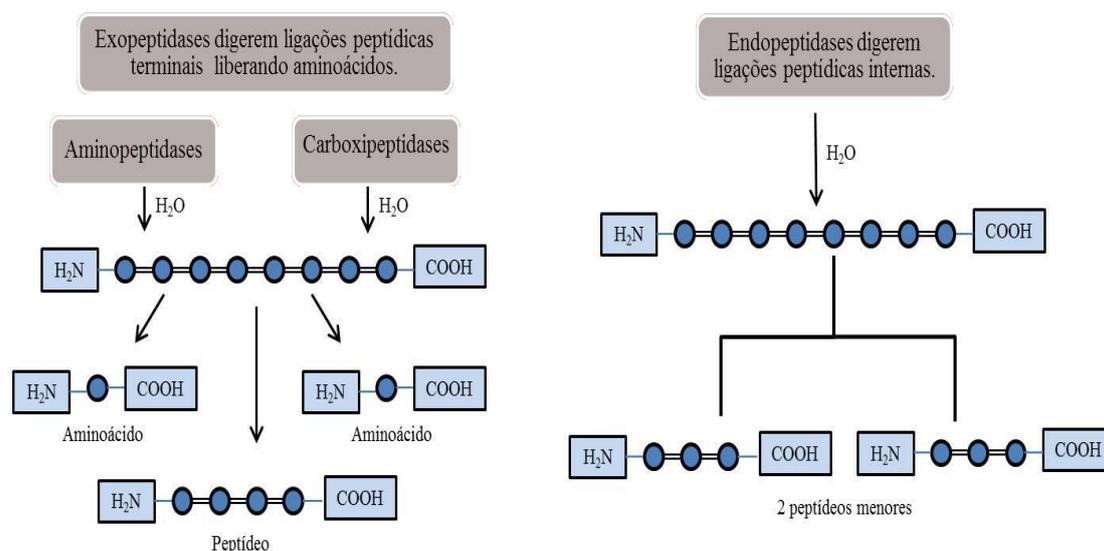
Nas plantas as proteases mais conhecidas pertencem aos grupos de proteases serínicas, cisteínicas e aspárticas. As proteases cisteínicas estão envolvidas em processos anabólicos e catabólicos presentes na maturação, degradação e reconstrução de proteínas em resposta a diversos estímulos externos e papel de limpeza ao destruir proteínas anômalas, desempenha função no processo de acúmulo de proteínas de armazenamento pela semente e na mobilização dessas (GONZÁLEZ RÁBADE *et al.*, 2011).

Proteases cisteínicas de origem vegetal tais como as de *Carica papaya* (papaína, quimopapaína, caricaína); *Ananas comosus* (bromelaína, ananaína, comosaína) e de *Ficus glabrata* (ficina) têm reconhecida importância comercial por possuírem forte atividade proteolítica sobre diversos substratos proteicos, além de serem estáveis em ampla faixa de pH e temperatura (ARAYA-GARAY *et al.*, 2011). Papaína, bromelaína e ficina são as proteases de plantas mais utilizadas, no entanto novas proteases com propriedades físico-químicas atraentes para a indústria são desejáveis (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011).

As enzimas proteolíticas são capazes de hidrolisar ligações peptídicas pelo ataque nucleofílico e hidrólise subsequente de um intermediário tetraédrico. Classificadas como pertencentes à classe 3 (hidrolases) e da subclasse 4 (hidrolisam ligações peptídicas) pelo Comitê Internacional de Nomenclatura Enzimática da União de Bioquímica e Biologia Molecular (NCI-UBMB). Essas enzimas podem ser agrupadas de acordo com seu mecanismo químico catalítico. Os aminoácidos presentes no sítio ativo definem seus tipos: aspártica (EC 3.4.23), (aspartato e tirosina); serínica (EC 3.4.21), (serina e histidina); cisteínica (EC 3.4.22), (cisteína e histidina); treonina (treonina); glutamato (ácido glutâmico) e as metalo peptidases (EC 3.4.24), possuem íons metálicos no sítio ativo (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}), (TURK, 2012).

A subclasse 3.4, por sua vez, pode ser dividida quanto à posição da ligação peptídica a ser clivada: endopeptidases clivam resíduos de aminoácidos localizados na região interna da proteína; enquanto que, aminopeptidases atuam próximas à extremidade N-terminal e carboxipeptidases na região próxima à extremidade C-terminal, sendo que as duas últimas podem ser chamadas genericamente de exopeptidases (Figura 1), (CORNISH-BOWDEN, 2014; SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015).

Figura 1 – Hidrólise de exopeptidases e endopeptidases, sobre uma cadeia polipeptídica



Fonte: Mótyán; Tóth; Tózsér (2013), com modificações.

2.10 Látex e plantas laticíferas

Dentre a grande variedade de plantas que compõe o Reino Vegetal, cerca de 20.000 espécies, pertencentes a 22 famílias, consideradas plantas laticíferas (HAGEL *et al.*, 2008). Em termos gerais, o látex pode ser descrito como um líquido, geralmente de aspecto leitoso, exsudado de plantas após algum tipo de injúria, seja por dano mecânico ou herbívoria (KEKWICK, 2001). Semelhante à ação do sangue nos animais, os tecidos de plantas laticíferas, quando danificados, vertem látex com uma coagulação rápida quando exposto ao ar (AGRAWAL ; KONNO, 2009).

O látex é sintetizado e acumulado sobre pressão em sistemas de canais especializados denominados de laticíferos, que são formados por um conjunto de células tubulares alongadas altamente especializadas, onde ocorre a produção e armazenamento do látex, podendo estar presente em todas as partes da planta ou isolado em tecidos e órgãos como em raízes, caules, frutos e folhas (PICKARD, 2008; KITAJIMA *et al.*, 2013).

Inúmeros compostos são encontrados no látex: proteínas, alcaloides, esteróis, ácidos graxos, amidos, açúcares, óleos, taninos, poli-isopreno (borracha), resinas e gomas. Além de possuir também diversas proteínas enzimáticas e não enzimáticas, tais como: proteases cisteínicas, serínicas, quitinases, oxidases, glucosidades, lipases, esterases, trombinas, plasminas, peroxidases, lectinas, inibidores de proteases e diversos alérgenos (HELI *et al.*, 2008; SANTOS ; VAN REE, 2011).

O látex apresenta elevada concentração de poli-isopreno (borracha), sendo encontrado em diferentes concentrações nas seguintes espécies: *Cryptostegia grandiflora* (96,6%); *Calotropis procera* (82,52%); *Plumeria rubra* (82,2%); *Ficus* ssp. (15-30%); *Alstonia boonei* (15,5%) (AGRAWAL; KONNO, 2009; KONNO, 2011; FREITAS *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2011). Entretanto, apenas a seringueira (*Hevea brasiliensis*) é utilizada comercialmente como fonte de borracha natural, devido ao seu extraordinário rendimento e propriedades físicas (AOKI *et al.*, 2014).

Outras espécies de plantas laticíferas apresentam uma aplicação diferente do látex de *H. brasiliensis*. Os látices destas plantas são largamente utilizados na medicina popular para diversos fins, como: cicatrização, dores nas articulações, controle de verminoses, entre outros fins terapêuticos (UPADHYAY, 2011). Deve-se salientar a importância científica de espécies como *C. procera*, *C. grandiflora* e *P. rubra*, no que concerne o potencial biotecnológico de moléculas oriundas de seus látices (FREITAS *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2014).

2.11 *Calotropis procera* (Ait.) R.Br

Calotropis procera (Ait.) R.Br. é um arbusto pertencente à família Apocynaceae, nativo de regiões tropicais, explorado principalmente pelos povos indígenas. É uma planta laticífera explorada em vários países, como Índia, Paquistão, Egito e Malásia, e em menor intensidade no Nordeste do Brasil (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

O nome científico da espécie vegetal é derivado do grego (“kalos” = belo, “tropis” = barco) e *procera* é a partir das palavras latinas "em favor de" e "cera", referindo-se à aparência cerosa da planta (HASSAN *et al.*, 2015). Teve sua origem na Índia, sendo disseminada para outras partes do mundo com o intuito ornamental, é uma planta perene, pouco ramificada, porte arbustivo, podendo alcançar de 3 a 4 metros de altura. Essa espécie pode ser encontrada nas regiões áridas e semiáridas da Ásia, África e Sul da América, incluindo o Brasil (KAKKAR *et al.*, 2012).

Seu desenvolvimento ocorre em solos secos, arenosos e em climas quentes, podendo crescer como erva daninha em terrenos agrícolas (ABHISHEK *et al.*, 2010). No Brasil, a *C. procera* é conhecida como algodão de seda, paninha de seda, leiteiro, queimadura e Jacaúna, sendo no Ceará mais conhecida como ciúme, flor de seda e Hortência (VIANA, 2011), (Figura 2).

Figura 2- Aspectos gerais da planta de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.



Fonte: Autor.

Todas as partes dessa planta apresentam diversos usos medicinais, sendo utilizada pela população no combate a doenças como febre, reumatismo, indigestão, tosse, resfriado, eczema, asma, elefantíase, náuseas, vômitos, diarreia (ABHISHEK *et al.*, 2010).

Também é utilizada para fins não convencionais, em práticas de suicídio de acordo com Rutten; Staius Van Eps (1998), que relataram um caso de envenenamento intencional. Kosaraju *et al.* (2015) também registraram casos de suicídios realizados pela população da zona rural da Índia após consumo de *C. procera*. Em contraste, o látex de *C. procera* também apresenta diversas propriedades farmacológicas sendo utilizadas tradicionalmente para o tratamento de infecções cutâneas, doenças inflamatórias, entre outras doenças (SHARMA *et al.*, 2012).

Em seus fluídos laticíferos já foram identificados diversos compostos como cardenolídeos, alcaloides, carboidratos, esteroides, terpenos, carbonatos orgânicos, proteases cisteínicas, quitinases, osmotinas, inibidores de proteases entre outros fazendo deste látex uma potente fonte de compostos com atividades farmacológicas (FREITAS *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2010). Recentemente foram anotados, a partir de uma biblioteca de cDNA, 27 peptidases, todas do tipo cisteínicas (KWON *et al.*, 2015).

Dentre os diversos compostos, os cardenolídeos são altamente tóxicos por inibirem as bombas de sódio-potássio. Estas bombas são responsáveis pela manutenção do potencial elétrico de células animais, e são particularmente importantes na manutenção da condutividade elétrica do coração (ASLANI *et al.*, 2004).

Outros componentes presentes no látex, como os alcaloides, são considerados tóxicos para animais e insetos por afetarem neurotransmissores e lectinas que se ligam às porções específicas de carboidratos, promovendo coagulação (WALDHOER *et al.*, 2004).

O látex de *C. procera* foi processado através de centrifugações e diálises, tornando-se livre da fração de borracha e de pequenos metabólitos (< 8.000 Da). Esta fração proteica retida foi denominada (LP) apresentando atividade antinociceptiva (SOARES *et al.*, 2005) e anti-inflamatória, enquanto sua fração proteica complementar, de baixo peso molecular, apresenta atividade pró-inflamatória (ALENCAR *et al.*, 2006).

Em um estudo avaliando a digestibilidade, *in vitro* e *in vivo* de (LP), foi possível observar parcial digestibilidade *in vitro* e ausência de (LP) em material fecal de ratos tratados com (LP) em água de ingestão por 35 dias. Estes dados reunidos sugeriram que a toxicidade do látex deve estar relacionada com a fração de borracha (RAMOS *et al.*, 2006).

Singhal; Kumar (2009) avaliaram os efeitos tóxicos da suspensão aquosa do látex em pó de *C. procera*, livre da fração de poli-isopreno (borracha), sobre a função hepática e renal de ratos, onde foi administrada por 45 dias, via oral, nas doses de 10, 100 e 400 mg/kg. Nenhum efeito adverso foi observado pelos autores durante o período de tratamento, sugerindo que a fração de borracha seja a principal responsável pelos efeitos tóxicos.

Corroborando com as conclusões de Singhal & Kumar (2009), Lima e colaboradores (2011) constataram que o látex íntegro (com fração da borracha) de *C. procera*, possui propriedades cardiotóxicas e hepatotóxicas após administração intraperitoneal em ratos, na dose de 1 ml/kg.

De acordo com Freitas *et al.* (2007) a caracterização bioquímica das Proteínas do látex de *C. procera* (LP), definiu que esta fração proteica, é composta por proteínas básicas (PI > 6,0), com massas variando entre (5-95 kDa), sendo as de (26 kDa) mais abundantes, seu conteúdo de proteínas solúveis aproximadamente é de (8,85 mg mL⁻¹), representando em média 17% do peso seco do látex, forte atividade enzimática em temperaturas de (30-60 °C). Apresenta enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e ascorbato dismutase, sendo a última em menor nível de atividade, atividade quitinolítica e intensa atividade proteolítica atribuída às proteases cisteínicas.

As proteases cisteínicas é um grupo diverso com mais de 130 enzimas conhecidas presentes em animais, plantas e microrganismos. Apresentam massa de 24 a 35 kDa, mostra ótima atividade enzimática em pH (6,0 a 7,5) e podem suportar temperaturas de até (60 a 80 °C), em parte pelas três pontes dissulfeto (PARKIN, 2010).

As proteases cisteínicas possuem um grande potencial nas indústrias alimentícia, de biotecnologia e farmacêutica por apresentar atividade em uma vasta gama de temperatura e pH, ocorrendo em vários tecidos das plantas, em alguns casos, em quantidade excessiva, desta forma oferecem uma alternativa atraente para a sua extração e purificação (GONZÁLEZ-RÁBADE, 2011).

A planta *C. procera* possui diversas aplicações biotecnológicas atribuídas as proteases oriundas do seu látex ou de seu extrato proteico sendo constatadas nas mais distintas áreas como a medicina, agricultura e indústria de alimentos, como descrito (Tabela 2).

Tabela 2. Aplicações biotecnológicas das proteases de *Caloropsis procera*.

Atividade	Referências
Defesa contra insetos e fungos	KONNO <i>et al</i> (2004); RAMOS <i>et al</i> (2014)
Antinociceptivas	SOARES <i>et al</i> (2005)
Pró e anti-inflamatórias	ALENCAR <i>et al</i> (2006)
Citotóxica e antitumoral	OLIVEIRA <i>et al</i> (2007); OLIVEIRA <i>et al</i> (2010)
Anti-inflamatória	SALAS <i>et al</i> (2008)
Anti-helmíntica e anticâncer	SALAS <i>et al</i> (2008)
Inseticida	RAMOS <i>et al</i> (2010)
Antifúngico	SOUZA <i>et al</i> (2011)
Depressora sobre o SNC	LIMA <i>et al</i> (2010)
Prevenção de mucosite oral	FREITAS <i>et al</i> (2012)
Prevenção de mucosite intestinal	ALENCAR <i>et al</i> (2016)
Cicatrizante	FIGUEIREDO <i>et al</i> (2014); RAMOS <i>et al</i> (2016)
Pró-coagulante	RAMOS <i>et al</i> (2012)
Coagulação do plasma sanguíneo	VIANA <i>et al</i> (2013)
Antiedematogênica, antioxidante e antiartrite	CHAUDHARY <i>et al</i> (2015); CHAUDHARY <i>et al</i> (2016).
Contra choque séptico causado por infecção com bactérias patogênicas	LIMA-FILHO <i>et al</i> (2010); OLIVEIRA <i>et al</i> (2012); NASCIMENTO <i>et al</i> (2016)
Amaciamento de carnes	RAWDKUEN;JAIMAKREU;BENJAKUL (2013)
Coagulação do leite	RASKOVIC; LAZIC; POLOVIC (2016)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Seu potencial é verificado na ciência e tecnologia de alimentos, incluindo a hidrólise de grandes polipeptídeos em peptídeos menores e aminoácidos, o que facilita a digestão e absorção de proteínas (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011; MORCELLE *et al.*, 2004).

O fluido laticífero de *C. procera* é uma fonte rica de enzimas proteolíticas e muitas destas enzimas têm sido analisadas em termos moleculares, enzimáticos, funcionais e prospecção biotecnológica (RAMOS *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar os níveis de inclusão das proteases do látex de *C. procera* (LP), na ração para alevinos de tilápia do Nilo, verificar seu efeito no desempenho zootécnico, digestibilidade e parâmetros hematológicos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a composição bromatológica dos filés e rações;
- Determinar os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína, lipídios e matéria seca das dietas com diferentes níveis de inclusão das proteases de *C. procera*;
- Verificar o desempenho produtivo, respostas hematológicas dos alevinos de Tilápia do Nilo alimentados com diferentes níveis de inclusão das proteases de *C. procera*;
- Monitoramento dos parâmetros de qualidade da água.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho teve duração de 60 dias e foi conduzido no período de janeiro a março de 2018, no Laboratório de Aquicultura e Sistemas Integrados de Produção (LASIP) do Departamento de Engenharia de Pesca, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Ceará (DEP/CCA/UFC), localizado no *Campus* do Pici, em Fortaleza- Ceará.

4.1 Aquisição dos alevinos e aclimação

Foram adquiridos 200 alevinos revertidos de tilápia do Nilo da linhagem GIFT, de uma piscicultura particular localizada em Itaitinga-Ce. Os peixes com peso médio entre $2,8 \pm 0,02$ g foram transportados em saco plástico com capacidade para 20 L, contendo 10 L de água com adição de oxigênio puro. No laboratório os alevinos foram transferidos para um recipiente de polietileno com capacidade de 500 L, com fornecimento de oxigênio, permanecendo durante uma semana para aclimação as condições do laboratório, sendo alimentados três vezes ao dia com ração comercial com 40% de proteína bruta (PB).

4.2 Sistema de cultivo

Após o período de aclimação, foram selecionados 160 alevinos, e distribuídos em 16 aquários de cultivo contendo o volume de 100 L ($0,1 \text{ m}^3$). Em cada aquário foram colocados 10 alevinos de tilápia do Nilo. Os aquários foram mantidos com aeração contínua utilizando um compressor de ar (CE Cubos Air 140) com vazão de 140 L/min e sifonados, diariamente às 7 horas para retirada das excretas e sobras de ração. Nos 30 dias iniciais, o volume sifonado dos aquários variou de 10 a 20% e nos últimos 30 dias foi sifonado 30% do volume do aquário, logo em seguida o volume era repostado (Figura 3).

Figura 3- Sistema de cultivo. (Aquários vista lateral e frontal).



Fonte: Autor.

4.3 Delineamento experimental e manejo de cultivo

Os tratamentos foram sorteados e distribuídos entre os aquários de forma a manter um delineamento inteiramente casualizado. O experimento teve um grupo Controle e três grupos teste, com diferentes níveis de inclusão do LP (Proteínas do látex de *C.procera*) à ração, com quatro repetições cada.

O tratamento controle recebeu uma ração comercial contendo (32% de PB) sem a inclusão do (LP), enquanto os demais tratamentos receberam a mesma ração comercial (32% de PB) com a inclusão de diferentes concentrações do (LP). Os peixes foram alimentados três vezes ao dia nos horários de (08:00h, 12:00h e 16:00h) com uma taxa de alimentação variando entre 10% a 5% do peso vivo dia⁻¹ ao longo do experimento.

Quinzenalmente foi realizada a biometria para acompanhamento do desempenho zootécnico e ajuste da alimentação, onde os peixes de cada aquário foram pesados em balança digital com precisão de 0,01 g e medidos individualmente com um paquímetro. Como se trata de uma espécie bem ativa, para facilitar o procedimento, foi necessário o uso do anestésico eugenol, diluído em álcool 96° PA, tendo como base as indicações na literatura: para a fase inicial foi determinado o valor de 0,5 ml L⁻¹ para peixes até 10 gramas; 0,6 ml L⁻¹ para peixes até 20 gramas; 0,7 ml L⁻¹ para peixes até 30 gramas; 0,8 ml L⁻¹ para peixes até 40 gramas e 0,9 ml L⁻¹ para peixes até 50 gramas.

4.4 Coleta e processamento do látex de *Calotropis procera*

A planta *C. procera* pertencente à família Apocynaceae, foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará e foi depositada sob exsicata de número 32663. A coleta do látex foi realizada nos arredores da região metropolitana de Fortaleza-CE.

O látex de *C. procera* foi coletado no período da manhã, entre 07-09 horas, através de incisões no ápice caulinar de espécimes com o auxílio de tubos do tipo Falcon, contendo 20 mL de água destilada, sendo o mesmo misturado na proporção de 1:1 (v/v), (Figura 4). A coleta de até 20 mL pode ser obtida de um único exemplar da planta e leva em média 10-15 min. (RAMOS *et al.*, 2010).

Após a coleta do látex de *C. procera*, o mesmo foi centrifugado a 10.000x g por 10 min. a 4 °C. O precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante submetido à diálise em membranas com poros de 8.000 Da, contra água destilada a 4 °C durante três dias (com três trocas de água por dia, totalizando 9 trocas).

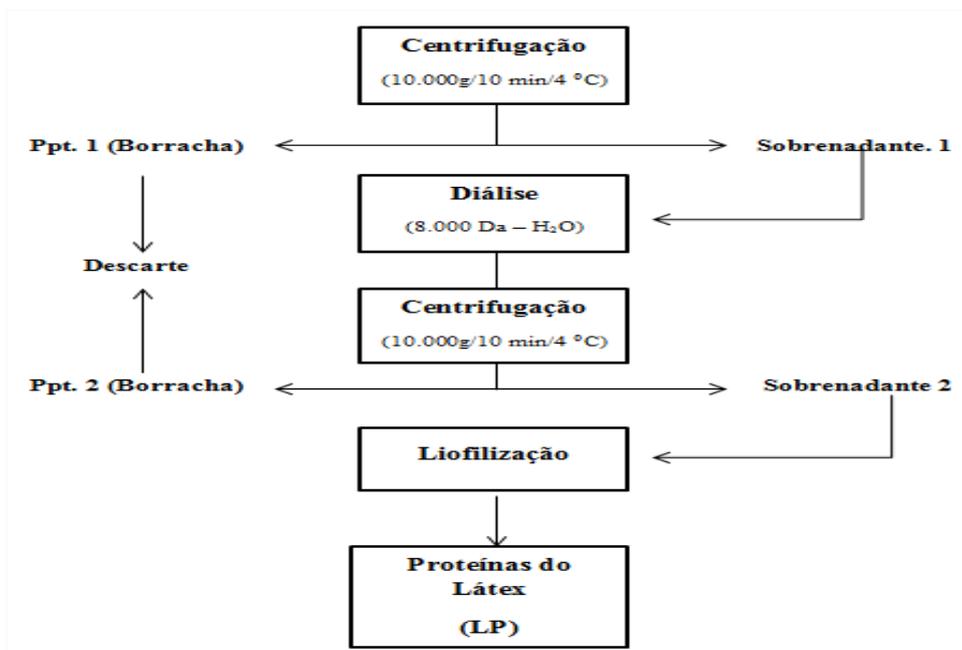
Após a segunda centrifugação, nas mesmas condições acima, o sobrenadante límpido desprovido de borracha foi obtido e liofilizado, essa fração proteica é denominada como Proteínas do Látex (LP), (ALENCAR *et al.*, 2006). (Figura 5).

Figura 4. Coleta do látex de *Calotropis procera*.



Fonte: Autor.

Figura 5 – Esquema para obtenção da fração proteica do látex de *Calotropis procera* (LP).



Fonte: Autor.

É importante destacar que a coleta não causa danos irreversíveis às plantas, sendo que seus ápices caulinares se regeneram logo após um período curto de tempo retomando seu desenvolvimento.

Esta fração proteica (LP), livre da borracha, sais, metabólitos secundários, rica em proteínas solúveis posteriormente foi utilizada nas rações experimentais para avaliação de seu efeito no desempenho dos animais (Figura 6).

Figura 6. (A) Látex, (B) material após processamento, (C) LP (*Calotropis procera*)



Fonte: Autor.

4.5 Preparo das rações

Para o preparo das rações experimentais foi utilizada uma ração comercial, (AQUAMIX PR-300) com os seguintes níveis de garantia: 100 g kg⁻¹ umidade; 320 g kg⁻¹ (32%) proteína bruta; 40 g kg⁻¹ extrato etéreo; 120 g kg⁻¹ matéria mineral; 50 g kg⁻¹ fibra bruta; 35 g kg⁻¹ cálcio; 6000 mg kg⁻¹ fósforo de acordo com o fabricante (INTEGRAL MIX).

A ração comercial foi triturada em um liquidificador industrial até virar pó. Em seguida foi adicionado (0,5%) de Cr₂O₃ e (5%) de gelatina incolor sem sabor, como aglutinante, diluída em 400 mL de água morna adicionada aos ingredientes secos. Posteriormente, os ingredientes secos e o aglutinante foram misturados aos poucos para que houvesse a homogeneização e formação de uma pasta.

A pasta foi colocada em um moedor para formação dos *pelletes*, os quais foram colocados em bandejas na estufa a 60 °C durante 24 horas. Depois de secos, os *pelletes* foram armazenados em recipientes plásticos e acondicionados no freezer a -20 °C.

Um dia antes de iniciar o experimento, foi adicionado às rações, as concentrações aproximadas de (100, 200, 300 mg kg⁻¹) do (LP) diluídos em 100 ml de água destilada contendo (L-Cisteína 3 mM), por meio de aspersão para ativação das proteases cisteínicas presentes no (LP). O aminoácido essencial (L-cisteína) não é tóxico, pode ser utilizado como aditivo em alimentos (ZHAO *et al.*, 2014).

As rações experimentais foram secas a temperatura ambiente por 24 horas, em seguida foram utilizadas na alimentação dos animais. Os tratamentos foram nomeados de acordo com as concentrações empregadas da seguinte forma:

- **Ração Controle:** Sem adição de LP-Cp;
- **Ração LP-Cp 01:** 100 mg kg⁻¹ ;
- **Ração LP-Cp 02:** 200 mg kg⁻¹ ;
- **Ração LP-Cp 03:** 300 mg kg⁻¹ .

4.6 Ensaio de Digestibilidade

Os peixes foram alimentados com as rações experimentais acrescidas de 0,5% de Cr₂O₃ por um período de quinze dias para obtenção de material fecal suficiente para as análises. As coletas fecais foram realizadas por sifonagem dos aquários, visando evitar a lixiviação dos nutrientes e a contaminação das fezes com resíduos de ração entre os pratos alimentares, horários preestabelecidos de coleta das fezes, alimentação e limpeza foram adotados para não comprometer as interpretações de digestibilidade (Tabela 3).

Tabela 3. Cronograma de atividades de limpeza, alimentação e coleta de fezes dos alevinos de tilápia do Nilo no ensaio de digestibilidade.

Horário	Atividade
07:00 h	Limpeza do sistema
08:00 h	1 ^a alimentação
09:00 h	1 ^a coleta de fezes
10:30 h	2 ^a coleta de fezes
12:00 h	2 ^a alimentação
13:00 h	3 ^a coleta de fezes
14:30 h	4 ^a coleta de fezes
16:00 h	3 ^a alimentação

Fonte: Autor.

As fezes coletadas foram armazenadas em potes devidamente identificados e acondicionadas em *freezer* a -20 °C, posteriormente estas amostras foram secas em estufa com circulação de ar forçada a 55 °C, até peso constante.

Antes das análises as fezes foram moídas e homogeneizadas com gral e pistilo, as análises bromatológicas, das rações e fezes, foram realizadas no Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE) da Universidade Federal do Ceará, segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC 2000).

Para a quantificação do óxido de crômio, amostras das rações e fezes (0,1 g) foram digeridas com 3 mL de ácido nítrico e 2 mL de ácido perclórico em balões Kjeldahl, a 400 °C, por 40 min, até obtenção de uma coloração alaranjada. Após diluição em 50 mL de água destilada, a absorbância foi lida a 550 nm (BREMER NETO *et al.*, 2005).

No sentido de mensurar os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA), após a determinação da concentração do óxido de crômio-III (Cr₂O₃). A avaliação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo foram calculados segundo Nose (1960):

$$CDA_{(\%)} = 100 - \left[100 \left(\frac{\%Cr_2O_3d}{\%Cr_2O_3f} \right) \times \left(\frac{\%Nf}{\%Nd} \right) \right]$$

Onde:

CDA (%) = coeficiente de digestibilidade aparente (%);

% Cr₂O₃d = porcentagem do óxido de crômio na dieta;

% Cr₂O₃f = porcentagem do óxido de crômio nas fezes;

% Nd = porcentagem de nutrientes ou energia na dieta;

% Nf = porcentagem de nutrientes ou energia nas fezes.

4.7 Parâmetros de Qualidade da água

Os parâmetros de qualidade de água foram analisados semanalmente. O oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) foi verificado com uma Sonda HANNA (HI9146) e a temperatura com um termômetro de mercúrio. Esses dois parâmetros foram analisados diretamente nas estruturas de cultivo. O pH foi determinado em pHmetro de bancada. As concentrações de amônia (mg L⁻¹), nitrito (mg L⁻¹), nitrato (mg L⁻¹) e fósforo reativo (mg L⁻¹) foram determinadas quinzenalmente com auxílio de um espectrofotômetro modelo DR 2700 (HACH), seguindo os protocolos e reagentes específicos constantes no manual de instruções do equipamento.

4.8 Parâmetros de desempenho zootécnicos

Com os dados de peso e comprimento obtidos nas biometrias quinzenais foram determinados os seguintes parâmetros zootécnicos: Sobrevivência S (%); Ganho de Peso-GP (g); Ganho de Peso Diário-GPD (g); Ganho de Biomassa (g); Crescimento Médio-CM (cm); Crescimento Médio Diário-CMD (cm); Taxa de Crescimento Específico TCE (%); Conversão Alimentar Aparente (CAA); Eficiência Alimentar EA (%); Índice de Eficiência Proteica-IEP (%); de acordo com as equações abaixo:

$$(S)\% = N_f \times 100 / N_i \quad (1)$$

Onde:

S = taxa de sobrevivência (%);

N_f = número final de peixes;

N_i = número inicial de peixes.

$$GP = PM_f - PM_i \quad (2)$$

Onde:

GP = ganho de peso (g);

PM_f = peso médio final (g);

PM_i = peso médio inicial (g).

$$GB = B_f - B_i \quad (3)$$

Onde:

GB = ganho de biomassa (g);

B_f = Biomassa final (g);

B_i = Biomassa inicial (g).

$$GPD = (PM_f - PM_i) / T \quad (4)$$

Onde:

GPD = Ganho de peso médio diário (g /dia⁻¹);

PM_f e PM_i - peso médio final e inicial, respectivamente (g /dia⁻¹);

T – tempo de cultivo (dias).

$$CM = CM_f - C_{mi} \quad (5)$$

Onde:

CM = crescimento médio (cm);

CM_f = comprimento médio final (cm);

CM_i = comprimento médio inicial (cm).

$$CMD = (CM_f - C_{mi}) / T \quad (6)$$

Onde:

CMD= Crescimento Médio Diário (cm);

T= tempo de cultivo (dias).

$$TCE = 100 \times (\ln P_f - \ln P_i) / T \quad (7)$$

Onde:

TCE = Taxa de crescimento específico (%);

Ln = logaritmo neperiano;

P_f = peso médio final;

P_i = peso médio inicial;

T = tempo de cultivo (dias).

$$CAA = QR/GB \quad (8)$$

Onde:

CAA = conversão alimentar aparente (g de ração g de peixe-1);

QR = quantidade média de ração consumida (g).

GB = ganho de biomassa (g).

$$EA = GP \times (100/QR) \quad (9)$$

Onde:

EA = Eficiência Alimentar (%);

GP = ganho de peso médio por peixe (g);

QR = quantidade média de ração consumida por peixe (g).

$$IEP = GB / QR \quad (10)$$

Onde:

IEP= Índice de Eficiência Proteica (%);

GB= Ganho de Biomassa (g);

QR= Quantidade média de ração consumida (g).

4.9 Composição centesimal da ração e do filé

Para a análise da composição centesimal foram filetados quatro peixes de cada tratamento com comprimento de 12,85 cm e peso médio de 38,51 g, os filés foram armazenados à -18 °C até o dia das análises. Foram utilizadas 25 g de amostra dos filés e rações por tratamento. As análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEPE), do Departamento de Engenharia de Pesca.

4.9.1 Umidade

As amostras foram homogeneizadas e 2,0 gramas de cada amostra foram depositadas em cadinhos previamente secos em estufa a 105 °C por 24 horas, até atingir um peso constante, e a umidade calculada segundo a equação:

$$U = (V2 - V1 / V2 - V0) \times 100 \quad (11)$$

Onde:

U = umidade;

V0 = peso do cadinho seco;

V2 = peso do cadinho com amostra;

V1 = peso do cadinho c/ amostra após secagem.

4.9.2 Lipídios

A determinação de lipídios foi realizada segundo a metodologia proposta por Soxhlet (AOAC, 2000), com a utilização da acetona como solvente extrator. Os balões de Soxhlet foram secos na estufa a 100-105 °C durante uma hora e em seguida foram pesados. Foram pesadas 3,0 gramas das amostras em cartuchos e colocados no extrator de Soxhlet, com a adição de acetona nos balões (100 mL) e após extração por 2 horas (90 °C), os balões foram pesados e a determinação do teor de lipídios foi calculada segundo a equação:

$$\text{Lipídios Totais} = \frac{\text{Peso do balão com gordura} - \text{Peso do balão vazio seco}}{\text{Peso da amostra}} \times 100 \quad (12)$$

4.9.3 Cinzas

O cálculo do teor de cinzas foi realizado conforme AOAC (2000), onde 2,0 g de cada amostra foram colocados em cadinhos previamente secos e postos no forno mufla até a total incineração das amostras a 550°C. O teor de cinzas nas amostras foi calculado segundo a equação:

$$C = \frac{V1 - V0}{V2 - V0} \times 100 \quad (13)$$

Onde:

V0 = peso do cadinho;

V1 = peso do cadinho + cinza; V2 = peso do cadinho + amostra.

4.9.4 Proteína

O teor de proteína bruta foi calculado a partir do método de Kjeldahl segundo a AOAC (2000) o qual se baseia na determinação do nitrogênio total da amostra que é convertido a proteína total multiplicando-se o valor encontrado pelo fator 6,25. Em papel vegetal foi pesado 0,2 gramas da amostra macerada, passadas para um balão de Kjeldahl e acrescentado 2,0 – 3,0 g de catalisador e 4 mL de H₂SO₄ concentrado.

Os balões foram colocados no digestor de Kjeldahl e aquecidos brandamente no início (150 °C) e depois mais energicamente (350 °C) até o final da digestão (desaparecimento da cor escura). Em seguida as amostras foram levadas para o destilador de Kjeldahl, sendo neutralizadas com NaOH a 50% (10 mL).

Posteriormente foram colocadas em erlenmeyer com 10 mL de solução de H₃BO₃ a 2%, contendo 3 gotas do indicador misto (verde de bromocresol e vermelho de metila) e foram tituladas com HCl 0,04N e realizado o cálculo segundo a equação:

$$\% \text{ N total} = \frac{(\text{Vol. da amostra} - \text{Vol. do branco}) \times 0,014 \times 0,04\text{N HCl} \times F}{\text{Peso da Amostra}} \times 100 \quad (14)$$

Onde:

% Pt = % Nt x 6,25

4.10 Parâmetros hematológicos

Para a coleta de sangue e eutanásia dos peixes ao final do experimento foram empregadas às práticas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme as Diretrizes de Prática de Eutanásia (de acordo como §1º do art.14 da Lei nº 11.794, de 2008).O procedimento foi realizado através da anestesia cirúrgica para a coleta do sangue, e para a eutanásia o método físico do resfriamento (CONCEA,2013).

4.10.1 Coleta de sangue

Para coleta de sangue os peixes foram previamente anestesiados a fim de mitigar o estresse, com o uso do anestésico eugenol, diluído em álcool 96° PA, na concentração 0,9 mL L⁻¹ de água. Para prevenir a coagulação do sangue foi utilizada uma solução de heparina líquida (heparina 5.000 UI mL = 1,0 mL em 50,0 mL de solução salina 0,65%). Foi coletado sangue de dois (2) peixes por aquário, sendo oito (8) por tratamento, por meio da venopunção do vaso caudal, onde foi coletado aproximadamente 0,2 ml de sangue com seringas (1 mL) e agulhas hipodérmicas estéreis com 10µL de heparina(Figura 7). O sangue foi transferido para microtubos tipo Eppendorf (2,0 mL) e submetido às análises hematológicas.

Figura 7. Coleta de sangue dos alevinos de tilápia do Nilo.



Fonte: Autor.

4.10.2 Confeção das extensões sanguíneas

Após a coleta de sangue, foram confeccionadas as extensões sanguíneas, utilizando uma gota de sangue sem anticoagulante em uma lâmina de vidro e posteriormente realizada a coloração panótica.

4.10.3 Eritrograma

O eritrograma foi determinado pela contagem de eritrócitos ($10^6 \times \mu\text{L}^{-1}$), determinação do hematócrito (%), da taxa de hemoglobina (g dL^{-1}), e dos índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio-fL), HCM (hemoglobina corpuscular média-pg) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média-g dL^{-1}). Todos os parâmetros citados foram determinados por um analisador hematológico automático (ABX Micros 60CS), onde foi utilizada uma alíquota de 10 μL de sangue por animal para as análises.

4.10.4 Leucograma

O leucograma que corresponde à contagem global e específica dos leucócitos, representados pela leucometria e pelo estudo quantitativo e qualitativo dos glóbulos brancos, foi obtido segundo metodologia abaixo.

4.10.5 Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem de leucócitos totais foi determinada pelo modelo hematocitômetro de Neubauer segundo Stoskopf (1993), descrita por (RANZANI- PAIVA *et al.*, 2013). Cerca de 20 μL de sangue foram diluídos em 400 μL de líquido de Turck (1:20) e levados ao microscópio com aumento(400x), para contagem de todos os leucócitos presentes nos quadros marcados “L” na figura relativa de Neubauer correspondendo a 4 mm^2 .

$\text{N}^\circ \text{ total de leucócitos} \times 50 = \text{n}^\circ \text{ total de leucócitos}/\text{mm}^3$ (ou microlitro- μL).

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada com as extensões sanguíneas confeccionadas no momento da coleta de sangue pela coloração panótica. Foi realizada a identificação de cada célula em um microscópio óptico (400x), (linfócitos; neutrófilos; monócitos; eosinófilos e basófilos) por meio da contagem de 100 leucócitos para o cálculo percentual de cada uma das células analisadas.

4.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® versão 5.0 para Microsoft Windows®, cujos dados do presente trabalho foram submetidos à análise de variância (ANOVA) simples ($p < 0,05$), com determinações das médias \pm desvio padrão para três repetições, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição centesimal das rações

Os valores médios da composição centesimal das rações com níveis crescentes do (LP) utilizadas no experimento estão descritos na (Tabela 4).

Tabela 4 – Composição centesimal das rações utilizadas no cultivo dos alevinos de tilápia do Nilo com níveis crescentes de (LP).

VARIÁVEL	TRATAMENTO			
	Controle	LP-Cp 01	LP-Cp 02	LP-Cp 03
Umidade (%)	8,93 ± 0,22 ^a	11,87 ± 0,13 ^b	10,96 ± 0,11 ^c	10,63 ± 0,15 ^c
Lipídios (%)	3,38 ± 0,11 ^b	3,35 ± 0,13 ^b	2,29 ± 0,71 ^a	2,37 ± 0,53 ^a
Proteína Bruta (%)	29,96 ± 0,20 ^a	29,11 ± 0,33 ^a	29,07 ± 0,49 ^a	29,03 ± 0,52 ^a
Cinzas (%)	10,74 ± 0,04 ^a	10,73 ± 0,22 ^a	10,67 ± 0,04 ^a	10,62 ± 0,04 ^a

Os valores representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

As médias para cinzas não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos com o (LP) e o controle ($p > 0,05$), todavia se mantiveram dentro da faixa considerada natural. O percentual de cinzas representa a matéria mineral, que normalmente contém minerais, tais como cálcio, fósforo, potássio e magnésio, e o teor considerado normal de cinzas nas rações para peixes varia de 7 a 12% (CHAPMAN; MILES, 2009).

Os valores de umidade apresentaram diferença estatística entre os tratamentos com o (LP) em relação ao controle ($p > 0,05$), os valores obtidos estão de acordo com o desejável, próximos a 13%, o que é indicado para que as rações possam ser armazenadas a temperaturas ambientes (CHAPMAN; MILES, 2009).

O teor de lipídios das rações com a adição do (LP), apresentou diferença estatística significativa em relação à ração controle ($p < 0,05$) mostrando uma redução com o aumento dos níveis (LP). Os lipídios são combustíveis metabólicos que podem ser utilizados para obtenção de energia pelos organismos aquáticos, com nível ótimo variando em função de fatores como o ambiente, hábito alimentar, temperatura e fase de desenvolvimento (GARCIA *et al.*, 2012).

A proteína bruta das rações não apresentou diferença estatística entre os tratamentos com o (LP) e o controle ($p > 0,05$). É importante ressaltar que as rações para peixes onívoros, como a tilápia, o teor de PB varia de 24 a 32%. Na piscicultura intensiva as rações correspondem a 50 a 70% do custo de produção (KUBTIZA; CYRINO, ONO, 1998).

Níveis excessivos de proteína na dieta não são economicamente e ambientalmente saudáveis, uma vez que a proteína é o componente alimentar mais caro e seu excesso aumenta a excreção de resíduos nitrogenados (GATLIN, 2010).

5.2 Qualidade de água

Os valores médios dos parâmetros de qualidade de água obtidos durante o cultivo experimental estão descritos na (Tabela 5). Oxigênio dissolvido (OD), temperatura e pH não apresentaram diferenças estatística significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$) e se mantiveram com valores dentro da faixa ideal para a espécie cultivada.

Tabela 5 - Parâmetros de qualidade da água do cultivo de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.

VARIÁVEL	TRATAMENTO			
	Controle	LP-Cp 01	LP-Cp 02	LP-Cp 03
Temperatura (°C)	26,50 ± 0,19 ^a	26,48 ± 0,17 ^a	26,54 ± 0,17 ^a	26,45 ± 0,18 ^a
Oxigênio (OD)(mg/L ⁻¹)	5,35 ± 0,11 ^a	5,41 ± 0,05 ^a	5,38 ± 0,07 ^a	5,51 ± 0,09 ^a
pH	7,63 ± 0,09 ^a	7,67 ± 0,15 ^a	7,66 ± 0,11 ^a	7,53 ± 0,13 ^a
Amônia-NH ₃ (mg/L ⁻¹)	0,61 ± 0,19 ^a	0,57 ± 0,10 ^a	0,55 ± 0,11 ^a	0,58 ± 0,03 ^a
Nitrito-NO ₂ (mg/L ⁻¹)	0,26 ± 0,11 ^a	0,23 ± 0,08 ^a	0,23 ± 0,07 ^a	0,27 ± 0,06 ^a
Nitrato-NO ₃ (mg/L ⁻¹)	2,13 ± 1,36 ^a	2,08 ± 1,40 ^a	2,05 ± 1,37 ^a	2,19 ± 1,31 ^a
Fosfato-PO ₄ ⁻ (mg/L ⁻¹)	0,73 ± 0,45 ^a	0,71 ± 0,43 ^a	0,70 ± 0,46 ^a	0,70 ± 0,38 ^a

Os valores representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Todos os organismos aquáticos vivos têm limites toleráveis em relação a parâmetros de qualidade da água em que possuem melhor desempenho, os quais são caracterizados pela quantidade adequada de oxigênio, temperatura, transparência, níveis limitados de metabolitos e outros fatores ambientais essenciais para a sobrevivência e crescimento dos peixes (BHATNAGAR; DEVI, 2013).

Os valores médios de temperatura entre os tratamentos do presente estudo foi de 26,4 °C, permanecendo de acordo com o recomendado (26 a 32 °C) para o desenvolvimento satisfatório de tilápias do Nilo (SÁ, 2011).

A temperatura é um dos fatores de maior importância em relação ao crescimento de animais peçonhentos, influenciando diretamente na velocidade do metabolismo e na utilização dos nutrientes presentes na dieta (GUERREIRO *et al.*, 2012).

A concentração de oxigênio dissolvido (OD) adequada para manutenção de uma boa saúde e crescimento de peixes tropicais em cativeiro está compreendida entre 4,0 e 15,0 mg L⁻¹. Concentrações acima de 15,0 mg L⁻¹ podem acarretar o trauma da bolha de gás no sangue, já entre 1,5 e 4,0 mg L⁻¹ é considerado estressante, provocando retardo no crescimento e queda na imunidade. Em concentrações menores que 1,5 mg L⁻¹ são toleradas por breves períodos, mas se a exposição for prolongada, pode acarretar na morte do animal (SÁ, 2012).

A concentração média de (OD) foi de 5,47 mg L⁻¹ entre os tratamentos no presente estudo, não apresentando diferença estatística ($p > 0,05$) mantendo-se dentro da faixa ideal para a tilápia do Nilo, o que é de extrema importância levando em consideração que juntamente com a temperatura, o OD é um fator de grande relevância para a manutenção de todos os processos fisiológicos dos peixes (SÁ, 2011).

Desta forma, relativo a qualidade química da água, o oxigênio dissolvido é um parâmetro que merece atenção especial quanto ao crescimento dos peixes e a consequente deposição de nutrientes. Pois, o animal submetido a hipóxia, reduz a ingestão alimentar e a digestibilidade, além de reduzir a capacidade imunológica, aumentando a susceptibilidade de doenças e portanto depositando menos nutrientes em seu corpo (ABDEL-TAWWAB *et al.*, 2015).

Os valores médios de pH entre os tratamentos foi de (7,6), não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$), estando dentro da faixa ideal para o desenvolvimento dos organismos aquáticos, que deve estar entre (6,5 - 9,0). Valores de pH abaixo da faixa ideal provocam estresse ácido, e acima podem gerar estresse alcalino. Quando a atividade enzimática dos peixes é apropriada, verifica-se boa atividade natatória, elevada taxa digestiva, melhor aproveitamento alimentar e, por conseguinte, um crescimento rápido, a média para uma excelente atividade enzimática, é de 7,4 o mesmo encontrado no sangue (SÁ, 2012).

O fosfato-PO₄³⁻ não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Todavia, ultrapassaram os limites recomendados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), onde de acordo com a resolução N° 357/2005 estabelece o limite máximo de 0,03 mg L⁻¹ de fósforo reativo para ambientes lênticos e 0,05 mg L⁻¹ para ambientes intermediários, com tempo de residência de água de 2 - 40 dias, tornando-se necessário o tratamento do efluente antes da descarga ou reutilização (BRASIL, 2005).

O emprego da alimentação artificial foi a principal fonte de fosfato no cultivo importante ressaltar que este elemento é considerado um nutriente essencial para a formação da estrutura óssea e para o metabolismo corporal, portanto, é imprescindível ter uma concentração adequada deste elemento na ração para atender à exigência nutricional do animal (DIETERICH *et al.*, 2012).

Amônia é o produto da excreção dos peixes após a assimilação de proteínas das rações e pode ser tóxica, pois é altamente solúvel em água (MORO *et al.*, 2013). Os níveis de amônia e nitrito entre os tratamentos com (LP) e o controle, não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) e se mantiveram estáveis e de acordo com as condições ideais de cultivo, ou seja, abaixo de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, abaixo de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente (COÊLHO *et al.*, 2014).

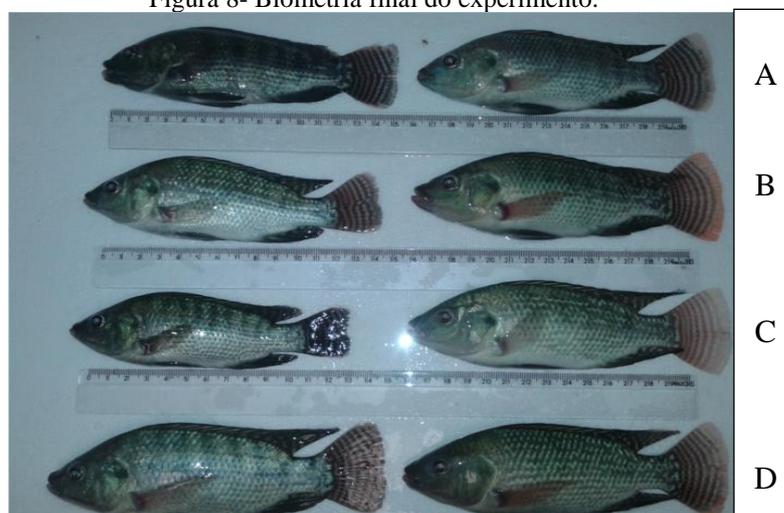
Quando a concentração de amônia supera $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ é indicado realizar a troca de água e aumentar a aeração, que também reduz essa quantidade pelo processo de nitrificação e movimentação da água (SÁ, 2012).

Os valores médios de nitrato entre os tratamentos não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), mantendo-se dentro da faixa recomendada para a aquicultura que é $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ (BRASIL, 2005). O nitrato é obtido a partir da transformação do nitrito por bactérias do gênero *Nitrobacter*, não é tão tóxico aos peixes, somente é tóxico em concentrações elevadas (SÁ, 2012).

5.3 Desempenho zootécnico

A Figura 8 mostra os alevinos de tilápia do Nilo nas biometrias que foram realizadas ao final do experimento: (A) Grupo Controle; (B) (LP-Cp 01); (C) (LP-Cp 02); (D) (LP-Cp 03).

Figura 8- Biometria final do experimento.



Fonte: Autor.

Os valores referentes ao desempenho zootécnico dos tratamentos com níveis crescentes do (LP) adicionados na ração estão descritos na (Tabela 6). Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Tabela 6 - Parâmetros zootécnicos dos alevinos de tilápias do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.

PARÂMETRO	TRATAMENTO			
	Controle	LP-Cp 01	LP-Cp 02	LP-Cp 03
PMI (g peixe ⁻¹)	3,62 ± 0,88 ^c	3,31 ± 0,68 ^b	3,10 ± 0,73 ^a	3,14 ± 0,70 ^a
PMF(g peixe ⁻¹)	37,31 ± 5,33 ^a	37,66 ± 6,35 ^a	38,08 ± 6,76 ^a	40,15 ± 5,67 ^a
GP (g peixe ⁻¹)	33,69 ± 5,51 ^a	34,35 ± 5,76 ^a	34,98 ± 5,57 ^a	37,01 ± 5,46 ^a
GPD(g dia ⁻¹)	0,56 ± 0,09 ^a	0,57 ± 0,07 ^a	0,58 ± 0,07 ^a	0,62 ± 0,06 ^a
CMF (cm)	12,27 ± 0,87 ^a	12,41 ± 0,95 ^a	12,43 ± 0,98 ^a	12,96 ± 0,69 ^a
CMD (cmdia ⁻¹)	0,11 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,02 ^a
TCE (% dia ⁻¹)	3,89 ± 0,10 ^a	4,05 ± 0,12 ^b	4,18 ± 0,10 ^c	4,25 ± 0,09 ^c

Os valores representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Parâmetros: PMI= Peso médio inicial; PMF= Peso médio final; GP= Ganho de peso; GPD= Ganho de peso diário; CMF= Crescimento médio final; CMD= Crescimento médio diário; TCE= Taxa de crescimento específico.

Melhores resultados para o peso médio final (g peixe⁻¹), crescimento médio final (cm) e crescimento médio diário (cm dia⁻¹) foram obtidos nos tratamentos que receberam o (LP). Os valores para o ganho de peso (g peixe⁻¹) e ganho de peso diário (g dia⁻¹), não apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Os melhores resultados foram encontrados no tratamento (LP-Cp 03), com um acréscimo de 9,85% para o ganho em peso (g peixe⁻¹) e 10,71% no ganho de peso diário (g dia⁻¹).

Resultados positivos têm sido relatados com a inclusão de enzimas nas rações. Um desses bons exemplos é com a truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*), onde foram alimentadas com 0,1 e 0,2% de complexo enzimático digestivo exógeno, apresentando aumento no ganho de peso, taxa de crescimento e diminuição na taxa de mortalidade (GALECIO *et al.*, 2004).

Em um trabalho com suplementação de protease para tambacus, não foi observada diferença significativa no peso final, assim como no presente estudo (NUNES *et al.*, 2006).

Soares *et al.* (2008), em experimento avaliando o efeito da inclusão de protease exógena em ração para tucunaré (*Cichla* sp.) relataram que a inclusão de 0,10%, melhorou a conversão alimentar, ganho em peso e taxa de crescimento específico. De maneira similar, Moura *et al.* (2012) observaram que a suplementação com um complexo enzimático melhorou o peso final e ganho em peso dos animais.

Outro experimento com tilápias do Nilo foi avaliado com níveis crescentes de inclusão 0; 0,033; 0,066; e 0,099% de complexo enzimático contendo (amilase, protease, celulase, lipase, pectinase, xilanase, β -glucanase e fitase) na ração, não afetou o ganho de peso, as taxas de sobrevivência e de crescimento específico, mas melhorou a conversão e a eficiência alimentar, com valores maiores para o nível de inclusão de 0,066%. (SIGNOR *et al.*, 2010).

Adeoye *et al.* (2016) ao avaliarem a suplementação enzimática (fitase, protease e carboidrase) de forma unitária em dietas para tilápia do Nilo, constaram que houve incremento no peso final e taxa de crescimento específico, para dietas suplementadas com fitase ou protease.

A adição das enzimas fitase, protease e alfa-amilase na dieta do peixe ornamental guppy (*Poecilia reticulata*) proporcionou maior ganho em peso, taxa de crescimento específico, e melhor conversão alimentar, sem que houvesse diferença em relação ao consumo de ração (GOMES *et al.*, 2017).

O fornecimento de dietas com adequado teor de proteína digestível, além de possibilitar o aproveitamento eficiente da fração proteica, reduz a produção de resíduos nitrogenados excretados na água, que são prejudiciais ao peixe e ambiente de criação (HAYASHI *et al.*, 2002; NRC, 2011).

Os valores referentes a taxa de crescimento específico TCE (% dia⁻¹) observadas no presente estudo, se mostraram mais eficientes nos tratamentos com LP, apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) destacando um acréscimo de 9,25% (LP-Cp 03); 7,45% (LP-Cp 02) na TCE (% dia⁻¹), em relação ao controle.

A taxa de crescimento específico (TCE) está associada a vários fatores, entre os quais a variação ontogenética, a adaptação a algum ambiente de cultivo, podendo apresentar diferentes efeitos para indivíduos de uma mesma espécie (JUNIOR; ALMEIDA; SOUZA-FILHO, 2007).

Todas as rações testadas com os diferentes níveis de (LP) foram aceitas e ativamente ingeridas pelos peixes, demonstrando sua boa aceitação, sem alterações na palatabilidade e consumo.

Para os valores de biomassa final (g) e ganho em biomassa (g), não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$), contudo os melhores resultados foram obtidos no tratamento (LP-Cp 03), com um aumento na biomassa final e ganho em biomassa de 7,60% e 12,98% respectivamente em relação ao controle (Tabela 7).

Tabela 7 - Sobrevivência e desempenho produtivo dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração

PARÂMETRO	TRATAMENTO			
	Controle	LP-Cp 01	LP-Cp 02	LP-Cp 03
Sobrevivência(%)	98,0 ± 0,23 ^a	98,0 ± 0,25 ^a	98,0 ± 0,23 ^a	97,5 ± 0,33 ^a
BF (g)	318,24 ± 29,84 ^a	324,27 ± 26,85 ^a	330,76 ± 28,27 ^a	350,05 ± 36,97 ^a
GB (g)	282,04 ± 28,96 ^a	291,17 ± 26,17 ^a	299,76 ± 27,54 ^a	318,65 ± 35,27 ^a
IEP	0,57 ± 0,04 ^a	0,59 ± 0,02 ^a	0,60 ± 0,04 ^a	0,65 ± 0,04 ^a

Os valores representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). BF= Biomassa final; GB= Ganho em biomassa; IEP= Índice de eficiência proteica.

Durante o cultivo a média geral para a sobrevivência foi de 97,8%, indicando que os crescentes níveis de inclusão do LP nas rações não influenciaram na mortalidade. Não houve diferença estatística no índice de eficiência proteica entre os tratamentos com o LP e o controle ($p > 0,05$), entretanto foi observado o melhor desempenho de (14,03%), para o (Lp-Cp 03) em relação ao controle. O índice de eficiência proteica (IEP) indica quanto da proteína bruta (PB) da dieta foi convertida em peso corporal (ROSSATO *et al.*, 2014).

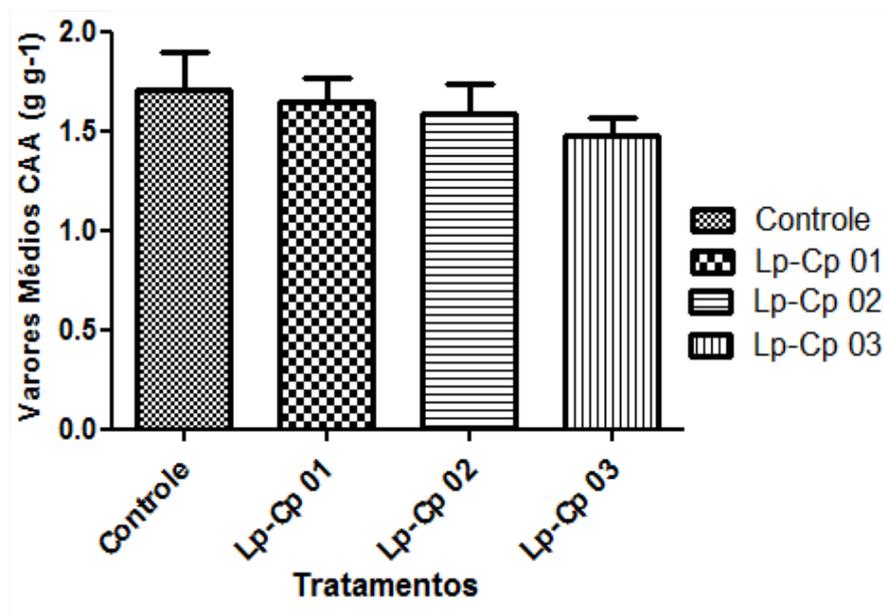
Segundo Bomfim *et al.* (2008), com a diminuição do teor de proteína na dieta houve aumento do índice de eficiência proteica (IEP). Esse fato demonstra que os carboidratos, presentes em maior quantidade nas dietas com baixos níveis proteicos foram capazes de economizar a proteína como fonte energética.

O uso combinado de complexos enzimáticos (contendo fitase, protease e xilanase) e pró-bióticos, melhorou o peso final, taxa de crescimento específico, conversão alimentar e eficiência proteica em tilápias juvenis, além de favorecer a absorção de nutrientes por interferir de forma positiva na morfologia intestinal ao aumentar o diâmetro de microvilosidades e superfície de absorção dos enterócitos (ADEOYE *et al.*, 2016).

A eficiência de utilização da proteína pelos peixes está atrelada não somente à qualidade e o nível ótimo de suplementação, mas também à presença de outros nutrientes que influenciam sua utilização metabólica (AZAZA *et al.*, 2009; SÁ *et al.*, 2014; AZAZA *et al.*, 2015).

Os valores de CAA (g g^{-1}) obtidos no presente estudo não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos com o (LP) e o controle (Gráfico 1). Os valores obtidos foram: $1,71 \pm 0,19$ (Controle); $1,65 \pm 0,15$ (Lp-Cp 01); $1,59 \pm 0,12$ (Lp-Cp 02) e $1,48 \pm 0,09$ (Lp-Cp 03).

Gráfico 1 - Conversão alimentar aparente de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.



Fonte: Autor.

A melhor maneira de se avaliar a qualidade de um alimento para peixes é determinando a conversão alimentar aparente (CAA), que corresponde ao consumo de ração do animal em um período de tempo/ganho de peso (SANTOS, 2007).

A conversão alimentar varia com a temperatura do ambiente sendo proporcional a mesma, o tamanho do peixe e a qualidade do alimento fornecido. As conversões alimentares mais comuns variam normalmente entre 1,2:1 a 1,8:1, (SANTOS, 2007).

Em um estudo com a utilização de complexo enzimático nas concentrações de 0,25; 0,50; 0,75g/kg de ração com tilápias, (*O. niloticus* x *O. aureus*), foram melhores resultados para o crescimento e conversão alimentar, indicando que o complexo enzimático é benéfico para o crescimento de tilápias (LIN *et al.*, 2007).

Resultados benéficos também foram observados após a suplementação com protease exógena para juvenis de tucunaré-paca ao nível de inclusão de 0,10%, apresentando melhores resultados de ganho de peso, conversão alimentar e crescimento específico (SOARES *et al.* 2008).

Em dietas para catfish africano (*Clarias gariepinus*), suplementadas com o complexo enzimático composto por, xilanase, pentonases, amilase, hemicelulase, celulase, pectinases, celubiase e β -glucanase, foi observado que os animais alimentados com ração contendo o complexo enzimático obtiveram melhor conversão alimentar ($P < 0,05$) quando suplementadas nos níveis de 0,05% e 0,075% (YILDIRIM; TURAN, 2010).

Moura *et al.* (2012) em seu experimento com crescentes níveis do complexo enzimático SSF em rações para tilápias do Nilo. Observaram melhoras gradativas na conversão alimentar com a inclusão do SSF até o maior nível de inclusão (150 ppm), ainda ressaltam que esta melhora ocorre em função da maior biodisponibilidade de nutrientes.

Em um trabalho realizado para avaliar o efeito da inclusão de diferentes níveis de um complexo enzimático SSF, adicionados na forma “on top” em rações para tambacu, composto por seis tratamentos sendo eles: (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppm kg de ração), foi observado que inclusão de 600ppm de SSF “on top” proporcionou melhores índices de conversão alimentar, todavia não foram observadas diferenças ($p > 0,05$), para o peso final, ganho de peso, comprimento total, biomassa final, ganho em biomassa (PEDREIRA *et al.*, 2016).

O crescimento dos peixes depende da digestão e da absorção de nutrientes, sendo a capacidade digestiva definida como a capacidade do animal em secretar enzimas no trato, de forma a hidrolisar os nutrientes presentes nos alimentos, sendo que os níveis destas enzimas dependem dos níveis dos nutrientes presentes no alimento ingerido (STECH *et al.*, 2009).

Conforme a intensificação na produção, a busca pela máxima eficiência alimentar tem promovido o uso de aditivos na ração utilizados para controlar agentes prejudiciais ao processo digestivo e proporcionar a melhora dos índices zootécnicos (NUNES *et al.*, 2012).

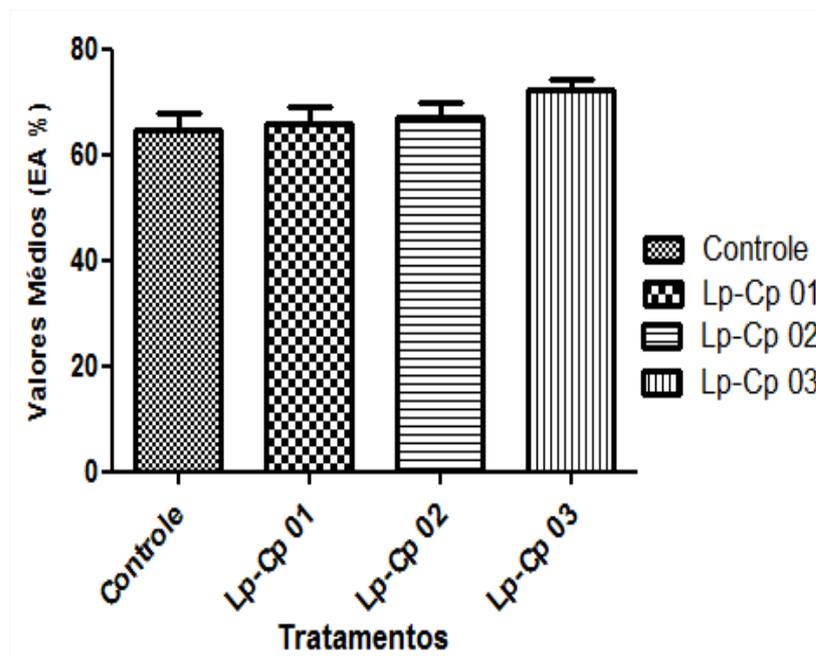
Em estudos de nutrição é importante considerar também os efeitos da composição da dieta sobre as respostas fisiológicas e metabólicas dos peixes. A compreensão de como esses animais utilizam a proteína e o que acontece *in vivo* durante o crescimento é fator importante ao manejo de criação, pois possibilita maximizar a eficiência de conversão do alimento e reduzir custos (JIN *et al.*, 2015).

Os valores encontrados para a CAA (g g^{-1}) no presente estudo foram melhores para os tratamentos experimentais com o (LP) em relação ao controle, com destaque para o (Lp-Cp 03), com um melhor desempenho(13,45%). Mostrando eficiência na conversão alimentar, contribuindo de forma positiva no processo digestivo das dietas.

Eficiência alimentar (%) é o ganho de peso médio por peixe no tratamento/consumo médio de ração por indivíduo. Claramente é a eficiência dos animais em converter a ração consumida em peso vivo. Com relação aos valores médios de eficiência alimentar (%) foi observada diferença estatística significativa entre o tratamento (Lp-Cp 03) e o controle ($p < 0,05$) como descrito no (Gráfico 2).

Os valores obtidos foram de $64,55 \pm 3,41\%$ (Controle); $66,05 \pm 3,08\%$ (Lp-Cp 01); $66,97 \pm 2,76\%$ (Lp-Cp 02); $72,31 \pm 1,91\%$ (Lp-Cp 03) , onde foi verificado um acréscimo de 12,02% na eficiência alimentar no tratamento (Lp-Cp 03) em relação ao controle.

Gráfico 2 - Eficiência alimentar dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.



Fonte: Autor.

Em outras espécies, como o tambaqui, enzimas ou o complexos enzimáticos exógenos promoveram resultados positivos como relatado por Nunes *et al.* (2006), avaliando o efeito no desempenho da adição de (0; 0,05; 0,1 e 0,2 g kg) de enzimas (amilase, lipase e protease) na ração. Os resultados de ganho de peso, conversão alimentar aparente e crescimento específico dos peixes foram diferentes entre os tratamentos ($p < 0,05$). A amilase promoveu melhor resultado a 0,05%, já a lipase a 0,2%, entretanto a protease não apresentou influência significativa.

Um estudo conduzido para investigar o efeito da suplementação de uma protease serínica na ração para *O. niloticus* com níveis de proteína bruta de 28 e 26% com a adição de 0, 200, 400 mg kg⁻¹ demonstrou resultados positivos para o ganho de peso, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência protéica e digestibilidade protéica aparente foram significativamente aumentados com a suplementação enzimática enquanto a conversão alimentar diminuiu significativamente. (NAELA *et al.*, 2017).

De acordo com Kubitzka (2012), se o produtor trabalhar em todas as fases do cultivo em busca de eficiência alimentar poderá ter uma redução significativa no custo total na produção por meio de uma alimentação eficiente com melhor aproveitamento proteico da ração. O crescimento está diretamente relacionado à incorporação de tecidos proteicos, de gordura e ósseo, sendo estes influenciados pelo consumo e balanceamento de nutrientes oriundos da ração, conforme a capacidade genética de incorporação diária para cada espécie animal (BOMFIM *et al.*, 2010; NRC, 2011).

Embora o incremento no consumo de proteína (aminoácidos) aumenta a deposição de proteína corporal até a capacidade máxima de utilização dos peixes, a eficiência de utilização dos aminoácidos diminui linearmente, tornando-se negativa quando excede a exigência (LEMME, 2013).

No presente trabalho, verificou-se que a inclusão das proteases do látex de *C. procera* (LP) na ração, apresentou uma tendência positiva no desempenho zootécnico dos alevinos. A maior concentração (300 mg kg⁻¹), do tratamento (Lp-Cp 03) mostrou resultados melhores para o ganho de peso, ganho de biomassa, biomassa final, conversão alimentar, eficiência proteica, taxa de crescimento específico, se mostrando como uma alternativa promissora para melhorar o desempenho produtivo de tilápias, tornando necessário a realização de mais estudos.

5.4 Ensaio de Digestibilidade

Enzimas exógenas podem ser usadas na alimentação de peixes para suplementar a produção de enzimas incluindo amilases para melhorar a digestibilidade do amido, proteases para melhorar a digestibilidade da proteína e lipases para melhorar a digestibilidade lipídica (LIN *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2009).

Não foram observadas diferenças significativas nos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta, extrato etéreo e matéria seca dos tratamentos com a inclusão do (LP) em relação ao controle ($p > 0,05$). Os valores encontrados neste trabalho para os coeficientes de digestibilidade para a (PB) variaram de 73,82% a 75,46%; (EE) 65,52% a 73,45%; (MS) 71,19% a 72,16% como descrito (Tabela 8).

Tabela 8. Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína bruta(PB),extrato etéreo(EE) e matéria seca(MS) dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.

TRATAMENTO	CDA PB (%)	CDA EE (%)	CDA MS (%)
Controle	75,46 ± 2,48 ^a	73,45 ± 2,04 ^a	71,91 ± 3,74 ^a
Lp-Cp 01	74,30 ± 2,62 ^a	71,53 ± 3,80 ^a	71,19 ± 3,78 ^a
Lp-Cp 02	73,82 ± 3,50 ^a	65,52 ± 8,12 ^a	71,46 ± 3,97 ^a
Lp-Cp 03	74,84 ± 3,31 ^a	67,71 ± 6,58 ^a	72,16 ± 3,61 ^a

Os valores representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Ogunkoya *et al.* (2005) observaram a influência de um complexo enzimático composto por (amilase, xilanase, protease, celulase e α -galactosidase) em dietas para truta *Oncorhynchus mykiss*, que aumentaram os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta, lipídios, fósforo e energia.

Silva *et al.* (2007) avaliaram a digestibilidade aparente dos nutrientes e energia da ração suplementada com enzimas exógenas (amilase, protease, lipase e celulase) administrada para juvenis de tambaqui, com quatro níveis de inclusão; 0; 0,05; 0,1 e 0,15%. Os pesquisadores observaram um aumento da digestibilidade aparente e energia bruta com inclusão de 0,05 % de complexo enzimático digestivo exógeno ($p < 0,05$).

Oliveira *et al.* (2007) observaram melhora no coeficiente de digestibilidade aparente de matéria seca, proteína bruta, energia bruta, amido, cálcio e fósforo com a inclusão de 0,05% de complexo enzimático (celulase, protease e amilase).

Em outro estudo, Lin *et al.* (2007) não relataram efeitos positivos sobre os coeficientes de digestibilidade da proteína bruta, lipídio e energia com a inclusão de 1,5 g / kg de complexo enzimático,(protease neutra, β -glucanase e xilanase) na dieta de tilápias.

A ação enzimática depende dos tipos de enzimas, o nível de inclusão nas dietas e a composição da dieta. Os efeitos das enzimas são geralmente menos pronunciados em dietas de alta densidade e alta digestibilidade (LIN *et al.*, 2007).

O pH interfere na atividade de enzimas digestivas em outras espécies de peixes como o tucunaré (*Cichla sp.*). Apesar de apresentarem hábitos alimentares distintos, as tilápias produzem proteases e a influência das variações de pH, pode ser estendida a espécie, constatou-se que a atividade de uma protease exógena adicionada em níveis crescentes na dieta de tucunarés juvenis foi maior em pH ácido do que no pH alcalino (SOARES *et al.*, 2008).

Guimarães *et al.* (2009), avaliando a inclusão de (0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 g kg⁻¹) do complexo enzimático Bioenzimaplus (lipase, protease e carboidrase), observaram aumento linear nos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta e extrato etéreo, matéria seca que variaram de 81,6 a 84,9%; 74,2 a 82,7%; 49,47 a 58,39% respectivamente. A inclusão de 0,4 g kg⁻¹ do complexo enzimático resultou nos maiores coeficientes de digestibilidade aparente.

Tachibana *et al.* (2010) ao avaliarem a suplementação com um blend (endo-xilanase e endo-beta-glucanase), sobre a digestibilidade dos nutrientes e energia do triticales (um híbrido do trigo com centeio) pela tilápia do Nilo, obtiveram máxima eficiência digestiva com a inclusão de 300 a 450 mg/Kg do complexo.

As enzimas utilizadas na alimentação de tilápias podem ser adicionadas de forma unitária ou na forma de misturas denominadas de “blends” (quando as enzimas são provenientes de espécies diferentes) ou complexos (as enzimas presentes tem uma mesma origem) (GOMES *et al.*, 2016).

A inclusão de complexos enzimáticos, em rações para tilápias possibilita resultados positivos no desempenho destes animais, permitindo uma utilização eficiente do amido e proteína (MOURA *et al.*, 2012). Melhora os coeficientes de digestibilidade das rações (OLIVEIRA *et al.*, 2007) e contribui para diminuição de fatores antinutricionais presentes em ingredientes de origem vegetal (TACHIBANA *et al.*, 2010).

A suplementação com a enzima protease pode melhorar o desempenho produtivo e a digestibilidade proteica em tilápias. Esta enzima poderia ser usada para reduzir o teor de proteína da dieta com a manutenção do desempenho dos peixes (NAELA *et al.*, 2017).

Na maioria das pesquisas envolvendo a adição de enzimas exógenas em dietas para peixes, os coeficientes de digestibilidade aparente apresentaram respostas positivas e crescentes até determinado nível de inclusão e, a partir desse ponto, demonstraram tendência de estabilização ou declínio (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A eficiência da atuação de enzimas digestivas e de absorção endógenas sobre seus respectivos substratos, bem como a capacidade dos peixes em metabolizar os nutrientes, pode ser fator limitante aos efeitos benéficos da adição de enzimas exógenas às dietas, em virtude da formação de fluxos muito intensos de nutrientes e/ou da saturação dos sítios de absorção ao longo do trato gastrintestinal dos peixes (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Vale destacar que nem sempre é possível observar respostas positivas com inclusão de enzimas. Para uma atuação eficiente é indispensável a presença do substrato específico, a concentração apropriada da enzima, a estabilidade enzimática ao processamento da ração e que esta enzima transponha todas as barreiras físico-químicas do processo digestório (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Apesar dos resultados encontrados até o momento sugerirem que a inclusão de enzimas nas dietas para peixes é uma forma de se aumentar a eficiência de utilização dos ingredientes disponíveis e com menor impacto ambiental. Os resultados disponíveis não são conclusivos, justificando a realização de mais estudos, pois estes trabalhos mostram que as respostas dependem da espécie utilizada, da dieta, da origem, concentração, estabilidade da enzima e seu uso concomitante ou não com outras enzimas (STECH *et al.*, 2009).

Comparar resultados com a suplementação de enzimas em dietas para peixes é bastante complexo, porém, necessário para a compreensão dos resultados obtidos. Na literatura há uma grande variedade de trabalhos com a suplementação de enzimas na forma isolada ou em complexos, com diferentes atividades enzimáticas, adicionadas a dietas contendo ingredientes diversificados, diversas metodologias, animais com hábitos alimentares e fases de vida distintas (SIGNOR *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos no presente estudo, para os coeficientes de digestibilidade da proteína bruta, lipídios e matéria seca, foram diferentes em relação aos diversos trabalhos já realizados. Possivelmente, uma resposta para os resultados obtidos, tenha relação com os níveis testados de inclusão do (LP) que nesse primeiro momento foram inferiores aos demais trabalhos citados. Também podemos ressaltar a questão do uso combinado de várias enzimas entre os vários trabalhos já realizados, que favorecem uma maior digestibilidade sobre os nutrientes alimentares.

Todavia a inclusão das proteases do látex de *C. procera* (LP) na ração se mostra como uma alternativa viável para melhorar a digestibilidade, mais estudos são necessários para se determinar a melhor concentração, e possivelmente o seu uso combinado com outras enzimas para uma melhor resposta.

5.5 Composição centesimal do filé

As médias da composição centesimal encontrada nos filés dos alevinos de tilápia do Nilo do presente estudo (Tabela 9), não mostraram diferença estatística entre os tratamentos com o (LP) e o controle ($p>0,05$). Os teores de umidade nos filés apresentaram valores dentro do encontrado em pescados que varia de 64 a 90% (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Os teores de cinzas, ou seja, o conteúdo mineral ficou dentro da faixa considerada aceitável, 1 a 2%, não apresentando diferença estatística entre os tratamentos ($p>0,05$) no experimento. Da mesma forma não foi verificada diferença estatística para os valores de lipídios dos tratamentos com (LP) e o controle ($p>0,05$). Os valores de lipídios apresentaram percentuais considerados baixos, dentro da faixa (0,5 a 25%), portanto uma vantagem para o consumo e processamento do filé dessa espécie (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Tabela 9 - Composição centesimal dos filés de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.

PARÂMETRO	TRATAMENTO			
	Controle	Lp-Cp 01	Lp-Cp 02	Lp-Cp 03
Umidade (%)	81,05 ± 0,11 ^a	80,89 ± 0,13 ^a	80,46 ± 0,11 ^a	80,57 ± 0,11 ^a
Lipídios (%)	2,10 ± 0,12 ^a	2,05 ± 0,23 ^a	1,85 ± 0,27 ^a	1,79 ± 0,31 ^a
Cinzas (%)	2,05 ± 0,09 ^a	2,04 ± 0,13 ^a	2,01 ± 0,09 ^a	2,00 ± 0,03 ^a
Proteína Bruta (%)	15,02 ± 0,08 ^a	14,99 ± 0,16 ^a	15,07 ± 0,04 ^a	15,19 ± 0,11 ^a

Os valores representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p<0,05$).

O excesso de lipídios mesmo de excelente qualidade, é atualmente indesejável, pois além de afetar as características sensoriais da carne, diminui a percentagem de rendimento de filé devido ao acúmulo de gordura no tecido adiposo da cavidade abdominal, afetando negativamente o valor comercial do peixe (MEURER *et al.*, 2002).

O pescado deve ser incluso na dieta por ser uma fonte rica em componentes nutricionais, pois apresenta baixo teor de gordura e alto teor proteico, e que além de atuar como uma fonte energética são ricos em ácidos graxos poliinsaturados, como os da família ômega 3 (ZUANAZZI *et al.*, 2013).

O músculo do pescado pode conter de 8 a 23% de proteína (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). Os valores médios de proteína bruta, observados entre os tratamentos com (LP) e o controle não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Corroborando com os resultados do presente estudo, a suplementação enzimática exógena em dietas para tilápia do Nilo não alterou composição corporal (LIN *et al.*, 2007; SOLTAN, 2009), entretanto em um trabalho com uma suplementação de 5 ou 7,5 g/kg de um complexo multi-enzimático comercial, foi observado o aumento no teor de proteína bruta do corpo do bagre africano (*Clarias gariepinus*) (YILDIRIM e TURAN, 2010).

Segundo Boch *et al.* (2007), a suplementação de fitase nas rações não influenciou ($P > 0,01$) os conteúdos de matéria seca, proteína e lipídios da carcaça de tilápias do Nilo. Rocha *et al.* (2008), em seu trabalho com diferentes níveis de suplementação enzimática para alevinos de jundiá (*Rhamdia quelem*), não observaram diferença significativa nos valores da matéria seca, matéria mineral e proteína bruta, corroborando com o presente estudo.

Signor *et al.* (2010), afirmaram que composição corporal de tilápias, em geral, não sofre efeito da suplementação com enzimas exógenas, não foi observado efeito significativo da suplementação enzimática sobre os teores de umidade, proteína bruta e material mineral.

A suplementação com um complexo enzimático em dietas de *kinguios*, em excesso proporcionou aumento no índice de conversão alimentar, porém, não influenciou os demais parâmetros zootécnicos e na composição de carcaça dos animais (SIGNOR *et al.*, 2013).

Adeoye *et al.* (2016) ao avaliarem a suplementação enzimática (fitase, protease e carboidrase) de forma unitária em dietas para tilápia do Nilo, constaram que a composição corporal não diferiu quanto a proteína, lipídeos e cinzas, no entanto, as tilápias alimentadas com dietas contendo protease apresentaram menor teor de umidade quando comparada a dieta controle, corroborando com os resultados do presente estudo.

Alguns aditivos utilizados em rações possuem a capacidade de promover mudanças metabólicas que se traduzem em respostas celulares, resultando no aumento da deposição proteica e diminuição do teor lipídico (FABRICIO, 2013).

Vale destacar que a composição corporal dos alevinos de tilápias varia quanto ao tamanho dos peixes, o teor de matéria seca e proteína bruta aumentam conforme aumenta o peso corporal dos peixes (SOUZA *et al.*, 2013).

A composição química de um pescado é extremamente variável e depende de vários fatores, tais como: espécie, ambiente, época do ano, quantidade e qualidade do alimento consumido, estágio de maturação sexual, idade e parte do corpo analisada (LIMA; MUJICA; LIMA, 2012; SOUZA *et al.*, 2015).

Os níveis testados de inclusão do (LP) adicionados a ração no presente estudo não apresentaram efeito significativo na composição corporal dos alevinos de tilápia do Nilo. Os trabalhos aqui apresentados e já publicados na área corroboram com os nossos resultados.

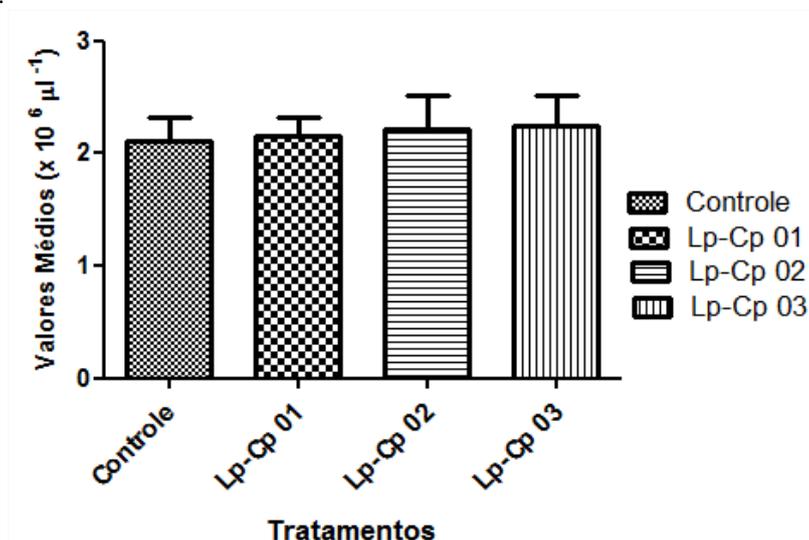
5.6 Parâmetros hematológicos

A aplicação da hematologia em pesquisas com animais é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnóstico, não revelando somente aspectos patológicos, mas também aspectos nutricionais de grande relevância (ARAUJO *et al.*, 2011).

5.6.1 Eritrograma

No presente estudo não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com o (LP) e o controle ($p > 0,05$). A contagem total de eritrócitos no tratamento (Controle) foi de $2,11 \pm 0,21 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$; $2,16 \pm 0,22 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ (Lp-Cp 01); $2,21 \pm 0,34 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ (Lp-Cp 02) e $2,25 \pm 0,26 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ (Lp-Cp 03) como descrito no (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Número de eritrócitos totais dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.



A contagem de glóbulos vermelhos é quase sempre parte da análise e este teste pode ajudar a diagnosticar anemias e outras condições que afetam as células vermelhas do sangue (BUNN, 2011). Os eritrócitos são as células dominantes na circulação sanguínea da grande maioria das espécies de peixes (VAZQUEZ; GUERRERO, 2007).

Os resultados da contagem total de eritrócitos encontrados neste estudo estão dentro da faixa considerada normal para a espécie, estes valores são próximos aos obtidos por Nagata *et al.* (2009) que foram (2,0 a 2,7 x 10⁶µL) e por Araújo *et al.* (2011) que obtiveram médias de (1,95 a 2,27 x 10⁶µL).

Jerônimo *et al.*(2011) avaliando a influência sazonal sobre os parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo relataram valores de (1,30 a 2,54 x 10⁶µL) de eritrócitos no sangue, sendo próximos dos que foram encontrados neste estudo.

De acordo com Rojas (2011) uma possível elevação na concentração de eritrócitos é uma resposta à condição de hipóxia, fato que não foi observado no presente estudo.

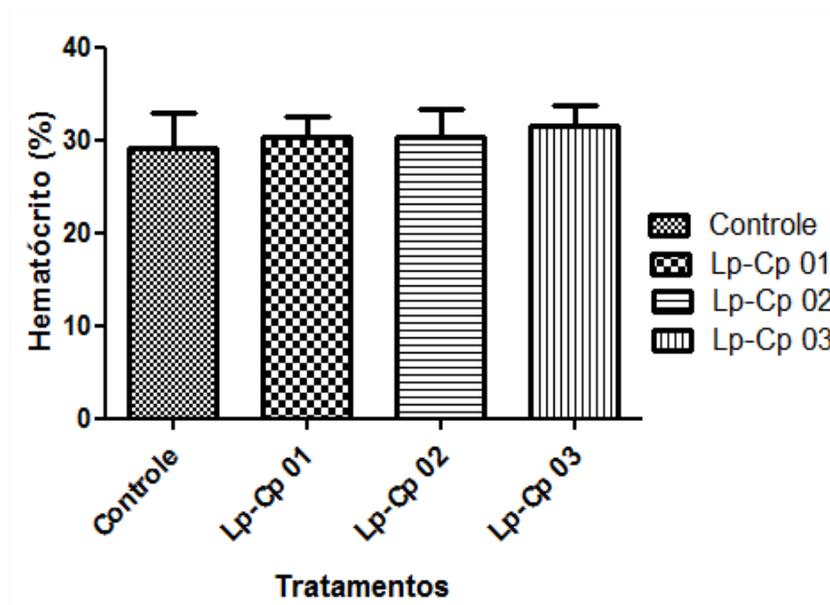
O aumento no número de eritrócitos pode ser uma resposta ao estresse ambiental de cultivo, desde que as exigências nutricionais da espécie não sejam devidamente atendidas (Belo *et al.*,2014). Segundo Tavares-Dias e Mariano (2015), a elevação do número de eritrócitos no sangue de peixes condiciona os animais a terem uma maior oxigenação no sangue, além disso, o baço também contribui para o aumento destas células.

Apesar da importância da hematologia como ferramenta para avaliação do quadro homeostático em peixes, o estudo do sangue como medida estratégica será bem aceito desde que consideradas as peculiaridades relacionadas ao estímulo que os peixes são submetidos, à espécie criada, à biologia e ao hábito ecológico (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Sabe-se, no entanto, que a dieta é fator essencial para o crescimento e manutenção das funções vitais, como respostas a estressores e defesas imunológicas (SANTOS; OBA, 2009).

O hematócrito reflete a proporção de eritrócitos no sangue em relação à quantidade de leucócitos, trombócitos e plasma sanguíneo, se caracterizando por ser um dos parâmetros hematológicos mais confiáveis, devido a pouca variabilidade e baixa margem de erros durante a sua determinação (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Os valores do hematócrito não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos com o (LP) e o controle conforme ilustrado no (Gráfico 4). Os índices obtidos no presente estudo, para o hematócrito foram de 29,03 ± 3,80% para o (Controle); 30,43 ± 2,08% (Lp-Cp 01); 30,26 ± 2,46% (Lp-Cp 02); e 31,53 ± 3,83% para o (Lp-Cp 03).

Gráfico 4 - Hematócrito dos alevinos de tilápias do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.



Fonte: Autor.

Os valores encontrados para o hematócrito no presente estudo se assemelharam aos resultados obtidos por Bittencourt *et al.* (2003) que investigou os intervalos de referência para valores hematológicos e bioquímicos de tilápias do Nilo cultivadas em sistema semi-intensivo, que foi de $31,85 \pm 8,45\%$.

De acordo com Feldman *et al.* (2006) não foi observada redução dos valores de hematócrito em peixes alimentados com dietas com óleo de linhaça, submetidos ou não ao frio. Os demais valores de hematócrito, para peixes antes e após estímulo pelo frio, com exceção do mínimo após estímulo pelo frio, estão entre os considerados normais (27 a 37%) para tilápias saudáveis corroborando com nossos resultados.

Os valores para o hematócrito encontrados por Silva (2008) variaram entre 25,92% a 28,94%, utilizando vacinação polivalente por via oral, banho de imersão e injeção intraperitoneal de imunestimulante em tilápias do Nilo.

Fernandes Junior *et al.* (2010) obtiveram resultados de 21,75 a 34,58%, com a utilização do cloreto de colina como suplemento na dieta de tilápias do Nilo em taxas de 100, 200, 400, 600, 800, 1.000 e 1.200 mg de colina/kg de ração. Tais resultados para o hematócrito corroboram com os valores do presente estudo.

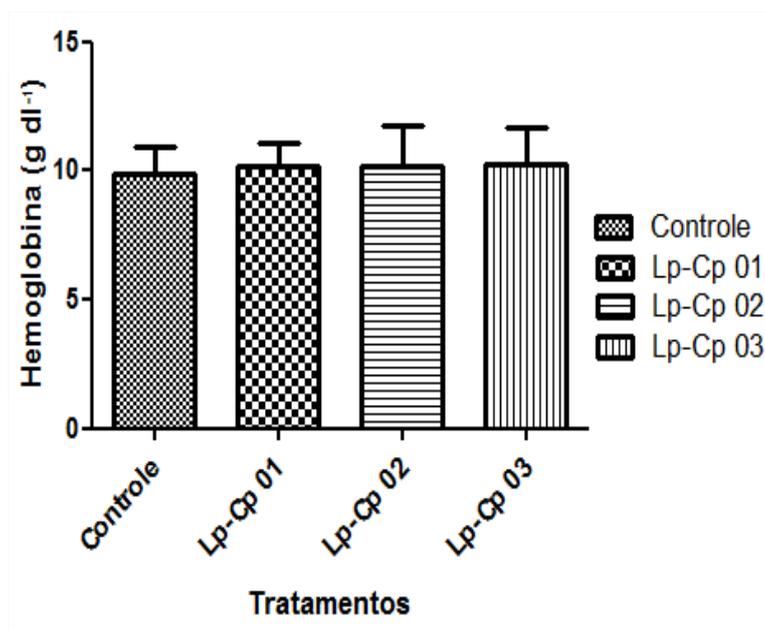
Resultados semelhantes foram obtidos por Ibrahem, Mohamed e Ibrahim (2013) que observaram o aumento do hematócrito (%) conforme aumentou o nível de inclusão da *A. platensis* na dieta da tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

É indispensável e necessário que os peixes sejam nutridos a partir do desenvolvimento com estratégias que favoreçam a saúde e resistência orgânica tornando-os aptos a responder aos desafios impostos (TEIXEIRA, 2009).

A hemoglobina no sangue transporta oxigênio dos órgãos respiratórios (pulmões ou das guelras) e para os tecidos, liberando o oxigênio para queimar nutrientes e fornecer energia para as funções do organismo além de recolher o produto resultante dióxido de carbono para trazê-lo de volta para os órgãos respiratórios e ser dispensados do organismo (ETIM *et al.*, 2013). A redução da hemoglobina pode significar menor capacidade de transporte de gases no interior do corpo (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Não foi observada diferença estatística significativa na concentração de hemoglobina entre os tratamentos que receberam (LP) e o controle ($p > 0,05$). Os valores obtidos para a concentração de hemoglobina no presente estudo foram os seguintes: $9,85 \pm 1,21 \text{ g dL}^{-1}$ (Controle); $10,15 \pm 0,92 \text{ g dL}^{-1}$ (Lp-Cp 01); $10,19 \pm 1,55 \text{ g dL}^{-1}$ (Lp-Cp 02); $10,23 \pm 1,45 \text{ g dL}^{-1}$ (Lp-Cp 03), (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Concentração de hemoglobina em alevinos de tilápias do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.



Fonte: Autor.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os relatados para tilápia nilótica por Bittencourt *et al.* (2003), ($10,5 \text{ g dL}^{-1}$). Os valores para a concentração de hemoglobina foram considerados excelentes, normalmente apresentam valores entre $7,0$ e $9,3 \text{ g dL}^{-1}$ (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003).

Diversos trabalhos como o de Nagata *et al.* (2009) encontraram valores de (9,9 a 11,6 g dL⁻¹). Hrubec e Smith (2010), com o intervalo encontrado de (5 a 10 g dL⁻¹) para tilápias saudáveis proposto pelos próprios autores, corrobora com os resultados deste estudo.

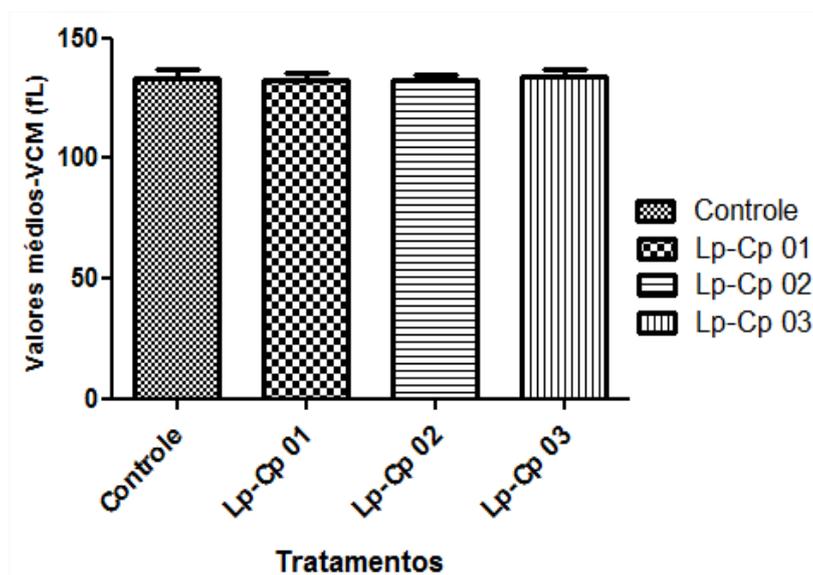
Ekanem *et al.* (2012) ao avaliarem amostras de sangue de tilápias encontraram valores entre (9,8-10,5g dL⁻¹), estando nossos resultados em concordância.

Araújo *et al.* (2017) não registraram diferença nos teores de hemoglobina ao submeterem alevinos de tilápia ao estresse pelo frio, encontrando valores próximos aos do presente estudo.

Rawling, Merrifield e Davies (2009) afirmaram que a concentração de hemoglobina é um dos parâmetros sanguíneos de maior confiabilidade na avaliação do estado nutricional em resposta à composição da dieta, estando também relacionada com as condições ambientais que pode afetar a sanidade de peixes cultivados. A hemoglobina é frequentemente utilizada como indicador do estado de saúde dos peixes, além de estar envolvida na regulação da função imunológica do organismo (ALI *et al.*, 2017).

O volume corpuscular médio (VCM) mede o tamanho das hemácias sendo utilizado para diagnosticar a ocorrência de anemias. Os resultados obtidos neste estudo estão descritos no (Gráfico 6). Os valores de (VCM) não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos com (Lp-Cp) em relação ao controle: 133,25 ± 3,41 fL (Controle); 132,62 ± 2,64 fL (Lp-Cp 01); 132,17 ± 2,68 fL (Lp-Cp 02); 134,33 ± 2,51 fL (Lp-Cp 03).

Gráfico 6 - Volume corpuscular médio (VCM) em alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionados a ração.



Fonte: Autor.

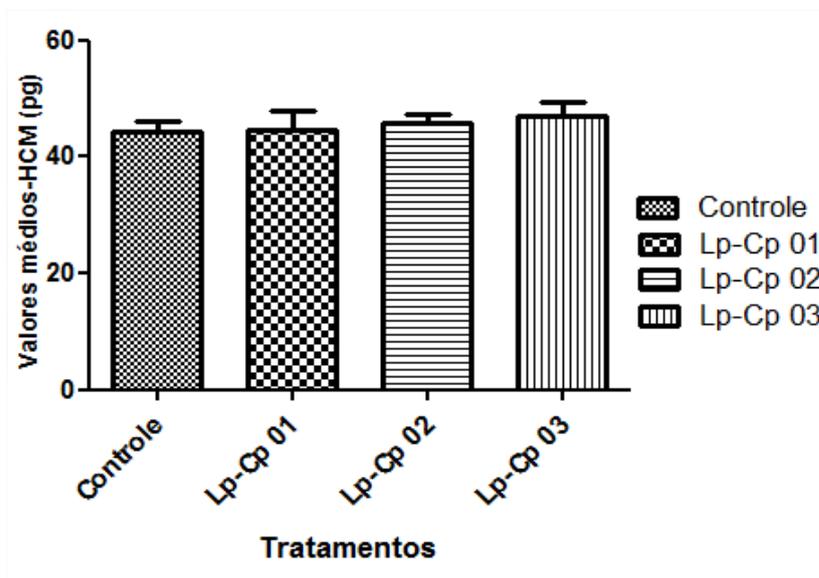
Os valores de VCM no presente estudo foram superiores aos valores descritos para tilápias por Tran-Duy *et al.* (2008) 111 fL e por Nagata *et al.* (2009) 106 fL. Signor *et al.* (2010) de 125,54 e 125,19 fL. Os valores do presente estudo estão de acordo com o demonstrado para tilápias do Nilo saudáveis entre 115 e 183 fL. (HRUBEC; SMITH, 2006).

Valores abaixo de 100 fL podem caracterizar um estado de microcitose, que é a diminuição do volume corpuscular decorrente dos efeitos deletérios do estresse geralmente relacionada com o aumento do cortisol no sangue (BELO *et al.*, 2014).

Em todos os tratamentos os valores de (VCM), foram superiores a 100 fL (Gráfico 6), o que caracteriza o bom estado de saúde dos animais (FERNANDES JUNIOR *et al.*, 2010; ARAUJO *et al.*, 2011).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nos valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) entre os tratamentos com o (LP) e o controle, como ilustrado no (Gráfico 7). Os valores foram de $44,15 \pm 1,83$ pg (Controle); $44,73 \pm 3,22$ pg (Lp-Cp 01); $45,72 \pm 1,51$ pg (Lp-Cp 02); $47,02 \pm 2,29$ pg (Lp-Cp 03).

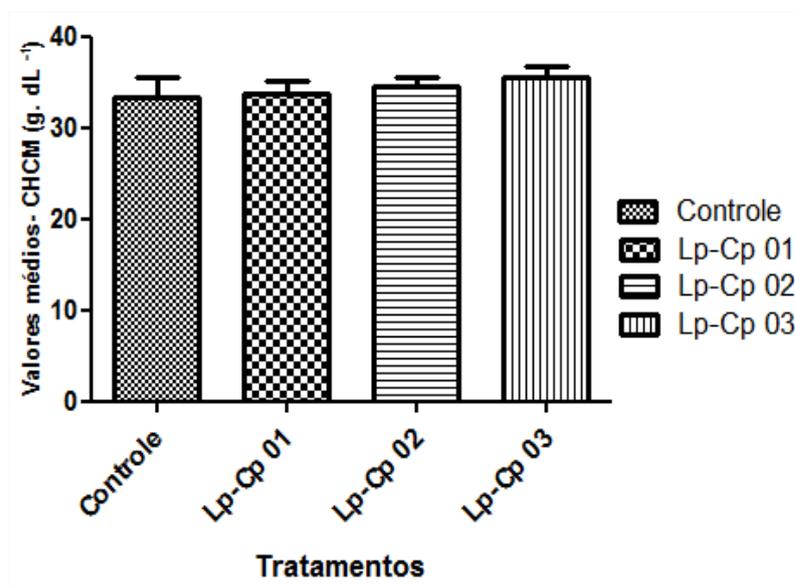
Gráfico 7 - Hemoglobina corpuscular média (HCM) em alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.



Fonte: Autor.

Foi observada diferença estatística na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) entre o tratamento (Lp-Cp 03) e o controle ($p < 0,05$). Os valores para CHCM foram de $33,37 \pm 2,18$ g dL⁻¹ no (Controle); $33,65 \pm 1,39$ g dL⁻¹ (Lp-Cp 01); $34,63 \pm 0,92$ g dL⁻¹ (Lp-Cp 02); $35,57 \pm 1,25$ g dL⁻¹ (Lp-Cp 03), (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em alevinos de tilápia do Nilo alimentados níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.



Fonte: Autor.

Os valores de CHCM do presente estudo foram semelhantes aos encontrados por Bittencourt *et al.* (2003) (35,2 g dL⁻¹); Nagata *et al.* (2009) (27 a 33 g dL⁻¹) para tilápias.

Resultados semelhantes obtidos por Araújo *et al.* (2011), em tilápias que receberam suplementação de óleo de girassol e linhaça na ração, onde o CHCM variou entre (34,28 a 38,04 g dL⁻¹) corroborando com o presente estudo.

O aumento desses índices hematimétricos ajuda a confirmar a melhor condição hematológica dos peixes, o que corresponde a uma melhor distribuição de oxigênio nos tecidos, e uma melhor resposta do sistema imune (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Os valores médios dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) como descrito na literatura, podem variar por meio da concentração de hemoglobina, hematócrito e número de eritrócitos. Estas variações podem ser decorrentes do estresse animal provocado por variações ambientais de cultivo ou distúrbios nutricionais de dietas com formulações inadequadas a espécie (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

5.6.2 Leucograma

O leucograma corresponde à determinação e à avaliação da série de células brancas (leucócitos) do sangue. Os valores de leucócitos totais apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos com o (LP) e o controle ($p < 0,05$). Apresentando os seguintes dados: $6,31 \pm 0,21 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ (Controle); $6,13 \pm 0,32 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ (Lp-Cp 01); $5,95 \pm 0,27 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ (Lp-Cp 02); $6,09 \pm 0,23 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ (Lp-Cp 03), (Tabela 10).

Tabela 10. Contagem total e diferencial de leucócitos dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de (LP) adicionadas a ração.

PARÂMETRO	TRATAMENTO			
	Controle	Lp-Cp 01	Lp-Cp 02	Lp-Cp 03
Leucócitos totais ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	6,31 \pm 0,21 ^b	6,13 \pm 0,32 ^{ab}	5,95 \pm 0,27 ^a	6,09 \pm 0,23 ^a
Linfócitos(%)	79,40 \pm 0,23 ^a	79,53 \pm 0,25 ^a	79,65 \pm 0,23 ^a	80,05 \pm 0,33 ^a
Neutrófilos (%)	17,47 \pm 0,41 ^a	17,39 \pm 0,37 ^a	17,13 \pm 0,60 ^a	17,00 \pm 0,63 ^a
Monócitos (%)	3,15 \pm 0,33 ^a	3,08 \pm 0,29 ^a	3,02 \pm 0,23 ^a	3,01 \pm 0,33 ^a
Eosinófilos (%)	0,00	0,00	0,00	0,00
Basófilos (%)	0,00	0,00	0,00	0,00

Os valores representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Em peixes, a contagem de leucócitos tem sido utilizada para avaliar a reação do sistema imunológico às infecções parasitárias (ALI; ANSARI, 2012; SANTOS; TAVARES, 2010). O aumento de leucócitos pode ser observado no início de um estresse na maioria das espécies de peixes, sendo considerado como uma tentativa de recuperar a homeostase em desequilíbrio, enquanto que o decréscimo pode ser atribuído pelo enfraquecimento do sistema imunológico (SILVA; LIMA; BLANCO, 2012).

O número total de leucócitos obtidos no presente estudo foram inferiores aos valores encontrados por Azevedo *et al.* (2006) $8,2 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$; Martins *et al.* (2008) $15,0 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$; superiores aos relatados por Ighwela *et al.* (2012) $2,9 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$; Azevedo *et al.* (2016) $4,7 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ e semelhantes aos encontrados por Tavares-Dias(2003) $6,6 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ para a mesma espécie.

Os valores de leucócitos em teleósteos podem apresentar variações intraespecíficas influenciadas por características próprias de cada indivíduo, relacionadas ao caráter migratório dos leucócitos entre a circulação e os órgãos leucopoéticos (rim e baço), em resposta aos estímulos ambientais, (NEGRETE *et al.*, 2009; TAVARES-DIAS *et al.*, 1999/2000; UEDA *et al.*, 1997). Bem como variações interespecífica como sazonalidade, reprodução, hábito alimentar, necessidades metabólicas de cada espécie (BARROS *et al.*, 2002; RANZANI-PAIVA *et al.*, 1999; TAVARES-DIAS E MORAES, 2004), presença de patógenos (MARTINS *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2008).

A tilápia do Nilo exibe um marcante comportamento de hierarquia social e, portanto, alterações no número de leucócitos circulantes podem ser determinadas em função dos confrontos aguerridos no ambiente de cultivo, constatado em estudos com tilápia-do-Nilo frente ao estresse (BARROS *et al.*, 2014; FALCON *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Com relação a contagem diferencial dos leucócitos, foram encontradas células semelhantes a outros peixes: linfócitos, neutrófilos, monócitos em maior quantidade e baixa quantidade ou ausência eosinófilos e basófilos (Tabela 10). Esses resultados corroboram com valores encontrados para a tilápia do Nilo (AZEVEDO *et al.*, 2006).

Os valores médios dos linfócitos (79,40 a 80,05%), não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$) sendo inferiores aos relatados por Azevedo *et al.* (2006) 96%; superiores aos encontrados por Tavares-Dias *et al.* (2000) 78%; Martins *et al.* (2004) 60%; Ighwela *et al.* (2012) 52%; e semelhantes a Azevedo *et al.* (2016) 79% para a tilápia do Nilo.

Os linfócitos atuam no organismo animal como uma das principais estruturas de defesa, interagindo em um complexo de células e moléculas específicas, que tem por função reconhecer agentes agressores, defender, manter a integridade e a homeostasia do organismo (NETO *et al.*, 2009). A redução do número de linfócitos pode ser indício de efeito estressante aos peixes cultivados (FUJIMOTO *et al.*, 2007).

Os valores médios de neutrófilos não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$), variando de 17,0 a 17,47%, foram superiores aos valores encontrados por Tavares-Dias *et al.* (2000) 13%; Azevedo *et al.* (2006) 15%; e inferiores aos valores relatados por Tavares-Dias (2003) 44%; Martins *et al.* (2004) 40%; Ighwela *et al.* (2012), 35%; Azevedo *et al.* (2016) 19% em tilápias do Nilo.

Conforme Ranzani-Paiva *et al.* (2013), os neutrófilos são as principais células responsáveis pela defesa do organismo contra infecções bacterianas, realizando a fagocitose destes agentes.

O aumento de leucócitos pode ser observado no início de um estresse na maioria das espécies de peixes, sendo considerado como uma tentativa de recuperar a homeostase em desequilíbrio, enquanto que o decréscimo pode ser conferido pelo enfraquecimento do sistema imunológico (SILVA; LIMA; BLANCO, 2012). As tilápias apresentam um maior número de linfócitos e neutrófilos circulantes o que é característico da espécie (AZEVEDO *et al.*, 2016).

O percentual de monócitos do presente estudo não apresentou diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$), variando de 3,01 a 3,15%, os mesmos foram inferiores aos encontrados por Tavares-Dias *et al.* (2000) 7,0%; Tavares-Dias (2003) 7,0%; e superiores aos encontrados por Azevedo *et al.* (2006) e Ighwela *et al.* (2012), que registraram 2%; Azevedo *et al.* (2016) 1%.

Os monócitos atuam na reação inflamatória e resposta imunológica nas quais ocorre a fagocitose, sendo de extrema importância aos mecanismos de defesa do hospedeiro (SILVA; LIMA; BLANCO, 2012).

De acordo com Thrall *et al.* (2007), também possuem habilidade citotóxica não-específicas, apresentando um aumento da atividade fagocítica de antígenos bacterianos ou induzida pela liberação de fatores ativadores de macrófagos através da inoculação dos patógenos mortos ou de seus produtos.

Eosinófilos e basófilos foram ausentes no presente estudo, diferindo dos valores relatados por Tavares-Dias *et al.* (2000) 1%; e Ighwela *et al.* (2012) 2% e 1% respectivamente. Os eosinófilos e basófilos são escassos ou ausentes em peixes normais (ROBERTS, 1981; CARVALHO *et al.*, 2006), corroborando com o presente estudo, indicando que todos os peixes do experimento apresentaram contagens compatíveis com um bom estado de saúde, denotando a ausência de qualquer infecção.

O perfil hematológico pode ser utilizado para estudar o padrão normal das células sanguíneas, lesões em órgãos ou tecidos, infecções ou alterações ambientais devido a uma maior demanda fisiológica dos indivíduos as diversas situações. Entretanto, muitas variáveis podem influenciar expressivamente nas características hematológicas: estado nutricional, sexo, fase de vida, fisiologia das espécies, manejo, condições ambientais, metodologia de coleta, anticoagulantes utilizados, técnicas aplicadas e execução das análises (AZEVEDO *et al.*, 2016).

No presente estudo os parâmetros hematológicos, índices hematimétricos e leucocitários se mantiveram dentro dos valores estabelecidos como normais para a espécie estudada, os animais mostraram condições satisfatórias para o cultivo. Esses dados demonstram que os níveis testados das proteases do látex de *C. procera* (LP) na ração (100 a 300 mg kg⁻¹) não promoveram alterações na composição sanguínea e não comprometeram a sanidade dos animais durante o período experimental.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo os parâmetros zootécnicos, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos experimentais. Contudo foi observada uma tendência de melhora nos tratamentos com o (LP). O nível de inclusão de 300 mg kg⁻¹ (LP-Cp 03), mostrou os valores mais expressivos para o ganho de peso (9,85%); taxa de crescimento específico (9,25%); biomassa final, ganho em biomassa (7,60% e 12,98%); índice de eficiência proteica (14,03%); conversão alimentar (13,45%). Pode-se afirmar que a inclusão do (LP) na ração mostrou padrões de melhoramento no desempenho zootécnico da espécie estudada.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína bruta, lipídios e matéria seca, bem como a composição corporal dos alevinos não apresentaram diferença entre os tratamentos para os níveis testados do (LP). A inclusão de enzimas nem sempre promove resultados positivos, sendo que os mesmos são dependentes de vários fatores.

Os níveis testados do (LP) não promoveram alterações no perfil hematológico dos alevinos de tilápia do Nilo, se mantendo dentro dos valores considerados normais. Pode-se afirmar que os peixes mantiveram-se saudáveis, apresentando condições satisfatórias para o cultivo durante o período experimental.

Dentre os parâmetros de qualidade de água, todos se mantiveram dentro dos limites aceitáveis para a espécie cultivada, com exceção do fósforo reativo. Desta forma a inclusão das proteases do (LP) na ração não afetou de forma significativa a qualidade de água.

As proteases do látex de *C. procera* possuem um considerável potencial biotecnológico, revelando-se como uma alternativa promissora na melhoria do desempenho zootécnico e na digestibilidade das rações. Mais pesquisas devem ser realizadas com o intuito de testar diferentes níveis, seja de forma individual, e ou combinadas com outras enzimas, bem com o acréscimo de uma segunda fase experimental levando em consideração todo o ciclo produtivo da tilápia desde a alevinagem até a fase de terminação, viabilizando ainda mais a produção.

REFERÊNCIAS

ABDEL-TAWWAB, M., AHMAD, M.H. Effect of dietary protein regime during the growing period on growth performance, feed utilization and whole-body chemical composition of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, v.40, n.13, p.1532-1537, 2009.

ABDEL-TAWWAB, Mohsen et al. Effects of dissolved oxygen and fish size on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): growth performance, whole-body composition, and innate immunity. **Aquaculture International**, v. 23, n. 5, p. 1261-1274, 2015.

ABHISHEK, D.; MOHIT, C.; ASHISH, G.; AMEETA, A. Medicinal utility of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. as used by natives of village Sanwer of Indore District, Madhya Pradesh. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 1, p. 188-190, 2010.

ABIMORAD, E. G.; CASTELLANI, D. Exigências nutricionais de aminoácidos para o lambari-do-rabo amarelo baseadas na composição da carcaça e do músculo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.37, n.1, p.31-38, 2011.

ADEOLA, O; COWIESON, A.J. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *J. Anim. Sci.* v.89, p.3189-3218, 2011.

ADEOYE, A. A., JARAMILLO-TORRES, A., FOX, S. W., MERRIFIELD, D. L., DAVIES, S. J. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: Overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. **Animal Feed Science and Technology**, v. 215, p. 133-143, 2016.

AGRAWAL A. A.; KONNO K. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. Volume 40, p. 11–31. 2009.

ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETHELLES, J. P.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research**, v. 55, p. 559–564, 2006.

ALENCAR, N. M. N.; BITENCOURT, F. DA S.; FIGUEIREDO, I. S. T.; LUZ, P. B.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; ARAGÃO K. S.; MAGALHÃES, P. J. C.; BRITO, G. A. DE C.; RIBEIRO, R. A.; FREITAS, A. P. F.; RAMOS, M. V. Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae)†. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 312–320, 2016.

ALI, S. S. R.; AMBASANKAR, K.; MUSTHAFA, M. S.; HARIKRISHNAN, R. Jerusalem artichoke enriched diet on growth performance, immunohematological changes and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in Asian seabass (*Lates calcarifer*). **Fish & Shellfish Immunology**, Londres, v. 70, p. 335-342, 2017.

ALI, H.; ANSARI, K.K. Comparison of haematological and biochemical de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, indices in healthy and monogenean infected common carp, *Cyprinus* São Paulo, Brasil. I. Protozoários. **Revista brasileira de Zoologia, carpio. Annals of Biological Research**, v. 3, p. 1843-1846, 2012.

ALMEIDA, A.; RODRIGUES, R. L.; FREITAS, R. R. POTENCIALIDADES DE INVESTIMENTO AQUÍCOLAS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO: UMA BREVE CARACTERIZAÇÃO DO SETOR. **ACTAPESCA - Acta fisheries and aquaculture/Acta Pesca e Aquicultura**, v. 2, n. 1, 2014.

ALVES, C. C; WAITZBERG, D. Nutrição oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 4ª edição, p. 85-108, 2009.

AMRI, E.; MAMBOYA F. Papain, a plant enzyme of biological importance: A Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, volume 8 (2), p. 99-104, 2012.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 17th ed. Virginia, 2000.

AOKI, Y.; TAKAHASHI, S.; TAKAYAMA, D.; OGATA, Y.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; ASAWATREERATANAKUL, K.; WITITSUWANNAKUL, D.; WITITSUWANNAKUL, R.; SHIBATA, D.; KOYAMA, T.; NAKAYAMA, T. Identification of laticifer-specific genes and their promoter regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*. **Plant Science**, v. 225, p.1-8, 2014.

ASLANI, M.R.; MOVASSACHI, A.R.; MOHRI, M.; ABBASIAN, A.; ZAREHPOU, M. Clinical and pathological aspects of experimental oleander (*Nerium oleander*) toxicosis in sheep. **Veterinary Research Communications**. v. 28, p. 609–616, 2004.

ARAUJO, D. M; PEZZATO, A. C; BARROS, M. M; PEZZATO, L. E; NAKAGOME, F. K. Hematologia de tilápias do Nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. **Pesquisa Agropecuária**, v. 46, n. 3, p. 294-302, 2011.

ARAYA-GARAY J. M.; FEIJOO-SIOTA L.; VEIGA-CRESPO P.; VILLA T. G. cDNA cloning of a novel gene codifying for the enzyme lycopene β -cyclase from *Ficus carica* and its expression in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology Biotechnology**. Volume 92(4), p.769–777. 2011.

AZAZA, M.S., MENSI, F., WASSIM, K., ABDELMOULEH, A., BRINI, B; KRAIEM, M.M. Nutritional evaluation of waste date fruit as partial substitute for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquacult. Nutr.**, v.15, p.262-272, 2009.

AZAZA, M.S., KHIARI, N., DHRAEIF, N., ALOUI, M.M.K., ELFEKI, A. Growth performance, oxidative stress indices and hepatic carbohydrate metabolic enzymes activities of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in response to dietary starch to protein ratios. **Aquac. Res.**, v.46, p. 14-27, 2015.

- AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M. L.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R. Haematological and gills response in parasitized tilapia from valley of Tijucas River, SC, Brazil. **Scientia Agricola**. v.63, p.115-120, 2006.
- AZEVEDO, T.M.P; ALBINATI, R.C.B; GUERRA-SANTOS, B; PINTO, L.F.B ; LIRA, A.D; MEDEIROS,S.D.C; AYRES,M.C.C. Valores de referência para hematologia de *Oreochromis niloticus* cultivados em tanques-rede na Bahia. **Braz. J. Aquat. Sci. Technol.** 20(2), 2016.
- AYHAN, V.; DILER, I.; ARABACI, M.; SEVGILI, H. Enzyme Supplementation to Soybean Based Diet in Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*): Effects on Growth Parameters and Nitrogen and Phosphorus Excretion. **Kafkas Üniv Vet Fak Derg**, v.14, n.2, p.161-168, 2008.
- BADGUJAR, S. B., PATEL, V. V, BANDIVDEKAR, A. H., & MAHAJAN, R. T. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: a review. **Pharmaceutical Biology**, 52(11), 1487–503. 2014.
- BARLETTA, A. Introduction: current market and expected developments. In: Bedford, M.R.; Partridge, G.G. (Eds) **Enzymes in farm animal nutrition**. 2ed. London: Wallingford: CAB International, cap.1, p.1-11. 2010.
- BARROS, M.M., FALCON, D.R., ORSI, R.O., PEZZATO, L.E., FERNANDES Jr., GUIMARÃES, I.G., FERNANDES Jr., A.; PADOVANI, C.R., SARTORI, M.M.P. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. **Fish Shellfish Immun.**, 39, 188-195,2014.
- BARROS, M.M., PEZZATO, L.E., KLEEMANN, G.K., HISANO, H.; ROSA, G.J.M. Níveis de vitamina C e ferro para tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 3, n. 6, p. 2149-2156, 2002.
- BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. 2. ed. London: CAB Internationa, 2011.
- BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**.2.ed.New York: Cabi, 273p. 2001.
- BELO, M. A. A; MORAES, F. R; YOSHIDA, L; PRADO, E. J. R; MORAES, J. R. E; SOARES, V. E; SILVA, M. G. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. **Aquaculture**, v.422-423, n.1, p. 124-128, São Paulo, 2014.
- BICUDO, A.J.A. **Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus Mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos**. 2008. 122p. Tese(Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E.P. Estimating amino acid requirement of brazilianfresh water fish from muscle amino acid profile. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, n. 6, p.818-823, 2009.

- BHUJEL, R. C. A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) brood fish in seed production systems, especially hapa-based systems. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 181, p. 37-59, 2000.
- BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; FREITAS, J. M. A. Proteína e energia em rações para alevinos de piavuçu. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.12, p.2553-2559, 2010.
- BITTENCOURT, N.L. R.; MOLINARI, L.M.; SCOARIS, D.O.; PEDROSO, R.B.; NAKAMURA, C.V.; NAKAMURA, T.U.; FILHO-ABREU, B.A.; FILHO-DIAS, B. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá*, v. 25, no. 2, p. 385-389, 2003.
- BHATNAGAR, A.; DEVI, P. Water quality guidelines for the management of pond fish culture. **International journal of environmental sciences**, v.3, n.6, p.1980-2009, 2013.
- BOCH, C. L.; PEZZATO, L. E.; CANTELMO, O. A.; BARROS, M. M. Fitase em rações para tilápia-do-nilo na fase de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1455-1461, 2007.
- BOMFIM, M. A. D., E. A. T. LANNA, J. L. DONZELLE, M. QUADROS, F. B. RIBEIRO, e M. P. SOUSA. Níveis de lisina, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia-do-nilo. **Rev. Bras. Zootec.** 39(1): 1-8, 2010.
- BOMFIM, M. A. D.; LANNA, E. A. T.; DONZELE, J. L.; et al. Redução de proteína bruta com suplementação de aminoácidos, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 10, p. 1713–1720, 2008.
- BOMFIM, M.A.D. ; LANA, E.A.T. Fatores que afetam os coeficientes de digestibilidade nos alimentos para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**. v. 1, n. 1, p.20-30, 2004.
- BOSTOCK J, MCANDREW B, RICHARDS R, JAUNCEY K, TELFER T, LORENZEN K, LITTLE D, ROSS L, HANDISYDE N, GATWARD I AND CORNER R. **Aquaculture: global status and trends – Review**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365, 2897-2912, 2010.
- BOYD, C.E. Overview of aquaculture feeds: global impacts of ingredient use. In: DAVIS, D.A. (Ed.). *Feed and feeding practices in aquaculture*. Cambridge: Elsevier/ Woodhead Publishing, p.3-26. 2015.
- BRASIL. **Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009**. Diário Oficial da União República Federativa do Brasil, Poder Legislativo, Brasília, DF, 30 jun. Seção 1, p. 1. 2009.
- BRASIL. **BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA 2011**. 2013. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/publicações>> acesso em 19/05/2018.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 357 de 17 de março de 2005**. Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2005.

BREMER NETO, H.; GRANER, C.A.F.; PEZZATO, L.E. et al. Determinação de rotina do crômio em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. *Cienc. Rural*, v.25, p.691-697, 2005.

BRITO, T. M. D.; SILVA, A. M. C. Taxa de sobrevivência de tilápia *Oreochromis niloticus* em tanque de decantação com águas salobras em sistema intensivo de cultivo. *Actapesca*, v. 2, n. 2, p. 40-50, 2014.

BUNN, H. F. Approach to the anemias. In: GOLDMAN, L., SCHAFFER, A. I. eds. **Cecil Medicine**. 24th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier, 161. 2011.

BURKERT, D.; ANDRADE, D. R.; SIROL, R. N.; SALARO, A. L.; RASGUIDO, J. E. A.; QUIRINO, C. R. Rendimentos do processamento e composição química de filés de surubim cultivado em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 7, p. 1137-1143, 2008.

CABRAL, E.M. *et al.* Replacement of fish meal by plant protein sources up to 75% induces good growth performance without affecting flesh quality in on growing *Senegalese sole*. **Aquaculture**, v. 380-383, p. 130-138, 2013.

CARLSON, D.; POULSEN, H. D. Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed effect of diet, time of soaking, heat treatment, phytase activity, pH and temperature. **Animal Feed Science and Technology**, v. 103, n. 1, p. 141-154, 2003.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPET, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.6, p.254-267, 2005.

CAMPBELL, T.W., 2012. Hematology of fish, in: Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R., Campbell, T.W. (Ed), Veterinary hematology and clinical chemistry. Ames, Iowa: **Wiley-Blackwell**, p.298-312,2012.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M. Silagem de resíduo de peixes em dietas para alevinos de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 126-130, 2006.

CASTILLO, S., GATLIN, D.M. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: a review. *Aquaculture* 435, 286-292, 2015.

CHAPMAN, F.; MILES, R. Interpreting a Fish Food Package Label. **FA159**. Program in Fisheries and Aquatic Sciences in the School of Forest Resources and Conservation, UF/IFAS Extension. Dec, 2009. Disponível em <<https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/FA/FA15900.pdf>>acesso em 28/04/2018.

CHAUDHARY. P.; RAMOS, M. V.; VASCONCELOS, M. DA S.; KUMAR, V. L. Protective Effect of High Molecular Weight Protein Sub-fraction of *Calotropis procera* Latex in Monoarthritic Rats. **Pharmacognosy Magazine**, v.12, p. 147-151, 2016.

CHAUDHARY, P.; VIANA, C. A., RAMOS, M. V. ; KUMAR, V. L. Antiedematogenic and antioxidant properties of high molecular weight protein sub-fraction of *Calotropis procera* latex in rat. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 6, p 69-73, 2015.

CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**. Volume 33, p. 1443-1454, 2015.

CLAUSS, T. M. *et al.* Hematologic Disorders of Fish. **Veterinary Clinics Of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 3, p.445-462, set. 2008.

COELHO, A. A. C; BEZERRA, J. H. C; SILVA, J. W. A; MOREIRA, R. T; ALBUQUERQUE, L. F. G; FARIAS, W. R. L. Desempenho zootécnico de alevinos de tilápia do Nilo em um sistema de recirculação de água com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 1, p. 149-159, 2014.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). 2013. Disponível em www.cobea.org.br acesso em 15/05/2018.

CÓRDOVA-MURUETA, J. H.; GARCÍA-CARREÑO, F. L.; NAVARRETE-DEL-TORO, M. DE LOS A. Digestive enzymes present in crustacean feces as a tool for biochemical, physiological, and ecological studies. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 297, p. 43-56, 2003.

CORNISH-BOWDEN ,A. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. **Perspectives in Science**. Volume 1, p. 74–87. 2014.

COSTA T. F. R.; LIMA A. P. C. A. Natural cysteine protease inhibitors in protozoa: Fifteen years of the chagasin family. **Biochimie**. Volume 122, p. 197-207. 2016.

COSTA, M.L. S.; MELO, F. P.; CORREIA, E. S. Efeitos de diferentes níveis protéicos da ração no crescimento na tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757), variedade chitralada, criadas em tanques-rede. *Boletim Instituto de Pesca, São Paulo*, 35(2): 285–294. 2009.

DALSGAARD, J.; VERLHAC, V.; HJERMITSLEVC, N.H.; EKMANN, K.S.; FISCHERD, M.; KLAUSEND, M. ; PEDERSENA, P.B. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. **Animal Feed Science and Technology** 171, 181– 191. 2012.

DAMATTA, R. A; RIBEIRO, M. L. S; CARVALHO, T. M. U;NASCIMENTO, J. C. M. **Caracterização morfológica e funcional de leucócitos de peixes**. Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Embrapa, 1º Edição, 2009.

DE OCA, G. A. R.-M.; ROMÁN-REYES, J. C.; ALANIZ-GONZALEZ, A.; et al. Effect of salinity on three tilapia (*Oreochromis sp.*) strains: hatching rate, length and yolk sac size. **Int. J. Aqu. Sci**, v. 6, n. 1, p. 96–106, 2015.

DIETERICH, F.; BOSCOLO, W. R.; LOSH, J. A.; FEIDEN, A.; FURUYA, W. M.; SIGNOR, A. A. Fontes de fósforo em rações orgânicas para alevinos e juvenis de tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 3, p.417-424, março, 2012.

EL-ZAEEM, S. Y.; AHMED, M. M. M.; SALAMA, M. E.; EL-MAREMIE, H. A. Production of salinity tolerant Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* through traditional and modern breeding methods: II. Application of genetically modified breeding by introducing foreign DNA into fish gonads. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 684–695, 2013.

EKANEM, A.P.; UDOH, A.J. Effect of different anticoagulants on hematological parameters of *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Science and Advanced Technology**, v.2, n.6, p.17-20, 2012.

EMBRAPA. Informativo Mercado da Tilápia. EMBRAPA Pesca e Aquicultura. 2016.

ETIM, N.N.; ENYENIHI, G.E.; WILLIAMS, M.E.; UDO, M.D.; OFFIONG, E.E.A. Haematological Parameters: Indicators of the Physiological Status of Farm Animals. **British Journal of Science**, v.10, p.33-45. Dec, 2013.

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

FABRICIO, L. F. F. **Desempenho e qualidade da carcaça e do filé de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo ractopamina**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

FALCON, D.R., BARROS, M.M., PEZZATO, L.E., SOLARTE, W.V.N., GUIMARÃES, I.G. Differential leucocyte counts of Nile tilapia fed diets supplemented vitamin C and lipid and submitted to low temperature stress. **Ciência. Anim. Bras**, v. 9, 543-551, 2008.

FALCON, D. R. **β-glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos em juvenil de tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração**. 2007. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

FAO. (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos**. Roma, 2016. 224p.

FAO Fisheries and Aquaculture Department, **O Estado de Pesca e Aquicultura do Mundo**. 2014 (SOFIA). FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Rome, 2014.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T.G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. **Food Bioprocess Technology**, 4: 1066-1088, 2011.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, C.N. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006. 1344p.

FERNANDES JUNIOR, A. C.; PEZZATO, L. E.; GUIMARÃES, I. G.; TEIXEIRA, P. C.; KOCH, J. F. A.; BARROS, M. M. Resposta hemática de tilápias do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1619-1625, 2010.

FERREIRA, M.S, et al. Efeito da quantidade de proteína na dieta e treinamento físico sobre a hematologia, desempenho natatório, resistência ao estresse e composição do filé de matrinhã (*Brycon amazonicus*, Gunther 1869). **Acta Amazonica**, v. 43, n. 4, 2013.

FIGUEIREDO, I. S. T.; RAMOS, M. V.; RICARDO, N. M. P. S.; GONZAGA, M. L. C.; PINHEIRO, R. S. P.; ALENCAR, N. M. N. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis Procera*. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 512–519, 2014.

FOOD INGREDIENTS BRASILEL. Propriedades funcionais das proteínas do peixe. **Revista FiB**, n. 8, p. 22-32, junho/julho, 2009.

FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. **Nutriaqua**: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 375 p,2012.

FREITAS, A. P. F.; BITENCOURT, F. S.; BRITO, G. A. C.; ALENCAR, N. M. N.; RIBEIRO, R. A.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; RAMOS, M. V.; VALE, M. L. Protein fraction of *Calotropis procera* latex protects against 5-fluorouracil-induced oral mucositis associated with downregulation of pivotal pro-inflammatory mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, p. 981-990, 2012.

FREITAS, C. D. T.; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; DOMONT, G. B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.49, p. 738-743, 2011.

FREITAS, C.D.T.; SOUZA, D.P.; ARAUJO, E.S.; CAVALHEIRO, M.G.; OLIVEIRA, L.S.; RAMOS, M.V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. Volume 22, n. 1, p.11-22, 2010.

FREITAS, C. D. T.; OLIVEIRA J. S.; MIRANDA, M. R. A.; MACEDO, N. M. R.; SALES, M. P.; VILLAS-BOAS, L. A.; RAMOS, M. V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 781-789, 2007.

FUCHS, V. I.; SCHMIDT, J.; SLATER, M. J.; ZENTEK, J.; BUCK, B. H.; STEINHAGEN, D.; The effect of supplementation with polysaccharides, nucleotides, acidifiers and *Bacillus* strains in fish meal and soy bean based diets on growth performance in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 437, p. 243-251, 2015.

FURUYA, W. M. Tabelas Brasileiras para a Nutrição de Tilápias. Toledo: GFM. 2010.100p.

FUJIMOTO, R.Y.; CASTRO, M.P.; MARTINS, M.L.; MOARES, F.R.; MONFORT, K.C.F. Parâmetros sanguíneos de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg,1887) alimentados com dietas suplementadas com cromo trivalente em duas densidades de estocagem. **Acta Sci. Anim. Sci.** Maringá, v.29, n.4, p.465-471, 2007.

GALECIO, F. R.; VICTOR VERGARA R.; RENZO CHAUPIS C. Efecto de la adición de cuatro niveles de Allzyme vegpro en dietas de crecimiento para trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). **Anales Científicos UNALM**, disponível em: http://www.lamolina.edu.pe/Investigacion/web/anales/pdf_anales/LIX-1.pdf. v.59, p.16-23, 2004.

GARCIA, A.S.; GONÇALVES, L.V.G.; CAVALLI, R.O.; VIEGAS, E.M.M. Lípidios: In: FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, XXIII, 375 p.2012.

GATLIN, D.G. Principles of Fish Nutrition. **Southern Regional Aquaculture Center'SRAC**. Publication n.5003. July, 2010.

GATLIN III, D.M. et al. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, v. 38, n. 6, p. 551-579, 2007.

GHOMI, M.R., SHAHRIARI, R., LANGROUDI, H.F., NIKOO, M., ELERT, E.V. Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings. **Aquaculture**. Int. 20, 249-254, 2012.

GLENCROSS B. D; BOOTH M; ALLAN G. L. A feed is only as good as its ingredients. A review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. **Aquaculture Nutrition**, v.13, n.1, p.17-34, 2007.

GODDARD, J.S. ; McLEAN, E. Acid-insoluble ash as an inert reference material for digestibility studies in tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**, v. 194, p. 93-98, 2001.

GOMES, V. D. S., SILVA, J. H. V., CAVALCANTI, C. R., DA FONSECA, S. B., JORDÃO FILHO, J., SILVA NETO, M. R., DA SILVA, F. B. Utilização de enzimas exógenas na nutrição de peixes - revisão de literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 4. 2016.

GOMES, V. D. S., SILVA, J. H. V., CAVALCANTI, C. R., LIMA, M.C; JORDÃO FILHO, J., AMÂNCIO, A.L.L. Exogenous enzymes in food fish guppy *Poecilia reticulata*. **Archives of Veterinary Science**. v.22, n.3, p.24-29, 2017.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do Pescado**. Editora Atheneu, São Paulo, 1ª Edição, 2011.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N., BADILLO-CORONA, J.A., ARANDA-BARRADAS, J.S.; OLIVER-SALVADOR, M.C. Production of plant proteases in vivo and in vitro - A review. **Biotechnology Advances**, volume 29, p. 983–996. 2011.

GUERREIRO, I; PERES, H; CASTRO-CUNHA, M; OLIVA-TELES, A. Effect of temperature and dietary protein/lipid ratio on growth performance and nutrient utilization of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Aquaculture Nutrition**, v.18, n.1, p. 98-106, 2012.

GUIMARÃES, I.G.; FALCON, D.R.; SCHICH, D.; BARROS, M.M.; L.E. PEZZATO, L.E.. Digestibilidade aparente de rações contendo complexo enzimático para tilápia-do-nilo. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.6, p.1397-1402, 2009.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1151p.2011.

HASSAN, L.M.; GALAL, T. M.; EMAD, A.F; MAHA, M. EL-M. The biology of *Calotropis procera* (Aiton) **W.T. TREES** 29:311–320, 2015.

HAYASHI, C. et al. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n. 2, p.823-828, 2002.

HELI, H.; AMANI, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; JABBARI, A.; FLORIS, G.; MURA, A. Electroactive centers in *Euphorbia latex* and lentil seedling amine oxidases. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.78, p.29-36, 2008.

HENN, J. D. Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pósgraduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, 2002.

HERNÁNDEZ, C.; OLVERA-NOVOA, M. A.; AGUILAR-VEJAR, K.; GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, B.; PARRA, I. A. Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 277, p. 244–250, 2008.

IBRAHEM, M. D.; FATHI, M.; MESALHY, S.; ABD EL-ATY, A. M. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Shellfish Immunology**, Londres, v. 29, p. 241-246, 2010.

IBRAHEM, M. D.; MOHAMED, F. M.; IBRAHIM, M. A. The role of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) in growth and immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to bacterial infection. **Journal of Agricultural Science**, Londres, v. 5, n. 6, p. 109-117, 2013.

IGHWELA, K.A.; AHMAD, A.B.; ABOL-MUNAF, A.B. Haematological Changes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed with Varying Dietary Maltose Levels. **World Journal of Fish and Marine Sciences** 4 (4): 376-381, 2012.

ISHIKAWA, M.M.; PÁDUA, S.B.P.; SATAKE, F.; PIETRO, P.S.; HISANO, H. Procedimentos básicos para colheita de sangue em peixes. **Circular Técnica**. EMBRAPA, Dourados, MS. Julho, 2010.

- IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The fish immune system. Acad. Press, London, 1996.380p.
- HINE, P.M. The granulocytes of fish. **Fish Shellfish Immunology**, v.2, n.2, p.79-88, 1992.
- HOUSTON, A.H., Blood and circulation. Methods for fish biology. **American Fisheries Society**, p. 273-334, 1990.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of Fishes. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed. Douglas J. ed. Singapore: **Blackwell Publishing Ltd.**, 994 –1003. 2010.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, C.N. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. p.1120-1125, 2006.
- JEEWANTHI, R.; LEE N.; PAIK H. Improved Functional Characteristics of Whey Protein Hydrolysates in Food Industry. **Korean J. Food Sci.** An. Volume 35, número 3, p. 350-359. 2015.
- JIN, Y., TIAN, Li-xia, XIE, Shi-wei, GUO, Ding-qian, YANG, Hui-jun, LIANG, Gui-ying, Liu, YONG-jian. Interactions between dietary protein levels, growth performance, feed utilization, gene expression and metabolic products in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture*, 437, 75-83, 2015.
- LIMA, A. F.; SILVA, A. P.; RODRIGUES, A. P. O.; BERGAMIN, G. T.; TORATI, L. S.; FILHOL, M. X. P.; MACIEL, P. O. Qualidade da água: piscicultura familiar. **Embrapa Pesca e Aquicultura**, Junho, 2013.
- KAMALAM, B.S; MEDALE, F.;PANSERA,T. S. Utilization of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. **Aquaculture** 467, 3-27, 2017.
- KAKKAR, A.; VERMA, D. R.; SURYAVANSHI, S.; DUBEY, P. Characterization of chemical constituents of *Calotropis procera* . **Chemistry of Natural Compounds**, v.48, p. 155–157, 2012.
- KAUSHIK, S.J. *et al.* Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, v. 230, n. 1-4, p. 391-404, 2004.
- KEKWICK, R.G.O. Latex and Laticifers. **Encyclopedia of Life Science**; Nature Publishing Group, 106, 2001.
- KITAJIMA S.; YAMAMOTO Y.; HIROOKA K.; TAKI C.; HIBINO S. Laticifers in mulberry exclusively accumulate defense proteins related to biotic stresses. **Plant Biotechnology**. Volume 30, p. 399–402. 2013.
- KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; Kohno, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**. Volume 37, P. 370–378. 2004.

- KONNO K.. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**. Volume 72(13), p. 1510–1530. 2011.
- KOPRUCU, K.: OZDEMIR, Y. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.250, p.308-316, 2005.
- KOSARAJU, S. K. M.; VADLAMANI, L. N.; BASHIR, M. S. M.; KALASAPATI, L. K.; RAO, G. L. V. C.; RAO, G. P. Risk Factors for Suicidal Attempts Among Lower Socioeconomic Rural Population of Telangana Region. **Indian Journal of Psychological Medicine**, v. 1, p. 3730–35, 2015.
- KROGDAHL, A.; PENN, M.; THORSEN, J.; REFSTIE, S.; BAKKE, A.M. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recente findings regarding responses in salmonids. **Aquac. Res.** 41, 333-344, 2010.
- KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: conquistas e desafios. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, n. 150, julho-agosto, 2015.
- KUBTIZA, F. Tambaqui alimentando com eficiência para reduzir custos. **Panorama da Aquicultura**, v. 22, n. 129, janeiro-fevereiro, 2012.
- KUBTIZA, F. O status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 21, n. 124, p.10-19, 2011.
- KUBTIZA, F; CYRINO, J. E. P.; ONO, E. A. Rações Comerciais para Peixes no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. **Panorama da Aquicultura**, v. 8, n. 50, novembro-dezembro, 1998.
- KWON, C.W.; PARK K-M.; KANG, B.C.; KWEON D.H.; KIM, M.D.; SHIN S.W. Cysteine Protease Profiles of the Medicinal Plant *Calotropis procera* R. Br. Revealed by De Novo Transcriptome Analysis. **PLoS ONE**. Volume 10, p 1-15. 2015.
- JERÔNIMO, G.T.; LATTIFFE, L.V.; SPECK, G.M.; MARTINS, M.L. Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. **Brazilian Journal Biology**, vol. 71, no. 3, p. 719-725. 2011.
- JUNIOR, J. L. S. G; ALMEIDA, V. G; SOUZA-FILHO, J. J. Adaptação de juvenis selvagens de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) (Pisces, Centropomidae) ao ambiente controlado. **Candombá – Revista Virtual**, v. 3, n. 1, p. 15-26, janeiro-junho, 2007.
- LABH, S. N.; SHAKYA, S.R. Application of immunostimulants as an alternative to vaccines for health management in aquaculture. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v.2, p.153-156, 2014.
- LEE, P. G; LAWRENCE, A. L. Digestibility. In: D'ÁBRAMO, L.; CONKLIN, D. E.; AKIYAMA, D. M. **Crustacean Nutrition**. Advances in World Aquaculture, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Lousiana, EUA. v. 6, p. 194-260, 1997.

LEMME, A. Recomendaciones de aminoácidos para carpas comunes - Avances en métodos para modelar. *AMINO News*® 17(1): 15-27.2013.

LIMA, M.M.; MUJICA, P.I.C.; LIMA, A.M. Caracterização química e avaliação do rendimento em filés de caranha (*Piaractus mesopotamicus*). **Braz. J. Food Technol.**, IV SSA, p.41-46. Maio, 2012.

LIMA, R. C. de S., SILVA, M. C. C., AGUIAR, C. C. T., CHAVES, E. M. C., DIAS, K. C. F., MACÊDO, D. S., VASCONCELOS, S. M. M. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 23(2), 123– 126. 2012.

LIMA, J. M.; FREITAS, F. J. C.; AMORIM, R. N. L.; CÂMARA, A. C. L.; BATISTA, J. S.; SOTO-BLANCO, B. Clinical and pathological effects of *Calotropis procera* exposure in sheep and rats. **Toxicon**, v. 57, p. 183–185, 2011.

LIN, S., MAI, K., TAN, B. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquac. Res.**, 38:1645-1653. 2007.

LOPES, S. T. A; BIONDO, A. W; SANTOS, P. Hematologia clínica. In: GONZÁLEZ, F.H.D.: SILVA, S.C.(Ed.). **Patologia Clínica veterinária: texto introdutório**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 342p. 2008.

LIU, L.W.; SU, J.M.; ZHANG, T.; LIANG X.F.; LUO, Y.L. Apparent digestibility of nutrients in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) diet supplemented with graded levels of neutral phytase using pretreatment and spraying methods. **Aquaculture Nutrition**, v.19, p.91-99, 2013.

MCANDREW, B. J. Evolution, phylogenetic relationships and biogeography. In: BEVERIDGE, M. C. M.; MCANDREW, B. J. (Eds.). *Tilapias: Biology and exploitation*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. Chapter one, p. 1-32, 2000.

MARTINS, M.L.; MIYAZAKI, D.M.Y.; MORAES, F.R.; GHIRALDELLI, L.; ADAMANTE, W.B.; MOURIÑO, J.L. P. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. Vitamin C and E supplemented diet influences the acute inflammatory response in Nile tilapia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.213-218, jan-fev, 2008.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK JR., J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, p.71-80, 2004.

MEURER F, HAYASHI C, BOSCOLO W.R; SOARES, C.M. Lipídios na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **R. Bras. Zootec.** 33(2):566-573, 2002.

MOREIRA, R. L.; COSTA, J. M.; QUIEROZ, R. V.; MOURA, P. S.; FARIAS, W. R. L. Utilização de *Spirulina platensis* como suplemento alimentar durante a reversão sexual de tilápia do Nilo. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 2, p. 134-141, 2011.

MORCELLE, S. R., CAFFINI, N. O., & PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funarium clausum* latex. *Fitoterapia*, 75(5), 480–93, 2004.

MORO, G.V.; TORATI, L.S.; LUIZ, D.B.; MATOS, F.T. Monitoramento e qualidade da água em pisciculturas. **In: Piscicultura de água doce: Multiplicando conhecimentos**. Brasília, DF. Embrapa, pesca e aquicultura, 2013.

MOURA, G. S. et al. Effects of enzyme complex SSF (solid state fermentation) in pellet diets for Nile tilapia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 10, p. 2139-2143, 2012.

MOURA, G.S.; LANNA, E.A.T.; FILER, K.; FALKOSKI, D.L.; DONZELE, J.L.; OLIVEIRA, M.G.A.; REZENDE, S.T. Effects of enzyme complex SSF (solid state fermentation) in pellet diets for Nile tilapia. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.41, n.10, p.2139-2143, 2012b.

NAELA M. R, NERMEEN M., ABU, E., AZZA, M. K., Kamel, N.F. Effect of a Serine-protease on Performance Parameters and Protein Digestibility of Cultured *Oreochromis niloticus* Fed Diets with Different Protein Levels. **Pakistan Journal of Nutrition**, 16: 148-154, 2017.

NAGATA, M.M.; ZANUZZO, F.S.; SAITA, M.V.; BILLER, J. da B.; URBINATI, E.C.; TAKAHASHI, L. S. Efeito da perseguição e exposição aérea nos parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia-do-Nilo. V Simpósio de Ciências da UNESP e VI Encontro de Zootecnia – UNESP Dracena, 22 a 24 de setembro de 2009.

NASCIMENTO, D. C. DE O.; RALPH, M. T.; BATISTA, J. E. C.; SILVA, D. M. F.; GOMES-FILHO, M. A.; ALENCAR, N. M.; LEAL, N. C.; RAMOS, M. V.; LIMA-FILHO, J. V. Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against experimental infections with *Listeria monocytogenes*. **Phytomedicine**, v. 23, p. 745–753, 2016.

NATORI, M. M.; SUSSEL, F. R.; SANTOS, E. C. B.; PREVIERO, T. C.; VIEGAS, E. M. M.; GAMEIRO, A. H. Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas**, SP, v.41, n.2. Fev. 2011.

NEGRETE, J.C.C.; CORREA, A.A.G.; GUEVARA, M.J.P.; ATENCIO GARCÍA, V.J.; CARRASCO, S.C.P. Caracterización de células sanguíneas y parámetros hematológicos en blanquillo *Sorubim cuspicaudus*. **Zootecnia Tropical**. 27(4): 393-405. 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed. 1274p. 2011.

NETO, E.C.; ALVES, R. M.; SPIGOLON, Z.; FERREIRA, M.L.O. LINFÓCITOS. REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA. Ano VII – n.12 - Periódicos Semestral. Janeiro, 2009.

NOSE, T. On the digestion of food protein by gold-fish (*Carassius auratus*) L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). Bull. Freshw. Fish Res. Lab., 10, 11-22.1960.

NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp. 3.ed. **National Academy Press**, Washington, D.C.2011.

NUNES, J.O.; BERTECHINI, A.G.;BRITO, J.A.; FASSANI, E.J.;MESQUITA, F.R.; MAKIYAMA, L.;MENEGHETTI, C. Evaluation of the probiotic (*Bacillus subtilis* C-3102) as additive to improve performance in broiler chicken diets. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.41, n.11, p.2374-2378,2012.

NUNES, E.S.S.; CAVERO, B.A.S.; PEREIRAFILHO, M.; ROUBACH, R.; Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui .**Pesquisa Agropecuária Brasileira**,v.41, n.1, p.139-143, 2006.

NOGUEIRA, G.C.C.B. et al. Desempenho produtivo de juvenis de trairão (*Hoplias lacerdae*) alimentados com rações comerciais. **Revista Ceres**, v. 52, n. 302, p. 491-497,2005.

OGUNKOYA, A.E.; PAGE, G.I.; ADEWOLU, M.A. et al. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v.254, p.466-475, 2005.

OLIVEIRA, R. S. B.; FIGUEIREDO, I. S. T.; FREITAS, L. B. N.; PINHEIRO, R. S. P.; BRITO, G. A. C.; ALENCAR, N. M. N.; RAMOS, M. V.; RALPH, M. T.; LIMA-FILHO, J. V. Inflammation induced by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflammation research**, v. 61, p. 689-698, 2012.

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M. N.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; FIGUEIREDO, I. S. T.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P. N. N.; RAMOS, M. V. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, p. 139–149, 2010.

OLIVEIRA, J. S.; BEZERRA, D. P.; FREITAS, C. D. T.; MARINHO FILHO, J. D. B.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; RAMOS, M. V. In vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1563–1573, 2007.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco ambiental e sociedade**, v. 2, n. 1, fevereiro, 2009.

OLIVEIRA, G. R. et al. Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1945-1952, 2007.

PARKIN, K.L. Enzimas. In: FENNEMA, O R; PARKIN, K L; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 6, p. 263-342, 2010.

PEDREIRA, M.M; MARTINS,M.G; MOURA,G.S; FERREIRA,T.A; FERREIRA, A.L; SANTOS,T.G. Inclusão de complexo enzimático SSF em rações para juvenis de tambacu.. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n.1, p.19-24, 2016.

PEZZATO, L. E. *et al.* Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais. **Revista brasileira de zootecnia**, v.38, p.43-51, 2009

PEZZATO, L.E. et al. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J.E.P. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Tecart. p. 75-169, 2004.

PEZZATO, L.E.; CASTAGNOLLI, N.; ROSSI, F. **Nutrição de alimentação de peixes**. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2001.

PICKARD W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytologist**. Volume 177, p. 877–888. 2008

POHLENZ, C., GATLIN III, D.M., 2014. Interrelationships between fish nutrition and health. **Aquaculture**, 431, 111-117,2014.

PONTES, A. S. G. C. **Influência das propriedades fluidodinâmicas na matriz do biodiesel metílico e suas misturas dieleis: Biodiesel de óleo de peixe**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

POPMA, T; MASSER, M. Tilapia: Life history and biology. Southern Regional Aquaculture Center, p. 1-4, 1999.

PORTZ, L.; FURUYA, W.M. Energia, Proteína e Aminoácidos. In. FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, 1 ed., p. 75-74, 2013.

RAMOS, M. V.; ALENCAR, N. M. N; OLIVEIRA, R. S. B.; FREITAS, L. B. N. ARAGÃO, K S.; ANDRADE, T. A. M.; FRADE, M. A. C.; BRITO, G. A. C.; & FIGUEIREDO, I. S. T. Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, p. 747–756, 2016.

RAMOS, M.V., SOUZA, D.P., GOMES, M.T.R., FREITAS, C.D.T., CARVALHO, C.P.S., JÚNIOR, P.A.V.R., Salas, C.E. A Phytopathogenic Cysteine Peptidase from Latex of Wild Rubber Vine *Cryptostegia grandiflora*. **Protein Journal**. Volume 33, p. 199–209. 2014.

RAMOS, M.V.; ARAÚJO, E.S.; JUCÁ T.L.; MONTEIRO-MOREIRA A.C.O.; VASCONCELOS I.M.; MOREIRA R.A.; VIANA C.A.; BELTRAMINI L.M.; PEREIRA D.A., MORENO F.B. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International Journal of Biological Macromolecules**. Volume 58, p 211-219. 2013.

RAMOS, M. V.; VIANA, C. A.; SILVA, A. F. B.; FREITAS, C. D. T.; FIGUEIREDO, I. S. T.; OLIVEIRA, R. S. B.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA-FILHO, J. V. M.; KUMAR, V. L. Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, p. 455–463, 2012.

RAMOS, M. V.; GRANGUEIRO, T. B.; FREIRE, E. A.; SALES, M. P.; SOUSA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 4, p 57-67, 2010.

RAMOS, M. V.; AGUIAR, V. C.; XAVIER, A. A. DA S.; LIMA, M. W.; BANDEIRA, G. P.; ETCHELLS, J. P.; NOGUEIRA, N. A. P.; ALENCAR, N. M. N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v. 77, p. 251–256, 2006.

RANZANI – PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES – DIAS, M.; EGAMI, M.I., **Métodos para análise hematologia de peixes**. 1 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 142p. 2013

RANZANI-PAIVA, M. T. J. e SILVA-SOUZA, A. T. **Hematologia de Peixes Brasileiros. Sanidade de Organismos Aquáticos**, Editora Varela, 2004.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SALLES, F. A.; EIRAS, J.C.; ISHIKAWA, C.M.; ALEXANDRINO, A. C. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do instituto de pesca. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 25, p. 77-83, 1999.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TABATA, Y.A.; EIRAS, A.C.das. Hematologia comparada entre diploides e triploides de truta arco-íres, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Pisces, Salmonidae). **Revista brasileira Zoologia**, v.15,n.4, p.1093-1102, 1998.

RASKOVIC B.; LAZIC J.; POLOVIC N. Characterisation of general proteolytic, milk clotting and antifungal activity of *Ficus carica* latex during fruit ripening. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Volume 96, p. 576-582. 2016.

RAWDKUEN, S.; JAIMAKREU, M.; BENJAKUL, S. Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex. **Food Chemistry**. Volume 136, p. 909–916. 2013.

RAWLING, M. D; MERRIFIELD, D. L; DAVIES, S. J. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. **Aquaculture**, v.294, n.1-2, p.118-122, , 2009.

RIBEIRO, P. A. P.; et al. Manejo nutricional e alimentar de peixes de água doce. 1. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, v. 1. 89p. 2012.

ROBERTS, R.J. Patologia de los peces, Madri, Ediciones Mundi prensa. 467p.1981.

ROBISON, T.; NIGAN, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 107-203. 2003.

ROCHA, C.M.C. *et al.* Prefácio: Avanços na pesquisa e desenvolvimento na aquicultura brasileira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 8, p. 4-6, 2013.

ROCHA, C.B.; POUHEY, J.L.O.F.; LOPES, P.R.S. *et al.* Suplementação da enzima fitase e o desempenho e retenção mineral em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.34, n.1, p.153-159, 2008.

RODRIGUES, A. N.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 21, n. 1, p. 63-66. 2001.

ROJAS, J. E. J. **Influência do oxigênio dissolvido no desempenho de juvenis de piava (*Leporinus obtusidens*)**. 2011. 54 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) –Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,2011.

ROSSATO, S; LAZZARI, R; FREITAS, I. L; MASCHIO, D; CORRÊA, V; NETO, J. R. Diferentes níveis de incorporação de farinha de resíduos de jundiás (*Rhamdia quelen*) cultivados na dieta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 3, p. 894-902, 2014.

RUTTEN, A. M.; STATIUS VAN EPS, L.W. Poisoning with toxic plants in Curacao in 1766. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde.**, v. 142, p. 2796-2798, 1998.

SÁ, R., GAVILÁN, M., RIOSECO, M.J., LANCABURE, A., VARGAS-CHACOFF, L., AUGSBURGER, A., Bas, F. Dietary protein requirement of Patagonian blennie (*Eleginops maclovinus*, Cuvier 1830) juveniles. **Aquaculture**, 428–429, 125–134,2014.

SÁ, M.V.C. **Limnocultura: Limnologia para aquicultura**. Edições UFC, 218p. 2012.

SAHA, S., ROY, R. N., SEN, S. K., RAY, A. K. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 4, p. 380-388, 2006.

SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. Nutrição de não ruminantes. Jaboticabal: FUNEP, 678 p. 2014.

SALAS, C.E.; GOMES, M.T.R.; HERNANDEZ, M.; LOPES, M.T.P. Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. **Phytochemistry**, 69, 2263–2269. 2008.

SANTOS, F. W.B. 1º Simpósio de Alimentação Animal. Nutrição de peixes de água doce: **Definições, Perspectivas e Avanços Científicos**. Fortaleza, 2007.

SANTOS, L.R.B.; OBA, E.T. Dieta: ferramenta importante para manejo dos peixes no cultivo. In: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009.

SANTOS, R. B. S.; TAVARES-DIAS, M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (Pisces, Doradidae), oriundos da bacia do médio rio Solimões, estado do Amazonas (Brasil), naturalmente parasitados. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.36, n4., p.283-292, 2011.

SANTOS, R.B.S.; TAVARES-DIAS, M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (Pisces, Doradidae) oriundos da bacia do médio Rio Solimões, estado do Amazonas, Brasil, naturalmente parasitados. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 4, p. 283-292, 2010.

SANTOS, A.; VAN REE, R. Profilins: Mimickers of allergy or relevant allergens? **International Archives of Allergy and Immunology** v.155, p.191-204, 2011.

SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; NAPOLEÃO, S.R. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v.33, n., p.107-112, 2011.

SHARMA, R.; THAKUR, G. S.; SANODIYA, B. S.; SAVITA, A.; PANDEY, M.; SHARMA, A. Therapeutic potential of *Calotropis procera*: a giant milkweed. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.4, p. 42-57, 2012.

SIGNOR, A.A., LUCHESI, J. D., COSTA, J.M., FRIES, E. M., SIGNOR, A., FEIDEN, A., BOSCOLO, W.R. Complexo enzimático na dieta de alevinos de kinguio *Carassius auratus*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1381-1388, 2013.

SIGNOR, A.A., BOSCOLO, W.R., BITTENCOURT, F., FEIDEN, A., GONÇALVES, G.S. E FREITAS, J.M.A. Desempenho de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo complexo enzimático. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.39, n.5, p.977-983, 2010.

SILVA, A.S.E.; LIMA, T.A.X.; BLANCO, B.S. Hematologia em Peixes. **Revista Centauro**, v.3, n.1, p.24-32. *Versão On-line* ISSN 178-7573, 2012.

SILVA, M. S. G. M. **Desenvolvimento de um sistema de recirculação com uso de wetlands contruídas para efluentes da piscicultura**. 2012. 115 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2012.

SILVA, T. D. C., FURUYA, W. M., DOS SANTOS, L. D., FUJII, K. M., MICHELATO, M., & IWAMOTO, B. S. Fitase líquida em dieta extrusada para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum-Animal Sciences**, v. 29, n. 4, p. 449-455, 2007.

SINGHAL, A.; KUMAR, V. L. Effect of aqueous suspension of dried latex of *Calotropis procera* on hepatorenal functions in rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 172–174, 2009.

SIKLOS M.; BENAÏSSA M.; THATCHER G. R. J. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. Volume 5, p. 506-519. 2015.

SOARES, E.C. et al. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca (*Cichla sp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p. 971-976, 2008.

SOARES, P. M.; LIMA, S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI, B. A.; CARVALHO, K. M.; ASSREUY, A. M. S.; VASCONCELOS, S. M. M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 125–129, 2005.

SOUZA, M. L. R.; MACEDO-VIEGAS, E. M.; ZUANON, J. A. S.; CARVALHO, M. R. B.; GOES, E. S. R. Processing yield and chemical composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with regard to body weight. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 2, p. 103-108, April/June, 2015.

SOUSA, F. M. C.; CONDE JÚNIOR, A. M.; FERNANDES, H. B.; EDLIN, E. N. S.; FORTES, E. A. M. Morfologia das células sanguíneas de Mandi (*Pimelodusma culatus*, Lacépède, 1803). **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Garça/SP, v. 23, p. 1-13, 2014.

SOUZA, R. C. et al. **Influencia da farinha de manga no crescimento e composição corporal da tilápia do Nilo**. *Archivos de zootecnia*, v. 62, n. 238, p. 217-225, 2013.

SOUZA, D. P.; FREITAS, C. D. T.; PEREIRA, D. A.; NOGUEIRA, F. C.; SILVA, F. D. A.; SALAS, C. E.; RAMOS, M. V. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Planta** v. 234, p.183–193, 2011.

SOLTAN, M.A. Effect of dietary fish meal replacement by poultry by-product meal with different grain source and enzyme supplementation on performance, feces recovery, body composition and nutrient balance of Nile tilapia. *Pak. J. Nutr.* 8, 395–407, 2009.

STECH, M.R. CARNEIRO, D.J. PIZAURO JÚNIOR, J.M. Fatores que afetam a produção de enzimas digestivas em peixes e o uso de enzimas exógenas como ferramentas em nutrição de peixes. **Ensaios e Ciência**, vol. XIII, 2, 79-93, 2009.

STOSKOPF, M. Anaesthesia. In: BROWN, L. (Ed). *Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine*. London, UK: Pergamon Veterinary Handbook Series. p.161-168, 1993.

SUSSEL, F. R. **Tilapicultura no Brasil e entraves na produção**. Junho, 2013. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/TilapiculturaEntraves2013.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2018.

TACHIBANA, L.; PINTO, L. G. Q.; GONÇALVES, G. S.; PEZZATO, L. E. Xilanase e β -glucanase na digestibilidade aparente de nutrientes do triticales pela Tilápia-do-nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2, p.445-452, 2010.

TACON, A.G.J.; HASAN, M.R.; METIAN, M. *Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects*. Rome: FAO. (FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, 564). 2011.

TACON, A.G.J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aqua feeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, v.285, 146-158, 2008.

TAVANO, O.L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, volume 90, p. 1-11. 2013.

TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. S. **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. São Carlos: Pedro e João Editores, 429 p. 2015.

TAVARES-DIAS, M., ONO, E. A., PILARSKI, F., e MORAES, F. R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? Acytochemical study and ultrastructural analysis. **J. Appl. Ichthyol.** v.23, p.709-712, 2007.

TAVARES-DIAS, M; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Editora Eletrônica e Arte Final. Ribeirão Preto, São Paulo, 144p. 2004.

TAVARES-DIAS, M. Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal: Centro de Aquicultura, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do Jundiá (*Rhamdia quelen*) (Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.693-698, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em "pesque-pague" do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria, Jaboticabal**, 16(2): 76-82, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R.A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16 (2): 423 - 431, 1999.

TEIXEIRA, C.P., BARROS, M.M., PEZZATO, L.E., FERNANDES JR, A.C., KOCH, J.F.A., PADOVANI, C.R. Growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing levels of pyridoxine and haematological response under heat stress. **Aquac. Res.**, 43, 1081-1088, 2012.

TEIXEIRA, C.P. **Suplementação de vitamina B6 em dietas práticas e purificadas no desempenho produtivo e resposta hemática da tilápia do Nilo submetida a estímulo térmico**. 2009. 45 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

TEIXEIRA, E. A., CREPALDI, D. V., FARIA, P. M. C., RIBEIRO, L. P., MELO, D. C. D.; EULER, A. C. C. Composição corporal e exigências nutricionais de aminoácidos para alevinos de tilápia ("*Oreochromis*" sp.). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 2, 2008.

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, São Paulo: Roca, 582p.2007.

TORT, L., BALACH, J., MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Imunologia**, 22, 277-286, 2003.

TRAN-DUY, A, SCHRAMA A,J.W.; VAM DAM, A.A.; VERRET, J.A.J. Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture** 275.152–162, 2008.

TROELL, M. *et al.* Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 37, p. 13257-13263, 2014b.

TRUSHENSKI, J.T.; KASPER, C.S.; KOHLER, C. Challenges and opportunities in finfish nutrition. *North American Journal of Aquaculture*, v. 68, p. 122-140, 2006.

TURK, B.; TURK, D.; TURK V. Protease signalling: the cutting edge. **The EMBO Journal**. European Molecular Biology Organization. Volume 31, p. 1630–164. 2012.

TUSCHE, K; WUERTZ, S; SUSENBETH, A; SCHULZ, C. Feeding fish according to organic aquaculture guidelines EC 710/2009: Influence of potato protein concentrates containing various glycoalkaloid levels on health status and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.319, n.1-2, p.122-131, 2011.

UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E.R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.34, p.270-275, 1997.

UPADHYAY, R. K. Plant latex: A natural source of pharmaceuticals and pesticides. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 5, p. 169-80, 2011.

VAZQUEZ, G.R.; GUERRERO, G.A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue and Cell**, v.39, p.151-160, 2007.

VERMELHO A. B.; CARDOSO, V.; NASCIMENTO, R. P.; PINHEIRO, A. S.RODRIGUES, I. A. Application of Microbial Enzymes in the Food Industry, **Advances in Food Biotechnology**, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, p. 103–132, 2015.

VIANA, C. A.; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D.; ALENCAR, N. M.; CARVALHO, C. P.; NISHI, B. C.; RAMOS, M. V. Thrombin and plasmin-like activities in the latices of *Cryptostegia grandiflora* and *Plumeria rubra*. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 4, p. 386-92, 2013.

VIANA, C. A. **Caracterização Bioquímica da Atividade pró-coagulante de Proteases de Fluidos Laticíferos**. Dissertação submetida à coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, 2011.

VALENTE, L.M.P. *et al.* Plant protein blends in diets for Senegalese sole affect skeletal muscle growth, flesh texture and the expression of related genes. **Aquaculture**, v. 453, p. 77-85, 2016.

VIEIRA, F. et al. **Características morfológicas, rendimentos de carcaça, filé, vísceras e resíduos em tilápias-do-Nilo em diferentes faixas de peso.** Rev. Bras. Zootecn, v. 38, p. 1407-1412, 2009.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica - 4.ed.: A Vida em Nível Molecular.** Artmed Editora, 2014.

ZAMINI, A., KANANI, H., ESMAEILI, A., RAMEZANI, S., ZORIEZAHRA, S. Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). Comp. Clin. Pathol. 23, 187–192, 2014.

ZHAO, P.; DENG S.; DING, Y. LYU, F. Optimization of additive combination based on L-cysteine for inhibition of nonenzymatic browning in cooked rice during storage. **Journal of Food Processing and Preservation.** Volume 39, p. 488-494. 2014.

ZHOU, Y., JIANG, L.D., Wang, T. Improved energy-utilizing efficiency by enzyme preparation supplement in broiler diets with different metabolizable energy levels. **Poult. Sci.**, 88:316-322, 2009.

ZUANAZZI, J. S. G.; DELBEM, A. C. B.; MARENGONI, N. G.; NASCIMENTO, F.

L.; LARA, J. A. F. **Determinação da composição centesimal de pacu (*Piaractus Mesopotamicus*) cultivados em tanques-rede no Pantanal.** SIMPAN - 6º Simpósio sobre Recursos Naturais e Socio econômicos do Pantanal, Desafios e Soluções para o Pantanal. Corumbá/MS, 2013.

Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan6/Resumos_6Simpan_1Evinci_2013.pdf>. Acesso em: 29 mai. 2018.

YILDIRIM, Y.B.; TURAN, F. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in African Catfish, *Clarias gariepinus*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 2, p.327-331, 2010.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S. E.; WHISTLER, J. L. Opioid receptors. **Annual Review of Biochemistry**, v.73, p.953–990, 2004. WANG, M.; LU, M. Tilapia polyculture: a global review. **Aquaculture Research**, Oxford, p. 1-12, 2015.

WU, G. Amino acids: biochemistry and nutrition. Boca Raton: CRC Press, 2013.