



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**DIGESTIBILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DA TORTA DE
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*) PARA JUVENIS DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*),**

ESAÚ AGUIAR CARVALHO

**MANAUS – AM
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

ESAÚ AGUIAR CARVALHO

**DIGESTIBILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DA TORTA DE
CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*) PARA JUVENIS DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação do curso Multi-institucional de Doutorado em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dra. Expedita Maria de Oliveira Pereira, UFAM, Manaus/AM
Co-orientador: Dr. Gilberto Moraes, UFSCAR, São Carlos/SP

**MANAUS – AM
2011**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Carvalho, Esaú Aguiar

C331d Digestibilidade *in vivo* e *in vitro* da torta de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Esaú Aguiar Carvalho. - Manaus: UFAM, 2011.
95 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientadora: Prof^a. Dra. Expedita Maria de Oliveira Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Gilberto Moraes

1. Piscicultura 2. Nutrição de peixes 3. Tambaqui (Peixe) - Nutrição I. Pereira, Expedita Maria de Oliveira (Orient.) II. Moraes, Gilberto (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 597.554.1:639.3.043(043.2)

BANCA EXAMINADORA

Dra. Expedita Maria de Oliveira Pereira
Universidade Federal do Amazonas

Dra. Ana Cristina Belarmino de Oliveira
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Antônio José Inhamuns
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Frank Jorge Guimarães Cruz
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Luís Antônio Kioshi Aoki Inoue
Embrapa Ocidental

Aprovada em 25 de agosto de 2011

Aos meus pais (*in memoriam*) pelo incentivo para seguir em frente sempre e à minha irmã Elna pelo apoio para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força suprema.

Ao Dr. Manoel Pereira Filho (*in memorian*) pelo apoio, grande incentivo, palavras amigas e primeira orientação quando cheguei ao INPA.

Ao Dr. Gilberto Moraes pelo forte apoio e grande amizade desenvolvidos quando estive na UFSCAR, para treinamento.

A minha orientadora Dra. Expedita Maria por me acolher como orientando e pelo incentivo para realização desse trabalho.

Ao Dr. Spartaco e ao Dr. José Odair pela compreensão e imenso incentivo para que eu pudesse completar esse trabalho.

A Professora Leonor, do departamento de Química, pelo grande apoio ao delineamento dos estudos *in vitro*, incentivo e amizade conquistada.

A Sra Maria Inês pelas análises bromatológicas realizadas e grande amizade conquistada juntos.

Aos funcionários do INPA Atílio, Sra Suzana, Sra Ana, Waldir, Evandro pelo apoio pessoal e funcional.

Ao pesquisador Alexandre Honckzarik pela amizade e concessão dos peixes para realização do estudo.

Ao funcionário do INPA Gabriel Nobre pela grande amizade e apoio para realização desse trabalho.

Ao colega Guto pelas análises estatísticas e grande apoio para delineamento dos estudos e grande amizade a mim dedicados.

Ao colega Cristian Castro pela enorme amizade conquistada e grande apoio para realização de parte prática e escrita.

A colega Iara pelo excepcional apoio e incentivo a mim propiciados.

A colega de curso Marta Nascimento pelo forte incentivo, apoio e amizade.

Ao colega Márcio pelo apoio nas finalizações da escrita do capítulo II.

Aos colegas César Oishi, Geraldão, André Anselmo, Lian, Fábio Soller, Cássia, Fábio Wegbecher, Elenice, Marieta, pelo apoio e amizade conquistados.

Aos colegas de curso Lioney Cabral e Ederly pela amizade e apoio mútuo.

A colega Flávia Paiva pelo auxílio nas análises químicas dos extratos enzimáticos.

As secretárias Elzimar e Nubiane pelo apoio aos assuntos burocráticos do curso.

Aos funcionários de serviços gerais do INPA/CPAQ, Fatinha e Sr. Joaquim, pela grande amizade a mim dispensada.

A CUPUAMA pelo fornecimento da torta de cupuaçu para os experimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse estudo.

Muito obrigado!

DIGESTIBILIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DA TORTA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*) PARA JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

RESUMO: Uma dieta ou um ingrediente são considerados digeríveis quando há habilidade do animal, que os consome, para absorver os nutrientes contidos nela, sendo determinado, portanto, um coeficiente de digestibilidade destes nutrientes, revelando o potencial nutricional da dieta ou do ingrediente. Objetivando determinar o coeficiente de digestibilidade (CDA) de um resíduo vegetal (torta de cupuaçu), por técnicas *in vivo* e *in vitro*, foram realizados dois estudos. No primeiro, duzentos juvenis de tambaqui ($87,2 \pm 6,3\text{g}$) foram acondicionados em cones de digestibilidade em um delineamento experimental de dois tratamentos: T0 (ração comercial) e o T1 (ração comercial com inclusão de 30% de farinha de torta de cupuaçu), e 5 repetições. O método de determinação dos coeficientes de digestibilidade foi o indireto com inclusão de 0,5% de óxido de cromo (Cr_2O_3) nas rações experimentais. As variáveis físico-químicas da água de cultivo foram monitoradas diariamente as 8:00 h. Os CDAs dos principais nutrientes estudados foram reduzidos com a inclusão de 30% de torta de cupuaçu em uma ração comercial, mostrando que esse nível de inclusão, segundo as condições desse ensaio, é inadequado para nutrição de juvenis de tambaqui. No segundo estudo, aplicando-se uma técnica *in vitro*, com a utilização do próprio extrato enzimático de trinta juvenis de tambaqui, provenientes do primeiro ensaio, se determinou os coeficientes de digestibilidade da fração solúvel protéica do resíduo (torta de cupuaçu) e de duas dietas, sendo uma constituída de ração comercial e outra com essa mesma ração com inclusão de 30% da torta de cupuaçu, após aplicação de metodologia desenvolvida no laboratório de Bioquímica de Peixe, da Universidade Federal de São Carlos – SP. Os resultados evidenciaram que, por meio dessa técnica, não foi possível observar o potencial solúvel protéico da torta de cupuaçu e das

dietas estudadas, sugerindo-se refinamento dessa metodologia com conseqüentes estudos comparativos a tradicionais técnicas *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Piscicultura, Nutrição de peixes, técnicas *in vivo* e *in vitro*

IN VIVO AND IN VITRO DIGESTIBILITY OF CUPUAÇU PIE (*Theobroma grandiflorum*) FOR JUVENILES TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*).

Abstract: A diet or a digestible ingredients are considered when there is ability of the animal, which consumes, to absorb the nutrients contained in it and is determined, therefore, a coefficient of digestibility of nutrients, revealing the potential nutritional or dietary ingredient. In order to determine the digestibility coefficient (ADC) of a plant residue (cake cupuaçu), techniques for *in vivo* and *in vitro* two studies. In the first two hundred juvenile tambaqui (87.2 ± 6.3 g) were placed in cones in a digestibility experiment of two treatments: T0 (commercial diet) and T1 (commercial diets with inclusion of 30% flour pie cupuaçu), and 5 repetitions. The method of determining digestibility was indirect, with the inclusion of 0.5% chromium oxide (Cr₂O₃) in the experimental diets. The physico-chemical variables of water cultivation were monitored daily at 8:00 pm. The EDCs of the main nutrients studied were reduced with the inclusion of 30% pie in a commercial feed cupuaçu, showing that this level of inclusion, according to the conditions of this test, is inadequate nutrition for tambaqui. In the second study, by applying a technique *in vitro*, with the operation of the enzymatic extract thirty tambaqui, from the first test, it was determined the digestibility of the soluble protein fraction of the residue (cake cupuaçu) and two diets, one consisting of commercial feed and the other with the same feed with 30% inclusion of Pie cupuaçu, after application of methodology developed in the laboratory of Biochemistry of Fish, Federal University of São Carlos - SP. The results showed that, using this technique, it was not possible to observe the potential of soluble protein cupuaçu pie and the diets studied, suggesting that refinement of this methodology with subsequent comparisons to traditional techniques *in vitro* and *in vivo*

Keywords: Fish farming, fish nutrition, techniques *in vivo* and *in vitro*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Concentração de proteínas (mg/mL) nos diferentes extratos enzimáticos.....79
- Figura 2. Percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica das dietas e do ingrediente, pelo extrato enzimático do “pool” de estômagos de juvenis de tambaqui, em 6 h de reação.....80
- Figura 3. Percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica das dietas e do ingrediente, pelo extrato enzimático do “pool” de cecos pilóricos de juvenis de tambaqui, em 6 h de reação.....81
- Figura 4. Percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica das dietas e do ingrediente, pelo extrato enzimático do “pool” de intestinos anteriores de juvenis de tambaqui, em 6 h de reação.....82
- Figura 5. Percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica das dietas e do ingrediente, pelo extrato enzimático do “pool” de intestinos posteriores de juvenis de tambaqui, em 6 h de reação.....83

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Proteases ácidas e alcalinas encontradas em diferentes partes do trato digestório de espécies de peixes.....37
- Tabela 2. Análise químico-bromatológica (%) das diferentes rações e do ingrediente.....57
- Tabela 3. Variáveis Físico-Químicas da Água monitoradas nos tanques de alvenaria e nos cones. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão.....59
- Tabela 4. Valores médios dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca e dos nutrientes das rações controle, teste e do ingrediente.....60

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
INTRODUÇÃO	15
1 REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1 Nutrição de Peixes	20
1.1.1 Proteínas	21
1.2 Tambaqui	22
1.3 Potencial de Utilização de Subprodutos do Despoldamento de Frutas na Alimentação de Peixes	24
1.3.1 Cupuaçu: seus subprodutos e uso	25
1.4 Digestibilidade	28
1.4.1 Considerações Gerais	28
1.4.2 Digestibilidade <i>in vivo</i>	29
1.4.3 Digestibilidade <i>in vitro</i>	31
1.5 Enzimas	33
1.5.1 Enzimas Digestivas em Peixes e a Microflora	33
1.5.2 Proteases	35
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPÍTULO I – DIGESTIBILIDADE APARENTE DA TORTA DE CUPUAÇU (<i>Theobroma grandiflorum</i>) VISANDO SUA INCLUSÃO EM RAÇÃO PARA JUVENIS DE TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>)	48
Resumo	49
Abstract	50
1 INTRODUÇÃO	51
2 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 Beneficiamento da Torta de Cupuaçu em Farinha para as Rações	53
2.2 Elaboração da Ração Teste	54
2.3 Manejo dos Peixes	54
2.3.1 Biometria	55
2.4 Critérios de Avaliação da Digestibilidade	55
2.4.1 Método de Coleta de Fezes por Decantação	55
2.4.2 Determinação dos Coeficientes de Digestibilidade	56
2.5 Análises Químico-Bromatológicas	57
2.6 Determinação do Óxido de Cromo (Cr₂ O₃)	58
2.7 Análise Estatística	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1 Variáveis Físico-Químicas da Água	59
3.2 Coeficientes de Digestibilidade Aparente	60
4 CONCLUSÃO	64
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CAPÍTULO II - DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA FRAÇÃO SOLÚVEL PROTÉICA DA TORTA DE CUPUAÇU E DIETAS PARA JUVENIS DE TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>)	70
Resumo	71

Abstract	72
1 INTRODUÇÃO	73
2 MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1 Extração dos Tecidos	76
2.2 Preparação dos Homogeneizados Celulares	76
2.3 Procedimento Experimental	77
3 RESULTADOS	79
4 DISCUSSÃO	85
5 CONCLUSÃO	89
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

INTRODUÇÃO

A aquicultura mundial segue crescendo e destacando-se como grande fornecedora de fonte protéica para a crescente população mundial. O consumo per capita de organismos aquáticos cultivados que era de 0,7 kg, em 1970, saltou para 7,8 kg, em 2008, correspondendo a taxas de 6,6% de crescimento médio anual (FAO, 2010). A piscicultura de água doce é a vertente da aquicultura que mais contribui para a produção de pescado mundial em cativeiro.

O panorama aquícola nacional segue acompanhando a tendência de crescimento mundial e com a piscicultura liderando os índices de produção que, segundo as últimas estatísticas avaliadas entre os anos de 2007 a 2009, houve um salto de aproximadamente 61% (MPA, 2010). Segundo essa mesma fonte, a região Norte, entre os anos de 2008 e 2009, estava em terceiro lugar, no ranking nacional, na produção de pescado de cultivo.

O Estado do Amazonas continua configurando como o primeiro da região em produção de peixes seguido pelos Estados de Rondônia e Tocantins, quando observado o período entre 2007 e 2009. No último ano deste período, as produções totais de pescado provenientes de cultivo foram: 10.234,7t, 8.178,1t e 6.004,1t, respectivamente (Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010).

Uma característica importante da piscicultura brasileira é o grande número de espécies criadas. Hoje, utilizam-se mais de 30 com os mais variados hábitos alimentares e ambientes de vida. Vão desde espécies de clima tropical (em sua grande maioria) até espécies de clima temperado e frio. E as que oferecem maior produção, em ordem de importância, são: as tilápias, os peixes redondos (pacu, tambaqui e seus híbridos) e as carpas (comum e chinesas). Outras espécies, porém, como os grandes bagres brasileiros (pintado, surubim e pirara), o dourado e os Brycons (matrinxã, piracanjuba, piraputanga e piabanha), começam a despertar o

interesse de criadores não apenas pelo seu valor para a pesca esportiva como também pela facilidade de comercialização.

Vários fatores favoreceram o rápido crescimento da piscicultura no Brasil: condições climáticas favoráveis (pequena variação de temperatura do ar e da água), grande quantidade de coleções hídricas disponíveis, grandes extensões de terra passíveis de cultivo, boa adaptabilidade das espécies à criação e facilidade de adaptação a tecnologias.

Em aquicultura, como nas demais cadeias produtivas agrícolas, a expansão de um dos elos acarreta o aumento de produtividade em todo o sistema. É o caso do aumento da demanda por ração pelos produtores aquícolas, que possibilitou o surgimento de novas fábricas, sendo que hoje já existem mais de 30 unidades instaladas no Brasil, com ampliação já confirmada da produção de ração específica para a aquicultura nos próximos anos. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES), no ano de 2009, foram produzidas 380 mil toneladas de ração para organismos aquáticos, passando para 429 mil toneladas em 2010.

As fábricas não apenas disponibilizam rações próprias para alguns organismos aquáticos, como também para as diversas fases do ciclo produtivo, o que contribui para um maior rendimento da criação (por melhor conversão cárnea, resistência a moléstias etc.) e a diminuição do custo de produção.

E nesse particular do custo de produção, indubitavelmente, o fator mais importante da composição da planilha de custo na aquicultura, como de resto em todas as criações, é o gasto relacionado à alimentação, razão pela qual o preço do peixe, camarão e outros organismos aquáticos criados é severamente influenciado pelo preço dos insumos utilizados na preparação das dietas. Segundo o SINDIRAÇÕES, as indústrias desse insumo encerraram 2009 com um recuo na produção da ordem de 0,5% em relação a 2008, ano de grandes turbulências.

Em vista disso, a participação do item ração voltou a ser de 40 a 60% na composição do custo de produção na piscicultura, enquanto entre 2000 e 2001 esse percentual girava em torno de 30% dos custos operacionais totais (SINDIRAÇÕES, 2010). Uma situação assim leva as indústrias a trabalharem com margens reduzidas de lucro, o que também as instabiliza, e a buscar fontes alternativas de matéria-prima, perseguindo menores custos (SINDIRAÇÕES, 2010).

Na região Norte, os custos de produção podem ser ainda maiores, face às grandes distâncias e problemas na infra-estrutura de transporte. Soma-se a isso, a região não produzir os principais insumos incorporados às rações, precisando importá-los. Mitigar os problemas que impactam a produção piscícola, sobretudo no quesito alimentação, constituirá reflexo positivo tanto no aspecto econômico como ambiental dos cultivos.

A região contempla programas agroflorestais e de arranjos produtivos de fruticultura com intuito de atender à grande demanda pelos diversos, exóticos e saborosos frutos nativos, que vêm despertando o interesse até mesmo em outros países. Este considerável volume de frutas produzidas está gerando resíduos, os quais poderiam servir como alimento para peixes nativos cultivados, uma vez que apresentam ampla plasticidade trófica. Contudo, estudos que revelem seu valor nutritivo e os impactos no desempenho produtivo dos animais devem ser realizados.

O cupuaçu é uma fruta nativa da região Norte e que também está inserida em programas agroflorestais no Estado do Amazonas. Dados mais recentes de sua produção registraram crescimento de 16% entre 2004 e 2005. Segundo a CUPUAMA, empresa que processa a polpa e a semente de cupuaçu no Estado, até junho de 2011, já havia sido produzida 40 toneladas de torta de cupuaçu, resíduo proveniente do processo de retirada da gordura da semente, que se não tiverem destino adequado serão descartadas na natureza.

A provável disponibilidade de um resíduo vegetal não é suficiente para atestá-lo como ingrediente alternativo. É preciso que seja avaliado o seu conteúdo em nutrientes e quantificados seus fatores antinutricionais, já que em sua grande maioria são provenientes de cascas e sementes, bastante conhecidas por conterem diversos desses fatores.

As técnicas empregadas para determinar a digestibilidade de um ingrediente ou de uma dieta variam de acordo com a metodologia. A técnica *in vivo* ainda é bastante aceita, predizendo o percentual digestível daquela dieta e ou daquele ingrediente acrescido, com resultados bastante aceitos entre os estudiosos do assunto.

A técnica *in vitro* surge, atualmente, como uma alternativa para ajudar na predição da digestibilidade das dietas, ingredientes e nutrientes por permitir menor custo e tempo quando comparada à *in vivo*. Permite ainda uma avaliação mais detalhada das enzimas responsáveis pela hidrólise, reduzindo o tempo de resposta à indústria de rações sobre o potencial digestivo dos componentes a serem usados nas formulações.

O cultivo de peixes na Amazônia, embora tenha apresentado bons índices de crescimento nos últimos anos não atingiu seu ápice por diferentes razões: ainda há necessidade de refinamento nos conhecimentos do manejo das espécies, faltam informações mais detalhadas sobre suas necessidades nutricionais, e a região não produz, nas quantidades necessárias, os ingredientes tradicionais utilizados em rações para peixes, importando-os de outros centros do país. Agravante complementar a essa importação é o fato que os insumos apresentam características que dificultam seu armazenamento por longos períodos e com padrão inconstante de qualidade, encarecendo as rações.

Levando em consideração os aspectos acima relacionados fazem-se necessários estudos de digestibilidade de matérias-primas de origem vegetal (resíduos), com alto teor protéico e de menor custo, e que estão apresentando constância de produção na região Norte.

Dessa forma, esse trabalho foi dividido em dois capítulos, que irão avaliar a digestibilidade do resíduo da polpa do cupuaçu (torta de cupuaçu), que é a semente desengordurada, por diferentes metodologias. No capítulo I, foi avaliada a digestibilidade *in vivo* da torta de cupuaçu por juvenis de tambaqui, utilizando o método de coleta de fezes por decantação, enquanto no segundo capítulo foram utilizados extratos enzimáticos do trato digestório desta espécie para avaliação da digestibilidade da fração solúvel protéica, por técnica *in vitro*, do ingrediente e de duas dietas.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Nutrição de peixes

A alimentação constitui um fator importante na piscicultura, pois representa uma parcela significativa dos custos operacionais nesta atividade. Dependendo da região, do sistema aplicado ou da espécie de peixe cultivada, eles podem representar entre 30 a 60% da produção (CHENG *et al.*, 2003; JOMORI *et al.*, 2005). Dado essa constatação, a redução significativa dos mesmos pode ser alcançada através do uso de ingredientes de alta qualidade, de técnicas eficazes no processamento das rações e da aplicação de estratégias na alimentação (KUBITZA, 1999).

Com o objetivo de otimizar as condições de cultivo das espécies de peixe economicamente viáveis, tentando reduzir o impacto ambiental e aumentar a lucratividade da aquicultura, os estudos em nutrição tem dado ênfase na digestibilidade e rendimento de macronutrientes (HALVER & HARDY, 2002). Alguns estudos se baseiam na capacidade do animal aproveitar o alimento alternativo como substitutivo parcial em rações (ROBAINA *et al.*, 1995; CARTER & HAULER, 2000; SILVA *et al.*, 2003; KAUSHIK *et al.*, 2004; KALITA *et al.* 2006; OISHI, 2007), enquanto outros avaliam a digestibilidade de ingredientes e nutrientes para diferentes espécies (LAZO *et al.*, 1998; LEMOS *et al.*, 2000; CHONG *et al.*, 2002; LEMOS *et al.*, 2004; FENERCI & SENER, 2005).

A nutrição de peixes destina amplamente ao estabelecimento da relação entre dieta e o crescimento do peixe, à comparação entre possíveis ingredientes alimentares e à determinação dos requerimentos nutricionais da espécie (CARTER *et al.*, 2001).

A dieta, de acordo com os estudos nutricionais, tem demonstrado influenciar o comportamento, a integridade estrutural, a saúde, as funções fisiológicas, a reprodução e o crescimento dos peixes (PEZZATO *et al.*, 2004), portanto, uma adequada formulação da ração, balanceando qualitativa e quantitativamente os nutrientes essenciais, proporcionará

qualidade ambiental do cultivo, além de otimização da produção e oferta de produtos seguros ao consumidor.

Alguns fatores estão diretamente relacionados à determinação das exigências nutricionais dos peixes e devem ser levados em consideração na elaboração das dietas: espécie, fase de desenvolvimento, sexo e estágio de maturação sexual, sistema e regime de produção, temperatura da água, frequência de arraçoamento e qualidade da dieta. É importante salientar, que níveis dietéticos de nutrientes abaixo ou acima daqueles exigidos pela espécie, podem interferir na digestibilidade e absorção tanto dos considerados essenciais como até mesmo de outros nutrientes, com consequências desastrosas à saúde dos peixes e à viabilidade dos cultivos (PEZZATO *et al.*, 2004).

Uma fonte de energia, aminoácidos essenciais, e certas vitaminas e minerais são exigências nutricionais de excelência, apontadas em estudos de nutrição, que devam ser incluídas em qualquer dieta que se proponha a promover crescimento (KUBITZA, 1999)

1.1.1 Proteína

As proteínas são polímeros de α -aminoácidos com máxima importância para o desenvolvimento dos peixes (PEZZATO *et al.*, 2004). Segundo DEVLIN (1998), suas funções no organismo são consideradas essenciais, podendo ser classificadas como dinâmicas (transporte, controle metabólico, contração, catálise, proteção) e estruturais (desenvolvimento matriz óssea e tecido conjuntivo).

A necessidade desse nutriente pelos peixes não é determinada pela sua quantidade, e sim pela exigência em suplemento equilibrado de aminoácidos indispensáveis. Quando comparado a outros animais, os peixes exigem quantidades maiores de proteína dietética, explicado pelo fato de apresentarem melhor eficiência no uso da energia, pois não precisam regular a temperatura corpórea e excretam os subprodutos do metabolismo dos aminoácidos, passivamente pelas brânquias, com reduzido custo energético (PEZZATO *et al.*, 2004).

A farinha de peixe é o ingrediente mais utilizado como fonte de proteína animal em rações para peixes (HARDY, 1999). O crescimento mundial da aquicultura aumentou a demanda por esse produto, diminuindo os estoques naturais e forçando o aumento do preço. O principal fator negativo na utilização deste ingrediente é o custo e a qualidade da farinha de peixe utilizada, que oscila dependendo da espécie e estado de conservação do pescado utilizado, apresentando variação quanto aos componentes nutricionais, presença de agentes patogênicos e toxinas (NAYLOR *et al.*, 2000).

A proteína é o nutriente mais oneroso na formulação de ração para peixes (MEROLA & PAGAN-FONT, 1988; CHENG *et al.*, 2003). Juntamente com a farinha de peixe outro ingrediente protéico amplamente utilizado é o farelo de soja, ambos entram na composição das rações em níveis até de 60% (LOVELL, 1989; BOONYARATPALIN *et al.*, 1998). Estes ingredientes, para a região Amazônica, constituem um problema relevante na formulação de rações para piscicultura regional, pois não há produção local, significando importação de outros centros do país. Soma-se a isso o fato de não apresentar padrão de qualidade constante e possuem características que dificultam seu armazenamento por longos períodos e os custos derivados disto.

Uma alternativa para mitigar essa situação seria o uso de insumos não convencionais para a formulação de rações pela indústria local, como os resíduos de despolpamento de frutos, com alto teor protéico. Para tanto, se fazem necessários estudos de digestibilidade de tais insumos que possam contribuir para o conhecimento de seu adequado uso e redução dos custos alimentares da piscicultura regional.

1.2 Tambaqui (*Colossoma macropomum*): aspectos gerais e importância da espécie

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, (Cuvier, 1818) é o segundo maior peixe de escamas da região neotropical e o segundo maior characiforme (LOWE-MC-CONNELL,

1999). Considerado um dos mais saborosos peixes de água doce, com carne rica em proteínas e sais minerais, é hoje um dos peixes mais apreciados pelas populações dos países amazônicos. Manaus caracteriza-se nesse contexto como o maior mercado consumidor (BARTHEM *et al.*, 1995; ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998; BATISTA, 1998).

A espécie apresenta grande plasticidade genotípica e fenotípica, permitindo-lhe sobreviver no heterogêneo ambiente amazônico. Nos períodos de cheia, ela habita as regiões de floresta inundada de várzea, alimentando-se de frutos e sementes; nos de vazante, os adultos migram para os rios de água branca, para reprodução, e os juvenis permanecem nos lagos de várzea, alimentando-se, nesse período, de zooplâncton. É uma espécie onívora, que suporta níveis baixos de oxigênio (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1993) e resistem a temperaturas entre 27°C e 35°C (SAINT-PAUL, 1986). Impressionantes características anatômicas da espécie são sua mandíbula forte com dentição capaz de quebrar e triturar frutos e sementes duras, e rastros branquiais desenvolvidos para filtração. Em ambiente natural, pode atingir cerca de 1 m de comprimento e mais de 30 kg (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998).

Este peixe é considerado, há mais de 15 anos, a melhor espécie para a aquicultura na Amazônia (OSTRENSKI, *et al.*, 2008), junto ao matrinxã (*Brycon amazonicus*) e ao pirarucu (*Arapaima gigas*). Esta excelência se deve ao ótimo desempenho produtivo do tambaqui em cultivo intensivo, facilidade na obtenção dos alevinos, rusticidade, produtividade mais elevada e fácil aceitação a ração comercial (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998; MELO *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2004).

Por sua importância ecológica, demanda comercial e reconhecido potencial para a piscicultura, tanto dentro como fora da Bacia Amazônica, esta espécie foi e é alvo de estudos sobre aspectos de sua ecologia, biologia, pesca, criação entre outros (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998). Em virtude do seu hábito onívoro, o tambaqui faz excelente uso de proteína tanto de origem animal como vegetal (OISHI, 2007).

Vários estudos mostraram o excelente desempenho do tambaqui em diferentes regimes de criação, desde o extensivo até o intensivo, apresentando todas as características desejáveis para tanto (CYRINO & GRÝSCHEK, 1997; ZANIBONI, 1997; LOVSHIN & CYRINO, 1998; MELO, *et al.* 2001; SILVA *et al.*, 2000). Por estas razões, atualmente é o peixe nativo mais produzido no Brasil e nos países amazônicos, também sendo criado no Panamá, Cuba, México, Estados Unidos, Tailândia, China, Taiwan e outros (GUERRA *et al.*, 1996; ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998).

1.3 Potencial de utilização de subprodutos do despulpamento de frutas na alimentação de peixes

As condições edafoclimáticas, propícias à fruticultura no Brasil, têm conferido, atualmente, excelentes índices de produção ao país, proporcionando ao mesmo configurar em segundo lugar no ranking de maior produtor mundial de frutas. A última estatística de produção de frutas brasileiras, datada de 2007, e registrada pelo Instituto Brasileiro de Fruticultura-IBRAF, computou uma produção de aproximadamente 43 milhões de toneladas de frutas. Naquele ano, de acordo com dados da FAO, citados em MENDES (2007), cerca de 40% do total das frutas processadas para produção de sucos e polpas são resíduos. Isso comprova o aumento da capacidade do processamento da agroindústria frutícola, contudo, os resíduos gerados oneram os custos operacionais da mesma, uma vez que requerem destino apropriado.

Quaisquer fatores que possam alterar os custos das rações influenciarão os custos finais de produção. Reduzi-los, significará ao piscicultor maior rentabilidade na atividade. Alguns estudos têm revelado ser possível o uso de resíduos vegetais como ingredientes em rações para peixes, com bons resultados no desempenho zootécnico dos mesmos (MORI-

PINEDO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2003; KAUSHIK *et al.*, 2004; KALITA *et al.* 2006; OISHI, 2007).

A maioria dos resíduos empregados nos estudos de digestibilidade aparente é proveniente das cascas e sementes, que são conhecidas por apresentarem diversos fatores antinutricionais (FRANCIS *et al.*, 2001; BARCELOS *et al.*, 2001). Estes são substâncias que dificultam ou impedem a utilização do alimento pelos animais, seus processos digestivos, podem afetar a saúde do animal, com reflexos no desempenho produtivo dos peixes (THORPE & BEAL, 2001).

O alto preço de mercado de alguns ingredientes utilizados na fabricação de ração constitui fator para o aumento dos custos com alimentação em piscicultura. Dependendo da região, em que se encontra o cultivo, esses custos podem ser mais altos ainda, exemplo típico da região Norte, distante dos principais pólos cerealistas do país. Uma alternativa à redução de custos com alimentação para peixes na região seria a utilização de ingredientes alternativos locais, de baixo valor comercial e elevados valores nutritivos, que possam substituir os ingredientes tradicionais.

1.3.1 Cupuaçu: seus subprodutos e uso

O cupuaçu, *Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann, pertence à Família *Sterculiaceae* a mesma do cacaueiro, e é originário da região amazônica, podendo ser encontrado em outras regiões do país. O nome cupuaçu provém da língua Tupi (kupu = que parece com cacau + uasu = grande), sendo o mais comum, contudo, recebe outras denominações como: pupu e pupuaçu no português e copasú, cupuasú e cacao blanco no espanhol (GONDIM *et al.*, 2001).

Ele é uma espécie arbórea com porte variando de 4 a 8 m de altura, quando em cultivos racionais, porém, em condições de bosque tropical úmido pode alcançar os 20 m de

altura. A floração é concentrada entre outubro-novembro, apresentando em média 3.500 flores, com taxa de “vingamento” de frutos baixíssima (0,5%), correspondendo entre 15 a 20 frutos maduros, comum entre espécies tropicais. Estes têm as características de drupa e de baga, apresentando-se de forma alongada e com as extremidades arredondadas, classificando-se em diferentes formatos. O comprimento varia de 12 a 25 cm e o diâmetro de 10 a 12 cm. Seu peso situa-se entre 500 e 4.500g, com média de 1.275g. As sementes estão dispostas no interior do fruto em cinco fileiras verticais, em média de 32 unidades por fruto, com diâmetro entre 2,0 a 3,5 cm, correspondendo a aproximadamente 20% do peso do fruto (GONDIM *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2004).

A polpa, que corresponde de 35% a 45% do peso do fruto, é ácida, de cor amarela, branca ou creme, de sabor e aroma agradáveis, sendo consumida, principalmente, na forma de suco, sorvete, picolé, creme, iogurte, doce, compota, bolo, licor e geléias dentre outras iguarias. A produção brasileira de polpa de cupuaçu se situa entre 12.000 e 15.000 t/ano, sendo que mais de 80% é oriunda de pomares comerciais (CARVALHO *et al.*, 2004).

A produção de cupuaçu apresenta-se concentrada na região Amazônica e tem como principais produtores os estados do Pará, Amazonas, Roraima e Acre. O Pará é o grande destaque de produção, sendo que a maior parte é proveniente do extrativismo e semi-extrativismo, em virtude de ser área de dispersão natural (MOREIRA, 2009). Em 2005, a produção de cupuaçu no Brasil chegou perto da casa de 200 milhões de frutas. Naquele mesmo ano, o estado do Amazonas produziu 20 milhões, correspondendo a 10% do total nacional e com crescimento da ordem de 16% em relação ao ano anterior (SETEC/MEC, 2007).

O valor econômico do cupuaçu está baseado, principalmente, na industrialização e comercialização da sua polpa, apreciada sob várias formas de processamentos culinários. Apesar de constituírem cerca de 20% do peso do fruto e possuírem alto valor nutritivo, as

sementes são praticamente descartadas no beneficiamento deste. Em função de suas propriedades, ela é considerada valiosa, pois possui semelhança botânica e química com a semente de cacau, possibilitando a sua utilização na fabricação de produtos similares ao chocolate e na indústria de cosméticos, por uso de sua gordura branca, bastante semelhante a da manteiga de cacau (CARVALHO *et al.*, 2004; COHEN *et al.*, 2005). O processo de industrialização das sementes de cupuaçu ocorre de modo semelhante ao das sementes de cacau, que inclui as etapas de fermentação, secagem e torração.

Após o despulpamento dos frutos, a semente passa pelo processo de fermentação (média de 7 dias), que é essencial, pois é a etapa responsável pelo desenvolvimento dos precursores e inúmeros compostos de sabor. O processo de fermentação das sementes inicia-se naturalmente pela ação da atividade microbiana na polpa mucilagínosa, que envolve a semente. Os produtos do metabolismo dos microrganismos principalmente álcool, ácidos orgânicos e o calor gerado nos primeiros dias de fermentação provocam a destruição do poder germinativo da semente e desencadeiam importantes transformações físico-químicas e estruturais (CARVALHO, 2004).

O processo de secagem, que se segue após o fermentativo, expõe as sementes ao sol, em secadoras de tela, por aproximadamente 15 dias. O processo é finalizado pela torrefação das sementes em secadora aquecida por caldeira. Logo após, as mesmas passam por uma prensa mecânica, para separação do óleo, extraindo-se aproximadamente 80% deste, gerando um resíduo denominado torta de cupuaçu, com aproximadamente 20,4% de extrato etéreo total e 19,5% de proteína bruta (PEREIRA, 2009), que serve como adubo e pode ser aproveitado para produção do cupulate (chocolate de cupuaçu). O óleo, após beneficiamento, segue para a indústria de cosméticos.

CARVALHO *et al.* (2008) caracterizaram o teor de proteína total e de aminoácidos totais de amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu, constatando alto valor biológico e maiores teores de aminoácidos indispensáveis (leucina, isoleucina e tirosina) em comparação às amêndoas de cacau, segundo LOPES *et al.*, (2008), e o escore do Institute of Medicine (2002).

O cupuaçu está entre as frutas nativas mais consumidas, com crescente procura tanto no Brasil como no exterior. Ela está inserida em programas agroflorestais e de arranjos produtivos de fruticultura na região Norte (ANDRADE *et al.*, 1998; SETEC/MEC, 2007). Estes programas, graças ao aumento da demanda, têm sido desenvolvidos sob a expansão da agroindústria de sua polpa, contudo, a produção do resíduo gerado pelo despulpamento também tem aumentado, representando um possível empecilho dessa atividade no futuro, com a geração de toneladas de lixo orgânico.

O aproveitamento do resíduo vegetal (a semente desengordurada), como ingrediente substitutivo em rações para peixes, poderá diminuir o impacto ambiental que a expansão da agroindústria de polpa de frutas poderá causar na região. Algumas pesquisas têm sido realizadas visando o aprimoramento da utilização do fruto do cupuaçuzeiro, em especial de sua semente (LOPES *et al.*, 2003; PEREIRA, 2009).

1.4 Digestibilidade

1.4.1 Considerações gerais

A maximização da aquicultura comercial está atrelada ao incremento do crescimento e sobrevivência, com menor custo possível, portanto, grande importância deve ser dada ao conhecimento fisiológico e metabólico dos organismos cultivados, definindo-se dietas comerciais adequadas aos requerimentos nutricionais de cada espécie íctica, considerando os diferentes estádios ontogênicos envolvidos ao longo do cultivo.

O alimento, após ingestão, passa por diversos processos que se combinam para proporcionarem a digestão propriamente dita, culminando com a absorção dos nutrientes e excreção dos resíduos do metabolismo. Processos mecânicos, químicos e microbianos estão envolvidos nessa tarefa, compreendendo, respectivamente, a mastigação, contrações do tubo digestivo, secreção enzimática nos diversos sucos digestivos do animal, e a atividade microbiana dos alimentos que também é enzimática, porém realizada por bactérias e protozoários presentes geralmente na porção final do tubo digestivo (ROTTA, 2003).

Diferentes componentes dos alimentos podem, em conjunto, apresentar percentagens corretas de nutrientes, contudo, podem não produzir um crescimento apropriado, devido a não disponibilidade dos mesmos (EZQUERRA *et al.*, 1997). As características e composição de cada alimento, assim como a morfologia do aparelho digestivo, da fisiologia de seu funcionamento e as condições ambientais são fatores de grande influência na eficiência da digestibilidade (LEE & LAWRENCE, 1997), e precisam ser melhor compreendidos seus mecanismos de influência e inter-relação.

ANDRIGUETTO *et al.* (1990) afirmaram que a digestibilidade de uma dieta é definida como a habilidade com que o animal digere e absorve os nutrientes contidos no alimento e é quantificada pela determinação dos coeficientes de digestibilidade daquele.

1.4.2 Digestibilidade *in vivo*

A determinação da digestibilidade dos nutrientes de uma matéria prima é o primeiro passo quando se pretende avaliar seu potencial de inclusão numa dieta para peixes (PEZZATO *et al.*, 2004). A digestibilidade de um ingrediente da ração depende principalmente de sua composição química aliada à capacidade digestiva da espécie estudada (MCGOOGAN & REIGH, 1996). Desta maneira, quanto mais digestíveis forem os nutrientes

de uma ração, maiores serão as suas disponibilidades para absorção e menores as quantidades excretadas pelo peixe (COSTA-PIERCE, 2002).

O potencial de um ingrediente em possibilitar crescimento aos peixes pode ser avaliado por experimentos de dose/resposta entre o nível de inclusão do ingrediente na ração e os índices de desempenho zootécnico. Por outro lado, a qualidade do ingrediente pode ser avaliada através de variáveis de desempenho que expressem quão eficientemente os nutrientes são retidos através do crescimento, o que freqüentemente envolverá a coleta de dados sobre o consumo de alimento e incremento corporal (JOBLING, 2001).

A maneira mais prática e comum de determinar a digestibilidade é a indireta. O método consiste na inclusão de uma substância inerte (marcador externo) na ração ofertada ao peixe e, na posterior coleta das fezes, marcadas para determinação, será obtido, por cálculo matemático, o percentual de nutrientes e energia absorvidos (JOBLING, 2001). Dentre os marcadores fecais externos, o óxido de cromo III (Cr_2O_3) se apresenta como o mais empregado em estudos de digestibilidade com peixes, com as vantagens de substituir a coleta total de fezes e proporcionar economia de tempo e custos (PEZZATO *et al.*, 2004)

Existem várias metodologias para coleta de fezes em estudos de nutrição com peixes. De acordo com SALLUM (2000), o seu desenvolvimento visa, principalmente, a contornar situações tais como o estresse dos animais pelo manuseio nos métodos de pressão abdominal, sucção anal, contenção em câmara metabólica ou alimentação forçada, o sacrifício dos animais do método de dissecação intestinal e a lixiviação de nutrientes e de energia, principalmente das fezes.

Em um estudo realizado por ABIMORAD & CARNEIRO (2004), foram avaliados quatro métodos de coleta de fezes (dissecação, extrusão, sistema de Ghelph e sistema de Ghelph modificado), e o tempo mais eficiente para coleta de fezes nos sistemas de Guelph, analisando o coeficiente de digestibilidade da proteína bruta de uma dieta para o pacu

(*Piaractus mesopotamicus*). Os autores relataram que todos os métodos estudados podem ser adotados com segurança para a espécie estudada, desde que sejam rigorosamente aplicados, e o intervalo de tempo entre as coletas de fezes em estudos de digestibilidade, por intermédio dos sistemas de Guelph, não deve ultrapassar 30 minutos. Como as informações obtidas com uma espécie não devem ser generalizadas exatamente para outras, devido a fatores específicos como comportamento e consistência das fezes, novos estudos deveriam ser realizados e podem ser tão importantes a ponto de impedir a utilização de determinados métodos.

KITAGIMA & FRACALOSSO (2010), objetivando determinar o coeficiente de digestibilidade aparente para o catfish americano (*Ictalurus punctatus*), com peso médio de 100 a 172 g, em intervalo de 6 h entre as coletas, observaram que a digestibilidade da proteína aumentou com intervalos de coleta de fezes de 1, 6 e 12 h, indicando aumento na lixiviação deste nutriente à medida que aumentou o tempo de exposição das fezes à água.

1.4.3 Digestibilidade *in vitro*

A tecnologia de determinação da digestibilidade *in vitro*, em estudos de nutrição de organismos aquáticos, surge como uma ferramenta capaz de prever o potencial de digestibilidade de cada componente ou mesmo da própria dieta formulada em pequenas quantidades destes, em pouco tempo de ensaio e com melhor custo-benefício (LEMOS *et al.*, 2004).

Os estudos iniciais de digestibilidade *in vitro* eram baseados na análise da ação de uma única enzima, contudo, estudos mais recentes têm demonstrado que análises de conjuntos enzimáticos, extraídos do aparelho digestivo dos peixes estudados, simulam de forma mais aproximada o sistema digestivo animal, com resultados que se correlacionam em maior intensidade com as análises de digestibilidade *in vivo* (CARTER *et al.*, 1999; CHONG *et al.*, 2002; LEMOS *et al.*, 2004).

A maioria dos trabalhos de digestibilidade *in vitro* foi realizada em animais homeotérmicos não sendo possível a extrapolação dos resultados para pecilotérmicos. Para os organismos aquáticos, já foram desenvolvidos diferentes métodos que analisam a digestibilidade protéica *in vitro*. Um destes métodos é o “pH-drop”, que apesar de suas qualidades, vem demonstrando superestimar os valores de digestibilidade de alimentos pobres em proteínas e subestimar amostras ricas em proteínas. Além disso, ele demonstrou ser influenciado pela capacidade tamponadora da suspensão protéica (DIMES & HAARD, 1994; EZQUERRA *et al.*, 1997).

EZQUERRA *et al.* (1997) desenvolveram uma metodologia alternativa para prever a digestibilidade da proteína para camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*): o “pH-stat”. As vantagens desse método, em relação ao pH-drop, são que, durante o processo de digestão, o pH é mantido constante, sem necessidade de um tampão fisiológico e a taxa de hidrólise protéica pode ser estimada durante o processo de digestão, através da avaliação dos dados obtidos na curva de titulação. Alguns trabalhos tem se valido dessa técnica (CAVALCANTI, 1998; LEMOS *et al.*, 2004; MOTIKAWA, 2006)

Apesar das técnicas *in vitro* de determinação da digestibilidade protéica de um alimento não poder substituir, na atualidade, os experimentos de digestibilidade aparente, já podem ser utilizadas como fonte de resultados do potencial de digestibilidade de cada componente ou mesmo da própria dieta formulada (FENERCI *et al.*, 2005; TOHEIM *et al.*, 2007).

Os ensaios *in vitro* podem ser diferenciados pela quantidade e tipo de enzima utilizada, condições de hidrólise, método de digestão fracionada e a forma como a hidrólise é testada (HIDALGO *et al.*, 1999).

LAZO *et al.*, 1998, avaliando três métodos *in vitro* para estimar a digestibilidade da proteína para o camarão branco (*Litopenaeus vannamei*), inclusive um simples sugerido por

eles, concluíram: utilizando a variação de pH do meio reativo (amostra + enzima) em comparação a uma fonte padrão de proteína, pode-se prever o grau de hidrólise das amostras analisadas com bom índice de significância e, quando comparado ao método *in vivo*, também há boa correlação, reafirmando sua qualidade como método *in vitro*.

Estudos recentes, aplicando diferentes metodologias *in vitro* inclusive a combinação entre as mesmas, foram realizados para determinar a digestibilidade da fração protéica de alimentos para peixes (MOYANO & SAVOIE, 2001; CHONG *et al.*, 2002; FENERCI & SENER, 2005; TONHEIM *et al.*, 2007).

1.5 Enzimas

As enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem como catalisadores biológicos, possibilitando e ou aumentando a velocidade das reações químicas no organismo. A estrutura molecular das enzimas é bastante frágil e, conseqüentemente, pode ser desnaturada por calor, álcalis, metais pesados e outros agentes oxidantes (NELSON & COX, 2002).

De acordo com estes mesmos autores, todas as enzimas possuem as seguintes características: não apresentam modificações ao final da reação, atuam em quantidades muito pequenas e aceleram a velocidade da reação sem modificar a posição de equilíbrio de uma reação reversível.

1.5.1 Enzimas digestivas em peixes e a microflora

As pesquisas têm mostrado uma ampla convergência entre as atividades digestivas nos peixes teleósteos adultos (BALDISSEROTTO, 2009) e as existentes nos vertebrados superiores, o que sugere que o equipamento enzimático é, em grande parte, análogo. As diferentes células glandulares do estômago secretam proteases (pepsina, tripsina,

quimiotripsina) e ácido clorídrico (ROTTA, 2003), sendo a pepsina dos peixes considerada análoga à dos mamíferos.

A digestão no intestino ocorre devido à ação de distintos produtos secretados pela parede intestinal e também por glândulas anexas (pâncreas e fígado). O pâncreas lança no intestino enzimas digestivas diversas: proteases, carboidrases e lipases. A bÍlis proveniente do fígado aporta, primordialmente, os sais biliares e parece ter uma composição e função análogas à bÍlis de vertebrados superiores (ROTTA, 2003).

Nos mamíferos, a amilase é produzida por células salivares ou pancreáticas, enquanto a única fonte de α -amilase em peixes parece ser o pâncreas exócrino, visto que os mesmos não possuem glândulas salivares. Alta atividade de amilase ocorre no fígado e biles de algumas espécies de carpa e goldfish que possuem hepatopâncreas (KROGDAHL *et al.*, 2005).

Várias enzimas intestinais envolvidas nos processos de digestão e absorção têm sido reportadas em tambaqui, como amilase, maltase, pepsina, tripsina e quimotripsina (CORRÊA *et al.*, 2007). A atividade das carboidrases no trato digestório de peixes parece ser diretamente associada ao nível de carboidrato na dieta (MORAES & BIDINOTTO, 2000). Como outros peixes onÍvoros, o tambaqui apresenta maior atividade de carboidrase do que de protease e uma pequena atividade de lipase, comparada aos peixes carnÍvoros (KUZ'MINA *et al.* 1996; LUNDSTEDT, 2003; MELO, 2004).

Existem enzimas que não são secretadas, mesmo na presença de substrato. Entre estas enzimas, destacam-se a celulase, a hemicelulase, a xilanase e a fitase, dentre outras. Essas enzimas não são secretadas devido ao fato de os monogástricos não possuírem os respectivos genes responsáveis (PENZ JÚNIOR, 1998).

A microbiota aquática exerce um importante papel na formação da microbiota do trato digestivo dos peixes, pois estes estão em constante contato com a água (STROM &

OLAFSEN, 1999). Sendo rico em nutrientes, o ambiente do trato digestivo de peixes, em comparação com o da água, confere um ambiente mais favorável para o crescimento dos microorganismos. Recentemente, diversas comunidades microbianas têm sido reportadas no intestino de peixes de várias espécies (BAIRAGI *et al.*, 2002; GHOSH *et al.*, 2002).

Enzimas provenientes dessa microflora intestinal podem ter um papel significativo no processo de digestão, especialmente para substratos como a celulose, que poucos animais podem digerir e também para outros substratos (DE SILVA & ANDERSON, 1998).

Assim como as dietas geralmente são compostas por carboidratos resistentes às enzimas digestivas endógenas (ANNISON, 1993), a fermentação microbiana e a síntese de nutrientes são mecanismos importantes para os organismos que utilizam dietas ricas em fibra (DE SILVA & ANDERSON, 1998).

O uso de ingredientes de origem vegetal como fonte de proteína não convencional, para substituir a onerosa farinha de peixe na formulação de dietas para peixes, dá origem a uma nova área de pesquisa para produzir alimentos com uma melhor relação custo/benefício. Devido ao aumento da escassez de farinha de peixe de boa qualidade, pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de analisar o valor nutricional de ingredientes de origem vegetal e aumentar a biodisponibilidade de nutrientes por meio da degradação fermentativa (SAHA *et al.*, 2006).

1.5.2 Proteases

A digestão das proteínas em peixes começa no estômago. O ácido clorídrico produzido pela mucosa estomacal ativa o pepsinogênio, transformando-o na enzima pepsina, que apresenta ótima atividade em pH 2. Esta endopeptidase apresenta importância diferenciada entre carnívoros e herbívoros, proporcionando, respectivamente, o início da digestão das

proteínas por atacarem suas ligações peptídicas e capacitação da decomposição da clorofila e quebra das paredes celulares das algas verde-azuladas (ROTTA, 2003).

CORRÊA *et al.*, 2007, estudando o efeito do aumento dos teores de milho numa dieta para tambaqui, observaram que somente as proteases ácidas atuaram na digestibilidade da proteína dietética, supondo que a ação destas estava diretamente relacionada com os teores protéicos da dieta.

Na superfície luminal do intestino são produzidas as peptidases que são classificadas em aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases as quais liberam os aminoácidos livres e peptídeos. Existem também as que atuam sobre os ácidos nucléicos, as nucleotidases, liberadas pelo suco pancreático. As proteases de origem pancreática e intestinal apresentam maior atividade em condições alcalinas (HIDALGO *et al.*, 1999). Essas enzimas são liberadas pelo pâncreas no início do intestino e nos cecos pilóricos (ROTTA, 2003).

As proteases alcalinas, tripsina e quimotripsina, parecem ser normalmente restritas a algumas partes do trato digestório, como ocorreu em estudos com *Lates calcarifer* (SABAPATHY & TEO, 1993) e *Colossoma macropomum* (CORRÊA, 2007), em que os autores as observaram atuando somente nos cecos pilóricos e intestino dessas espécies.

A Tabela 1 mostra algumas proteases caracterizadas e encontradas em diferentes porções do trato digestório de algumas espécies de peixes, segundo os respectivos autores que as caracterizaram.

Tabela 1. Proteases ácidas e alcalinas encontradas em diferentes partes do trato digestório de espécies de peixes.

Espécie	Órgão	Proteases Alcalinas	Proteases Ácidas	Referência
<i>Cyprinus carpio</i> <i>Carassius auratus</i> <i>Sparus aurata</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cecos pilóricos e intestino	Proteases alcalinas totais		Hidalgo <i>et al.</i> (1999)
<i>Caranx hippos</i> <i>Pseudopeneus maculatus</i> <i>Sparisoma sp</i> <i>Hoplias malabaricus</i>	Cecos pilóricos e intestino	Serina protease e Cisteína Protease		Alencar <i>et al.</i> (2003)
<i>Sardinops sagax caerulea</i>	Estômago		Áspártico protease	Catillo-Yáñez <i>et al.</i> (2004)
<i>Colossoma macropomun</i>	Cecos pilóricos e intestino	Tripsina e Quimotripsina		Corrêa <i>et al.</i> (2007)

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **R. Bras. Zootec.**, v. 33, n. 5, p. 1101-1109, 2004.

ALENCAR, R. B.; BIONDI, M. M.; PAIVA, P. M. G. *et al.* Alkaline Proteases from the Digestive Tract of Four Tropical Fishes. **Braz. J. Food Technol.**, v.6, n.2, p. 279-284, 2003.

ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; HOCHACHKA, P. W. Hypoxia tolerance in amazonian fishes: status of an under-explorer biological “goldmine”. In: HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P. L.; SICK, T.; *et al.* (Eds). **Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation**. CRC Press. Boca Ratón. p. 438-445, 1993.

ANDRADE, F. G. de; SÁ, C. P. de; ALMEIDA, N. F. de. **Uma visão prospectiva do cupuaçu nos limites do Acre: vilas Nova Califórnia e Extrema, RO**. Rio Branco: Embrapa-CPAF/AC. Circular Técnica 21.18p, 1998.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMEAL, A.; FLEMING, J. S.; SOUZA, G. A.; BONA FILHO, A. 1990. **Nutrição Animal: As bases e os fundamentos da nutrição animal – os alimentos**. 4 ed. São Paulo : Nobel, v. 1, 1990.

ANISSON, G. The role of wheat non-starch polysaccharides in broiler nutrition. **Australian Journal Agriculture Research**, v. 44, n. 3, p. 405-422, 1993.

ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Sociedade Civil Mamirauá/CNPq. Tefé, AM. BRASIL. 187p., 1998.

BAIRAGI, A.; SARKAR GOSH, K.; SEM, S. K.; RAY, A. K. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v. 10, n. 2, p. 109-121, 2002.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à Piscicultura**. 2º ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2009. 352p.

BARCELOS, A. F.; PAIVA; P. C. de A., PÉREZ, J. R. O. ; SANTOS, V. B. dos; CARDOSO, R. M. Fatores Antinutricionais da casca e da polpa desidratada de café (*Coffea*

arabica L.) armazenadas em diferentes períodos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p.1325-1331, 2001.

BATISTA, V. da S. **Distribuição, dinâmica da frota e dos recursos pesqueiros da Amazônia Central**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas, 1998. 291p. Tese (Doutorado em Biologia), 1998.

BOONYARATPALIN, M.; SURANEIRANAT, P.; TUNPIBAL, T. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*. **Aquaculture**, v.161, p. 67-78, 1998.

BUREAU, D. P., HARRIS, A. M., CHO, C. Y. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.180, p.345–358, 1999.

CARTER, C. G; BRANSDEN, M. P.; VAN BARNEVELD, R. J.; CLARKE, S. M. Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: in vitro digestibility. **Aquaculture**, v. 179, p.57-70, 1999.

CARTER, C. G., HAULER, R. C. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Aquaculture**, v. 185, p. 299-311, 2000.

CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F.; KIESSLING, A.; JOBLING, M. Physiological effects of feeding. In: Houlihan, D. F.; Boujard, T.; Jobling, M. (eds). **Food Intake Fish**. Blackwell Science. p. 297-331, 2001.

CARVALHO, J. E. U. de; MULLER, C. H.; ALVES, R. M.; NAZARÉ, R. F. R. de. **Cupuaçuzeiro**. Comunicado Técnico /EMBRAPA, 115p. 2004.

CARVALHO, A. V. **Extração, concentração e caracterização físico-químicas e funcionais das proteínas da semente de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Shum.)** – Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004, 151p. Tese (Doutorado em Tecnologia dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2004.

CASTAGNOLLI, N. Piscicultura intensiva e sustentável de espécies nativas brasileiras. In: CYRINO, E. E KUBITZA, F (Eds). Campinas-SP. **Anais do I Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Peixes**. p. 117-130, 1997.

CASTILLO-YANEZ, F. J.; PACHECO-AGUILAR, R. N.; GARCIA-CARRENO, F. L. *et al.* Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. **Food Chemistry**, v. 85, p. 343–350, 2004.

CAVALCANTI, C. de A. **Proteases digestivas em juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Pisces:Characidae) e aplicação da técnica de digestibilidade in vitro.** Florianópolis:Universidade Federal de Santa Catarina, 1998, 101p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

CHENG, Z. J.; HARDY, R. W.; USRY, J. L. Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and apparent digestibility coefficients of nutrients. **Aquaculture**, v. 215, n. 1-4, p.255-265, 2003.

CHONG, A. S. C.; HASHIM, R.; ALI, A. B. Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using *in vivo* and *in vitro* methods. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p.229-238, 2002.

CLAY, J. W.; CLEMENT, C. R. **Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian forests.** FAO, Rome.18p, 1993.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Estudo do liquor de cupuaçu. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, SP, v. 25, n. 1, p. 182-190, 2005.

CORREA, C. F.; AGUIAR, L. H. de; LUNDSTEDT, L. M.; MORAES, G. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 857-862, 2007.

COSTA-PIEARCE, B. A. Farming systems research and extension methods for the development of sustainable aquaculture ecosystems. *In*: Costa-Pearce, B.A. (Eds). **Ecological aquaculture, the evolution of the blue revolution.** Blackwell Science Ltd. Oxford, UK. p. 103-124, 2002.

CYRINO, J. E. P.; GRÛSCHEK, J. M. B. Perspectivas da piscicultura como agroindústria no Brasil. *In*: Cyrino, E. e Kubitza, F (Eds). Campinas – SP. **Anais do I Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Peixes.** p.1-30,1997.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Químicas.** 4 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1007 p. 1998.

DIMES, L. E.; HAARD, F. M. Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). **Comp. Biochem. Physiol.** v.108 A, p.349-362, 1994.

EZQUERRA, J. M.; GARCIA-CARREÑO, F. L.; CIVERA, R.; HAARD, N. F. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture**, v.157, p.251-262, 1997.

FENERCI, S.; SENER, E. *In vivo* and *in vitro* protein digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) fed steam pressured or extruded feeds. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.5, p.17-22, 2005.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, v.199, p.197-227, 2001.

GHOSH, K.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Characterization of Bacilli isolated from the gut of rohu *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 12, n. 1, p. 33-42, 2002.

GOMES, L., BRANDÃO, F., CHAGAS, E., BARRONCAS, M. F., LOURENÇO, N. Efeito do volume do tanque-rede na produtividade do tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a recria. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 1, p. 111-113, 2004.

GONDIM, T. M. de S.; THOMAZINI, M. S.; CAVALCANTE, M. de J. B.; SOUZA, J. M. L. de. 2001. **Aspectos da produção de cupuaçu**. Rio Branco: Embrapa Acre, 43 p. (Embrapa Acre. Documentos Técnicos, 67).

GUERRA, H.; ALCÁNTARA, F.; CAMPOS, L. **Piscicultura Amazônica com Espécies Nativas**. Lima: TCA Impressão Mirigriff S.R.L. 169 p, 1996.

HALVER, J. E. & HARDY, R. W. Nutrient flow and retention. In: Halver, J. E.; Hardy, R. W. (eds). **Fish Nutrition**. 3 ed., Academic Press, p. 755-770, 2002.

HARDY, R. W. Aquaculture's rapid growth requirements for alternative protein sources. **Feed Management**, v.58, p.25-28,1999.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, v.170, p.267-283, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF. **Produção brasileira de frutas – 2007/ Estatísticas**. Disponível em <<http://www.ibraf.org.br>>. Acesso em 13 de julho de 2011.

JOBLING, M. Feed composition and analysis. In: HOULIHAN, D.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (Eds.). **Food intake in fish**. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK. p. 1-24, 2001.

JOMORI, R. K. ; CARNEIRO, D. J. ; MARTINS, M. I. E. G.; PORTELLA, M. C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v.243, p.175-183, 2005.

KALITA, P.; MUKHOPADHYAY, P. K.; MUKHERJEE, A. K. Evaluation of the nutritional quality of four unexplored aquatic weeds from northeast India for the formulation of cost-effective fish feeds. **Food Chemistry**, doi: 10.1016/j. foodchem.2006.08.007.2006.

KAUSHIK, S. J.; COVES, D.; DUTTO, G.; BLANC, D. 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, p.391-404, 2004.

KROGDAHL, A.; HEMRE, G. I.; MOMMSEN, T. P. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 103-122, 2005.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. Jundiaí:USP, 3.ed., 123 p, 1999.

KUZ'MINA, V. V. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. **Aquaculture**, v. 148, p. 25-37, 1996.

LAZO, J. P.; ROMAIRE, R. P. REIGH, R. C. Evaluation of three *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 29, n. 4, p. 441-450, 1998.

LEE, P. G.; LAWRENCE, A. L. Digestibility. In: Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture. **Anais**. Louisiana: CNWA, v. 1, p. 194-260, 1997.

LEMOS, D.; EZQUERRA, J. M.; GARCIA-CARREÑO, F. L. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. **Aquaculture**, v.186, p.89-105, 2000.

LEMOS, D.; NAVARRETE DEL TORO, A.; CÓRDOVA-MURUETA, J. H.; GARCIA-CARREÑO, F. Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: in vitro determination of protein digestibility and proteinase inhibition. **Aquaculture**, v. 239, p.307-321, 2004.

LOPES, A. S.; GARCÍA, N. H. P.; VASCONCELOS, M. A. M. Avaliação das Condições de Torração Após a Fermentação de Amêndoas de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e Cacao (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p.309-316, 2003.

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

LOVSHIN, L.; CYRINO, J. Status of commercial fish culture in Brazil. **Magazine World Aquacult.**, v. 29, n.3, p.23-28, 36-39, 1998.

LOWE-MC-CONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo:USP, 535 p. 1999.

LUNDSTEDT, L. M. **Aspectos adaptativos dos processos digestivos e metabólicos de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2003. 103 p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, 2003.

MAY, H. P. **A survey of environmentally friendly products of Brazil**. United Nations conference on trade and development management of commodity resources in the context of sustainable development. UNCTAD/ITCD/COM/10, 68 p, 1997.

MCGOOGAN, B. B.; REIGH, C. R. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum *Sciaenops ocellatus* diets. **Aquaculture**, v.141, p. 233-244, 1996.

MELO, L. A. S.; IZEL, A. C. U.; RODRIGUES, F. M. **Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. BRASIL. 30p, 2001.

MELO, J. F. B. **Digestão e metabolismo de jundiá *Rhamdia quelen* submetido a diferentes regimes alimentares.** São Carlos:Universidade Federal de São Carlos, 2004, 80p. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Fisiologia) – Universidade Federal de São Carlos, 2004.

MENDES, C. Q.; GILAVERTE, S. **Subprodutos da agroindústria de frutas como alternativa na alimentação de ovinos.** In: Fazendaboipreto. <http://fazendaboipreto.blig.ig.com.br/2007/07/subprodutos-da-agroindustria-de-frutas-como-alternativa.html>. Acesso em 13 de julho de 2011.

MEROLA N.; PAGAN-FONT F. A. Pond culture of the amazon fish tambaqui, *Colossoma macropomum* - a pilot-study. **Aquacultural Engineering**, v.7, n.2, p.113-125, 1988.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. **Produção pesqueira e aquícola. Estatística 2008 e 2009.** Disponível em <<http://www.mpa.gov.br>>. Acesso em 13 de julho de 2011.

MORAES, G.; BIDINOTTO, P. M. Induced changes in the amylohydrolitic profile of the gut of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1885) fed different contents of soluble carbohydrate; its correlation with metabolic aspects. **Revista de Ictiologia**, v. 8, n. 1/2, p. 47-51, 2000.

MORI-PINEDO, L. A. **Determinação das exigências protéico calóricas de alevinos de tambaqui *Colossoma macropomum*, Cuvier 1818 (Pisces, Serrasalminidae).** Manaus:Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1999, 168p. Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1999.

MOREIRA, J. da S, de A. **Desidratação de polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) em estufa com circulação de ar forçado.** Rio Branco: Universidade Federal do Acre, 2009, 84 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Acre, 2009.

MOTIKAWA, S. **Digestibilidade proteica de rações comerciais para o camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* Pérez-Farfante 1967:avaliação por métodos in vitro e in vivo.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006, 78p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade de São Paulo, 2006.

MOYANO, F. J.; SAVOIE, L. Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 128, p. 359-368, 2001.

NAYLOR, R. L.; GOLDBURG, R. J.; PRIMAVERA, J. H.; *et al.* Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1017-1024, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 978 p., 2002.

PENZ JÚNIOR, A. M. Enzimas em rações para aves e suínos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu-SP. **Anais...** Botucatu-SP, 1998. p. 165-178.

PEREIRA, E. M. de O. **Torta de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) na alimentação de ovinos**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2009. 119p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, 2009.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical e intensiva**. 1 ed. São Paulo, TecArt, v. 1, p. 175-169, 2004.

OISHI, C. A. **Resíduo da castanha da Amazônia (*Bertholletia excelsa*) como ingrediente em rações para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2007, 71p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2007.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília-DF. 276 p, 2008.

ROBAINA, L.; IZQUIERDO, M. S.; MOYANO, F. J.; *et al.* Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. **Aquaculture**, v.130, p. 219-233, 1995.

ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Documentos 53/EMBRAPA, ISSN. 1517-1973, 49p, 2003.

ROUBACH, R. **Uso de frutos e sementes de florestas inundáveis na alimentação do tambaqui *Colossoma macropomum***. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1991, 81p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1991.

SABAPATHY, U.; TEO, L. H. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea brass, *Lates calcarifer*. J. **Fish Biol**, v. 42, p. 595-602, 1993.

SAHA, S.; ROY, R. N.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Characterization of cellulose producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2006.

SALLUM, W. B. **Óxido de crômio III como indicador externo em ensaios metabólicos para o matrinxã (*Bycon cephalus*, Gunther 1869) (Teleostei, Characidae)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000, 116f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2000.

SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. **Aquaculture**, v. 54, p. 205-240, 1986.

SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA - SETEC/MEC. **Cupuaçu**. Cartilha Temática. Brasília, DF. 29 p, 2007.

SILVA, S. S. de; ANDERSON, T. A. **Fish nutrition in aquaculture**. London: Ipswich Book Company Ltd, Suffolk, UK, 319p, 1998.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Seasonal variation of nutrients and energy in tambaqui's (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1828) natural food. **Rev. Bras. de Biologia**, v. 60, n.4, p. 200-208, 2000.

SILVA DA, J. A. M.; FILHO, M. P.; OLIVEIRA-PEREIRA DE, M. I. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) incorporados em rações. Digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal. **R. Bras. Zootec.**, v.32, n. 6, p. 1815-1824, 2003.

SMITH, L. S. Digestive functions in teleost fish. In: HALVER, J. E. (Ed.). **Fish nutrition**. 2. ed. London: Academic Press, p. 332-423, 1989.

STROM, E.; OLAFSEN, J. A. The indigenous microflora of wildcaptured cod in net-pen rearing. In: **Microbiology of Poecilotherms**. 1999.

THORPE, J.; BEAL, J. D. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. In: Bedford, M.R.; Partridge, G.G. (Ed). **Enzymes in farm animal nutrition**. CAB International, UK. p. 125-143, 2001.

TONHEIM, S. K.; NORDGREEN, A.; HOGOY, I.; HAMRE, K.; RONNESTAD, I. 2007. In vitro digestibility of water-soluble and water-insoluble protein fractions of some common fish larval feeds and feed ingredients. **Aquaculture**, v. 262, p. 426-435,2007.

VINATEA, J. E.; VEGA, A. L. **Piscicultura tropical, peces exóticos e nativos**. Lima:Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 341 p., 1995.

ZANIBONI FILHO, E. **Piscicultura das espécies nativas de água doce**. Apostila da disciplina de Piscicultura. Dpto. de Aquicultura-CCA. UFSC. Florianópolis. SC. BRASIL. 20 p., 1997.

CAPÍTULO I

**DIGESTIBILIDADE APARENTE DA TORTA DE CUPUAÇU
(*Theobroma grandiflorum*) VISANDO SUA INCLUSÃO EM RAÇÃO
PARA JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

DIGESTIBILIDADE APARENTE DA TORTA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*) VISANDO SUA INCLUSÃO EM RAÇÃO PARA JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Resumo: O estudo teve como objetivo avaliar a digestibilidade aparente de um ingrediente alternativo (torta de cupuaçu), visando seu uso substitutivo protéico em rações para juvenis de tambaqui. Duzentos juvenis de tambaqui, peso médio $87,2 \pm 6,3$ g, foram distribuídos em 10 cones de fibra de vidro, adaptados para estudos de digestibilidade, com circulação de água e aeração constantes, por 60 dias. O delineamento experimental constou de dois tratamentos: ração comercial (T0) e ração comercial com inclusão de 30% de farinha de torta de cupuaçu (T1), com 5 repetições. Diariamente, às 8:00 h, foram monitoradas as variáveis físico-químicas da água (oxigênio dissolvido, pH, temperatura e condutividade). Utilizou-se o método indireto para avaliação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA), com a inclusão de 0,5% de óxido de cromo (Cr_2O_3) nas rações experimentais. Os resultados revelaram os seguintes CDAs: 85%, 95%, 89% e 89% para matéria seca (MS), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB) e carboidratos (ENN), respectivamente, para a ração comercial; 66%, 94%, 71% e 69%, para os mesmos nutrientes estudados, para a ração comercial com inclusão de 30% de torta de cupuaçu. Os CDAs dos principais nutrientes estudados foram reduzidos com a inclusão de 30% de torta de cupuaçu em uma ração comercial, mostrando que esse nível de inclusão, segundo as condições desse ensaio, é inadequado para nutrição de juvenis de tambaqui.

Palavras-chave: Piscicultura, nutrição animal, proteína vegetal, ingrediente alternativo

APPARENT DIGESTIBILITY OF PIE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*) AIMING FOR INCLUSION IN FEED FOR JUVENILES TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Abstract: This study aimed to evaluate the apparent digestibility of an alternative ingredient (cupuaçu pie), to use protein substitute in diets for juvenile tambaqui. Two hundred juvenile tambaqui, average weight 87.2 ± 6.3 g were distributed in 10 glass-fiber cones, adapted for digestibility studies with water circulation and aeration constant for 60 days. The experimental design consisted of two treatments: commercial diet (T0) and commercial diets with inclusion of 30% flour pie cupuaçu (T1), with five repetitions. Every day at 8:00 am, were monitored physico-chemical variables of water (dissolved oxygen, pH, temperature and conductivity). We used the indirect method to evaluate the apparent digestibility coefficients (ADC), with the inclusion of 0.5% chromium oxide (Cr_2O_3) in the experimental diets. The results revealed the following VDCs: 85%, 95%, 89% and 89% for dry matter (DM), ether extract (EE), crude protein (CP) and carbohydrates (NFE), respectively, for the commercial feed; 66 %, 94%, 71% and 69% for the same nutrients studied, for the inclusion of commercial diets with 30% cupuaçu pie. The ADCs of the main nutrients studied were reduced with the inclusion of 30% of the pie cupuaçu a commercial diet, this test tambaqui, and inadequate nutrition of this species.

Keywords: fish farming, animal nutrition, plant protein alternative ingredient

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira vem apresentando um ritmo crescente de produção, acompanhando à tendência mundial aquícola (FAO, 2009). Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (2010), ela, sozinha, apresentou um crescimento de 60,2% em 2008 e 2009, em comparação com 2007.

Na região amazônica, a produção de peixes em cativeiro tem sido vista como uma das mais promissoras nesta atividade, tendo apresentado no ano de 2007 um crescimento de 18,3%, sendo maior que o registrado para as regiões Sul (2,6%) e Sudeste (-1,3%), estando em terceiro lugar logo após o Nordeste (22%) e o Centro-Oeste (18,5%) do país (IBAMA, 2007).

Em piscicultura intensiva, a alimentação representa uma parte importante nos custos dos cultivos, contribuindo com 40 a 60% dos custos operacionais (CHENG *et al.*, 2003), podendo ser maior, dependendo da região, do sistema aplicado ou da espécie cultivada. O uso de alimentos de má qualidade associado a estratégias de alimentação inadequadas correspondem à grande parte dos problemas de qualidade da água de cultivo, potencializando, assim, o aumento dos custos operacionais (KUBITZA, 2003).

Estudos sobre exigências nutricionais das espécies aquáticas, que visam diminuir os impactos ambientais e o custo dos alimentos, têm se tornado indispensáveis para o desenvolvimento da aquíicultura (MUÑOZ-RAMIREZ & CARNEIRO, 2002).

As cascas e as sementes são as fontes de resíduos vegetais mais empregados em estudos de digestibilidade aparente animal, no entanto, apresentam vários fatores antinutricionais (FRANCIS *et al.*, 2001) e elevados teores de fibra bruta (NRC, 1993; KAUSHIK *et al.*, 2004), que são componentes químicos presentes nestas matérias primas e seus teores exercem grande influência sob o aproveitamento digestivo da dieta pelos animais, podendo ainda comprometer a saúde física e o desempenho produtivo.

Resultados de estudos realizados com tambaqui por diferentes autores demonstram a possibilidade de substituição total de alimentos de origem animal, notadamente a farinha de peixe, por ingredientes de origem vegetal sem grandes prejuízos ao desempenho dos animais, comprovando que espécies onívoras são capazes de utilizar, de forma eficiente, diferentes fontes de proteína dietética, convertendo-as em proteína corporal (VIDAL JR. *et al.*, 2004; PEREIRA JR., 2006; OISHI, 2007, ANSELMO, 2008).

A agroindústria de frutas tem crescido bastante no Brasil nos últimos anos (IBRAF, 2007). Do total de frutas processadas, 40% são resíduos que precisam de um destino apropriado (MENDES, 2007). Baseado nesse percentual de resíduos gerados, o Estado do Amazonas, que produziu 20 milhões de frutos de cupuaçu, em 2005 (SETEC/MEC, 2007), gerou aproximadamente 8 milhões de toneladas do resíduo torta (semente desengordurada), que a agricultura do estado sozinha não comporta absorver como insumo agrícola.

A região amazônica não produz, nas quantidades necessárias, os ingredientes tradicionais utilizados em rações para peixes e o que é importado apresenta características que dificultam seu armazenamento por longos períodos. Uma alternativa na região, para baratear os custos com alimentação para peixes, seria a utilização de ingredientes alternativos locais.

Diante das considerações acima, objetivou-se avaliar a digestibilidade aparente da torta de cupuaçu, resíduo da agroindústria dessa fruta, visando seu uso em ração para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado nas dependências da Coordenação de Pesquisa em Aqüicultura – CPAQ, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

2.1 Beneficiamento da Torta de Cupuaçu em Farinha para as Rações

A amêndoa semi-desengordurada de cupuaçu (torta), resíduo proveniente da agroindústria de polpa de frutas existente em Manaus, foi a matéria prima utilizada nos estudos de digestibilidade *in vivo*. Ela foi obtida junto à empresa Cupuama, localizada na cidade do Castanho, no município do Careiro-AM.

O processamento da torta se iniciou com uma extração máxima da polpa que recobre as sementes, seguido do depósito destas em caixas de madeira (190cm x 120cm x 60cm), com fundo telado, permanecendo por aproximadamente 3 dias, para redução do teor de umidade. Cada caixa foi coberta por plástico, para proteção contra chuva. Esta pré-secagem foi seguida pelo processo de fermentação através de inóculo com levedura, sendo favorecida sua retenção de calor, por cobertura de cada caixa com sacos de aniagem. A fermentação durou aproximadamente 7 dias, com revolvimento diário das sementes. Em seguida, estas foram acondicionadas em secadores solares, durante 4 dias, com revolvimento por duas vezes ao dia, visando remoção uniforme da umidade e impedimento de proliferação de mofo, ficando assim até obtenção de produto com aproximadamente 93% de matéria seca.

As etapas seguintes foram de quebra grosseira das amêndoas, torrefação em forno industrial, por 50 minutos, com temperatura regulada para 100° C e prensagem, para extração do óleo vegetal, em prensa mecânica com eixo helicoidal e capacidade de processamento de 300 kg de amêndoas por hora. Finalmente, o óleo extraído desse processo foi filtrado e armazenado em galões plásticos, sendo a torta recolhida e ensacada.

Ao chegar a Coordenação de Pesquisa em Aqüicultura, a torta foi moída em moinho elétrico, com matriz de seleção inferior a 1 mm. Após a moagem, o produto obtido (farinha) foi acondicionado em saco de rafia, sob refrigeração a 25° C. Uma amostra foi retirada e enviada para análise de composição centesimal.

2.2 Elaboração da Ração Teste

Com o intuito de se determinar a digestibilidade aparente do ingrediente teste (torta de cupuaçu), as rações utilizadas no experimento foram obtidas segundo metodologia descrita por BUREAU *et al.*, (1999), que recomenda a inclusão de 30% do ingrediente teste em uma ração comercial base.

Dois sacos de uma ração comercial de 25 kg foram adquiridos no comércio varejista de Manaus. Um foi utilizado como ração controle e o outro como base para ração teste.

Para obtenção da ração teste, foram retirados 7,5 kg de ração comercial, do peso total do saco e inseridas as mesmas medidas de torta de cupuaçu. A seguir, cada ração foi moída e misturada em betoneira, por 20 minutos, para homogeneização do produto. Após a moagem, 0,5% de óxido de cromo III foi adicionado para determinação das digestibilidades.

Por fim, cada ração foi peletizada e a secagem do produto final foi feita em estufa, com circulação forçada de ar, com temperatura interna de 55° C, por 12 h. As rações foram conservadas em sacos de rafia e armazenadas em ambiente com temperatura de 25° C.

2.3 Manejo dos Peixes

Os peixes foram adquiridos na fazenda comercial Santo Antônio, Rio Preto da Eva/AM, e transportados até a CPAQ - INPA.

Quatrocentos juvenis de tambaqui, com peso médio de 35 g, foram previamente aclimatados às condições experimentais, por 15 dias, em tanque de alvenaria (4m³), com

renovação de água e aeração constante. Os parâmetros de qualidade de água (oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e pH) foram monitorados diariamente às 8:00 h.

Os animais foram alimentados com ração comercial com 32% de proteína bruta, duas vezes ao dia (9:00 h e 16:00 h), até a saciedade aparente. Findo o prazo de aclimatação, os peixes passaram por uma biometria inicial, separados em lotes homogêneos quanto ao peso, e levados para os cones de digestibilidade.

As unidades experimentais (10) constaram de cones de fibra de vidro (200 L de volume útil) adaptados com um sistema coletor de fezes (SCF) em sua porção inferior. Estes foram abastecidos com água de poço artesiano, com taxa de renovação diária de cinco vezes do volume total, e aeração constante. Os parâmetros de qualidade de água (oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e pH) foram monitorados diariamente às 8:00 h. Em cada unidade experimental, foram colocados 20 peixes que eram alimentados duas vezes ao dia (9:00 h e 16:00 h) até a saciedade aparente.

2.3.1 Biometria

Dois biometrias foram feitas durante o experimento, sendo uma no dia de transferência dos peixes para os cones e a outra no último dia de criação. O peso dos animais foi obtido em balança digital, com meio grama de precisão.

Para reduzir o estresse durante o manejo biométrico, os peixes foram anestesiados com anestésico 2-phenoxyethanol (5mL/20L de água).

2.4 Critérios de Avaliação da Digestibilidade

2.4.1 Método de Coleta de Fezes por Decantação

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9:00 h e 16:00 h). Durante esse intervalo de alimentações, três colheitas de fezes foram realizadas, uma antes da primeira alimentação do dia, a segunda 4 horas depois da primeira alimentação e a terceira colheita foi

realizada antes da última alimentação do dia. O excesso de água encontrado no recipiente coletor de fezes era descartado de forma que se obtivesse maior volume fecal possível.

As fezes foram homogeneizadas em potes plásticos, separados 1 para cada cone, totalizando 10 potes, congelados em freezer, e finalmente enviados para liofilização e análises bromatológicas.

O período de coleta iniciou-se após 10 dias de adaptação dos animais aos cones de digestibilidade e durou o tempo necessário para que se juntasse a quantidade aproximada de 100 gramas por pote de coleta para as análises centesimais.

2.4.2 Determinação dos Coeficientes de Digestibilidade

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e extrato não nitrogenado dos nutrientes das rações experimentais foram calculados segundo JOBLING (2001).

$$A = 100 - 100[(X_A / X_B) \times (Y_B / Y_A)], \text{ Onde:}$$

A = digestibilidade

X_A = concentração de marcador na ração

X_B = concentração de marcador nas fezes

Y_A = concentração de nutriente na ração

Y_B = concentração de nutriente nas fezes.

Os coeficientes de digestibilidade aparente da torta de cupuaçu foram calculados segundo BUREAU *et al.* (1999).

$$CDA_{IT} = CDA_{DT} + [(CDA_{TI} - CDA_{DC}) \times (0.7 \times D_R / 0.3 \times D_I)], \text{ Onde :}$$

IT = ingrediente testado

DT = dieta testada

DP = dieta controle

R=% do nutriente (ou kJ/g energia bruta) da dieta testada

I= % do nutriente (ou kJ/g energia bruta) do ingrediente testado.

2.5 Análises Químico-Bromatológicas

As análises da composição centesimal das amostras da torta de cupuaçu, das rações experimentais (Tabela 2) e das fezes coletadas foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Peixes da CPAQ – INPA, conforme metodologia descrita pela A.O.A.C (1997).

Tabela 2. Análise químico-bromatológica (%) das diferentes rações e do ingrediente.

AMOSTRAS	UM	CZ	EE	PB	FB	ENN
R. Comercial ⁽¹⁾	6,6	10,5	3,5	32	3,5	48,1
R. Cupuaçu (30%)	7,1	9,4	5,3	27,8	5,3	40,9
Torta de Cupuaçu	8	6,2	9,2	18,1	14,4	44,1

R. Comercial = ração comercial; R. Cupuaçu (30%) = ração comercial com 30% de torta de cupuaçu; UM = umidade; CZ = cinza; EE = extrato etéreo; PB = proteína bruta; FB = fibra bruta; ENN = extrato não nitrogenado
(1) Nutripeixe TR 32 V, Zoofort Suplementação Animal Ind. e Com.

A umidade (UM) foi determinada submetendo a amostra à temperatura de 105°C até peso constante. A proteína bruta (PB) foi calculada através da determinação do nitrogênio total, pelo método de micro-kjeldahl. As concentrações de proteína bruta das amostras foram calculadas multiplicando-se os valores de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25. O extrato etéreo (EE) foi determinado por extração contínua com o solvente éter de petróleo, num extrator intermitente em aparelho Soxhlet. As concentrações de cinza total (CZ) foram determinadas em amostras incineradas em mufla a 550°C durante 3 horas. A fibra bruta (FB) foi determinada, no resíduo, por digestão ácido-básica de acordo com o método de Weende. Os valores do extrato não nitrogenado (ENN), carboidratos, foram obtidos pelo cálculo da diferença entre a totalidade do peso de cada amostra menos os valores percentuais de UM, PB, EE, FB e CZ.

2.6 Determinação do Óxido de Cromo (Cr_2O_3)

As análises para determinação da concentração de óxido de cromo III nas amostras de rações e fezes foram realizadas por método colorimétrico, conforme metodologia descrita por FURUKAWA & TSUKAHARA (1966). A curva de calibração foi calculada a partir da digestão nitro-perclórica de amostras com concentrações conhecidas de óxido de cromo III. A leitura foi feita em espectrofotômetro, ajustado para 350 nm de comprimento de onda. As concentrações de óxido de cromo III nas rações e nas fezes foram determinadas por meio da equação:

$$y = a + bx, \text{ onde:}$$

y = concentração ótica;

x = concentração de cromo na amostra

2.7 Análise Estatística

O experimento constou de 2 tratamentos, sendo um representativo do nível de inclusão de farinha de torta de cupuaçu em uma ração comercial, e o controle (ração comercial), em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições cada, com duração de 60 dias.

Os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca e dos nutrientes foram submetidos à transformação arcosseno de sua raiz quadrada antes de serem comparados por análise de variância unifatorial, seguidos pelo de contraste de médias Tukey ($p < 0,05$).

O programa estatístico Bioestat 5.0 foi a ferramenta empregada para realização dos cálculos estatísticos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Variáveis Físico-Químicas da Água

Os valores médios obtidos para as variáveis físico-químicas da água, analisadas durante os quinze dias de adaptação e 60 dias de criação, estão expressos, respectivamente, na Tabela 3. Entre os dados obtidos não foram observadas variações que comprometessem a criação dos animais.

Tabela 3. Variáveis físico-químicas da água monitoradas nos tanques de alvenaria e nos cones. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão.

Parâmetro	Unidades (15 dias)		Cones (60 dias)	
	Tanque 1	Tanque 2	Ração c/ cupuaçu	Ração Comercial
OD (mg/L)	4,0 \pm 2,76	4,3 \pm 1,80	4,2 \pm 1,8	3,8 \pm 1,8
Temperatura (° C)	27,6 \pm 0,57	27,9 \pm 0,78	27,1 \pm 0,5	27,3 \pm 0,6
pH	5,7 \pm 0,86	5,4 \pm 0,9	4,9 \pm 0,0	4,8 \pm 0,03
Condutividade ($\mu\text{s}/\text{cm}^2$)	28,0 \pm 2,76	24,4 \pm 7,5	26,1 \pm 1,2	25,0 \pm 2,12

OD = oxigênio dissolvido

KUBITZA (2003) afirma que os índices padrões para o oxigênio dissolvido, em ambiente de cultivo, devem ser acima de 4mg/L, para que mantenham o conforto dos peixes e se evite problemas na produção. De acordo com o mesmo autor, os tecidos, células e moléculas dos peixes são afetadas diretamente pelas variações de temperatura, que devem estar entre 25°C e 32°C, sendo consideradas ideais para que se mantenha uma média de conforto para criação do tambaqui, de forma que se obtenha rápido crescimento dessa espécie em cativeiro.

O pH é uma das variáveis que influencia bastante os processos fisiológicos dos peixes em cultivo, sendo ideal numa faixa entre 6,0 a 8,0, porém, existem espécies que vivem na região amazônica, onde o pH da água dos igarapés muitas vezes varia entre 3,5 a 4,4 (BALDISSEROTTO, 2009).

A capacidade da água em conduzir eletricidade é determinada pela análise da variável denominada condutividade elétrica, e está relacionada com a quantidade de íons carregados

eletricamente nela dissolvidos. Estes íons, quando ocorrem em grandes concentrações, podem influenciar o equilíbrio osmótico dos peixes. Os dados médios de condutividade registrados nesse estudo não foram discrepantes o suficiente para comprometer o equilíbrio osmótico dos animais.

As variáveis físico-químicas da água observados nesse estudo estão de acordo com os postulados acima, encontrando-se dentro dos índices aceitos para criação do tambaqui.

3.2 Coeficientes de Digestibilidade Aparente

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca e dos nutrientes das duas rações empregadas no estudo e do ingrediente testado estão expressos na Tabela 4. Pode-se observar que houve diferença significativa ao nível 5% de probabilidade, para os parâmetros avaliados, entre as diferentes rações, exceto para o extrato etéreo.

Tabela 4. Valores médios dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca e dos nutrientes das rações controle, teste e do ingrediente.

AMOSTRAS	CDA (%)*			
	MS	EE	PROT	ENN
Ração comercial	85,0 ± 0,00a	95,0 ± 0,01a	89,0 ± 0,00a	89,0 ± 0,00a
Ração c/ cupuaçu (30%)	66,0 ± 0,00b	94,0 ± 0,01a	71,0 ± 0,01b	69,0 ± 0,02b
Torta de cupuaçu	22,0 ± 6,7c	91,2 ± 3,1a	21,3 ± 7,4c	18,6 ± 8,6c

MS = matéria seca; EE = extrato etéreo; PROT = proteína; ENN = extrato não nitrogenado. * Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

Os resultados positivos para a boa digestibilidade da fração lipídica das rações e do ingrediente, podem ser explicados pela habilidade que os peixes apresentam em metabolizarem bem os lipídios (PEZZATO *et al.*, 2004) bem como a torta de cupuaçu ter apresentado nível lipídico de 9,2%, estando dentro da faixa considerada aceitável (4 a 10%) para inclusão em dietas para peixes onívoros tropicais, sem comprometimento das suas funções metabólicas e do desempenho produtivo (KUBITZA, 1999).

Considerando que os valores de digestibilidade aparente de uma dieta está diretamente relacionada com o potencial digestivo de seus ingredientes pode-se observar que houve uma

redução do percentual de digestibilidade aparente da ração comercial com cupuaçu que pode ser correlacionada com o nível de inclusão do ingrediente teste.

A torta de cupuaçu é proveniente de uma das fontes mais empregadas em estudos de digestibilidade animal, as sementes. Juntamente com as cascas, elas apresentam altos teores de fibra bruta e diversos fatores antinutricionais com fortes impactos na utilização da dieta e nos processos digestivos em peixes (SILVA *et al.*, 2003; LANNA *et al.*, 2004; THORPE & BEAL, 2001).

A fração fibrosa dos alimentos pode atuar na atividade de enzimas digestivas e interagir com a parede intestinal, modificando a absorção dos nutrientes (TACON, 1989). Nos peixes, os compostos fibrosos são sujeitos à digestão por hidrólise ácida no estômago e especialmente pelas enzimas da flora microbiana intestinal (KAUSHIK, 2004). O excesso de fibra na dieta diminui a digestibilidade dos nutrientes e aumenta a produção de resíduo fecal, contribuindo para a poluição do ambiente aquático.

SILVA *et al.*, (2003), estudando o efeito da incorporação de frutos e sementes em rações para tambaquis, atribuiu aos altos teores de fibra bruta, de ocorrência na embaúba (28,5%) e no jauari (17,4%), a redução nos coeficientes de digestibilidade totais das dietas.

LANNA *et al.*, (2004), avaliando a digestibilidade aparente e trânsito gastrointestinal em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em função da fibra bruta da dieta, afirmaram que níveis acima de 7,5% de fibra bruta nas dietas purificadas interferiram significativamente na digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo. Na literatura não foram encontrados estudos de nutrição de peixes que empregassem a torta de cupuaçu como ingrediente substitutivo em dietas.

Os peixes não têm apresentado grande capacidade de digerir diversas fontes de carboidratos, por não possuírem enzimas que sejam capazes de digerir a celulose e hemicelulose ou que sejam capazes de quebrar a ligação lignocelulose (NRC, 1993). KHOLA

et al. (1992) determinaram a atividade enzimática no trato digestório do tambaqui e não encontraram qualquer evidência da capacidade dele de digerir enzimaticamente carboidratos complexos da fibra. Apesar de recentemente alguns estudos terem debruçado esforços na caracterização enzimática do trato digestório de algumas espécies tropicais, entre elas o tambaqui, estes têm avaliado a resposta das enzimas digestivas às variações dos teores amilolíticos da dieta (LUNDSTEDT, 2003; MELO, 2004; ALMEIDA, 2006; CORRÊA *et al.*, 2007).

Os resultados de baixos índices de digestibilidade para MS, PB e ENN da ração teste empregada neste estudo, podem ser atribuídos, em parte, aos elevados índices de fibra bruta detectados para a torta de cupuaçu pela análise bromatológica (14,4%). CARVALHO *et al.* (2009) encontraram índices médios de fibra bruta da torta de cupuaçu, na base seca, de 10,8%. PEREIRA (2009), após estudo de digestibilidade desse ingrediente na alimentação de ovinos, encontrou valores altos para suas frações fibrosas: celulose (21,5%), hemicelulose (9,6%) e lignina (14,2%) que reduziram a digestibilidade dos outros nutrientes.

Uma outra razão para estes baixos índices de digestibilidade seria a presença de um componente químico que possa exercer uma ação antinutricional presente no ingrediente teste. FRANCIS *et al.* (2001), numa revisão sobre os efeitos dos fatores antinutricionais na nutrição de peixes, afirmaram que essas substâncias podem afetar a utilização e a digestão das proteínas (inibidores de proteína, taninos, lecitinas); afetar a utilização dos minerais (fitatos, pigmentos de gossipol, oxalatos, entre outros); funcionarem como antivitaminicos, entre outras ações, com interferências na utilização do alimento e conseqüências na saúde e desempenho produtivo dos animais.

BECKER & MAKKAR (1999) estudaram o efeito de um hidrolisado de tanino e de um concentrado de tanino, na proporção de 2%, em dietas para carpa comum (*Cyprinus carpio*). Eles observaram que o hidrolisado de tanino afeta a performance dos peixes,

provocando a diminuição do consumo com 28 dias de cultivo, paralisando por completo, aos 40 dias. Os autores concluíram que a toxicidade do hidrolisado de tanino é alta para a carpa comum, e quando pensar em incluir fontes vegetais que o contenha em substituição à farinha de peixe, para essa espécie, deve ser feita com cautela.

KROGDAHL *et al.* (2000), observaram mudanças do tipo enterite no intestino posterior de salmão do atlântico (*Salmo salar* L.) alimentados com dietas contendo farelo de soja submetido a processos com extração por solvente ou extrato de álcool, comprovando que alguns compostos antigênicos podem estar presente em sementes de algumas leguminosas e cereais, sendo capazes de induzir lesões na mucosa intestinal, dentre outros efeitos.

A teobromina é um alcalóide da família das metil-xantinas, bastante presente nas sementes das espécies do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schun) e do cacau (*Theobroma cacao*) (CARVALHO, 2004; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY 2008). Teores médios desse alcalóide (15,7 g/kg MS) foram encontrados por LO COCO *et al.* (2007) quando buscavam caracterizar a composição das sementes fermentadas e torradas de cupuaçu. Segundo a EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2008), é atribuído à teobromina o poder de inibição da ingestão da dieta pelo animal e redução do seu desempenho, após estudos realizados com farelo ou torta de cacau.

Estudos que mostrassem os efeitos da teobromina sobre os processos digestivos em peixes não foram encontrados, contudo, baseado na teoria que essa substância possa ter algum efeito bactericida ou bacteriostático sobre a população microbiana do trato digestório de ruminantes (PEREIRA, 2009) e levando-se em consideração às afirmações descritas acima, talvez ela deva ter influenciado nos baixos resultados de digestibilidade nesse estudo, sugerindo que tais efeitos sejam melhor avaliados em trabalhos futuros.

4. CONCLUSÃO

A torta de cupuaçu, incluída ao nível de 30% em uma dieta comercial, reduziu os coeficientes de digestibilidade aparente dos principais nutrientes estudados não sendo adequada, nesse índice, para nutrição de juvenis de tambaqui.

Estudos futuros precisam ser realizados de forma a:

- ✓ avaliar níveis abaixo de 30% de inclusão de torta de cupuaçu e seus efeitos no desempenho zootécnico de juvenis de tambaqui;

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. C. de. **Perfil digestivo e metabólico de juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) alimentados com diferentes teores de proteína e lipídio.** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2006. 77 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, 2006.

ANSELMO, A. A. dos S. **Resíduos de frutos Amazônicos como ingredientes alternativos em rações extrusadas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*).** Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2008. 46p. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURE CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analyses of the Association of Agriculture Chemists.** Washington, D. C.: 1997. 937p.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.** 2º ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. 2009.352p.

BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Effects of dietary tannic acid and quebracho tannin on growth performance and metabolic rates of common carp (*Cyprinus carpio* L) **Aquaculture**, v. 175, p. 327–335, 1999.

BUREAU, D. P., HARRIS, A. M., CHO, C. Y. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 180:345–358, 1999.

CARVALHO, A. V. **Extração, concentração e caracterização físico-químicas e funcionais das proteínas da semente de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Shum.).** Campinas. SP. 2004. 151p. Tese (Doutorado em Tecnologia dos Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 2004

CARVALHO, A. V.; GARCIA, N. H. P.; FARFÁN, J. A.; WADA, J. K. A. Caracterização de concentrado e isolado protéico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum). **Braz. J. Food Technol**, v. 12, n. 1, p. 01-08, 2009.

CHENG, Z. J.; HARDY, R. W.; URSY, J. L. Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein level in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets, and reduce ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion. **Aquaculture**, 218: 553-565, 2003.

CORREA, C. F.; AGUIAR, L. H. de; LUNDSTEDT, L. M.; MORAES, G. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 857-862, 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA.. Theobromine as undesirable substances in animal feed. Scientific Opinion of the panel on contaminants in food chain. **The EFSA Journal**, n. 725, 2008.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, v.199, p.197-227, 2001.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION-FAO. Fishery and aquaculture statistics. **FAO Fishery and Aquaculture Statistics Yearbook**. Rome, Italy, 2009.101 p.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF. **Produção brasileira de frutas – 2007/ Estatísticas**. Disponível em <<http://www.ibraf.org.br>. Acesso em 13 de julho de 11.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Estatística da Pesca 2007-Brasil: Grandes regiões e unidades da federação**. Brasília, DF: 2007. 113p.

JOBLING, M. Feed composition and analysis. In: HOULIHAN, D.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (Eds.). **Food intake in fish**. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK: 2001. p. 1-24.

KAUSHIK, S. J.; COVES, D.; DUTTO, G.; BLANC, D. 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, p.391-404, 2004.

KHOLA, U.; SAINT-PAUL, U.; FRIEBE, J. *et al.* Growth, digestive enzyme activities and hepatic glycogen levels in juvenile *Colossoma macropomum* Curvier from South America during feeding, starvation and refeeding. **Aquaculture Fisheries Management**, v. 23, n. 1, p. 189-208, 1992.

KROGDAHL, A., BAKKE-MCKELLEP, A.M., ROED, K.H., BAEVERFJORD, G. Feeding Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. **Aquacult. Nutr.** v. 6, p.77–84, 2000.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. 3.ed. Jundiaí:USP, 1999, 123p.

KUBITZA, F. **Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões**. 1.ed. Jundiaí:USP, 2003, 229p.

LANNA, E. A. T.; PEZZATO, L. E.; CECON, P. R. *et al.* Digestibilidade aparente e trânsito gastrointestinal em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em função da fibra bruta da dieta. **R. Bras. Zootec.**, v. 33, n.6, p. 2186-2192, 2004.

LO COCO, F *et al.* Determination of theobromine, theophylline, and caffeine in by-products of cupuacu and cacao seeds by high-performance liquid chromatography **Journal of Chromatographi Science**, v. 45, p.273-5, 2007.

LUNDSTEDT, L. M. **Aspectos adaptativos dos processos digestivos e metabólicos de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2003. 103 p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, 2003.

MELO, J. F. B. **Digestão e Metabolismo de jundiá *Rhamdia quelen* submetido a diferentes regimes alimentares**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2004. 80p. Tese (Doutorado em Ciências, área concentração: Fisiologia) – Universidade Federal de São Carlos, 2004.

MENDES, C. Q.; GILAVERTE, S. Subprodutos da agroindústria de frutas como alternativa na alimentação de ovinos. In: Fazendaboipreto. <http://fazendaboipreto.blog.ig.com.br/2007/07/subprodutos-da-agroindustria-de-frutas-como-alternativa.html>. Acesso em 13 de julho de 2011.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. **Estatística da Aquicultura e Pesca no Brasil 2008/2009**. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/nt_AGO_19-08-Producao-de-pescado-aumenta. Acesso em: 13 de julho de 2011.

MUNÕZ-RAMIREZ, A. P. M.; CARNEIRO, D. J. Suplementação de Lisina e Metionina em Dietas com Baixo nível Protéico para o Crescimento Inicial do Pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Acta Scientiarum**, v.24, n.4, p. 909-916, 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. **Nutrient Requirements of Fish**. 1 ed. Washington, D.C., 1993.114p.

OISHI, C. A. **Resíduo da castanha da amazônia (*Bertholletia excelsa*) como ingrediente em rações para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2007. 60p. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2007.

PEREIRA, E. M. de O. **Torta de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) na alimentação de ovinos**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2009. 119p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, 2009.

PEREIRA JUNIOR, G. **Farinha de folha de leucena (*Leucaena leucocephala* lam. de wit) como fonte de proteína para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* cuvier, 1818)**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2006. 46p. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2006.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical e intensiva**. 1 ed. São Paulo, TecArt, v. 1, 2004, p. 169-175.

SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA - SETEC/MEC. **Cupuaçu**. Cartilha Temática. Brasília, DF. 29 p, 2007.

SILVA, J. A. M. da.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. de. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) incorporados em rações. Digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal. **R. Bras. Zootec**, v. 32, n. 6, p. 1815-1824, 2003

TACON, A. G. J. **Nutrición y alimentación de peces y camaróns cultivados: manual de capacitación**. Organización de lãs Naciones Unidas para La Agricultura y La Alimentación. Brasília, Brasil. 1989. 572p.

THORPE, J.; BEAL, J. D. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. In: Bedford, M.R.; Partridge, G.G. (Ed). **Enzymes in farm animal nutrition**. CAB International, UK, 2001, p. 125-143.

VIDAL JR, M. V.; DONZELE, J. L.; ANDRADE, D. R. de.; SANTOS, L. C. dos. Determinação da digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta do fubá de milho e do farelo de soja para tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizando-se técnicas com uso de indicadores internos e externos. **R. Bras. Zootec**, v. 33, n.6, p. 2193-2200, 2004.

CAPÍTULO II

DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA FRAÇÃO SOLÚVEL PROTÉICA DA TORTA DE CUPUAÇU E DIETAS PARA JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA FRAÇÃO SOLÚVEL PROTÉICA DA
TORTA DE CUPUAÇU E DIETAS PARA JUVENIS DE TAMBAQUI
(*Colossoma macropomum*)

Resumo: As técnicas *in vitro* despontam como uma ferramenta de resultados rápidos para predição da qualidade de um ingrediente potencial para alimentação de peixes. Esse estudo pretendeu avaliar a digestibilidade *in vitro* da fração solúvel protéica da torta de cupuaçu e dietas para juvenis de tambaqui, utilizando nova técnica, que empregou os próprios extratos enzimáticos da espécie. Trinta peixes, provenientes de um experimento de digestibilidade *in vivo*, após jejum de 24 h, foram sacrificados por hipotermia, dissecados os tratos digestórios em estômago, cecos pilóricos, intestino anterior e intestino posterior, homogeneizados em tampão pH 7, e postos em reação com duas dietas e um ingrediente (farinha de torta de cupuaçu), a temperatura de 28°C, por 6 h de incubação, para avaliação do grau de hidrólise da fração solúvel protéica. Após leitura das absorbâncias em espectrofotômetro, a 550 nm, e comparação das mesmas com um padrão de albumina bovina, foi determinado o grau de hidrólise em termos de percentual protéico digerido ao longo de 6 h de reação. A fração solúvel protéica da torta de cupuaçu apresentou maior percentual de digestibilidade registrado pelos extratos de cecos pilóricos (41,9%) e estômago (35,8%), com picos de atividade proteolítica às 3 h em ambos os extratos e 5 h somente no estômago. Nos intestinos houve maior digestibilidade das dietas em detrimento do ingrediente. Os resultados evidenciaram que, por meio dessa técnica, não foi possível observar o potencial solúvel protéico da torta de cupuaçu e das dietas estudadas, sugerindo-se refinamento dessa metodologia com conseqüentes estudos comparativos a tradicionais técnicas *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Bioquímica de peixes, proteases, ingrediente alternativo.

IN VITRO DIGESTIBILITY OF THE SOLUBLE PROTEIN FRACTION OF THE
CUPUAÇU PIE AND DIETS FOR JUVENILES TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Abstract: The in vitro techniques are emerging as a tool for quick results to predict the quality of a potential ingredient for fish food. This study sought to evaluate the in vitro soluble protein fraction of the pie cupuaçu and diets for juvenile tambaqui, using new technique, which employed its own kind of enzyme extract. Thirty fish from an in vivo digestibility experiment, after fasting for 24 h, were killed by hypothermia, dissected digestive tracts in the stomach, pyloric caeca, foregut and hindgut, homogenized in pH 7 buffer, and put into reaction with two diets and ingredients (flour pie cupuaçu), the temperature of 28 ° C for 6 h of incubation, to evaluate the degree of hydrolysis of soluble protein fraction. After reading the absorbance in a spectrophotometer at 550 nm, and comparing them with a standard bovine serum albumin, we determined the degree of hydrolysis in terms of percentage digestible protein over 6 h of reaction. The soluble protein fraction of the pie cupuaçu had a higher percentage of digestibility recorded by extracts of pyloric caeca (41.9%) and stomach (35.8%), with peaks of proteolytic activity at 3 h in both extracts and only 5 h in the stomach. In the intestines was greater digestibility of diets over the ingredient. The results showed that, using this technique, it was not possible to observe the potential of soluble protein cupuaçu pie and the diets studied, suggesting that refinement of this methodology with subsequent comparisons to traditional techniques in vitro and in vivo.

Keywords: Biochemistry of fish, proteases, alternative ingredient

1 INTRODUÇÃO

Determinar as necessidades qualitativas dos nutrientes na dieta de uma espécie contribui bastante para uma adequada formulação de rações para a mesma, pois a dieta impacta diretamente o seu comportamento, a integridade estrutural, a saúde, as funções fisiológicas, a reprodução, o crescimento e as exigências nutricionais (PEZZATO *et al.*, 2004). Dentre os nutrientes, as proteínas destacam-se pelo grande valor biológico como material estrutural e funcional no crescimento de peixes (KUBITZA, 1999)

Os métodos mais empregados nos estudos que visam determinar os valores nutricionais e o coeficiente de digestibilidade de uma dieta ou de um ingrediente são os ensaios *in vivo*. Eles representam, de forma bem aproximada, a habilidade com que o animal digere e absorve a energia e os nutrientes contidos nos alimentos, contudo, são métodos que demandam muito tempo, requerem considerável número de animais e são caros (GARCIA-ORTEGA *et al.*, 2000).

Várias técnicas têm sido utilizadas em estudos de digestibilidade *in vitro*. A Incubação de ingrediente com enzimas para determinar a quantidade de sobras de nutrientes não digeridos, a fim de estimar a quantidade relativa de nutrientes digeridos, em comparação com o nível de ingrediente é uma delas (CARTER *et al.*, 1999); mudanças nos valores de pH após incubação de uma enzima com o ingrediente testado (LAZO *et al.*, 1998; FENERCI & SENER, 2005) e o método do pH-stat, baseado na estimativa do percentual de hidrólise das ligações peptídicas (EZQUERRA *et al.*, 1997; EZQUERRA *et al.*, 1998; CHONG *et al.*, 2002; LEMOS *et al.*, 2004; MOTIKAWA, 2006) são outras duas muito importantes.

Todas as técnicas de determinação da digestibilidade *in vitro* se baseiam em digerir a amostra com enzimas proteolíticas em condições padronizadas. A diferença está entre o número e a natureza das enzimas que se utilizam e a medida final a ser realizada. Em geral, para a estimativa da digestibilidade, procura-se imitar, inclusive, as condições de pH ou de

acidez, características do estômago e do intestino onde a digestão das proteínas se processa (PIRES *et al.*, 2006)

Métodos como o “pH-drop” e o “pH-stat”, foram os primeiros a serem empregados para análise da digestibilidade protéica em peixes e crustáceos (EZQUERRA *et al.*, 1997; LAZO *et al.*, 1998). O pH-stat é bastante aceito para predizer a hidrólise protéica de fontes alimentares e, como o pH-drop, geralmente são baseados na análise da ação de uma única enzima, contudo, estudos mais recentes têm demonstrado que análises de conjuntos enzimáticos, extraídos do aparelho digestivo dos peixes estudados, simulam de forma mais aproximada o sistema digestivo animal (CHONG *et al.*, 2002; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN *et al.*, 2002)

A tecnologia de determinação da digestibilidade *in vitro* em estudos de nutrição de organismos aquáticos surge como uma ferramenta capaz de predizer o potencial de digestibilidade de cada componente ou mesmo da própria dieta formulada em pequenas quantidades destes, em pouco tempo de ensaio e com melhor custo-benefício (LEMOS *et al.*, 2004). Ela também permite ter uma avaliação mais detalhada das enzimas digestivas responsáveis pela hidrólise protéica, ainda mais se utilizar as da própria espécie de estudo (EZQUERRA *et al.*, 1997).

Na região Norte, o uso de ingredientes alternativos em rações para peixes assume grande importância para o desenvolvimento local, visto que a grande maioria dos insumos utilizados em sua composição não é produzida localmente, precisando ser importada dos grandes centros cerealistas do país, encarecendo os custos de produção das pisciculturas.

A agroindústria de frutas tem apresentando nos últimos anos um crescimento expressivo e dentre os diferentes resíduos gerados a torta de cupuaçu, oriunda do processamento das sementes é o mais abundante. CARVALHO *et al.* (2009), caracterizando o concentrado e o isolado protéico extraídos de farinha de sementes de cupuaçu, encontraram

teores de proteína de 31,18% e 64,33%, respectivamente. Estes teores respaldam a necessidade de se fazerem estudos de digestibilidade *in vitro* da torta de cupuaçu, de forma que se possa aferir o grau de hidrólise do seu potencial protéico e o quanto desse potencial é biodisponível para os peixes cultivados.

Conforme considerações acima citadas, este estudo objetivou avaliar a digestibilidade *in vitro*, por ação das enzimas de diferentes partes do trato digestório de tambaqui (estômago, cecos pilóricos, intestino anterior e intestino posterior), sobre a fração protéica solúvel da torta de cupuaçu, visando sua potencialidade nutritiva para esta espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Nutrição de peixes da Coordenação de Pesquisa em Aqüicultura – CPAQ, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

2.1 Extração dos tecidos

Ao final de um experimento *in vivo*, em que os peixes estavam submetidos aos tratamentos com ração comercial e ração comercial com inclusão de 30% de torta de cupuaçu, foi dado aos animais jejum de 24 h. Após jejum, foram coletados trinta peixes, de um total de duzentos, para serem sacrificados por hipotermia e retirados seus tratos digestórios. Após morte, foram levados ao laboratório, sendo dissecados em bandeja de inox sob gelo, para retirada do estômago, cecos pilóricos e intestino. O intestino foi dividido em 2 porções: anterior (proximal) e posterior (distal). Cada órgão foi então seccionado, dissecado e lavado com água destilada gelada. Para cada peixe, foi selecionada uma placa de Petri, separada em quadrantes, onde em cada um se acondicionou os órgãos. Finalmente, os tecidos foram congelados em freezer (4° C), permanecendo assim até o preparo dos homogenizados para as etapas seguintes.

2.2 Preparação dos homogeneizados celulares

Os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador mecânico tipo Tissue-Terror, em velocidade máxima, por 2 minutos, em banho de gelo, adequando-se suas quantidades à proporção de 100 mg de tecido para 1,0 mL de tampão de homogeneização (fosfato de sódio monobásico 10mM; glicerina 87%, pH ajustado para 7,0). Os extratos enzimáticos foram obtidos de um “pool” de tecidos extraídos de cada peixe, separados individualmente em microtubos, correspondendo ao tratamento a que pertenciam no ensaio *in vivo*. Em seguida, os

extratos foram centrifugados a 12.000 x g, por 3 minutos, a 4 ° C, e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima.

O conteúdo protéico dos extratos enzimáticos foi determinado pela metodologia de BRADFORD (1976).

2.3 Procedimento Experimental

Os substratos farinha de torta de cupuaçu, ração comercial (Nutripeixe TR 32V) e ração comercial com inclusão de farinha de torta de cupuaçu a 30% foram finamente moídos em peneira de malha de 0,8 mm. Em seguida, às 19:00 h, eles foram pesados individualmente, um para cada dia de ensaio, na quantidade de 5g, e imersos em 100 mL de água destilada, mantendo-os sob agito e refrigeração, por 12 h. Na manhã seguinte, a solução substrato-água foi filtrada em filtro de fibra de vidro, ϕ 9 cm, resultando num filtrado que constituía a fonte protéica para a ação enzimática. Um total de 128 tubos de ensaio e microtubos foram utilizados por dia, representando dois tipos de tecido e um substrato.

Sessenta e quatro tubos de ensaio foram então dispostos em duas baterias de trinta e dois cada, em banho a 28° C, em quadruplicata, representando as horas de ensaio (0 h a 6 h), a origem do extrato enzimático (estômago, cecos, intestino anterior ou intestino posterior) e os brancos da reação (total de 8). As réplicas receberam 1,0 mL de tampão Glicina/HCl 200mM pH 2, quando o tecido era o estômago ou 1,0 mL de tampão Tris/HCl 200 mM pH 8 quando os tecidos eram cecos pilóricos ou intestino anterior ou posterior, 3,0 mL do filtrado e 300 μ L do extrato enzimático. Os brancos receberam 1,0 mL de tampão e 3,3 mL de água destilada.

O tempo de reação foi cronometrado logo após a adição da primeira alíquota de extrato enzimático de cada órgão dos peixes. Em intervalos de 1h, até tempo total de 6h, retirou-se alíquotas de 1mL para interrupção da reação, adicionando-as em volumes de 1mL de solução de NaOH 6N, em tubos de ensaio incubados previamente a 100° C. Em seguida,

600 µL dessa solução foi pipetada em microtubos e resfriada, para finalmente, assim que os últimos volumes fossem pipetados, adicionar-se 600 µL de reativo de biureto (marca Human do Brasil), ficando nessa condição por 30 minutos a temperatura ambiente (25° C) e depois leitura em espectrofotômetro a 550 nm.

A albumina bovina – BSA foi utilizada como padrão protéico para comparação das absorvâncias encontradas para os diferentes extratos enzimáticos agindo sobre os diferentes substratos.

O grau de hidrólise da fração solúvel da proteína das dietas e do ingrediente, efetuado pelos diferentes “pools” de extratos enzimáticos, foi definido em termos de percentual de digestão protéica, ao longo de 6:00 h de incubação, conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Digestibilidade Prot. } t_n = 100\% - ([\text{Prot. } t_n] \times 100 / [\text{Prot. } t_0]), \text{ onde:}$$

$[\text{Prot. } t_n]$ = concentração de proteína (mg/mL), no tempo (n)

$$= [\text{Prot. Total } t_n] - [\text{Prot. do extrato enzimático na mistura}]$$

$[\text{Prot. } t_0]$ = concentração de proteína (mg/mL), no tempo (0)

T_0 = tempo de início da reação

T_n = intervalos de tempo ($T_0, T_1, T_2, \dots, T_6$), em horas, em que se processou a reação enzimática.

3 RESULTADOS

A figura 1 representa os diferentes teores de proteínas totais encontrados nos quatro extratos enzimáticos empregados na digestibilidade do ingrediente e das rações.

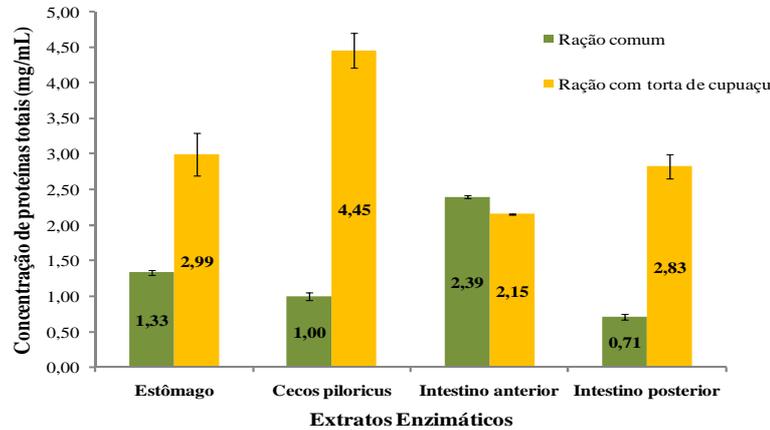


Figura 1. Concentração de proteínas (mg/mL) nos diferentes extratos enzimáticos

Com relação aos teores de proteína dos extratos que agiram sobre a ração com inclusão de torta de cupuaçu, se observa que os de cecos pilóricos (4,45 mg/mL), seguidos dos teores dos extratos de estômago (2,99mg/mL) e os de intestino posterior (2,83mg/mL) apresentaram os mais altos valores de proteínas totais presentes, tendo por último os do intestino anterior (2,15mg/mL). Já com relação aos extratos dos tecidos de peixes alimentados com ração comercial (comum), o do intestino anterior (2,39mg/mL) apresentou maior teor de proteína total, seguido pelo do estômago (1,33mg/mL), cecos pilóricos (1mg/mL) e, finalmente, do intestino posterior (0,71mg/mL).

A figura 2 representa os efeitos do extrato enzimático do “pool” de estômagos de juvenis de tambaqui sobre a fração solúvel da proteína das dietas e do ingrediente, com relação ao tempo de reação.

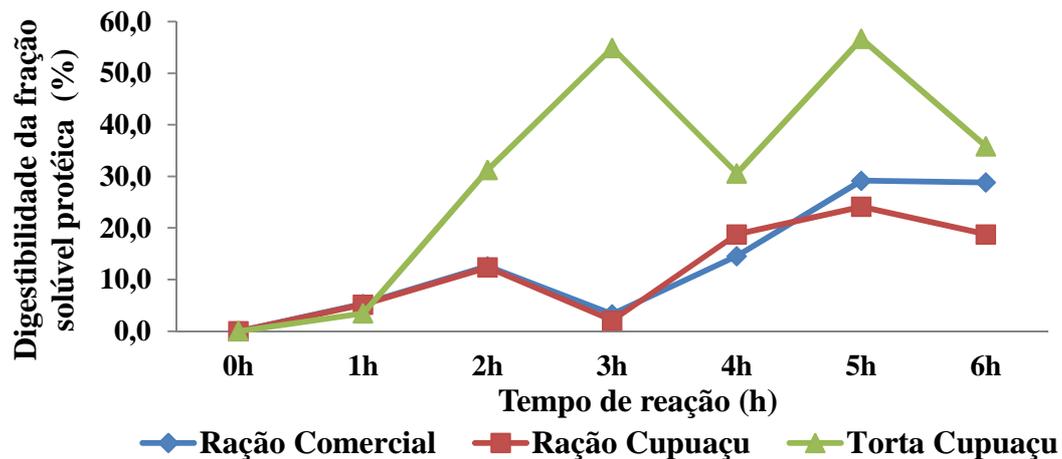


Figura 2. Percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica das dietas e do ingrediente, pelo extrato enzimático do “pool” de estômagos de juvenis de tambaqui, em 6h de reação.

O ingrediente (torta de cupuaçu (TC)) , quando comparado às dietas, foi o que apresentou maior tendência de aumento do grau de hidrólise da fração solúvel protéica, pelos extratos de estômagos de juvenis de tambaqui, ao longo de 6h de reação, seguido da ração comercial (RC) e da ração com inclusão de torta de cupuaçu (RTC).

Entre os tempos de 0h e 3h, a fração solúvel protéica da RC, RTC e TC foi sendo digerida até pico de interrupção para RC e RTC, às 3h, enquanto para TC, houve pico do percentual de digestibilidade (54,9%) da sua fração solúvel protéica. Por fim, somente 3,3% e 2,1% das frações solúveis protéicas da RC e da RTC, respectivamente, naquele tempo, tinham sido digeridas.

Entre o intervalo de 3h e 6h, houve tendência de aumento do grau de hidrólise da fração protéica das dietas e do ingrediente, tendo pico de interrupção para TC, às 4h, enquanto as frações solúveis protéicas de RC e RTC continuaram sendo digeridas. Ao final das 6h de reação, o percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica do TC (35,8%) foi maior que da RC (28,8%), seguido, finalmente, da RTC (18,8%).

A figura 3 representa os efeitos do extrato enzimático do “pool” de cecos pilóricos de juvenis de tambaqui sobre a fração solúvel da proteína das dietas e do ingrediente, com relação ao tempo de reação.

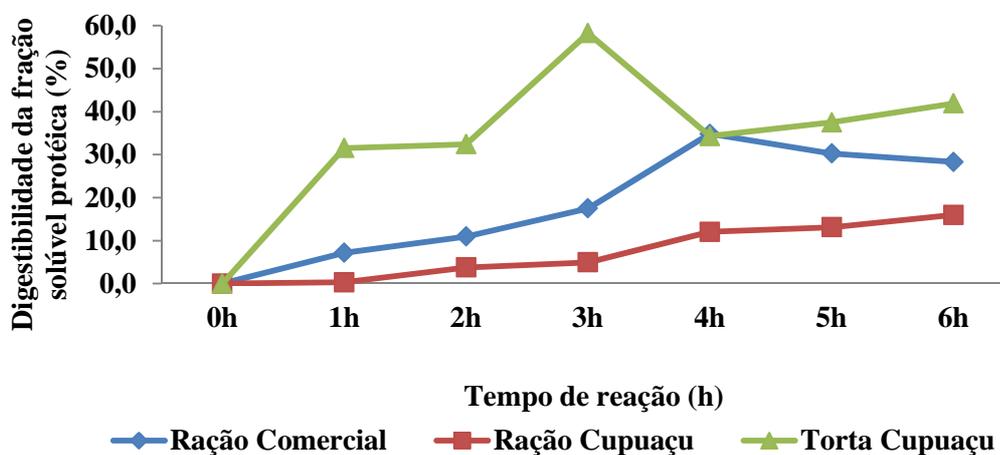


Figura 3. Percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica das dietas e do ingrediente, pelo extrato enzimático do “pool” de cecos pilóricos de juvenis de tambaqui, em 6h de reação.

O ingrediente (TC), também foi o que apresentou maior tendência de aumento do grau de hidrólise da fração solúvel protéica, pelos extratos de cecos pilóricos de juvenis de tambaqui, ao longo de 6h de reação, seguido da ração comercial (RC) e da ração com inclusão de torta de cupuaçu (RTC).

Entre os tempos de 0h e 3h, a fração solúvel protéica da RC, RTC e TC foi sendo digerida até pico de interrupção para TC, às 2h. Houve pico do percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica (58,3%), para TC, às 3h, contra somente 17,5% e 4,9% das frações protéicas de RC e RTC, respectivamente.

Entre o intervalo de 3h e 6h, houve tendência de aumento do grau de hidrólise da fração protéica das dietas e do ingrediente, sendo que às 4h houve pico de interrupção do processo para TC, coincidindo com o de aumento do percentual de digestão da fração protéica de RC, que foi de 34,8%, contra 30,3% e 13,1% para TC e RTC, respectivamente. Ao final

das 6h de reação, o percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica do TC (41,9%) foi maior que da RC (28,3%), seguido, finalmente, da RTC (16%).

A figura 4 representa os efeitos do extrato enzimático do “pool” de intestinos anteriores de juvenis de tambaqui sobre a fração solúvel da proteína das dietas e do ingrediente, com relação ao tempo de reação.

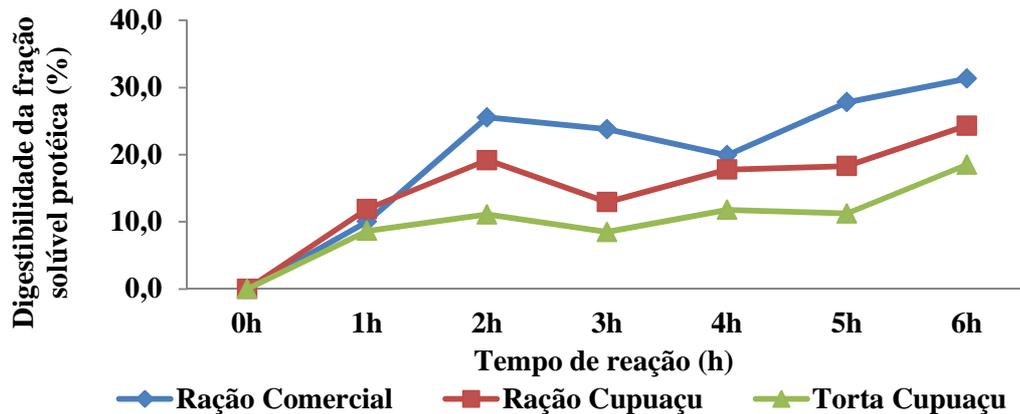


Figura 4. Percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica das dietas e do ingrediente, pelo extrato enzimático do “pool” de intestinos anteriores de juvenis de tambaqui, em 6h de reação.

A ração comercial (RC) foi quem apresentou maior tendência de aumento do grau de hidrólise da fração solúvel protéica, pelos extratos de intestinos anteriores de juvenis de tambaqui, ao longo de 6h de reação, seguido da ração com torta de cupuaçu (RTC) e do ingrediente (TC).

Entre os tempos de 0h e 3h, a RC e a RTC tiveram pico de aumento do grau de hidrólise de suas frações protéicas, atingindo percentuais de 25,6% e 19,2% de digestão das mesmas, enquanto TC atingiu apenas 11,1%. Ao final das 3h de reação, os extratos de intestino anterior já haviam digerido 23,8%, 12,9% e 8,5% das frações solúveis protéicas de RC, RTC e TC, respectivamente.

Entre o intervalo de 3h e 6h, houve tendência de aumento do grau de hidrólise protéica, com pico de interrupção do processo para RC. Ao final das 6h de reação, o

percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica da RC (31,3%) foi maior que o da RTC (24,3%), seguido, finalmente, do TC (18,5%).

A figura 5 representa os efeitos do extrato enzimático do “pool” de intestinos posteriores de juvenis de tambaqui sobre a fração solúvel da proteína das dietas e do ingrediente, com relação ao tempo de reação.

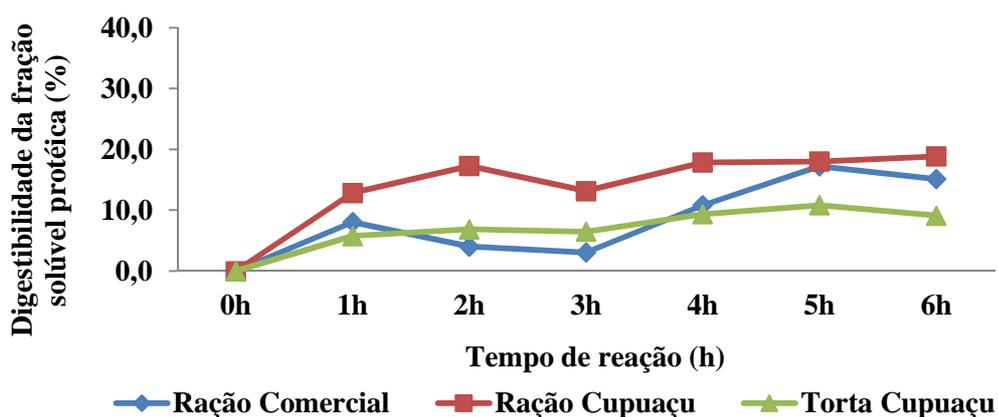


Figura 5. Percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica das dietas e do ingrediente, pelo extrato enzimático do “pool” de intestinos posteriores de juvenis de tambaqui, em 6h de reação.

A ração com torta de cupuaçu (RTC) foi quem apresentou maior tendência de aumento do grau de hidrólise da fração solúvel protéica, pelos extratos de intestinos anteriores de juvenis de tambaqui, ao longo de 6h de reação, seguido da ração comercial (RC) e do ingrediente (TC).

Entre os tempos de 0h e 3h, RTC e RC tiveram tendência de aumento do grau de hidrólise de suas frações solúveis protéicas, atingindo pico de interrupção do processo às 3h, enquanto para TC o processo seguiu normalmente. Ao final, os percentuais de digestibilidade das frações protéicas foram: RTC (13,2%), TC (6,5%) e RC (3,1%).

Entre o intervalo de 3h e 6h, a RC apresentou pico do aumento do grau de hidrólise, às 5h, enquanto para RTC e TC, praticamente esse grau não apresentou alterações. Ao final das

6h de reação, o percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica da RTC (18,8%) foi maior que o da RC (15,1%), seguido, finalmente, do TC (9,1%).

4 DISCUSSÃO

Os resultados revelaram maior grau de hidrólise da fração solúvel protéica da torta de cupuaçu (TC) quando comparado aos da ração comercial (RC) e aos da ração com inclusão de torta de cupuaçu (RTC), sob ação de digestão dos extratos enzimáticos de estômago e cecos pilóricos de juvenis de tambaqui, concomitantemente. A composição em proteínas totais e o balanceamento dos aminoácidos da torta de cupuaçu poderiam explicar esses resultados, que embora não realizados nesse estudo encontram respaldo nos achados por CARVALHO *et al.* (2008).

Os autores acima citados caracterizaram o teor de proteína total e de aminoácidos totais de amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu, mesmo processo que passou a amêndoa que gerou a torta empregada nesse estudo. Eles constataram alto valor biológico e maiores teores de aminoácidos indispensáveis em comparação às amêndoas de cacau (LOPES *et al.*, 2008) e o escore do Institute of Medicine (2002), citado por eles.

As proteínas estão constituídas por aminoácidos que podem apresentar cargas (aminoácidos polares) ou não (aminoácidos apolares). Quando apresentam cargas, as proteínas podem ser compostas de aminoácidos polares positivos, negativos e neutros. Estes podem se encontrar em uma proteína em diferentes proporções, favorecendo a digestão ácida quando há predomínio de aminoácidos polares negativos, a digestão básica pela predominância de aminoácidos polares positivos ou neutra, com participação ativa de aminoácidos polares neutros (NELSON & COX, 2002).

Quando se observou que a fração solúvel protéica da torta foi mais digerida pelos extratos de cecos pilóricos (41,9%) e estômago (35,8%), ao final de 6h de reação, notaram-se duas regiões do trato digestório do tambaqui bastante envolvidas com a atividade proteolítica.

O estômago tem sido registrado como o local onde ocorre a maior parte da digestão protéica de um alimento em peixes (SILVA & ANDERSON, 1998), sendo um ambiente de

pH ácido onde atua a enzima pepsina, principal protease encontrada em estômagos de peixes e primeira, na digestão destes, a quebrar cadeias proteolíticas (TENGGJAROENKUL *et al.*, 2000). Esta endopeptidase atua em meio ácido, com grande afinidade pela cadeia peptídica com presença do grupo NH, característico dos resíduos de aminoácidos polares negativos fenilalanina, tirosina e triptofano. Estes estão presentes em altos teores nas amêndoas fermentadas e torradas de cupuaçu, segundo CARVALHO *et al.* (2008).

Nos cecos pilóricos, em que ocorre a ação da tripsina e quimiotripsina, endopeptidases que atuam sob ação de pHs alcalinos, e presentes em cecos de algumas espécies de peixes, inclusive no tambaqui (HAARD *et al.*, 1996; HIDALGO *et al.*, 1999; CORRÊA *et al.*, 2007), o favorecimento de maior percentual de digestibilidade da fração solúvel protéica da torta em detrimento aos das dietas, também se explica pela grande disponibilidade dos aminoácidos afins a estas enzimas (aminoácidos polares positivos) e que estariam presentes nela, bem como nesse órgão ocorrer funções de suplementação da função digestiva do estômago (ROTTA, 2003) e por ele contribuir com grande parte da digestão de proteínas (BALDISSEROTTO, 2009).

TENGGJAROENKUL *et al.*, 2000, trabalhando com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), CHONG *et al.*, 2002 com peixe disco (*Symphysodon aequifasciata*), LIU *et al.*, 2008 com carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), dentre outros, em estudos de caracterização enzimática de diferentes tratos digestórios dos peixes, mostraram alta atividade inicial de proteases ácidas seguida de atividade proteolítica alcalina. BEZERRA *et al.* (2000) encontraram o mesmo comportamento para extratos de estômago e cecos pilóricos de tambaqui.

Os mais baixos índices de digestibilidade das frações protéicas das dietas (RC e RTC), apresentados para extratos de estômago e de cecos pilóricos, podem ser explicados pela teoria da compensação enzimática, onde os alimentos de difícil digestão, com menor porcentagem

de proteínas ou com proteínas carregadas predominantemente de aminoácidos polares inadequados para serem degradados nesses órgãos, propiciam uma maior produção enzimática em relação a alimentos de fácil digestão e ricos em proteína (CAVALCANTI, 1998). No caso desse estudo, a RC, embora informada pelo fabricante que continha em sua composição farinha de carne, farinha de sangue e farinha de peixe, como fontes protéicas, pode ser que estas não apresentassem a característica acima citada, que favorecesse maior ação enzimática proteolítica. Já para RTC, em que houve inclusão de 30% de torta de cupuaçu em uma ração comercial, provavelmente houve desbalanceamento com a inclusão, comprometendo seus teores em aminoácidos e favorecendo menor ação enzimática sobre sua constituição protéica.

Os percentuais de digestibilidade da fração solúvel protéica da RC foram mais altos que os encontrados para RTC e TC, respectivamente, sob ação das proteases dos extratos de intestino anterior. Esse resultado provavelmente ocorreu em função da composição aminoacídica dos ingredientes da ração comercial, indicando que esse produto seja composto predominantemente por aminoácidos polares positivos (arginina, lisina e histidina, por ex.), justificando, desta forma, sua alta digestibilidade em ambientes alcalinos, que sofrem ação das tripsinas, quimotripsinas, elastases, entre outras (WHITAKER, 1994). Por outro lado, a TC apresentou resultado contrário, o que pode ser explicado pela alta porcentagem de aminoácidos polares negativos deste ingrediente (CARVALHO *et al.*, 2008), sendo digeridos por ação das pepsinas, que atuam preferencialmente em ambientes ácidos, conforme foi evidenciado na análise do extrato estomacal.

Os extratos de intestino posterior revelaram, de uma forma geral, baixos índices de digestibilidade da fração protéica das dietas e do ingrediente, quando comparados aos índices apresentados pelos extratos dos outros órgãos. ALMEIDA (2007) encontrou baixa atividade enzimática em intestino posterior de tambaqui. Segundo TENGJAROENKUL *et al.* (2000), o

comportamento enzimático dessa parte do trato digestório de peixes é atribuída à reabsorção nesta porção do trato, demonstrando seu papel secundário na produção de enzimas.

Em relação ao efeito do tempo de exposição das dietas e do ingrediente aos extratos enzimáticos, foi observado que os órgãos que sofrem ação das proteases ácidas, como cecos e estômago em menor proporção, apresentaram picos de digestibilidade protéica. Segundo CAVALCANTI (1998), a atividade das enzimas proteolíticas apresenta dois padrões: o primeiro marcado por valores máximos de atuação, evidenciado por picos de atividade, o que claramente foi constatado em estômago e cecos pilóricos do tambaqui. O segundo perfil de atividade proteolítica é caracterizado pela ausência de atuação enzimática marcante, apresentando curvas suaves, conforme observado nos intestino anterior e posterior, nesse estudo. A autora afirma ainda, que a presença de picos de atividade é indício da existência de uma enzima majoritária, que no estômago é a pepsina, com extensão de sua ação até os cecos. Já nos intestinos há presença de ampla gama de enzimas proteolíticas (tripsina, quimiotripsina, aminopeptidase, elastase, carboxipeptidase), proporcionando a continuidade e estabilidade da curva de ação enzimática.

Em função da escassez de trabalhos sobre atuação das enzimas digestivas de peixes neotropicais ou tropicais (BEZERRA *et al.*, 2000; GARCÍA-CARREÑO, 2002; CORRÊA *et al.*, 2007), pois a maioria das informações existentes estão relacionadas com espécies de água fria ou marinha (HIDALGO *et al.*, 1999; KOLKOVSKI, 2001; CASTILLO-YAÑEZ *et al.*, 2004; SKLOMKLAO, 2008), os resultados desse estudo contribuem para o conhecimento da biologia digestiva do tambaqui, além de fornecer subsídios para trabalhos futuros que visem a avaliação do potencial de ingredientes alternativos e a formulação de dietas nutricionalmente balanceadas.

5 CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que, por meio da técnica de utilização de extratos enzimáticos de juvenis de tambaqui, não foi possível observar o potencial solúvel protéico da torta de cupuaçu e das dietas aplicadas, sugerindo-se refinamento dessa metodologia com conseqüentes ensaios comparativos a tradicionais técnicas *in vitro* e *in vivo*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. C. de. **Perfil digestivo e metabólico de juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) alimentados com diferentes teores de proteína e lipídio.** São Carlos:Universidade Federal de São Carlos, 2007, 77p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, 2007.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.** 2º Ed. Santa Maria:UFSM, 352p., 2009.

BEZERRA, R. de S.; SANTOS, J. F. dos; LINO, M. A. da S. et al. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, p. 189-199, 2000.

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

CARTER, C. G; BRANDSEN, M. P.; VAN BARNEVELD, R. J.; CLARKE, S. M Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: in vitro digestibility. **Aquaculture**, v. 179, p.57-70, 1999.

CARVALHO, A. V.; GARCÍA, N. H. P.; FARFÁN, J. A. Proteínas da semente de cupuaçu e alterações devidas à fermentação e à torração. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, n. 4, p. 986-993, 2008.

CARVALHO, A. V.; GARCIA, N. H. P.; FARFÁN, J. A.; WADA, J. K. A. Caracterização de concentrado e isolado protéico extraído de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum). **Braz. J. Food Technol**, v. 12, n. 1, p. 01-08, 2009.

CASTILLO-YAÑEZ, F. J.; PACHECO-AGUILARA, R.; GARCIA-CARREÑO, F. L.; NAVARRETE-DEL TORO, M. de los A. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. **Food Chemistry**,v. 85, p. 343–350, 2004.

CAVALCANTI, C. de A. **Proteases digestivas em juvenis de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Pisces:Characidae) e aplicação da técnica de digestibilidade *in vitro*.** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1998. 101p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

CHONG, A. S. C.; HASHIM, R; ALI, A. B. Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using *in vivo* and *in vitro* methods. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p. 229-238, 2002.

CORRÊA, C. F.; AGUIAR, L. H. de; LUNDSTEDT, L. M.; MORAES, G. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 147, p. 857-862, 2007.

EZQUERRA, J. M.; GARCIA-CARRENO, F. L.; CIVERA, R; HAARD, N. F. ph-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 157, p. 251-262, 1997.

EZQUERRA, J. M.; GARCIA-CARRENO, F. L.; CARRILLO, O. In vitro digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 163, p. 123-136, 1998.

FENERCI, S.; SENER, E. *In vivo* and *in vitro* protein digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) fed steam pressured or extruded feeds. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 5:17-22, 2005.

GARCIA-CARREÑO, F. L.; ALBUQUERQUE-CAVALCANTI, C.; NAVARRETE DEL TORO, M. A. ZANIBONI-FILHO, E. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 343–352, 2002.

GARCIA-ORTEGA, A.; KOUSSOULAK, A.; BOER, H.; VERRETH, J. In vitro protein digestibility of *Artemia* decapsulated cysts and nauplii, and of microbound diets for larval fish. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 475-477, 2000.

HAARD, N. F.; DIMES, L. E.; ARNDT, R. E.; DONG, F. M. Estimation of protein digestibility IV. Digestive proteinases from pyloric caeca of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed diets containing soybean meal. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 115B-4, p. 533-540, 1996.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylases activities. **Aquaculture**, v. 170, p. 267-283, 1999.

KLOMKLAO, S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. **Songklanakarin J. Sci. Technol**, v. 30, n. 1, p. 37-46, 2008.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles - implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, v. 200, p. 181-201, 2001.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação dos peixes cultivados. 3º Ed. Jundiaí: Degaspari, 1999. 123p.

LAZO, J. P.; ROMAIRE, R. P. REIGH, R. C. Evaluation of three *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, vol. 29, n. 4, p. 441-450, 1998.

LEMO, D.; NAVARRETE DEL TORO, A.; CÓRDOVA-MURUETA, J. H.; GARCIA-CARREÑO, F. Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: *in vitro* determination of protein digestibility and proteinase inhibition. **Aquaculture**, v. 239, p.307-321, 2004.

LIU, Z. Y.; WANG, Z.; XU, S. Y.; XU, L.N. Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). **Aquaculture Nutrition**, v. 14, p.31-39, 2008.

LOPES, A. S.; PEZOA-GARCÍA, N. H.; AMAYA-FARFÁN, J. Qualidade nutricional das proteínas de cupuaçu e de cacau. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 1-6, 2008.

MOTIKAWA, S. **Digestibilidade protéica de rações comerciais para o camarão rosa (Farfante *penaeus paulensis* Pérez-Farfante (1967): avaliação por métodos *in vivo* e *in vitro***. São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2006. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de Oceanografia Biológica) - Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 978 p., 2002.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P.. **Nutrição de peixes**. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (eds). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical e intensiva. 1 ed. São Paulo, TecArt, v. 1, p. 175-169, 2004.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. de A.; ROSA, J. C. *et al.* Digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de proteínas de alimentos: estudo comparativo. **Alim. Nutr**, v, 17, n.1, p. 13-23, 2006.

ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. Documentos 53. ISSN 1517-1973, EMBRAPA, Corumbá-MS, 49p., 2003.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K.; RUSTAD, A.; SUNDE, J. et al. *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. **J. Sci. Food Agric.**, v. 82, p. 644-654, 2002.

SILVA, S. S. de; ANDERSON, T. A. **Fish nutrition and aquaculture**. London:SE1 8HN, UK, 319p, 1998.

TENGJAROENKUL, B; SMITH, B. J.; CACECI, T; SMITH, S. A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* **L.Aquaculture**, v. 182, p. 317-327, 2000.

WHITAKER, J. R. **Principals of enzymology for food sciences**. 2º ed. N. York: Marcel Dekker. INC, 625p.,1994.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com um crescimento significativo da piscicultura mundial e brasileira, proporcionado pela também crescente procura por pescado de qualidade sob produção ecologicamente correta e ambientalmente sustentável, mudanças nas tecnologias de cultivo de peixes proporcionarão ganhos sociais, econômicos e ambientais. Em regiões mais distantes dos grandes centros produtores dos principais insumos para dietas, estas mudanças trarão saltos em qualidade de produção ainda maiores.

Os resultados desse trabalho, que é pioneiro quanto ao potencial de utilização da torta de cupuaçu em ração para peixes tropicais, abrem caminho para novos estudos na área de nutrição dessas espécies, com ênfase na definição da melhor proporção desse ingrediente a ser empregada na alimentação e que gere bom desempenho produtivo, na determinação de possíveis fatores antinutricionais e métodos de controle dos mesmos, na determinação de sua composição aminoacídica e digestibilidade dos aminoácidos em particular, na comparação entre diferentes técnicas *in vitro* e associação com a *in vivo*, e em estudos de impactos econômicos, ecológicos e sociais do uso desse ingrediente alternativo nos cultivos, principalmente na região Norte.