

Cristina Rios

**PERFIL DE ENZIMAS DIGESTIVAS EM JUVENIS DO  
CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO *Litopenaeus vannamei*  
ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO DIFERENTES  
NÍVEIS DE SUBSTITUIÇÃO DE FARINHA DE PEIXE POR  
FARINHADAS LARVAS DO INSETO *Tenebrio molitor***

Dissertação submetida ao Programa  
de Pós-Graduação em Bioquímica  
da Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção do grau de  
mestre em Bioquímica.

Orientador: Dr. Carlos Peres Silva.

FLORIANÓPOLIS/SC

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rios, Cristina

Perfil de enzimas digestivas em juvenis do camarão-branco-do-pacífico *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas contendo diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por farinha das larvas do inseto *Tenebrio molitor* / Cristina Rios ; orientador, Carlos Peres Silva - Florianópolis, SC, 2017.

60 p.

- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

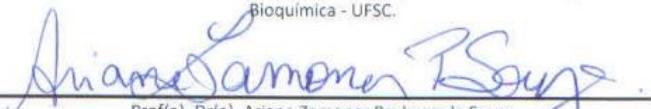
1. Bioquímica. 2. Entomofagia. 3. Camarão. 4. Enzimas digestivas. 5. Farinha de inseto. I. Peres Silva, Carlos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

**"Perfil de enzimas digestivas em juvenis do camarão-branco-do-pacífico  
Litopenaeus vannamei alimentados com dieta contendo diferentes níveis de  
substituição de farinha de peixe por farinha das larvas do inseto Tenebrio  
molitor"**

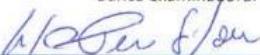
Por

**Cristina Rios**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da  
Banca Examinadora (004/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica - UFSC.

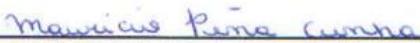
  
Prof(a). Dr(a), Ariane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:

  
Dr(a) Carlos Peres Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

  
Dr(a) Felipe do Nascimento Vieira (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr(a) Renata Ávila Ozório (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr(a) Mauricio Peña Cunha (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2017.







## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, ao meu orientador Carlos Peres Silva;

Aos meus pais Daniel Antônio Rios e Elizabete Maria Garcia, à minha querida irmã Sabrina Rios que sempre me apoiaram;

Aos amigos de laboratório Theo Bräscher, Daniele Kunz, Roseane Panini, Ana Paula Souza e Gabriel Oliveira pelos ensinamentos;

À querida Gabriela Karasiak, que tirou sempre minhas dúvidas e me auxiliou nas análises;

Aos amigos do laboratório do professor Boris Stambuk: Eduardo Zanella, Angela Santos, Marilia knychala, Leonardo Kretzer, Bruna Souza, Gabriela Gubert, Wallace Moraes, pela companhia maravilhosa,

Aos amigos do laboratório do professor Alcir Dafré, pelas dúvidas, Aos laboratórios LCM e Labnutri pela ajuda com os experimentos,

Aos amigos e professores do Curso de Aquicultura que sempre me apoiaram,

Aos meus amigos, que entendem minha ausência.



*Embora ninguém possa  
voltar atrás e fazer um novo começo,  
qualquer um pode começar agora e  
fazer um novo fim.*

*Chico Xavier.*



## RESUMO

A carcinicultura é um dos setores da aquicultura mais rentáveis e o camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) é uma das espécies mais cultivadas mundialmente devido à sua rusticidade, rápido crescimento, fácil manejo e aceitação comercial. O Brasil encontra-se como um grande produtor, favorecido por sua ampla faixa costeira, porém alguns fatores como enfermidade virais e insumos acarretam custos na produção, pois demandam gastos altos de manutenção. A nutrição de espécies é um deles, sendo considerada um grande entrave da carcinicultura, por seu alto custo, em particular devido à utilização da farinha de peixe como um dos componentes nas rações. Contudo, tem-se buscando formas econômicas e sustentáveis de fontes proteicas alternativas para substituição da farinha de peixe. Para isso, tem-se elaborado estudos no fortalecimento do uso de farinha de inseto na alimentação de camarões sem perdas financeiras. O presente trabalho tem por objetivo analisar o perfil de enzimas digestivas de juvenis da espécie de camarões marinhos *L. vannamei* (n=9), com peso inicial de  $4,42 \pm 0,02$ g (média,  $\pm$  desvio padrão) peso final de  $9,23 \pm 0,31$ g (média,  $\pm$  desvio padrão) e com um ganho de peso de  $4,81 \pm 0,30$  g (média,  $\pm$  desvio padrão). Os camarões alimentados com farinhas das larvas do inseto *Tenebrio molitor*, em diferentes níveis de substituição, com 25%, 50%, 75% e 100% e o controle (farinha de resíduo de salmão). O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC (LCM) iniciando com o cultivo dos camarões em tanques de engorda fornecendo diariamente as rações durante 42 dias. Após esse período de engorda, os animais foram eutanasiados, sendo dissecados o hepatopâncreas e esses mantidos em freezer a  $-25$  °C em tubos cônicos contendo 1 mL de solução salina 3%. Os hepatopâncreas foram homogeneizados e centrifugados para a realização dos ensaios enzimáticos para determinação de atividades proteolíticas do tipo tripsina (substrato usado bz-R-pNA), quimotripsina (substrato usado suc-AAPF-pNA) e sobre o substrato proteico azoalbumina, além de amilases e lipases. Zimogramas utilizando-se géis SDS-PAGE foram obtidos para fracionamento das atividades proteolíticas e amilásicas. Os dados obtidos mostram que houve um ganho de peso e que a taxa de sobrevivência não foi afetada com a substituição de farinha de inseto na dieta dos camarões. Os resultados de

atividade absoluta de tripsina, quimotripsina, lipases e amilases demonstram não haver diferenças significativas entre o controle e os tratamentos, assim como nos padrões das atividades enzimáticas encontradas nos zimogramas. Já as determinações das atividades específicas de quimotripsina e amilases demonstraram diferenças significativas entre a dieta contendo 25% de substituição e a dieta controle. Já na atividade sobre azoalbumina, foi encontrada diferença nos tratamentos 75% para atividade absoluta e 25% para atividade específica, e no tratamento com 100% para as duas atividades.

**Palavras-chave:** Entomofagia; camarão; enzimas digestivas; farinha de inseto; proteinases, amilases.

## ABSTRACT

Shrimp farming is one of the most profitable sectors of aquaculture, and the white Pacific shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) is one of the most cultivated species worldwide due to its rusticity, rapid growth, easy handling and commercial acceptance. Brazil is a major producer, favored by its wide coastal area, but factors such as viral illnesses and inputs cause costs in production, as they demand high maintenance costs. The nutrition of species is one of them, being considered a great hindrance of shrimp farming, due to its high cost, in particular due to the use of fish meal as one of the components in the feeds. However, we have been looking for economic and sustainable forms of alternative protein sources for fish meal substitution. For this purpose, studies have been carried out to strengthen the use of insect meal in shrimp feed without financial losses. The objective of the present work was to analyze the digestive enzymes profile of juveniles of the marine shrimp *L. vannamei* ( $n = 9$ ), with initial weight of  $4.42 \pm 0.02$  g (mean, standard deviation),  $23 \pm 0.31$  g (mean  $\pm$  standard deviation) and a weight gain of  $4.81 \pm 0.30$  g (mean  $\pm$  standard deviation). The shrimp fed the larvae of the mealworm *Tenebrio molitor*, at different replacement levels, with 25%, 50%, 75% and 100% and control (commercial fish meal). The experiment was carried out in the Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC (LCM), starting with the cultivation of shrimp in fattening tanks, providing daily feed for 42 days. After this fattening period, the animals were euthanized and the hepatopancreas were dissected and kept in a freezer at  $-25$  °C in conical tubes containing 1 mL of 3% saline solution. The hepatopancreas were homogenized and centrifuged for the enzymatic assays to determine protease activities trypsin-like (bz-R-pNA as the substrate), chymotrypsin-like (suc-AAPF-pNA as the substrate) and against the proteinaceous substrate azoalbumin, as well as amylases and lipases. Zymograms using SDS-PAGE gels were obtained for fractionation of proteolytic and amylase activities. The data obtained showed that there the a weight gain and the survival rate were not altered with the incorporation of insect meal in the shrimp diet in addition. The results of the absolute activity of trypsin, chymotrypsin, lipases and amylase demonstrated no significant differences between control and treatments, as well as in the patterns of enzymatic activities found in the

zymograms. The determinations of the specific activities of chymotrypsin and amylases showed significant differences between the diet containing 25% of incorporation and the control. In the azoalbumin activity, a difference was found in treatments 75% for absolute activity and 25% for specific activity, and in the treatment with 100% for both activities.

**Keywords:** Entomophagy; Shrimp; Digestive enzymes; Insect meal; Proteinases; Amylases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Espécime de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	20
Figura 2- Sistema digestório do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	26
Figura 3- Média da atividade absoluta e específica da enzima tripsina .....	39
Figura 4- Média da atividade da absoluta e específica da enzima quimotripsina ..	40
Figura 5- Determinação de atividade absoluta e específica de azo albumina.....	41
Figura 6- Média da atividade absoluta e específica da enzima lipase.....	42
Figura 7- Média da atividade absoluta e específica da enzima amilase.....	43
Figura 8- Zimograma de atividade proteolítica .....	44
Figura 9- Zimograma de atividade de amilase .....	45



## **LISTA DE TABELA**

Tabela 1- Composição dos ingredientes proteicos.....	32
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila.

BCA – ácido biconínico.

bz-R-pNA – N-benzoil-DL-argininil-p nitroanilida.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations.

NRC – National Research Council.

OD – Oxigênio Dissolvido.

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida.

PUFAs – Ácidos graxos poli-insaturados. Do inglês Polyunsaturated Fatty Acids.

SDS – Dodecil sulfato de sódio.

suc-AAPF-pNA – succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil-p nitroanilida.

TCA – Ácido tricloroacético

Tris – *tris*(hidroximetil)aminometano.

Volts.

...SV – Vírus da síndrome da mancha branca. Do inglês White spot syndrome vírus.







## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Carcinicultura .....	19
1.2 Nutrição na Carcinicultura.....	21
1.3 Farinha de inseto.....	22
1.4 Digestão em peneídeos .....	24
2. Objetivos .....	29
2.1 Objetivos específicos.....	29
3- Justificativa .....	30
4-Material e Métodos.....	31
4.1 - Delineamento Experimental.....	31
4.2- Determinação de atividades enzimáticas.....	34
4.2.1- Determinação de atividade proteolítica .....	34
4.2.2 – Determinação de atividade lipásica .....	35
4.2.3 – Determinação de atividade amilásica .....	35
4.3 –Determinação de proteína.....	36
4.4-Determinação de atividades enzimáticas em géis de eletroforese se mi-desnaturante .....	36
4.4.1 -Determinação de atividade proteolítica <i>in gel</i> .....	36
4.4.2 -Determinação de atividade amilásica <i>in gel</i> .....	37
5. Análise estatística .....	37
6- Resultados .....	39
6.1- Determinação de atividade proteolítica .....	39
6.2 – Determinação de atividade lipásica .....	41
6.3 – Determinação de atividade amilásica .....	42

6.4 -Determinação de atividade proteolítica <i>in gel</i> .....	43
6.5 -Determinação de atividade amilásica <i>in gel</i> .....	44
7- Discussão .....	46
8- Conclusões Finais .....	51
9- Referências Bibliográficas .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Carcinicultura

A carcinicultura marinha é desenvolvida em vários países e dentre os principais produtores destacam-se a China, a Tailândia e o Vietnã e, nas Américas, o Equador, o México e no nordeste do Brasil (FAO, 2010). Esse crescimento ocorreu devido a diversos fatores e entre eles destacam-se as inovações tecnológicas nos sistemas de cultivo e práticas adequadas de manejo (DOTTA, PIAZZA, 2012). Estatísticas da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2010) apontam que o cultivo da espécie *L. vannamei* aumentou consideravelmente em meados dos anos 80 e 90, com declínio no final dos anos 90 em virtude do vírus da síndrome da mancha branca (*White spot syndrome virus*, WSSV). Ainda, segundo estimativas da FAO (2014), a produção mundial de camarão obteve no ano de 2012 cerca de 3,4 milhões de toneladas.

No Brasil, a carcinicultura teve início por volta dos anos 1930, presente principalmente nas regiões costeiras. Em Santa Catarina, a Universidade Federal de Santa Catarina foi uma das pioneiras no estado, com realização de pesquisas relacionadas ao cultivo de camarões marinhos nativos *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti* para repovoamento, isso na década de 1970. Porém, a atividade só ganhou êxito na década de 90 com a introdução da espécie exótica *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), devido a algumas características zootécnicas como: rápido crescimento, alta taxa de conversão alimentar, rusticidade, alta taxa de sobrevivência e pacote tecnológico de cultivo conhecido (VINATEA, 2004).

O camarão branco, *L. vannamei* (Figura 1) é originário do Leste do Oceano Pacífico, com uma ocorrência desde Sonora, no México, até Thumbes no norte do Peru (BARBIERI, NETO 2002), segundo a FAO (2012) uma das espécies de crustáceos mais cultivadas mundialmente. Sua classificação taxonômica compreende a filo Arthropoda e o subfilo Crustacea que é composta pelos animais mais abundantes, diversificados e com maior distribuição nos oceanos. A espécie pertence ainda à classe Malacostraca e à ordem Decapoda devido a presença de três pares de maxilípedes e cinco pares de pereópodes e pôr fim à família Penaeidae.



Figura 1. Espécime de *Litopenaeus vannamei*. Fonte: Autor.

Os camarões marinhos se reproduzem naturalmente em alto mar, uma fêmea pode chegar a desovar até 500.000 ovos por desova, desses ovos eclodem os náuplios que se subdividem-se em cinco estágios (N1 a N5), nesta fase não há alimentação exógena, apenas uma fototaxismo positivo, este estágio tem duração de trinta e seis horas com temperatura em torno de 26 °C. Já no estágio protozoéia apresenta três subdivisões (Z1 a Z3) com hábito alimentar constituído apenas de fitoplâncton, a duração deste estágio é quatro dias. No estágio de mysis há três subdivisões (M1 a M3) com inclusão de zooplâncton na dieta e este estágio tem duração de três dias. Já no estágio de pós-larva, o camarão já possui características de adulto, procurando nesta fase ambiente estuarino, onde fica em torno de quatro meses, devido à baixa salinidade e a abundância em itens alimentares, após esse período retorna ao mar para maturação sexual que acontece aproximadamente no sexto mês de vida (VINATEA, 2004).

A maturação sexual é dependente de vários fatores físico-químicos como salinidade, oxigênio dissolvido (OD) e temperatura. O órgão X é responsável pela maturação sexual, e está presente no pedúnculo ocular, compreende um conjunto de células neurosecretoras, cuja função é ativar ou inibir a maturação gonadal. e esta fase é antagonista a ecdise em virtude do gasto energético. Na produção em

cativeiro a maturação sexual é obtida pela “ablação do pedúnculo ocular”(VINATEA, 2004).

## **1.2 Nutrição na Carcinicultura**

O sucesso produtivo na carcinicultura demanda de cuidados básicos de manejo, já que o ambiente aquático é propício para disseminação de agentes patogênicos. Além disso, o confinamento dos animais no ambiente de cultivo pode proporcionar um estado de estresse e, com isso, há a proliferação de agentes oportunistas como fungos, bactérias, dentre outros (DOTTA, PIAZZA, 2012). Sendo assim, para diminuir a mortalidade desses organismos e aumentar a resistência aos patógenos oportunistas, devem-se observar fatores como oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura, densidade e principalmente alimentação (CYRINO, FRACALOSSO, 2013). Quanto à alimentação, é necessário oferecer uma ração que atenda as exigências nutricionais da espécie cultivada, além de fatores como atratividade, palatabilidade e ser especialmente economicamente viável para o produtor (CYRINO, FRACALOSSO, 2013).

No Brasil, em geral, as rações ofertadas para os camarões de cultivo são compostas principalmente de farinha de resíduo de peixe que, muitas vezes, são provenientes de pescado, não utilizados para consumo humano ou da captura de peixes pelágicos, o que acarreta um aumento no preço da ração (van HUIS, 2012). Entretanto, tem-se realizado diversos estudos em busca de novas fontes de proteicas, como por exemplo, farelo de soja, trigo, glúten de milho, farinha de ossos e farinha de penas (NUNES et al., 2011). A farinha de resíduo de peixe é utilizada nas rações por ser uma fonte rica em aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais, além disso, aumenta a palatabilidade, digestibilidade e atratividade da ração, e com isso há um maior custo de produção (SUÁREZ et al., 2009). Contudo, estudos têm demonstrado a eficiência da substituição da farinha de peixe por fontes proteicas mais econômicas, seja ela de origem vegetal ou animal.

Na literatura têm sido relatados resultados positivos com a substituição da farinha de peixe por ingredientes alternativos, buscando sempre o correto balanceamento nutricional da ração, e assim proporcionar o desempenho zootécnico no cultivo de camarões. No

entanto, na busca dessas novas fontes proteicas alternativas deve-se observar fatores como disponibilidade no mercado, preço, crescimento, sobrevivência, consumo de ração e conversão alimentar (SUÁREZ et al., 2009). Suárez e colaboradores (2009) obtiveram resultados satisfatórios com a substituição de farinha de resíduo de peixe por rações com diferentes concentrações de farelo de soja e canola, em cultivo de *L. vannamei*, justificando que o uso de fontes proteicas acessíveis, pode aumentar a rentabilidade do produtor, já que a ração consiste no insumo mais caro da produção. Nunes e colaboradores (2011) relatam o bom desempenho com ganho em peso com dietas a base de 100% de proteína de origem vegetal. Já em trabalhos feitos por Cordova-Murueta et al., 2003 foram observados resultados positivos na alimentação com alimento vivo na análise do perfil enzimático em fezes de *L. vannamei*. Estes animais foram alimentados com diferentes fontes proteicas e em diferentes concentrações da ração comercial e ainda com a inclusão do alimento vivo sendo que, o alimento vivo proporcionou uma maior atividade enzimática, justificado que a composição do alimento ofertado ao camarão pode influenciar no processo digestivo. Molina-Proveda et al. (2013) observaram resultados positivos com 50% de substituição de farinha de peixe, usado a leguminosa *Lupinus mutabilis*, na dieta do camarão *L. vannamei* na fase de engorda.

Já Lourenço e colaboradores (2009) obtiveram bons resultados com substituição de *Artemia sp.* em berçários de pós-larvas de camarões *L. vannamei* por ração comercial com diferentes níveis de substituição de até 40% de ração. Martínez-Córdova et al. (2013) também obtiveram resultado satisfatório ofertando como alimento vivo, o inseto *Trichocorixa sp.*, em substituição parcial da ração formulada. Os melhores resultados foram observados quando utilizado 50% de substituição do inseto *Trichocorixa sp.* Além disto, o estudo demonstrou que não foram alteradas características organolépticas do camarão como cor, odor e sabor.

### **1.3 O uso de farinha de inseto comestíveis como fonte de nutrientes**

A entomofagia consiste na prática de consumir insetos, sendo comum em diversos países Orientais, embora no Ocidente a utilização de inseto para consumo humano seja tratado como algo atípico. No entanto, há uma busca por novas fontes proteicas alternativas para consumo

humano e animal, em virtude da redução dos recursos pesqueiros, do alto custo da produção pecuária, do aumento dos gases do efeito estufa, da poluição ambiental, do aumento no número de zoonoses e também da escassez de água, criam novas opções do uso do inseto para a manutenção da segurança alimentar (van HUIS, 2012).

Dados apontam que cerca de 1900 espécies de insetos são consumidas em todo mundo, além disso, órgãos como a FAO têm elaborado diversas pesquisas na avaliação do potencial do uso de inseto na alimentação humana e animal. Os insetos são opções interessantes para a manutenção da segurança alimentar, pois possuem vantagens como alta eficiência na conversão alimentar, por ser um alimento altamente nutritivo, além de conservar os recursos naturais por meio do seu cultivo, em virtude do uso reduzido de água e reciclagem matéria orgânica (van HUIS, 2012)

Busca-se a substituição de ingredientes “caros” na ração de organismos aquáticos cultiváveis para produção em escala industrial, e com isso em pesquisas tem-se demonstrado resultados promissores no uso de insetos como a *Musca domestica*, por possuir um alto teor de proteína e aminoácidos essenciais como lisina e arginina, e o besouro *Tenebrio molitor*, que é um inseto comestível, produzido comercialmente e que é utilizado também na produção da farinha de inseto por possuir um alto teor de aminoácidos e ácidos graxos (van HUIS, 2012; ROMEIRO et al, 2015). Siemianowska et al. (2013) encontraram resultados positivos em análise nutricional do inseto *T. molitor*, verificando a presença de ácidos graxos como ômega 3 e 6, e conteúdo de aproximadamente 18% de proteína seca, resultados esses que comprovam a eficiência no uso do *T. molitor* na alimentação de organismos aquáticos, pois esses demandam de valores altos de proteína e ácidos graxos essenciais.

#### **1.4 Enzimas**

As proteínas são macromoléculas biológicas que estão divididas em subunidade monoméricas simples, elas controlam quase todos os processos que ocorrem na célula (NELSON, COX, 2014). Possuem várias funções vitais como transporte de oxigênio e vitaminas, função estrutural, transmissão nervosa, contração muscular, coagulação sanguínea, defesa, hormonal e catalise metabólica. São sintetizadas por uma sequência de

aminoácidos unidos que formam uma estrutura poliamídica linear, polipeptídios ou ainda estruturas tridimensionais (PRATT, CORNELLY, 2006).

Todas as enzimas são proteínas com exceção de um grupo de moléculas de ácido ribonucleico (RNAs) catalíticos, as enzimas atuam em sequências organizadas catalisando diversas etapas que degradam as moléculas dos nutrientes, conservando e transformando energia química, além de construir macromoléculas a partir de precursores (NELSON, COX, 2014).

Uma das enzimas mas estudadas é a quimotripsina que é uma enzima digestiva, em mamíferos ela é sintetizada pelo pâncreas e secretada no intestino delgado, onde atua na degradação de proteínas oriundas da alimentação, foi uma das primeiras enzimas a serem cristalizadas, sendo composta por três cadeias peptídicas unidas por ponte dissulfeto, 241 aminoácidos e dois domínios. A hidrólise dos substratos peptídicos ocorre em uma fenda entre os dois domínios próximo a cadeia de três aminoácidos a histidina 57, o aspartato 102 e a serina 195, área conhecida como sitio ativo (PRATT, CORNELLY, 2006), já a clivagem ocorre próximo a aminoácidos aromáticos ou cadeia laterais hidrófobas grandes, como triptofano, tirosina, fenilalanina e metionina, fato conhecido como especificidade (Berg et al., 2008).

A tripsina também é uma enzima digestiva, sendo homóloga a quimotripsina, é uma enzima bastante específica e catalisa a separação de ligações peptídicas no lado carboxílico dos aminoácidos lisina e arginina, essa especificidade é devido a interação enzima e substrato, tal precisão é justificada pela complexa estrutura tridimensional da proteína enzimática (Berg et al., 2008).

O amido é a principal fonte de carboidratos da dieta, a enzima alfa-amilase hidrolisa as ligações glicosídicas (alfa 1→4) do amido, note que a digestão do glicogênio segue a mesma via, ou seja a hidrólise do glicogênio e do amido ocasionado pela enzima alfa-amilase é fundamental para entrada da destes na glicólise (NELSON, COX, 2014).

### **1.5 Digestão em peneídeos**

Os hábitos alimentares estão associados as características anatômicas, morfológicas e fisiológicas do sistema digestório, que devem ser analisadas para o desenvolvimento de rações adequadas para cada espécie. Informações como tamanho da boca e comportamento de captura

do alimento, podem demonstrar forma, tamanho e tempo de flutuação dos grânulos da ração. Já fatores como morfologia de órgão do sistema digestório podem fornecer dados com opções de ingredientes com maior quantidade de nutrientes como proteínas, lipídios e carboidratos desejados para espécie em questão (CYRINO, FRACALOSSO, 2013).

Outros fatores como fisiologia do sistema digestório, absorção, e aproveitamento de nutrientes informam dados importantes para a determinação das exigências nutricionais das espécies cultivadas (CYRINO, FRACALOSSO, 2013). Portanto, o processo de digestão envolve uma junção de processos que são observados desde a captura do alimento, a ingestão e a liberação de fezes e produtos nitrogenados, os processos ainda compreendem fatores: físicos que incluem a apreensão, a mastigação e maceração do alimento; químicos que inclui secreção de ácidos e atividades de enzimas que seria a “quebra” dos nutrientes em biomoléculas de proteínas, lipídios, carboidratos em moléculas menores passíveis de absorção (CYRINO, FRACALOSSO, 2013). Portanto, para produção em cativeiro é fundamental a observação de processos que abrangem de forma geral a alimentação do organismo cultivado.

Os camarões podem ser classificados, quanto ao hábito alimentar, como onívoro, além disso, é considerado um predador oportunista (ALBERTONI et al., 2003). Sendo assim, possuem uma alimentação variada já que os camarões são organismos, normalmente, bentônicos se alimentando de detritos, poliquetos, anfípodos, algas, dentre outros (ANDREATTA, BELTRAME, 2004).

O corpo do camarão é dividido em duas partes cefalotórax e abdômen, no cefalotórax é onde estão localizados os periópodos que tem função de locomoção e quimorrecepção e no abdômen os pleópodos que possuem a mesma função. As antenas e antênula tem a função de sensores contra predadores e quimorreceptores, respectivamente. Além, disso possuem um exoesqueleto que tem como função principal ser uma barreira protetora para evitar a entrada de microrganismos (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006).

O sistema digestório (Figura 2) desses organismos é extremamente desenvolvido, sendo composto pelo intestino, que é dividido em três partes (anterior, médio e posterior) e tem como função a absorção, digestão dos alimentos, além de osmorregulação, os intestinos anterior e médio são cobertos internamente por cutícula quitinosa, a qual atua como

uma barreira físico-química, além de ser um ambiente ácido e com diversas enzimas que são capazes de inativar ou digerir agentes invasores que não fazem parte da microbiota natural do camarão; o esôfago que faz a ligação entre a boca e o estômago, este por sua vez, participa ativamente no processo de trituração dos alimentos, pois contém duas cavidades a cardíaca que serve para triturar os alimentos e a câmara pilórica que atua como uma peneira que serve para separar as partículas, sendo que as partículas maiores podem ser regurgitadas (FELGENHAUER, 1992; BARBIERI, NETO, 2002; JIRAVANICHPAISAL et al, 2006). No entanto, um dos órgãos mais importantes do camarão é o hepatopâncreas onde a maioria das enzimas digestivas é secretada, além de fazer absorção, transporte e armazenamento de minerais, lipídios e glicogênio (FELGENHAUER, 1992), o hepatopâncreas é um conjunto de tubos que possui uma rede de fibras que permitem movimentos peristálticos (BARRACCO et al., 2014).

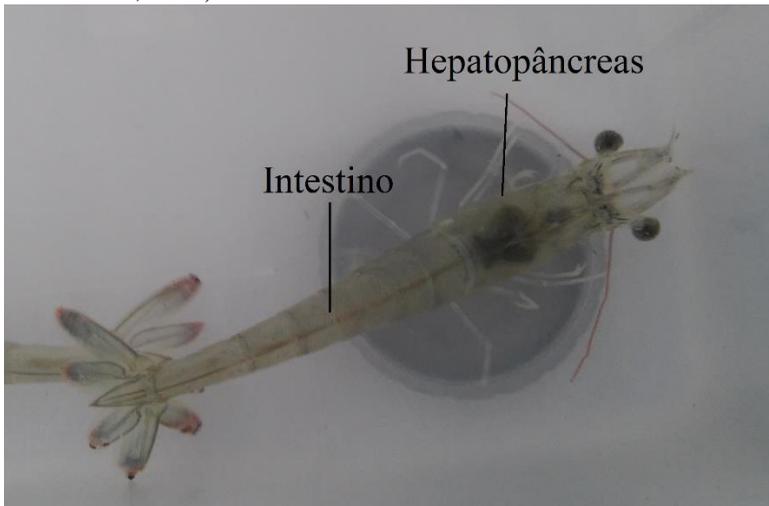


Figura 2. Sistema digestório do camarão *Litopenaeus vannamei*. Fonte: Autor.

O sistema circulatório dos crustáceos é aberto ou semi-aberto, por onde transita a hemolinfa, sendo esta composta por nutrientes, excretas, oxigênio e hormônios (BARROCCO et al, 2014). A degradação das moléculas ingeridas compreende um processo conhecido como digestão, sendo as enzimas digestivas responsáveis pela hidrólise de proteínas em aminoácidos, que irão proporcionar energia para os

processos vitais como crescimento e reprodução, além de originar novas proteínas (HERNÁNDEZ, MURUETA, 2009). Além disso, outro fator importante, é que as proteínas podem atuar de diversas formas, não só em processos que envolvem a digestão, como as enzimas hidrolíticas e lisozimas podem também fazer parte do sistema imune inato (SOONTHORNCHAI et al., 2010), porém não possuem atividade catalítica, além de alguns peptídeos antivirais e proteínas de reconhecimento padrão, que também atuam no sistema imune do camarão (BARRACCO et al., 2014). Em camarões as enzimas mais importantes no processo de digestão de proteínas são as proteinases serínicas quimotripsina e tripsina, sendo que sua atividade pode variar em função de alguns fatores genéticos ou alimentares (HERNÁNDEZ, MURUETA, 2009).

É também fundamental o conhecimento dos processos que envolvem a nutrição, entre eles a digestão dos quais compreendem etapas físicas, químicas e enzimáticas, a etapa enzimática representada pela degradação de proteínas ingeridas através da dieta, do qual devem ser degradadas a peptídeos e aminoácidos, para absorção, que por sua vez ocorre por meio da hidrólise, ou seja, adição de uma molécula de água a ligação peptídica, as enzimas responsáveis por essa clivagem são as proteases, como por exemplo a tripsina e a quimotripsina (BERG et al., 2008).

Em camarões o hepatopâncreas é o órgão responsável pela síntese dessas enzimas e com isso um indicador do metabolismo, portanto as compreensões acerca das atividades das principais enzimas digestivas do camarão podem fornecer informações importantes em relação a fisiologia nutricional e crescimento do animal (HERNÁNDEZ-ACOSTA et al., 2016). Além disso foi encontrado presença da membrana peritrófica em camarão da espécie *L. vannamei*, revestindo o bolo alimentar no lúmen intestinal, outro fato interessante é a atuação da membrana que é recoberta por quitina, no sistema imune inato, pois possui proteínas de reconhecimento padrão, atuando como barreira contra entrada de agentes patogênicos. Na membrana também há proteínas antioxidantes e digestivas como a tripsina; e atua na imobilização e na circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas (Wang et al., 2012; Alexandre et al., 2014).



## 2. Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo geral a verificação de possíveis mudanças no perfil enzimático no camarão da espécie *L. vannamei*, alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha das larvas de *T. molitor*.

### 2.1 Objetivos específicos

- Dosar as atividades de enzimas digestivas do tipo proteinases, lipases e amilases em termos absolutos e específicos no hepatopâncreas dos juvenis de camarão da espécie *L. vannamei*, alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha das larvas de *T. molitor*
- Analisar o efeito da substituição de farinha de peixe pela farinha das larvas de *T. molitor* no perfil de atividade de peptidases e amilases *in gel* através de eletroforese semi-desnaturante em gel SDS-PAGE.

### **3- Justificativa**

O cultivo de camarões demanda insumos que acarretam o custo de produção. O principal deles é com a nutrição, devido à utilização de dietas ricas em proteínas, oriundas de farinha de peixe na fabricação das rações. Nos últimos anos, pesquisas buscando ingredientes alternativos para a substituição da farinha de peixe, que são de alto valor comercial, têm sido realizadas para minimizar os gastos. Dentre esses ingredientes alternativos, o uso da farinha de inseto poderá representar um avanço sustentável e econômico para a carcinicultura brasileira.

A carcinicultura brasileira tem crescido de forma satisfatória nos últimos anos em relação a outros setores da economia aquícola. Sendo assim, diminuir custos com a alimentação desses organismos aumentar ainda mais o crescimento desse setor, sendo uma prioridade, já que constitui o principal item de custo de produção. No entanto, a elaboração de uma ração tem que atender as necessidades nutricionais do camarão, pois esta irá garantir um crescimento satisfatório e maior produtividade.

## 4-Material e Métodos

### 4.1 - Delineamento Experimental

Os experimentos de manejo foram realizados no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM-UFSC), localizado na Barra de Lagoa - Florianópolis (SC). Os camarões utilizados foram juvenis da espécie *L. vannamei* (n=9), com peso inicial de  $4,42 \pm 0,02$ g (média,  $\pm$  desvio padrão), peso final de  $9,23 \pm 0,31$ g e com um ganho de peso de  $4,81 \pm 0,30$  g, em experimento realizado em quarenta e dois dias. Os animais foram mantidos em tanques circulares de 500 L, em sistema de circulação, com renovação de aproximadamente 30% de água ao final do dia ou até que todos os resíduos de restos de alimentação ou fezes fossem eliminados, aeração constante, fotoperíodo (12h: 12h, claro/escuro), controle de temperatura de  $28,3 \pm 0,07$ °C e salinidade  $32,44 \pm 0,16$ . Também foram feitas verificações de oxigênio dissolvido (OD)  $6,23 \pm 0,03$  mg L<sup>-1</sup>, amônia  $0,47 \pm 0,05$  mg L<sup>-1</sup>, nitrito  $0,02 \pm 0,02$  mg L<sup>-1</sup> e pH  $8,13 \pm 0,02$ . Foram utilizados para medir amônia e nitrito, o método calorimétrico descrito por Strickland e Parsons(1972), já o OD, salinidade e temperatura foram observados com o aparelho YSI 55. O pH foi medido com potenciômetro digital da empresa Alfakit, conforme protocolos adotados pelo LCM e literatura descrita por Panini et al. (2017). A alimentação foi diária, incluindo três refeições (quantidade equivalente a 6% da biomassa total) com as dietas de farinha de larvas desidratadas de *T. molitor*: 0%, o controle de farinha de resíduo de salmão, 25%, 50%, 75% e 100% (denominadas 0-TM, 25-TM, 50-TM, 75-TM e 100-TM) sendo as larvas do inseto adquiridas da empresa Nutrinsecta. As rações foram elaboradas com auxílio do *software* OPTIMAL Fórmula 2000, para conter 300 g kg<sup>-1</sup> de proteína digestível e 3.000 Kcal kg<sup>-1</sup> de energia digestível, formuladas de acordo com as exigências nutricionais do camarão da espécie *L. vannamei* (NRC, 2011). A ração de farinha de *T. molitor* contém 55,58% de proteína bruta, 34,64 de lipídio, 3,03% de cinzas e 4,65 de fibras.

Tabela 1: Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas para alimentar o camarão *Litopenaeus vannamei* contendo diferentes níveis de substituição da farinha de peixe pela farinha das larvas de *Tenebrio molitor* (TM) e a composição da TM.

Ingredientes (g kg <sup>-1</sup> base seca)	<i>Substituição da farinha de peixe (%)</i>				
	0	25	50	75	100
Farinha de peixe <sup>1</sup>	206,0	154,5	103,0	51,5	0,0
Farinha de larva de <i>T. molitor</i> <sup>2</sup>	0,0	76,3	152,5	228,8	305,0
Concentrado proteico de soja <sup>3</sup>	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0
Farinha de trigo <sup>4</sup>	213,0	213,0	213,0	213,0	213,0
Óleo de fígado de bacalhau <sup>5</sup>	2,5	2,5	2,5	2,5	9,8
Óleo de soja <sup>6</sup>	50,9	30,3	9,7	0,0	0,0
Lecetina de soja <sup>7</sup>	20,3	20,3	20,3	20,3	20,3
Colesterol <sup>8</sup>	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Carboximetilcelulose <sup>9</sup>	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Caulim <sup>10</sup>	139,9	135,2	130,6	113,0	80,5
Premix vitamínico <sup>11</sup>	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Premix mineral <sup>12</sup>	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Cloreto de sódio <sup>9</sup>	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Vitamina C <sup>13</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fosfato bicálcico <sup>9</sup>	4,5	4,5	4,5	6,5	6,5
DL-Methionina <sup>14</sup>	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5

Tabela 1: Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas para alimentar o camarão *Litopenaeus vannamei* contendo diferentes níveis de substituição da farinha de peixe pela farinha das larvas de *Tenebrio molitor* (TM) e a composição da TM (*continuação*).

Composição centesimal (g kg <sup>-1</sup> base seca)				T. molitor		
Matéria seca	891,7	897,2	901,8	906,5	908,2	962,8
Umidade	108,3	102,8	98,2	93,5	91,8	37,2
Proteína	367,2	371,6	377,0	381,9	385,2	555,8
Proteína digesti	300	300	300	300	300	452,1
Lipídio	101,9	99,7	98,5	111,4	143,3	346,4
Cinzas	220,7	211,4	203,9	187,5	158,4	30,3
ELN <sup>a</sup>	310,2	317,3	320,6	319,2	313,1	18,6
Energia (kcal k	3972	4028	4084	4230	4525	7744
Energia digest.(kcal kg <sup>-1</sup> ;	3044	3028	3011	3086	3301	5150

<sup>1</sup> Farinha de resíduo de Salmão - Tectron Imp. e Exp. de Prod. Veterinários LTDA (Toledo, PR, Brasil).

<sup>2</sup> Nutrinsecta Ind. Com. LTDA (Betim, MG, Brasil).

<sup>3</sup> IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A. (Araucária, PR, Brasil);

<sup>4</sup> Nordeste Com. de Alimentos LTDA (Antônio Prado, RS, Brasil).

<sup>5</sup> Delaware Ltda (Porto Alegre, RS, Brasil).

<sup>6</sup> Cocamar Cooperativa Agroindustrial (Maringá, PR, Brasil).

<sup>7</sup> Quimidrol Com. Ind. Imp. Ltda (Joinville, SC, Brasil).

<sup>8</sup> Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

<sup>9</sup> VETEC Química Fina LTDA (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

<sup>10</sup> Vita Essência Farmácia de Manipulação e Homeopatia LTDA (Florianópolis, SC, Brasil).

<sup>11</sup> InVivo mix (Paulínia, SP, Brasil) – Premix vitaminico: vitamina A 3.000.000 IU; vitamina D<sub>3</sub> 1.000.000 IU; vitamina E 70.000 IU; vitamina K<sub>3</sub>, 14 g; vitamina B<sub>1</sub> 30 g; vitamina B<sub>2</sub> 20 g; vitamina B<sub>6</sub> 33 g; vitamina B<sub>12</sub> 50.000 mcg; ácido pantotênico 40 g; biotina 750 mg; ácido nicotínico 70 g; ácido fólico 3.000 mg; excipiente q.s.p., 1.000 g.

<sup>12</sup> InVivo mix (Paulínia, SP, Brasil) – Premix mineral: potássio 6.100 mg; cobre 23.330 mg; zinco 10.000 mg; manganês 20.000 mg; selênio 125 mg; iodo 1000 mg; cobalto 50 mg; excipiente q.s.p. 1.000 g.

<sup>13</sup> DSM Produtos Nutricionais (São Paulo, SP, Brasil).

<sup>14</sup> Evonik Degussa Brasil LTDA (Guarulhos, SP, Brasil).

<sup>a</sup> Extrato livre de nitrogênio = 100% - (% umidade + % proteína + % lipídio + % cinzas + % fibra bruta)

Fonte: Panini et al., 2017.

## 4.2- Determinação de atividades enzimáticas

Após o manejo alimentar (42 dias) os camarões foram colocados em gelo e, posteriormente foi realizada dissecação para a coleta dos hepatopâncreas, que foram mantidos em tubos cônicos tipo *Eppendorfs* com solução salina 3% (m/v). Posteriormente, os hepatopâncreas foram homogeneizadas em água destilada com auxílio de pistilos e tubos cônicos, contendo um hepatopâncreas por tubo e colocadas em centrifugas 15.000 x g, trinta minutos a 4°C, sendo retirado 1mL do sobrenadante.

### 4.2.1– Determinação de atividade proteolítica

A atividade tipo tripsina foi medida utilizando-se como substrato o composto N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (bz-R-pNA), conforme protocolo adaptado originalmente de Erlanger et al. (1961) e Delmar et al. (1979). Esse substrato sintético foi inicialmente dissolvido em dimetilsulfóxido e tampão fosfato de sódio dibásico 50 mM, pH 7,5 para uma concentração de 4 mM. As análises foram feitas incubando-se 50µL de amostra com 50µL da solução substrato/tampão em banho-maria (concentração do substrato no meio de reação de 2 mM) por pelo menos quatro diferentes períodos de tempo à temperatura de 30°C. As reações foram paradas com 100 µL ácido acético 30% (v/v), e posteriormente foram feitas as leituras de absorbâncias a 410 nm em leitor de microplacas TECAN (Infinite pro, Califórnia, EUA). Uma curva padrão com p-nitroanilina foi usada como referência para os cálculos de atividade.

A atividade da quimotripsina foi medida com 4 mM de succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil-p nitroanilida (suc-AAPF-pNA), substrato sintético que foi dissolvido em dimetilsulfóxido e tampão fosfato de sódio dibásico 50 mM, pH 7,5. As análises foram feitas com 50 µL de amostra e 50 µL de substrato tampão em banho-maria (concentração do substrato no meio de reação de 2 mM) por pelo menos quatro diferentes períodos de tempo à temperatura de 30°C. As reações serão paradas com 100 µL de ácido acético 30% (v/v), e posteriormente serão feitas as leituras

de absorvâncias a 410 nm em leitor de microplacas TECAN (Infinite pro, Califórnia, EUA). Uma curva padrão com p-nitroanilina foi usada como referência para os cálculos de atividade. Uma unidade de atividade enzimática proteolítica contra substrato derivados de p-nitroanilida foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar o equivalente a 1 $\mu$ mol de p-nitroanilina por minuto.

A atividade proteolítica também foi medida usando-se como substrato azo-albumina dissolvida em tampão fosfato 50 mM, em pH 7,5. As análises foram feitas com 100  $\mu$ L de amostra e 100  $\mu$ L de substrato/tampão (concentração da azo albumina no meio de reação 2%, m/v) em estufa a 30°C. As reações foram paradas por pelo menos quatro períodos de tempo com 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 25% (m/v). Posteriormente as amostras foram centrifugadas durante cinco minutos a 11.000 x g. Em seguida, foram coletados 100  $\mu$ L do sobrenadante e alcalinizados com 100  $\mu$ L de NaOH 2N. As leituras de absorvância 420 nm foram realizadas em leitor de microplacas TECAN (Infinite pro, Califórnia, EUA). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como quantidade capaz de produzir uma absorvância de 0,01 D.O por minuto (1U=0,01 ABS/min).

#### **4.2.2 – Determinação de atividade lipásica**

A atividade da lipase foi medida com metil umbeliferol oleato, substrato sintético que foi dissolvido em acetonitrila (ACN) para uma concentração de 1  $\mu$ M. As análises foram feitas com 50 $\mu$ L de amostra e 50 $\mu$ L de substrato tampão com leituras de absorvâncias a excitação 355nm e emissão 460nm em fluorímetro de placas. Uma curva padrão com metil umbeliferona foi usada como referência para os cálculos de atividade. Uma unidade de atividade enzimática será definida como a quantidade de enzima capaz de libera 1 $\mu$ mol de produto por minuto.

#### **4.2.3 – Determinação de atividade amilásica**

Para o ensaio de amilase utilizou-se protocolo do originalmente adaptado de Noelting (1948), primeiramente foi feito um tampão de acetato de sódio 50 mM, NaCl 20 mM CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 5,5 e amido 1% (m/v). Em seguida serão incubados 25 µL das amostras e 25 µL do substrato amido 1% (m/v) em tampão acetato de sódio descrito acima, que foram colocados em banho-maria a 30°C. Essa reação será parada com adição de 100 µL de DNS (ácido dinitrossalicílico) em pelo menos quatro intervalo de tempo. Após as amostras foram aquecidas a 100 °C durante cinco minutos e adicionado água 100 µL ao final, posteriormente as incubações serão feitas as leituras de absorbância a 550 nm em leitor de microplacas TECAN (Infinite pro, Califórnia, EUA). Uma curva padrão com glicose foi usada como referência para os cálculos de atividade.

### **4.3 – Determinação de proteína**

Para a determinação de proteínas, o método baseado na adsorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, proposto por Bradford em 1976, foi empregado utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. Foi utilizado também o método ensaio do ácido bicinonínico (BCA) do *kit* da empresa Sigma para quantificação de proteínas, segundo as instruções do fabricante.

### **4.4. – Determinação de atividades enzimáticas em géis de eletroforese semi-desnaturantes**

#### **4.4.1 -Determinação de atividade proteolítica *in gel***

Para a obtenção dos zimogramas foram utilizados géis de poliacrilamida SDS-PAGE 10%(m/v) contendo gelatina 0,1%(m/v). As amostras serão homogeneizadas em água destilada com pistilo e colocadas em centrifugas 15000 x g, trinta minutos a 4°C e retirado o sobrenadante. Após esses procedimentos as amostras serão mantidas em gelo e misturadas com tampão da amostra, esse tampão que contem Tris-HCL 200 mM pH 6,8, glicerol 20%(v/v), azul de bromofenol 0,1 %(m/v), SDS

2,5%(m/v) e água destilada. O equipamento utilizado foi mini-Protean III BioRad (EUA). A eletroforese foi realizada em geladeira com voltagem constante de 150 V com temperatura de 4°C, até o azul de bromofenol atingir o fundo do gel. Para a determinação de atividade proteolítica *in gel*, o gel foi renaturado com incubação de triton X-100 2,5% (v/v) por vinte minutos e incubado com tampão fosfato de sódio dibásico 50 mM, pH 7,5 durante trinta minutos a 30°C, após foi corado com corante Coomassie Blue R 1%(m/v), em solução etanol 25%(v/v) e ácido acético 5%(v/v) em água com incubação *overnight* e descoloração em solução etanol 25%(v/v) e ácido acético 5%(v/v) até visualização de bandas claras em um fundo azul escuro.

#### **4.4.2 -Determinação de atividade amilásica *in gel***

Para a obtenção dos zimogramas foram utilizados géis de poliacrilamida SDS-PAGE 10%(m/v). As amostras serão homogeneizadas em água destilada com pistilo e colocadas em centrifugas 15000 x g, trinta minutos a 4°C e retirado o sobrenadante. Após esses procedimentos as amostras serão mantidas em gelo e misturadas com tampão da amostra, esse tampão que contem Tris-HCl 200 mM pH 6,8, glicerol 20%(v/v), bromofenol blue 0,1 %(m/v), SDS 2,5%(m/v) e água destilada. O equipamento utilizado foi mini-Proteina III BioRad (EUA). A eletroforese foi realizada em geladeira com voltagem constante de 150 V com temperatura de 4°C, até o azul de bromofenol atingir o fundo do gel, o gel foi renaturado com incubação de triton X-100 2,5% (v/v). Após esse período, o gel foi incubado em tampão acetato de sódio pH 5,5 e amido 1% (m/v) durante trinta minutos a 30°C e corado com lugol 10% (v/v).

### **5. Análise estatística**

Para as análises estatísticas serão utilizado o programa Microsoft Excel para cálculos relacionados às curvas dos ensaios enzimáticos e dados de atividade enzimáticas foram testados por meio de análise de variância (ANOVA) e Dunnet com 5% de

significância para comparação das médias. Previamente, os dados foram testados para normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov. O programa utilizado para a análise estatística compreensão dos dados foi o STATISTICA versão 13 da empresa Statsoft.

## 6- Resultados

### 6.1– Determinação de atividade proteolítica

Foram analisadas através dos ensaios enzimáticos as atividades das enzimas tripsina, quimotripsina, lipase e amilase utilizando os substratos N-benzoil-DL-argininil-p nitroanilida (bz-R-pNA), succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil-p nitroanilida (suc-AAPF-pNA), metil umbeliferol oleato e amido 1%(m/v) respectivamente.

Os resultados demonstram que a atividade enzimática do tipo tripsina em termos absolutos (Figura 3a) e específicos (Figura 3b) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com diferentes níveis de substituição (25%, 50%, 75% e 100%) e o controle (0%) composto por ração de resíduo de salmão.

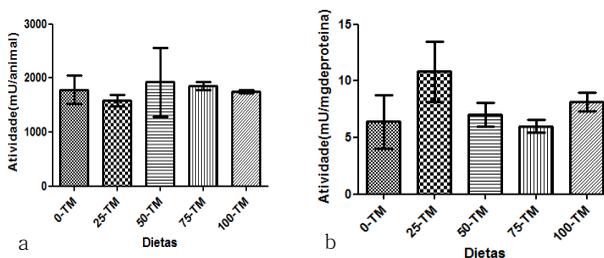


Figura 3. Média da atividade absoluta (a) e específica (b) da enzima tripsina do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de larva de *Tenebrio molitor* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 42 dias (avaliados através de ANOVA de uma via e as médias separadas pelo teste Dunnett ambas ao nível de significância de 5%).

Os resultados demonstram que a atividade absoluta da quimotripsina (Figura 4 a) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com diferentes níveis de substituição (25%, 50%, 75% e 100%) e o controle (0%) composto por ração de resíduo de salmão. Já em relação à atividade específica (Figura 4b),

os resultados dos ensaios demonstraram não haver diferença estatística significativa entre os tratamentos com os níveis de substituição 50%, 75% e 100% e o controle (0%), no entanto, para o nível de substituição de 25% houve uma pequena diferença.

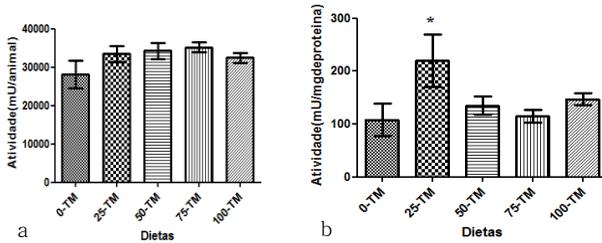


Figura 4. Média da atividade da absoluta (a) e específica (b) da enzima quimotripsina do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de larva de *Tenebrio molitor* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 42 dias (avaliados através de ANOVA de uma via e as médias separadas pelo teste Dunnett ambas ao nível de significância de 5%). \*Diferença significativa.

Em relação à atividade proteolítica absoluta frente ao substrato azo albumina (Figura 5 a) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com diferentes níveis de substituição 50%, 25% quando comparado com tratamento controle, exceto nos níveis de substituição 75% e 100%. Já em relação a atividade específica (Figura 5 b) os ensaios demonstram não haver diferença significativa entre os tratamentos com níveis de substituição 50% e 75%, quando comparados com o controle, exceto nos níveis 25% e 100%

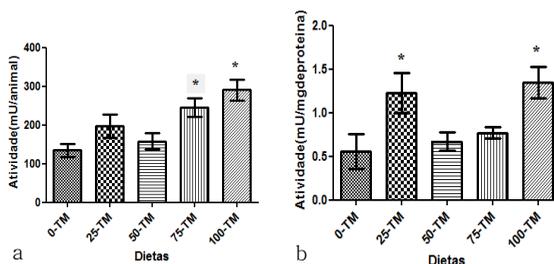


Figura 5. Determinação de atividade absoluta (a) e específica (b) de azo albumina em homogenatos de hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de larva de *Tenebrio molitor* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 42 dias utilizando-se como substrato azo albumina. Os dados foram avaliados através de ANOVA de uma via e as médias separadas pelo teste Dunnett ambas ao nível de significância de 5%. \*Diferença significativa.

## 6.2 – Determinação de atividade lipásica

Em relação à atividade absoluta (Figura 6 a) e específica (Figura 6 b) da enzima lipase no hepatopâncreas de *L. vannamei* frente substrato metil umbeliferil oleato, não houve diferença significativa entre o controle e os diferentes níveis de substituição (25%, 50%, 75% e 100%) de farinha de *T. molitor*.

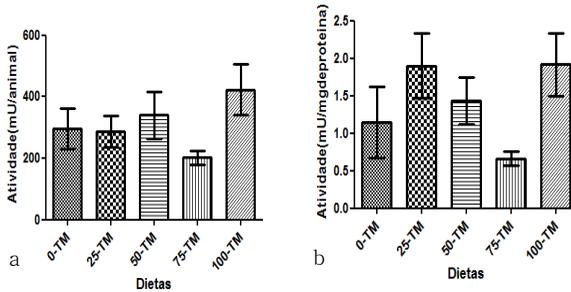


Figura 6. Média da atividade absoluta(a) e específica(b) da enzima lipase do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de larva de *Tenebrio molitor* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 42 dias (avaliados através de ANOVA de uma via e as médias separadas pelo teste Dunnett ambas ao nível de significância de 5%).

### 6.3 – Determinação de atividade amilásica

A atividade em termos absolutos (Figura 7a) da enzima amilase não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com diferentes níveis de substituição 25%, 50%, e 75% e 100% quando comparados com o controle (0%) composto por ração de resíduo de salmão. Já em relação à atividade específica (Figura 7b) os ensaios demonstram não haver diferença entre os tratamentos com níveis de substituição 50% e 75% e 100%, quando comparados com o controle, exceto no nível 25%.

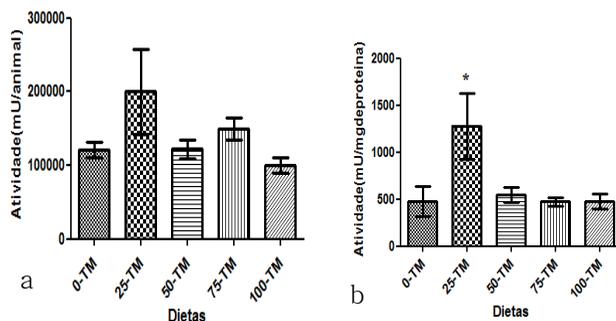


Figura 7. Média da atividade absoluta(a) e específica(b) da enzima amilase do hepatopâncreas do camarão *L. vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de larva de *T. molitor* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 42 dias (avaliados através de ANOVA de uma via e as médias separadas pelo teste Dunnett ambas ao nível de significância de 5%). \*Diferenças significativas.

#### 6.4 -Determinação de atividade proteolítica *in gel*

Em relação à atividade proteolítica em gel de SDS-PAGE (Figura 8), observa-se um perfil de bandas semelhantes para os diversos tratamentos.

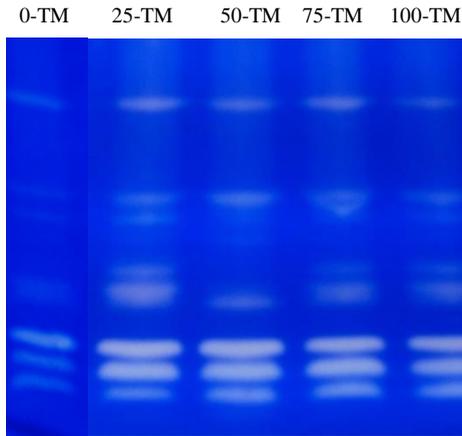


Figura 8. Zimograma de atividade proteolítica de proteínas do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de larva de *Tenebrio molitor* (0, 25, 50, 75 e 100%) em gel SDS-PAGE 10% contendo 0,1% de gelatina. Normalizados por quantidade de proteína.

### **6.5 -Determinação de atividade amilásica *in gel***

Em relação à atividade amilásica em gel de SDS-PAGE (Figura 9), observa-se um perfil de bandas semelhantes. Porém, há um aumento na intensidade de bandas na dieta contendo o nível de substituição de 100%.

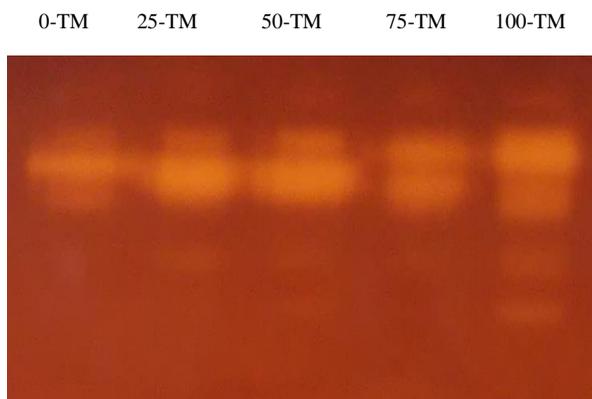


Figura 9. Zimograma de atividade de amilase do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de larva de *Tenebrio molitor* (0, 25, 50, 75 e 100%) em gel SDS-PAGE 10% polimerizado com amido 1% e corado com lugol 10%(v/v). Normalizados por quantidade de proteína.

## 7- Discussão

A carcinicultura no Brasil tem grande potencial de crescimento, devido ao cultivo da espécie exótica *L. vannamei*, suas características zootécnicas favoráveis, além disso tem sido relatado a ampla faixa de tolerância da espécie a salinidade (LIN, CHEN, 2003) e a temperatura (BUCKLE et al., 2006), embora setor ainda demande de melhorias como nas técnicas de manejo, principalmente nos aspectos relacionados a qualidade de água e nutrição. A nutrição de espécies aquícolas ainda é um insumo muito caro para produtor, no entanto tem se buscado fontes proteicas mais viáveis. Rumpold e Schluter (2013) relataram o potencial do uso de diversas espécies de insetos na alimentação humana e animal por serem ricos em amino ácidos, ácidos graxos, minerais e vitaminas, além disso o uso de insetos nas rações já tem sido relatado positivamente em peixes, inclusive a espécie de besouro *T. molitor* (Ng et al., 2001; Sanchez-Muros et al., 2016).

Em ambiente natural o hábito alimentar dos camarões, como a maioria dos crustáceos, é diversificada, o que pode ocasionar diversas mudanças no perfil enzimático, como demonstram estudos feitos por Figueiredo e Anderson (2009), que analisaram o perfil de enzimas digestivas de camarões das espécies: *Penaeus esculentus*, *Penaeus plebejus* e *Macrobrachium australiense* com alimentação de ambiente natural, observando a variação de quimotripsina e tripsina entre as espécies. Além disso, observou-se uma atividade relativamente alta de celulase em *M. australiense*, devido ao seu habito alimentar basicamente onívoro que incluem uma dieta variada, inclusive à base de insetos.

Já em estudos feitos por Chisty e colaboradores (2009) observaram a presença majoritária de quimotripsina e tripsina em juvenis da espécie *Macrobrachium rosenbergii*, alimentados com ração comercial contendo 38% de proteína. Resultado semelhante também foi observado na espécie de *Farfantepenaeus paulensis* alimentados com ração comercial contendo 35% proteína, em relação a presença de quimotripsina e tripsina (Buarque et al., 2009).

O trabalho feito por Alexandre e colaboradores (2014)

demonstraram a existência da membrana peritrófica, além de observar também o perfil de proteinases digestivas, observando um aumento de atividade enzimática no intestino quando foi aumentada a concentração de proteína na dieta de *L. vannamei*.

A compreensão do perfil enzimático é importante para elaboração de dietas, pois de acordo com Muhia-Almazán et al. (2008) em invertebrados a composição dos alimentos digeridos influencia no padrão das enzimas digestivas. Assim, a composição das enzimas sofrerá mudanças conforme os hábitos alimentares, o camarão ao longo do desenvolvimento larval, por exemplo, tem uma variação no hábito alimentar, no estágio de protozoéia cuja alimentação é fitoplâncton pode apresentar níveis altos de amilases e baixos níveis de proteases, já no estágio de mísis cuja dieta é zooplâncton espera-se um aumento no nível de proteases e redução nível de amilases (Figueiredo e Anderson, 2009).

Li et al. (2008) sugerem vantagens na capacidade de obtenção de energia a partir de proteínas, já que é conhecido que peixes e crustáceos, não apresentam exigências nutricionais para carboidratos, resultado do seu hábito alimentar (CYRINO, FRACALOSSO, 2013).

O metabolismo é a soma de todas as transformações químicas que ocorrem na célula ou organismo, sendo caracterizado por uma série de reações catalisadas por enzimas que compõem as vias metabólicas. Sabe-se que as vias metabólicas de catabolismo e anabolismo são semelhantes em todas as formas de vida. E a obtenção de energia ocorre através do catabolismo de biomoléculas como lipídio, carboidratos e proteína. Ou seja, a composição nutricional da dieta de organismos aquáticos cultiváveis, deve conter além de lipídios (principalmente PUFA's), carboidratos e proteínas (deve-se observar a composição dos aminoácidos essenciais), as vitaminas e os minerais, pois níveis baixos de proteína e lipídios podem prejudicar a eficiência reprodutiva (NELSON, COX, 2014; CYRINO, FRACALOSSO, 2013). No entanto, durante a fase de jejum prolongado que no caso dos camarões seria durante o processo de ecdise ou gasto energético prolongado para reprodução, por exemplo, quando não

há reservas de glicogênio, ocorre um processo denominado gliconeogênese, ou seja, método para sintetizar glicose a partir de precursores que não são carboidratos (NELSON, COX, 2014).

Os resultados demonstram que a atividade absoluta e específica da enzima tripsina e atividade absoluta da quimotripsina não apresentou diferença entre o controle e os tratamentos, sugerindo que a substituição da farinha de larvas de *T. molitor* não altera a capacidade dos camarões em digerir as proteínas da dieta. Outro fato interessante é que a enzima quimotripsina apresentou uma atividade absoluta (Figura 4a) dez vezes maior que a tripsina.

Em trabalhos elaborados por Ozório et al. (2015), com dieta suplementada com extrato de polissacarídeos da microalga *Porphyridium cruentum* em diferentes concentrações quando comparado com uma dieta de ração comercial, também não foi encontrado alterações na atividade das enzimas proteolíticas no hepatopâncreas (tripsina e quimotripsina) da dieta suplementada com microalga em relação ao controle.

No entanto, vale a pena ressaltar que em trabalhos feitos por ONG e JOHNSTON (2006), foi observado em *Penaeus monodon* que a produção de enzimas (tripsina, amilase e lipase) independe da alimentação, ou seja é contínua mesmo que o animal esteja em período de jejum prolongado.

Foi encontrado diferença significativa em relação a atividade proteolítica frente ao substrato azo albumina em relação atividade absoluta e específica, também em resultados encontrados por ALEXANDRE et al. (2014) foi observado uma diminuição da atividade no hepatopâncreas na dieta com incorporação de 80% de ovoalbumina em relação ao controle com ração comercial.

Os triacilgliceróis utilizados na produção de energia são geralmente advindos da dieta, sendo hidrolisados pelas enzimas lipases, gerando glicerol e ácidos graxos. Os ácidos graxos de cadeia longa como o linoleico e linolênico são destinados à  $\beta$ -oxidação e utilizados de forma mais vantajosa em termos de quantidade, quando comparado com carboidratos no quesito produção de adenosina trifosfato, o ATP (RIVERA-PÉREZ, et al, 2010; MARQUES, 2014). A atividade da enzima lipase já tem sido relatada em crustáceos como lagostas, lagostim e inclusive em

camarões (PERERA et al., 2008). Em trabalhos elaborados por RIVERA-PÉREZ, et al. (2010) em intestino médio de camarões da espécie *L. vannamei* foi observado lipases com massa molecular de 44,8kDa, que foram inclusive purificadas e otimizado faixa de pH (7 a 8) e temperatura (30-40° C).

Em relação à atividade absoluta e específica da enzima lipase não houve diferença significativa, embora a farinha de *T. molitor* contendo um alto teor lipídico. Em trabalhos elaborados por Siemianowska et al. (2013) foi encontrado em *T. molitor* cerca de 22% de gordura total, esperando assim um aumento no metabolismo de lipídio. Em *Clarias gariepinus* a substituição de farinha de *T. molitor* por farinha de peixe em diferentes níveis de substituição (0%, 20%, 40%,60% e 100%), demonstrou nível aceitável de proteína para o bagre, porém houve um aumento no teor lipídico (Ng, et al., 2001). Já em tilápia (*Oreochromis niloticus*) houve um aumento de atividade de proteases no estômago e intestino quando alimentados com diferentes taxas de incorporação de farinha de *T. molitor* integralmente ou parcialmente com farinha de peixe e farelo de soja (Sanchez-Muros et al., 2016).

Apesar de não haver exigências nutricionais em carboidratos eles são geralmente utilizados em rações como forma de produção de energia viável, pois são mais rentáveis para o produtor (CYRINO, FRACALOSSI, 2013). Os carboidratos geram o combustível essencial para a manutenção celular, a glicose, podendo ser armazenado na forma de glicogênio. A origem da glicose é advinda da dieta e constituída por polissacarídeos, o amido é um exemplo. Esses polissacarídeos são hidrolisados pelas enzimas digestivas, amilases (MARQUES, 2014).

A atividade absoluta da enzima amilase não apresentou diferença significativa, já em trabalhos elaborados por ANDRADE et al. (2011), com substituição da farinha de resíduo peixe por concentrado proteico de soja, em diferentes níveis de substituição, quando comparado com ração comercial, apresentaram maior atividade enzimática absoluta, em relação a amilase no grupo com 100% de substituição, porém os insetos podem ser uma alternativa

viável em escala de produção comercial, pois garantem uma produção constante em qualidade e quantidade, já que utilizam pouco espaço para produção, uso reduzido de água, podem ser cultivados em plantas ou grãos armazenados e também contribuem na reciclagem de resíduos orgânicos, vantagens superiores quando comparado com a soja (Sanchez-Muros et al., 2016).

Outra forma de análise para confirmação de alterações na atividade das enzimas presente no hepatopâncreas do camarão é o zimograma em gel de SDS-PAGE, conforme protocolo originalmente adaptado de Laemli (1970) e Studier (1973). Quanto a atividade proteolítica em gel (Figura 8), observa-se um perfil de bandas semelhantes, ou seja, não foi observado o aparecimento de outras isoformas de enzimas proteolíticas, mesmo com dietas diferentes. De acordo com Klein et al. (1996), a espécie *L. vannamei* possui três principais isoformas da enzima tripsina, majoritária nos invertebrados. Já em trabalhos feitos por Hernandez et al. (2006) demonstrou que os padrões de bandas mudam de acordo com o desenvolvimento larval, ocorrendo um crescimento em camarões *Litopenaeus shmitti*.

Foi observado através do zimograma a atividade da enzima amilase no hepatopâncreas do camarão, um perfil semelhante de bandas, porém houve um incrementona atividade de inseto na ração. Em trabalhos elaborados por Gualdezi et al. (2013) também foram observadas semelhanças nas bandas de atividade amilásica, mesmo em dietas diferentes. Em trabalhos elaborados por Castro et al. (2012) em *Farfantepenaeus subtilis*, *L. schmitti* e *L. vannamei*, foi observado através do zimograma, que a espécie *L. vannamei* exibia bandas mais fortes que as duas outras espécies (*F. subtilis*, *L. schmitti*), fato conclusivo de que a espécie *L. vannamei* se adapta a diferentes deitas, processo do qual pode estar relacionado a sua adaptação ao cativeiro.

## 8- Conclusões Finais

- Os resultados demonstram que não houve alterações significativas nas atividades específicas e absolutas das peptidases, lipases e amilases ensaiadas.

- Não houve alterações significativas no desempenho zootécnico dos camarões em relação ao crescimento e ao ganho de peso.

- Nos géis SDS-PAGE de atividade amilásica e proteolítica apresentaram um padrão de bandas semelhantes.

- Estes resultados demonstram que a substituição da farinha de resíduo de salmão pela farinha de larva de *T. molitor* na dieta de juvenis de *L. vannamei* não alterou o padrão das enzimas digestivas, ou seja, não houve inibição ou ativação enzimática.

## 9- Referências Bibliográficas

ALBERTONI, E.F.; PALMA-SILVA, C.; ESTEVES, F.A. Natural diet of three species of shrimp in a Tropical Coastal Lagoon. **Journal Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n. 3, p. 395-403, 2003.

ALEXANDRE, D.; OZÓRIO, R. A.; DERNER, R.B.; FRACALOSSO, D.M.; OLIVEIRA, G.B.;SAMUELS, R.I.;TERRA, W. R.; SILVA, C.P. Spatial distribution of digestive proteinases in the midgut of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) indicates the existence of endo-ectoperitrophic circulation in Crustacea. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 172-173, p. 90-95, 2014.

ANDRADE, D. H. DE H. **Enzimas digestivas do camarão branco *Litopenaeus vannamei* cultivado com dietas á base de concentrado protéico de soja em substituição a farinha de peixe.** Dissertação(Mestrado)- Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2011.

ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. **Aquicultura: experiências brasileiras.** Capítulo 8, p.199-219, 2004.

BARBIERI, J. R. C.; OSTRENSKY, N. A. Camarões marinhos - Engorda. **Aprenda Fácil**, Volume 2, p.370, 2002.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L.M.; ROSA, R.D. Avances en la Inmunología del Camarón. **Guía Técnica- Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos.** Capítulo 6, p. 237-288, 2014.

BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L.; STRYER, Lubert. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 1114 p.

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

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

BUCKLE, L.F; BARÓN, B.; HERNÁNDEZ, M. Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environment. **Rev. Biol. Trop**, v. 54(3), p. 745-753, 2006.

CASTRO, P. F.; Jr. FREITAS, A.C.V.; SANTANA, W. M.; COSTA, H. M. S.; Jr. CARVALHO, L. B.; BEZERRA, R. S. Comparative study of amylases from the midgut gland of three species of penaeid shrimp. **J. of crustacean biology**, v. 32(4), p. 607-613, 2012.

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

CÓRDOVA-MURUETA, J. H.; GARCIA-CARRENO, F. L.; MAVARRETE-DEL-TORO, M. D. L. A. Digestive enzymes present in crustacean feces as a tool for biochemical, Physiological, and ecological studies. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 297, p.43-56, 2003.

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

DELMAR, E.G.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J.W.; GEOKAS, M.C. A sensitive new substrate for chymotrypsin. **Analytical Biochemistry**, v. 99, p. 316-320, 1979.

DOTTA, G.; PIAZZA, R. S. Manejo e Sanidade no Cultivo. **Instituto Federal do Paraná para o Sistema Escola Técnica Aberta do Brasil – e-Tec Brasil**. p. 136, 2012.

ERLANGER, B.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.95, p. 271–278, 1961.

FAO 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, p. 197.

FAO 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, p. 230.

FAO 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, p. 243.

FELGENHAUER, B. E. Internal Anatomy of the Decapods: An Overview. **Rev. Microscopic Anatomy of Invertebrates**, v. 10, p. 45-75, 1992.

FIGUEIREDO, M.S.R.B.; ANDERSON, A.J. Digestive enzyme spectra in crustacean decapods (Paleomonidae, Portunidae and Penaeidae) feeding in the natural habitat. **Rev. Aquaculture Research**, v. 40, p. 282-291, 2009.

GUALDEZI, Miriam Cristina. **Efeito da concentração de amido de batata na expressão e distribuição de amilases no trato intestinal do camarão branco *Litopenaeus vannamei***. 59 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2013.

HERNANDEZ, D.; BECQUER, U.; MONTALBAN, M; ESPINOSA, G. Patrones electroforéticos de proteínas durante el desarrollo del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. **Rev. Invest. Mar**, v. 27(2), p. 147-152, 2006.

HERNÁNDEZ, J.C.S. & MURUETA, J.H.C. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. **Rev. Aquaculture**, v. 290, p.190-195, 2009.

HERNÁNDEZ-ACOSTA, M.; GUTIÉRREZ-SALAZAR, G.J.; GUZMÁN-SÁENZ, F.M.; AGUIRRE-GUZMÁN, G.; ALVAREZ-GONZÁLEZ, C. A.; LÓPEZ-ACEVEDO, E.A.; FITZSIMMON, K. The effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponária* on growth performance and enzymes activities of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured in low-salinity water. **Res. Lat. Am. J. Aquat**, v. 44(1), p. 121-128, 2016.

HUIS, van A. Potential of Insects as Food and Feed in

Assuring Food Security. **Rev. Entomol**, v.58, p. 563-583, 2012.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**. v. 211, p. 213-236, 2006.

B. KLEIN; G. Le MOULLAC; D. SELLOS; A. Van WORMHOUDT. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. **Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.28, p.551-563, 1996.

LAEMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Rev. Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEHNINGER, Albert L.; NELSON, David L.; COX, Michael M. **princípios de bioquímica**, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1298p.

LI, E.; CHEN, L.; ZENG, C.; YU, N.; XIONG, Z.; CHEN, X.; QIN, J.G. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. **Rev. Aquaculture**, v. 274, p. 80-86, 2008.

LIN, Y.; CHEN, J. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. **Rev. Aquaculture**, v. 224, p. 193–201, 2003.

LOURENÇO, J.A; SANTOS, C..A.; NETO, F.H.F.B.; ARENA, M.L.; IGARASHI, M.A. Influência de diferentes dietas no desenvolvimento do camarão *Litopenaeus*

*vannamei* (Boone, 1931) em berçários intensivos. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.31, p.1-7, 2009.

MARQUES, M. R. F. **Bioquímica**. Florianópolis: CED/LANTEC, 1. ed., p.182, 2014.

MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R. et al. Evaluation of partial and total replacement of formulated feed by live insects, *trichocorixa sp.* (Heteroptera: Corixidae) on the productive and nutritional response, and postharvest quality of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Rev.Aquaculture Nutrition**, v. 19, p. 218-226, 2013.

MOLINA-PROVEDA, C.; LUCAS, M.; JOVER, M. Evaluation of the potential of Andean lupin meal (*Lupinus mutabilis* Sweet) as an alternative to fish meal in juvenile *Litopenaeus vannamei* diets. **Rev. Aquaculture**, v.410-411, p. 148-156, 2013.

MUHLIA-ALMAZÁN, A; SÁNCHEZ-OAZ, A; GARCÍA-CARRENO, F. L. Invertebrate trypsins: a review. **Journal of comparative physiology B**, v.178, p. 655-672, 2008.

NG, W-K; LIEW, F.L.; ANG, L.P.; WONG, L.P. Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. **Rev. Aquaculture Research**, v. 32(suppl. 1), p. 273-280, 2001.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques. III. amilase: dosage d'activité et controle de l'absence amilase. *Helv.Chim Acta*. V.31, p.286-290, 1948.

NRC (2011). NATIONAL RESEARCH COUNCIL (ESTADOS UNIDOS); Committee on Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C.: National Academic

Press, p 376, 2011.

NUNES, A. J. P.; CARMO E SÁ, M. V. C.; NETO, H. S. As próximas gerações de ração para camarão marinho.

**Panorama da aquicultura**, v. 21, n.123, p.24-35, 2011.

ONG, B. L.; JOHNSTON, D. Influence of feeding on hepatopâncreas structure and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. **J. of Shellfish Research**, v. 25, p. 113–121, 2006.

OZÓRIO, R. Á.; LOPES, R.G.; Góes, B. S.; SILVA, C.P.; DERNER, R.B.; FRACALOSSI, D.M. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, 41(1): 123 – 131, 2015.

PANINI, R. L.; FREITAS, L. E. L.; GUIMARÃES, A. M.; RIOS, C; SILVA, M. F. O.; VIEIRA, F. N; FRACALOSSI, D. M.; SAMUELS, R. I.; PRUDENCIO, E.S; SILVA, C. P.; AMBONI, R.D. M. C. Potential use of mealworms as an alternative protein source for Pacific white shrimp: Digestibility and performance. **Rev. Aquaculture**. 2017. *Inpress*.

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

PRATT, Charlotte W.; CORNELLY, Kathleen. **Bioquímica essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006,716p.

RIVERA-PÉREZ, C.; GARCÍA-CARRENO, F. L.; SABOROWSKI, R. Purification and biochemical characterization of digestive lipase in whiteleg shrimp. **Rev. Mar Biotechnol**, v. 13, p. 284-295, 2010.

ROMEIRO, E. T.; OLIVEIRA, I. D.; CARVALHO, E. F. Insetos como alternativa alimentar: artigo de revisão. **Rev. Comportamento, Cultura e Sociedade**, v. 4, p.1-21, 2015.

RUMPOLD, B.; SCHLUTER, O. K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Rev. Mol. Nutr. Food**, v. 57, p. 802-823, 2013.

SANCHEZ-MUROS, M.J.; HARO, De C.; SANZ, A.; TRENZADO, C.E.; VILLARECES, S.; BARROSO, F.G. Nutritional evaluation of *Tenebrio molitor* meal as fishmeal substitute for tilapia(*Oreochromis niloticus*) diet. **Rev. Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 934-955, 2016.

SIEMIANOWSKA, E.; KOSEWSKA, A.; ALJEWICZ, M.; SKIBNIEWSKA, K.A.; POLAK-JUSZCZAK, L.; JOROCKI, A; JEDRAS, M. Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. **Rev. Agricultural Sciences**, v.4, n.6, p. 287-291, 2013.

SOONTHORNCHAI, W.; RUNGRASSAMEE, W.; KAROONUTHAISIRI, N; JARAYABHAND, P.; KLINBUNGA, S.; SODERHALL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, p.19–28, 2010.

STRICKLAND, J. D. H.; Parsons, T.R. **A practical handbook of seawater analysis**. 2. ed. Ottawa: Fisheries Research Board of Canadá, p.310, 1972.

STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol**, v. 79, p. 237-248, 1973.

SUÁREZ, J. A. et al. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Rev. Aquaculture**, v. 289, p.118-123, 2009.

VINATEA ARANA, Luis. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura : uma revisão para peixes e camarões..** 2. ed. rev. e ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC, 231p, 2004.

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