

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**DIGESTÃO E METABOLISMO DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen***  
**SUBMETIDO A DIFERENTES REGIMES ALIMENTARES**

**José Fernando Bibiano Melo**

**SÃO CARLOS – SP**  
**2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**DIGESTÃO E METABOLISMO DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen***  
**SUBMETIDO A DIFERENTES REGIMES ALIMENTARES**

**José Fernando Bibiano Melo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências, área de concentração: Fisiologia.

**SÃO CARLOS – SP**

**2004**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M528dm

Melo, José Fernando Bibiano.

Digestão e metabolismo de Jundiá *Rhamdia quelen*  
submetido a diferentes regimes alimentares / José Fernando  
Bibiano Melo . -- São Carlos : UFSCar, 2004.  
80 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2004.

1. Bioquímica. 2. Nutrição. 3. Peixe – metabolismo. I.  
Título.

CDD: 574.192 (20<sup>a</sup>)

ORIENTADOR:

---

Prof. Dr. Gilberto Moraes

*À minha família e ao meu orientador  
Dedico este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus nosso criador pela possibilidade de conhecer um pouco da sua criação junto a esta grande família universal.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de meu aperfeiçoamento.

À CAPES e a FAPESP que apoiaram financeiramente o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes pela orientação da pesquisa, coordenação, amizade, acolhida e pelo exemplo de humanidade e respeito à criação, ao ser humano e aos animais.

À Universidade de Barcelona e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia pela colaboração.

À Professora Dra. Isabel Vázquez Baanante pela co-orientação da pesquisa, e acolhida junto ao seu grupo de pesquisa.

Ao pesquisador Dr. Isidoro Metón pela valiosa contribuição e ensino das técnicas bioquímicas realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular.

À Cheila pelo carinho e companheirismo, auxílio e compreensão no decorrer do curso.

Ao meu filho André Luiz que compreendeu minha ausência em muitos momentos.

Aos meus colegas de pós graduação e graduação Luis, Ive, Lícia, Alexandre, Thori, Cássia, Rodrigo, Araceli, Cristina, Lúcia, Gustavo Colobiano, Jane, Grasiela e Bidinotto que dividiram momentos de aulas e laboratório.

Aos amigos de Barcelona Ana Maria, Cláudio, Ricardo, Tati, Maria Colombiana, Mirian, Tainá, Teresa, Toninho que dividiram comigo momentos importantes.

A todos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas e do Departamento de Genética e Evolução pela convivência e amizade.

À Giovanna pelo carinho, amizade, pelas aulas de espanhol e incentivo no meu trabalho, pela companhia e pelos momentos de alegria que dividimos.

***Meus sinceros agradecimentos***

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO .....	1
Digestão e Metabolismo .....	2
Requerimentos de proteína na alimentação dos peixes .....	6
Espécie <i>Rhamdia quelen</i> .....	7
OBJETIVOS .....	9
MATERIAL E MÉTODOS .....	10
Desenho experimental .....	10
Formulação, preparação das dietas experimentais e manejo alimentar .....	11
Determinações hematimétricas .....	14
Hematócrito .....	14
Taxa de hemoglobina .....	14
Preparação dos homogeneizados celulares .....	15
Preparação dos extratos ácidos .....	15
Intermediários metabólicos .....	15
Glicogênio hepático, renal e muscular .....	15
Açúcares redutores .....	16
Glicose .....	16
Lactato .....	16
Piruvato .....	17
Aminoácidos livres .....	17
Triglicerídeos .....	17
Ácidos graxos livres .....	17
Uréia .....	18
Amônia .....	18
Determinações enzimáticas .....	19
Amilase .....	19
Protease ácida .....	19
Protease alcalina .....	19
Lipase .....	20
Tripsina .....	20
Quimiotripsina .....	20
Arginino hidrolase (arginase) .....	21
Alanina aminotranferase (ALAT) e Aspartato aminotranferase (ASAT) .....	22

Glutamato desidrogenase (GDH).....	22
Glicoquinase (GK).....	22
Fosfofructoquinase-1 (PFK1).....	23
Piruvatoquinase (PK).....	23
Frutose 1,6 bifosfatase (FBP1).....	23
Glicose 6 fostato desidrogenase (G6-PDH).....	24
6-Fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH).....	24
Delineamento experimental e análise estatística.....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
Parâmetros imunológicos e hematológicos.....	25
Ganho de peso e crescimento.....	27
Metabolismo protéico.....	39
Metabolismo glicídico.....	51
Perfil metabólico.....	56
CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Média de peso (em gramas) e crescimento (em cm) do jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Médias ( $\pm$ DP) de n-30 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 29
- Figura 2. Atividade proteolítica ácida inespecífica no estômago de jundiá *Rhamdia quelen* alimentado com teores crescente de proteína. Os ensaios foram realizados em pH 2,0 a 35°C por 30 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 30
- Figura 3. Atividade proteolítica alcalina inespecífica no intestino anterior, médio e posterior de jundiá *Rhamdia quelen* alimentado com teores crescentes de proteína. Os ensaios foram realizados em pHs 8,0; 8,5 ou 9,0 a 35°C por 30 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 31
- Figura 4. Atividade enzimática da tripsina no estômago, intestino anterior, médio e posterior de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Os ensaios foram realizados em pHs 8,1 a 25°C e a hidrólise de TAME foi acompanhada em 247nm por 2 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 33
- Figura 5. Atividade enzimática da quimiotripsina no estômago, intestino anterior, médio e posterior de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Os ensaios foram realizados em pHs 7,8 a 25°C e a hidrólise de BTEE foi acompanhada em 256nm por 1 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 34

Figura 6. Atividade enzimática da amilase no estômago, intestino anterior, médio e posterior de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Os ensaios foram realizados em pHs 7,0 a 35°C por 30 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 35

Figura 7. Atividade enzimática da lipase no estômago, intestino anterior, médio e posterior de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Os ensaios foram realizados em pHs 7,8 a 35°C por 30 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 36

Figura 8. Atividade enzimática da Alanina aminotransferase (ALAT), Aspartato aminotransferase (ASAT) e da Glutamato desidrogenase (GDH) no fígado de jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (15 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 41

Figura 9. Relação entre as atividades enzimáticas da Alanina aminotransferase/Aspartato aminotransferase (ALAT/ASAT), Alanina aminotransferase/Glutamato desidrogenase (ALAT/GDH), Aspartato aminotransferase/Glutamato desidrogenase (ASAT/GDH) no fígado de jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (15 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 42

Figura 10. Atividade enzimática da arginase no fígado e concentração de uréia no plasma de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 44

Figura 11. Concentração de amônia no plasma e fígado do jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Médias

( $\pm$ DP) de n-8 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 45

Figura 12. Concentração de aminoácidos livres no plasma e fígado do jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 48

Figura 13. Concentração de ácidos graxos livres e triglicerídeos no plasma de jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 50

Figura 14. Atividade enzimática da glicoquinase (GK), fosfofrutoquinase-1 (PFK1) e piruvatoquinase (PK) no fígado e concentração de uréia no plasma de jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 para PFK1 e PK, n-5 para GK. (15 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 52

Figura 15. Atividade enzimática da frutose 1,6 bifosfatase (FBP1) hepática, relação fosfofrutoquinase-1/frutose 1,6 bifosfatase (PFK1/FBP1) e relação piruvatoquinase/ frutose 1,6 bifosfatase (PK/FBP1) do jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (15 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 54

Figura 16. Atividade enzimática da fosfogluconato desidrogenase e glicose, 6 fosfato desidrogenase no fígado do jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (15 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 55

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Composição dos ingredientes utilizados na elaboração das dietas experimentais. 12
- Tabela 2. Formulação e composição bromatológica das dietas experimentais utilizadas nos experimentos, (em percentagem). 13
- Tabela 3. Valores médios  $\pm$  desvio padrão das variáveis eritrocitárias e percentual de células sanguíneas de defesa orgânica em juvenis de *Rhamdia quelen*, alimentados com diferentes níveis de proteína da dieta. 26
- Tabela 4. Médias dos intermediários metabólicos analisados no fígado e plasma do jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína da dieta. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes nas linhas da tabela representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). 59

## RESUMO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Barcelona. No presente trabalho, propusemo-nos estudar aspectos digestivos e metabólicos de juvenis de jundiá *Rhamdia quelen*, em jejum e alimentado com quatro níveis de proteína (20, 27, 34 e 41 %) em dietas isocalóricas. Foram analisados os parâmetros hematológicos e sistema imune, o ganho médio de peso, intermediários metabólicos (glicose, lactato, piruvato, ácidos graxos livres, aminoácidos livres, glicogênio, proteína, amônia e uréia), enzimas digestivas (proteases inespecíficas, tripsina, quimiotripsina, amilase e lipase), enzimas do metabolismo protéico e excreção (Alanina aminotransferase ALAT, Aspartato aminotransferase ASAT, Glutamato desidrogenase GDH e Arginase) e enzimas do metabolismo de carboidratos (Glicoquinase GK, Fosfofrutoquinase1 PFK1, Piruvato quinase PK, Furtose 1,6-bifosfatase 1 FBP1, 6 Fosfogluconato desidrogenase 6GPDH e Glicose 6 fosfato desidrogenase G6PDH).

O resultados obtidos indicaram que o sistema imune de jundiá não sofreu alterações em função dos regimes alimentares. As enzimas digestivas foram responsivas à concentração de proteína na ração. As enzimas do metabolismo protéico aumentaram sua atividade em relação ao aumento de proteína para possível manutenção de síntese protéica e do crescimento. Houve aumento de excreção de compostos nitrogenados pela disponibilidade de aminoácidos livres. Algumas enzimas relacionadas com o metabolismo de carboidratos sofreram alterações nas atividades, e as concentrações dos intermediários metabólicos variaram em função da disponibilidade de proteína. Neste trabalho concluímos que as enzimas digestivas de jundiá são indutivas pela concentração de proteína da dieta, o aumento de proteína da dieta

aumenta o ganho de peso, a produção e excreção de nitrogenados, e a preferência metabólica nas condições ensaiadas para manutenção dos processos de produção de energia foi gliconeogênica.

## ABSTRACT

This work was done at the Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Genética e Evolução, UFSCar, and at the Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Barcelona. We proposed studying digestive and metabolic features of fasted juveniles jundia *Rhamdia quelen* and fed on 20, 27 34 and 41% of protein in isocaloric diets. It was studied the hematological parameters, the immune system, the weight gain, the metabolic intermediates (glucose, lactate, pyruvate, free fatty acids, free amino acids, glycogen, protein, ammonia and urea), the digestive enzymes (unspecific proteases, trypsin, chymotrypsin, amylase and lipase), the enzymes of protein metabolism and excretion (Alanine aminotransferase ALT, Aspartate aminotransferase AST, Glutamate dehydrogenase GDH e Arginase), and the enzymes of the sugar metabolism (Glucokinase GK, 6-phosphofructo 1-kinase PFK1, Pyruvate kinase PK, FBP1, 6-phosphogluconate dehydrogenase 6GPDH and Glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PDH).

We observed that the immune system of jundia was unaltered by the nutritional changes. The digestive enzymes were responsive to the feed protein. The activities of the protein metabolism enzymes increased with the dietary protein likely to the protein synthesis demanded by growth. Excretion of nitrogenous compounds as consequence of amino acids surplus was observed. The activity of some of sugar metabolism enzymes was changed and the concentration of metabolic intermediates was altered with the availability of protein.

We concluded that the digestive enzymes of jundia are inductive, responsive to the dietary protein. The increase of protein in diets leded to weight gain, higher production of nitrogen wastes, and gluconeogenesis for the metabolical demands.

## INTRODUÇÃO

A piscicultura vem apresentando avanços gradativos nos últimos anos. A associação de pesquisas na área da fisiologia da digestão, da nutrição e bioquímica metabólica de peixes tem possibilitado intensificar esta atividade, bem como trazer respostas que vêm melhorando o aproveitamento dos alimentos utilizados na elaboração de dietas. Segundo Tacon (1989), o desenvolvimento de um regime alimentar para criações semi-intensivas ou intensivas de peixes ou camarões, primeiramente requer um entendimento básico de aspectos nutricionais. Salienta esse autor que, além da água e da energia, os requerimentos nutricionais de todas as espécies aquáticas cultivadas podem estar compreendidas entre cinco grupos de nutrientes: proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e minerais.

A rentabilidade dos sistemas de criação, particularmente de peixes, depende da utilização de rações que apresentem todos os nutrientes em níveis adequados e exigidos para cada espécie. Nestas condições, admitiríamos o máximo de aproveitamento dos nutrientes e otimização do desenvolvimento e sobrevivência dos peixes com um ótimo de produtividade.

Na piscicultura intensiva, os gastos com alimentos representam de 50 a 70 % dos custos de produção, e uma significativa redução nestes custos pode ser alcançada através da utilização de ingredientes de alta qualidade, do uso de técnicas eficazes de processamento das rações e da aplicação de estratégias na alimentação (Kubitza, 1998). Com isto se faz necessário buscar parâmetros que reflitam o aproveitamento do alimento. A análise de parâmetros fisiológicos e bioquímicos de digestão e do metabolismo pode ser empregada para evitar o desperdício de alimento e a baixa produção do pescado, otimizando o uso de energia durante o processo de metabolização dos nutrientes.

As vantagens do uso de rações balanceadas na alimentação de peixes são: a melhora das condições de estocagem, facilidade de aquisição e maior uniformidade na qualidade das matérias-primas utilizadas. O emprego destas dietas leva a soluções para problemas particulares como: estruturas de criação específicas e instalação de distribuidores de alimentos. Por esta razão, este tipo de alimentação permitirá uma produção regular de peixes ao longo de um ciclo de produção.

### **Digestão e Metabolismo**

Ainda que as rações elaboradas e balanceadas apresentem vantagens para a criação de peixes, a possibilidade de sua utilização em espécies de interesse comercial, necessita de conhecimentos sobre aspectos da digestão, tais como a atividade enzimática do trato digestório e as implicações metabólicas. Alguns estudos sobre o processo de digestão, tais como o de Galvão et al. (1997), mostram que as enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil planatus* durante as fases de larva e juvenil são responsáveis pela digestão de alimentos externos. Com quatro dias de idade as larvas apresentam as enzimas digestivas tripsina e carboxipeptidases, embora suas atividades proteolíticas sejam baixas em relação aos juvenis. Glass et al. (1989) afirmam que o conhecimento exato da quantidade e especificidade de cada enzima presente num sistema digestório, e as condições em que ocorre a hidrólise, permitirão predizer a digestibilidade de novos alimentos com maior precisão. Moraes & Bidinotto (1995) verificaram indução de atividade enzimática da amilase em *Piaractus mesopotamicus* alimentados com diferentes conteúdos de carboidratos. Estes fatos denotam estreita relação entre os nutrientes da dieta e o perfil enzimático do trato digestório em peixes.

As rotas metabólicas constituem séries interligadas de reações químicas catabolizadas com produtos intermediários inicial e final iguais

(ciclos) ou diferentes (vias). As rotas metabólicas possibilitam maior aproveitamento de nutrientes aportados pela dieta, fundamentalmente proteína, lipídeos e carboidratos. As proteínas são catabolizadas em aminoácidos, utilizados para síntese *de novo* das proteínas. As gorduras neutras são hidrolisadas em ácidos graxos e glicerol, utilizados como fonte de energia ou em novos processos de biossíntese. Os carboidratos em geral, não são tidos como bem aproveitados pelos peixes (De Silva & Anderson, 1995; Moon, 2001).

Aminoácidos, ácidos graxos e açúcares são catabolizados através de rotas metabólicas específicas com diferentes processos e formas de regulação. Muitas destas rotas metabólicas foram inicialmente estudadas em mamíferos, sendo pouca a informação disponível em peixes teleósteos (Metón, 1996). Além disto, os trabalhos até o presente momento têm se concentrado em peixes não tropicais. Por isso, nosso entendimento está atualmente baseado em um modelo de comportamento bioquímico centrado em estudos com peixes que vivem adaptados a condições bem diferentes.

Na alimentação de peixes a utilização de proteínas em quantidades crescentes leva a um aumento na taxa de crescimento. Esse resultado tem sido correlacionado a um aumento do metabolismo oxidativo e da taxa de síntese protéica devido à estimulação hormonal e provavelmente, pela presença de aminoácidos livres resultantes da digestão (Houlihan *et al.* 1994). Alguns estudos têm mostrado estreita relação entre as atividades enzimáticas do metabolismo energético e protéico em relação ao estado nutricional (Baanante *et al.* 1991; Bonamusa *et al.* 1992; Moon & Foster, 1995). Em *Sparus aurata*, os conteúdos hepáticos de metabólitos como glicogênio, ou das enzimas 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bifosfatase (PFK2/F-2,6-Pase), sinalizam como informações chave para se concluir sobre a ativação/inibição da atividade glicolítica. Igualmente, o nível de atividade de enzimas chave no metabolismo de carboidratos, tais como fosfrutoquinase-1 (PFK1),

piruvato quinase (PK), frutose 1-6 bifosfatase (F-1,6-Pase) e glicose 6-fosfato-desidrogenase (G-6-PDH), tem demonstrado ser bons indicadores do estado nutricional em peixes (Bonamusa et al. 1989). Além das atividades das enzimas do metabolismo de carboidratos como indicadores do estado nutricional, outros estudos, tais como a expressão gênica das enzimas na regulação do metabolismo hepático, vêm sendo realizados com igual sucesso (Méton et al., 2003a).

No músculo do bacalhau atlântico *Gadus morhua* tem sido observada correlação entre as atividades glicolíticas, sinalizadas pelas atividades de PFK1 e PK, com a taxa de crescimento (Pelletier et al. 1994). Esses autores demonstram ainda que as enzimas implicadas no metabolismo de aminoácidos (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e glutamato desidrogenase) têm sua atividade aumentada quando a taxa de crescimento é elevada.

Já sabemos que em estudos de nutrição de peixes, o crescimento corporal, conversão alimentar, índice hepático, entre outras variáveis, são utilizadas como parâmetros de crescimento. Atualmente, alguns grupos de pesquisa vêm propondo novas ferramentas e/ou variáveis de estudo em nutrição de peixes. Estudos envolvendo análise de metabólitos e atividades enzimáticas poderão ser utilizadas como indicadores do estado nutricional e relacioná-las ao crescimento.

As determinações de atividades enzimáticas chave do metabolismo contribuem para estabelecer as situações específicas das vias metabólicas e assim inferir sobre o aproveitamento dos nutrientes das dietas. Através desses dados, é possível ainda verificar as possíveis situações metabólicas indesejáveis, tais como a utilização de proteína para obtenção de energia. Como exemplo, a atividade de enzimas do catabolismo de aminoácidos, tais como GDH (glutamato desidrogenase), ALAT (alanina aminotransferase), ASAT (aspartato aminotransferase), entre outras, pode servir de base para a indicação de uma alteração do estado metabólico.

No controle do metabolismo de carboidratos, o fígado exerce uma função básica através da regulação da glicemia. Esse órgão produz esse intermediário metabólico a partir de reservas de glicogênio e/ou precursores gliconeogênicos (Newgard et al. 1983). A produção e a utilização de glicose no fígado estão controladas por atividades enzimáticas reguladas a curto e a longo prazo por mecanismos específicos (Pilkis & Claus, 1991). Em muitos estudos realizados com peixes alimentados com grandes quantidades de carboidratos observou-se aumento das reservas hepáticas e musculares, as quais podem ser convertidas em ácidos graxos e estocadas como triglicerídeos (Cowey et al. 1975; Cowey & Walton, 1989; Fynn-Aikins et al. 1992.; De silva & Anderson, 1995; Peres et al. 1999)

A glicólise é única via de utilização de glicose provinda da digestão de carboidratos. Aí a glicose é convertida em piruvato obtendo-se desta forma energia em forma de ATP. Estas enzimas mostram um aumento de sua atividade na abundância de glicose. Este fato foi observado por Fideu et al. (1983) em trutas alimentadas com dietas contendo alto nível de carboidratos. De acordo com Caseras et al. (2000) peixes carnívoros têm o metabolismo adaptado para altos níveis de proteína, e em contraste, uma capacidade reduzida para aproveitar carboidratos.

A avaliação da gliconeogênese é também importante no estabelecimento da situação metabólica, visto que sua função é prover glicose a partir de moléculas não glicídicas. Este processo gera glicose a partir de piruvato, lactato, alanina, glicerol, metabólitos intermediários do Ciclo de Krebs e aminoácidos glico e cetoglicogênicos (Lemaigre & Rousseau 1994). A gliconeogênese em peixes, cuja dieta natural apresenta poucas fontes de carboidrato, reveste-se de um importante papel. De acordo com Cowey et al. (1979), esta é a principal via de síntese *de novo* de glicose em peixes carnívoros. E nos peixes, a mobilização de glicogênio é muito lenta, de forma que a maior parte da glicose requerida provém da gliconeogênese.

## Requerimentos de proteína na alimentação dos peixes

O primeiro relato oficial de trabalho com exigência de proteínas em peixes foi feito com o salmão "chinook" (*Oncorhynchus tshawytscha*) por De Long, Halver e Mertz (1958). Após este trabalho foram reportados vários dados para muitas outras espécies de peixes. Ling (1973) já observava que o fornecimento de alimentação suplementar possibilitava rápido crescimento dos peixes em condições de elevada densidade de estocagem. A garantia de obtenção de uma ótima resposta produtiva e máximo crescimento em peixes depende do atendimento das necessidades protéico-energéticas e demais nutrientes essenciais nas proporções requeridas. As proteínas são nutrientes de máxima importância na dieta, e sua exigência é definida em função da quantidade mínima de aminoácidos para obtenção do máximo crescimento (NRC 1993). Os peixes exigem maiores porcentagens de proteína na dieta que os outros animais. A concentração de proteína em rações de peixe pode variar entre 24 e 50 %.

Vários autores preconizam a necessidade do conhecimento das exigências nutricionais específicas. Contudo, as rações comerciais estão baseadas nos requerimentos de espécies exóticas. No entanto, para espécies nativas como o jundiá pouco foi estudado até o momento, quanto às exigências nutricionais.

De acordo com Cho et al. (1983) o requerimento protéico-energético em dietas para juvenis de "catfish" (*Ictalurus punctatus*), deve situar-se entre 25 e 35 % de proteína, e 2.425 e 3.745 Kcal/Kg de energia digestível, respectivamente. Winfree & Stickney (1981) relatam para *Oreochromis aureus* 34 % de proteína. Wang et al. (1985) para *Oreochromis niloticus* descreveram 30 %, e para *Oreochromis mosambicus* 40 % (Juancey, 1982). Do Carmo de Sá & Fracalossi et al. (2002), encontraram para a espécie de clima tropical *Brycon orbignyanus* uma necessidade protéica entre 32 e 40 %.

A exigências de proteína em peixes podem apresentar variações quanto às suas fontes, a espécie, a digestibilidade, e outros fatores como a temperatura e a taxa de estocagem.

### **Espécie *Rhamdia quelen***

O jundiá é uma espécie nativa da Região Sul, com grande potencial para a criação intensiva, graças à sua facilidade de adaptação a ambientes confinados. Apresenta rápido crescimento e rusticidade, possui carne de bom sabor e trata-se de uma espécie bastante promissora que vem despertando grande interesse entre os criadores de peixes.

Esta espécie é de fácil reprodução, apresentando altas taxas de fecundação. Uma fêmea de jundiá, em bom estado nutricional, produz em média 200.000 ovos por quilograma de peso vivo (Radünz Neto, 1981). O hábito alimentar do jundiá é onívoro, com forte preferência por peixes, crustáceos e insetos. De um modo geral, são encontrados no conteúdo estomacal e intestinal desta espécie organismos representativos de diversas comunidades da fauna aquática, e não apenas aqueles restritos à comunidade bentônica, sugerindo ser um organismo generalista na escolha do seu alimento (Ihering, 1938; Guedes, 1980; Meurer & Zaniboni Filho, 1997).

O jundiá foi inicialmente descrito por Quoy & Gaimard em 1824. A sistemática do gênero *Rhamdia* é confusa desde o tempo em que foi descrito. Segundo Silfvergrip (1996) o gênero *Rhamdia* é formado por apenas 11 espécies, dentre as quais *Rhamdia quelen* que possui 49 sinonímias. A espécie está contida na ordem Siluriformes, família Pimelodidae e gênero *Rhamdia*. Tem distribuição neotropical e é encontrado do sudeste do México até o centro da Argentina.

Segundo Luchini (1990), o jundiá *Rhamdia sapo*, que é também uma espécie nativa da Argentina e próxima do *Rhamdia quelen*, desenvolve-se bem em águas com temperaturas de 20 °C apresentando

uma conversão alimentar de 1,5 a 1,8 e podendo alcançar 400 gramas em 6 a 7 meses. Em seu cultivo em tanques gaiola, a produção pode chegar a 90 kg/m<sup>3</sup>. Em relação ao rendimento de carcaça, Melo e colaboradores (1999) testaram diferentes fontes de lipídios com inclusão de 5 % na dieta para juvenis desta espécie e obtiveram resultados de 80,03 a 81,56 % de rendimento. A composição química da carne do jundiá pode ser considerada como de alto valor nutricional para o consumo humano quando comparada a outras espécies de peixes, tal como relatado por Melo (2000; 2002) que encontrou valores de 12,38 à 15,99 % de proteína bruta e 2,17 à 12,28 % de lipídios na matéria natural. Estes dados são altamente promissores e apontam o *R. quelen* como uma espécie em que o investimento, no sentido de se conhecer melhor suas características fisiológicas relativas às suas necessidades nutricionais e respostas digestivas e bioquímicas, é importante para o cultivo da espécie.

## OBJETIVOS

O presente estudo teve como principais objetivos:

- Determinar a influência da variação de proteína da dieta no sistema imune e hematológico do jundiá;
- Determinar as respostas adaptativas do trato digestório do jundiá alimentado com diferentes níveis de proteína;
- Avaliar a influência dos níveis de proteína nas enzimas envolvidas no catabolismo de aminoácidos e na excreção de intermediários nitrogenados;
- Verificar se as concentrações de proteína e as variações de carboidratos e lipídeos nas dietas alteram as vias do metabolismo da glicose;
- Avaliar o perfil bioquímico através dos intermediários metabólicos, nos diferentes tecidos de jundiá, alimentado com diferentes teores de proteína;
- Determinar o requerimento de proteína para juvenis de jundiá.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Desenho experimental

Os exemplares de jundiá (*Rhamdia quelen*) foram adquiridos da Universidade Federal de Santa Maria-RS, obtidos através de reprodução induzida e estocados em tanques de cultivo. Os experimentos e análises bioquímicas foram realizados no Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade de Barcelona. Os experimentos foram realizados em dois períodos; um de 60 dias para análise de intermediários metabólicos, enzimas digestivas, parâmetros hematimétricos, parâmetros hematológicos, crescimento e ganho de peso. E outro período de 15 dias, para estudo de enzimas do metabolismo intermediário.

No experimento de 60 dias, foram utilizados 160 juvenis de jundiá com peso médio inicial de 32 gramas, igualmente distribuídos em quatro lotes. Os peixes foram alimentados com quatro níveis de proteína bruta (20, 27, 34 e 41 %) sendo as rações isocalóricas de 3.500 kcal de energia metabolizável por kg de ração.

No experimento de 15 dias foram utilizados 100 juvenis de jundiá com peso médio de 31 gramas, igualmente distribuídos em 5 lotes. Os peixes foram alimentados com os mesmos quatro níveis de proteína do experimento anterior sendo o quinto lote de animais mantido em jejum.

Ao final do período experimental de 60 dias, os peixes foram amostrados para análises hematológicas, hematimétricas e bioquímicas. Os animais foram puncionados na veia caudal para retirada de amostras de sangue, e em seguida, sacrificados para retirada do estômago, intestino, fígado, rins e músculo branco. Esses órgãos eram seccionados e dissecados em placa de Petri contendo solução salina 0,1 %. O intestino era dividido em três partes: porção anterior, média e posterior.

O conteúdo digestivo era descartado e os tecidos eram homogeneizados com tampão de homogeneização.

Ao final do período experimental de 15 dias, os peixes foram sacrificados e o tecido hepático foi coletado e armazenados em nitrogênio líquido para posteriores análises enzimáticas.

Durante os períodos experimentais foram aferidos diariamente os parâmetros de qualidade de água e mantiveram-se dentro das condições normais para a criação dos peixes. As médias foram: temperatura  $26,3 \pm 2,4$ ; pH  $6,9 \pm 1,2$ ; oxigênio dissolvido  $5,6 \pm 1,3$  mg/l, amônia total  $0,14 \pm 0,04$  mg/l.

A luminosidade nas instalações das unidades experimentais era de 14 horas de luz natural e 10 horas de escuro.

### **Formulação, preparação das dietas experimentais e manejo alimentar**

A composição química dos ingredientes utilizados na formulação das dietas foi determinada no Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal-UNESP, segundo normas da A.O.A.C. (1965).

As Rações experimentais foram elaboradas com base em análises prévias da composição química dos ingredientes (Tabela 1).

Foram formuladas quatro dietas práticas isocalóricas (4.500 Kcal EB/Kg de ração) com quatro níveis de proteína bruta (20, 27, 34 e 41 %), conforme tabela 2.

Depois de triturados e misturados os ingredientes eram as dietas peletizadas para obtenção de granulometria entre 6-8 mm. O arraçoamento era realizado duas vezes ao dia, uma na manhã (9:00 horas) e outra à tarde (17:00 horas), com base em 10 % da biomassa dos peixes.

**Tabela 1.** Composição química dos ingredientes utilizados na elaboração das dietas experimentais.

Ingredientes	Nutrientes				
	Proteína %	Energia Bruta Kcal/kg ração	Fibra %	Cálcio %	Fósforo %
Farinha de peixe	56,43	4.100	0,34	*5,20	*1,73
Farelo de soja	46,02	3.010	6,08	*0,30	*0,19
Levedura de cana	34,48	3.522	0,35	*0,10	*0,43
Milho	7,03	2.200	1,09	*0,03	*0,07
Trigo	11,84	2.700	8,40	*0,13	*0,33
Óleo vegetal	-	*8.100	-	-	-

\* Valor estimado de tabelas.

**Tabela 2.** Formulação e composição bromatológica das dietas experimentais utilizadas nos experimentos, (em percentagem).

Ingredientes	Níveis de proteína das dietas (%)			
	20	27	34	41
Farinha de peixe	14,2	24,2	19,2	35,2
Farelo de soja	8,0	11,0	11,0	24,0
Levedura de cana	8,0	8,0	20,0	15,0
Milho	38,0	30,0	26,0	8,0
Trigo	14,0	14,0	14,0	10
Óleo vegetal	17,0	12,0	9,0	7,0
Sal	0,5	0,5	0,5	0,5
Premix vitamínico <sup>1</sup>	0,2	0,2	0,2	0,2
Premix mineral <sup>2</sup>	0,1	0,1	0,1	0,1
Vit. C (mg/kg de dieta)	500	500	500	500
Composição bromatológica das dietas				
Proteína bruta (%)	19,37	26,33	33,20	40,14
Energia bruta Kcal/kg ração	4.419	4.610	4.504	4.438
Extrato etéreo (%)	18,57	14,76	11,98	9,70
Fibra (%)	3,24	3,24	3,14	3,92
Matéria Mineral (%)	5,35	7,88	7,53	12,61
Matéria Seca (%)	90,06	89,81	89,61	90,74
ENN (%)	43,53	38,60	32,5	24,37
Relação energia/proteína	228,14	175,08	139,80	110,56

- 1- Pré-mistura vitamínica/Kg de ração: A 10.000 UI, E 50 mg, D-3 2000 UI, K-3 25 mg, B 12 50 mg, Tiamina 15 mg, Riboflavina 35 mg, Pirodoxina 10 mg, Biotina 250 mg, Ácido Fólico 5 mg, Pantotenato de cálcio 60 mg, Niacina 60 mg, Cloreto de colina 120 g. Antioxidante 50 g.
- 2- Pré-mistura Mineral/Kg de ração: Ferro 40 mg, Cobre 12,5 mg, Zinco 30 mg, Cobalto 1 mg, Iodo 1,4 mg e Selênio 0,2 mg.

## Determinações hematimétricas

As amostras de sangue foram coletadas por punção caudal, com seringas de 1ml previamente heparinizadas. Parte do sangue coletado era destinado à determinação do hematócrito para avaliação do nível de estresse dos peixes tratados.

### Hematócrito

Foi realizado pela técnica de centrifugação em capilares, segundo Goldenfarb et al. (1971). Os tubos capilares heparinizados contendo amostras de sangue eram fechados em uma das extremidades com massa apropriada e centrifugados a 10.000 x G por 5 minutos. A leitura foi determinada em escala padronizada.

### Taxa de hemoglobina

A concentração da hemoglobina foi determinada pela formação de cianometahemoglobina como descrito por Collier (1944). Dez microlitros de sangue eram adicionados a 2 ml de solução Drabkin, homogeneizado em agitador Vortex e a leitura óptica era feita em espectrofotômetro à 540 nm. A concentração da hemoglobina foi calculada segundo a expressão:

$$g\% = Abs_{amostra} \times 0.143 \times diluição$$

Para contagem diferencial das células sangüíneas de defesa foram preparados esfregaços sangüíneos, e adotou-se a nomenclatura sugerida por Tavares-Dias et al. (1999a). A partir da contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina e hematócrito foram calculados: o volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), segundo Wintrobe (1934).

Para contagem diferencial de trombócitos e leucócitos foram preparados esfregaços sangüíneos e corados com Giemsa e May-Grünvald. A identificação e a nomenclatura das células seguiu as recomendações de Tavares-Dias et al. (2002).

### **Preparação dos homogeneizados celulares**

Os tecidos coletados eram amostrados sobre superfície gelada e pesados em quantidades apropriadas para as determinações enzimáticas. Mantida a proporção de 100 mg de tecido para 1,0 ml de tampão de homogeneização (fosfato de sódio 20 mM; ditioneitol 1 mM; glicerol 50 % ajustado para pH 7,0), os tecidos eram homogeneizados em homogeneizador mecânico tipo Potter 1.000 rpm, por 1 minuto com dois "strokes" de 30 segundos à 1000 rpm, em banho de gelo. Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 8.000 x G a 4 °C por 5 minutos e o sobrenadante era utilizado como fonte de enzima.

### **Preparação dos extratos ácidos**

Os tecidos hepático, renal e muscular, coletados eram amostrados sobre superfície gelada, e pesados em quantidades apropriadas para as determinações das concentrações dos intermediários metabólicos. Mantida a proporção de 100 mg de tecido / ml de ácido tricloroacético (TCA) 20 %, após eram homogeneizados em homogeneizador mecânico tipo Potter com dois "strokes" de 30 segundos à 1.000 rpm, em banho de gelo. Após a homogeneização, os extratos eram centrifugados a 3.000 x G em centrífuga clínica e os sobrenadantes utilizados como extratos celulares nas determinações de intermediários metabólicos.

### **Intermediários metabólicos**

#### **Glicogênio hepático, renal e muscular**

As determinações de glicogênio eram realizadas conforme técnica descrita por Bidinotto (1998). Amostras de fígado, rim e músculo de cada peixe amostrado eram transferidas para um tubo de ensaio na proporção de 50 a 100 mg de tecido para 1,0 ml de KOH 6,0N e incubado por 1 a 2 minutos em banho-maria a 100°C. Após a dissolução dos tecidos, 250 µl deste extrato eram transferidos para um tubo rigorosamente limpo onde eram adicionados 3 ml de etanol e 100 µl de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 % seguidos de

agitação. Logo após, a amostra era centrifugada a 2.000 x G por 1 minuto. Posteriormente, o sobrenadante era descartado por inversão e o precipitado re-suspendido em 2,5 ml de água destilada. Volume adequado desta dissolução era analisado quanto ao seu teor de açúcares redutores totais pelo método hidrolítico ácido de Dubois et al. (1960) e o conteúdo de glicogênio está expresso em  $\mu$ moles de glicosil-glicose/mg de tecido.

### **Açúcares redutores**

A determinação de açúcares redutores era realizada com base no método hidrolítico ácido de Dubois et al. (1960), realizada em ácido sulfúrico. Por meio desta análise era verificado o teor de hidratos de carbono sempre que a concentração de glicose, especificamente, não fosse necessária. Esta análise consiste na adição de um volume adequado de extrato a 500  $\mu$ l de fenol 4,1 % e 2,0 ml de ácido sulfúrico concentrado, rapidamente adicionado ao meio de reação. Os tubos de reação eram imediatamente resfriados em banho de água e a leitura óptica realizada em 480 nm. A concentração de glicose era estimada contra um padrão de glicose contendo 1mM.

### **Glicose**

Para as determinações de glicose era utilizado o método de Park & Johnson (1949). Resumidamente, este método consiste na incubação de alíquota adequada de extrato celular em meio contendo ferricianeto de potássio, carbonato de sódio e sulfato férrico de amônio em solução ácida com duponol sódico.

### **Lactato**

O lactato foi estimado nos extratos ácidos segundo o método de Harrower & Brown (1972). Um volume de extrato era adicionado de 20  $\mu$ l de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4%, 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado e 50  $\mu$ l de solução de p-fenilfenol (1,5 g de p-fenilfenol em solução aquosa de NaOH 2 %) lentamente adicionado. Após 15 minutos em repouso, os tubos eram fervidos por 90 segundos, imediatamente resfriados em

banho de água e a leitura óptica realizada em 750 nm. A concentração de lactato era estimada contra um padrão de lactato contendo 1mM.

### **Piruvato**

O piruvato foi estimado nos extratos ácidos segundo método de Lu (1939). Um volume adequado de extrato era adicionado a 250 µl de dinitrofenilhidrazina 0,1% em HCl 2,0 N. Após 30 minutos de repouso a 37°C, era adicionado à mistura de reação 3,0 ml de NaOH 1,3 N e a leitura óptica era realizada em 440 nm. A concentração de piruvato era determinada contra um padrão de piruvato contendo 1mM.

### **Aminoácidos livres**

O teor de aminoácidos livres foi determinado nos extratos neutros segundo Copley (1941). Um volume adequado de extrato era adicionado a 1,0 ml de solução ninhidrina 0,1% em propanol. Os tubos de reação eram colocados a uma temperatura de 45°C por 45 minutos e a leitura óptica era realizada em 570 nm. A concentração de aminoácidos livres era estimada contra um padrão de ácido alfa-amino-acético contendo 1mM.

### **Triglicerídeos**

Os triglicerídeos foram estimados colorimetricamente através da transformação em glicerol por ação de lipoproteína lipase e subsequente transformação do glicerol em glicerolfosfato (Chernecky et al., 1993). O glicerolfosfato é oxidado a dihidroxiacetonafosfato e água oxigenada. A água oxigenada, produzida em quantidades equimolares, em presença de aminoantipirina e etilsulfopropil anisidina, resulta na formação de quinoneimina que é lida em 450 nm.

### **Ácidos graxos livres**

A determinação de ácidos graxos livres foi realizada de acordo com método de Norvák (1965). Era adicionada 1,0 ml de solução Dole (heptano, álcool isopropílico e ácido sulfúrico na proporção de 1:4:0,1) a 50 µl de amostra de plasma, ou 50 µl de extrato de fígado, ou 500 µl de extrato de músculo branco, ou 50 µl de extrato de rim e imediatamente

agitada por 2 minutos. Após, era adicionado 1,0 ml de heptano e 2,0 ml de água e novamente agitada por inversão. Retirava-se uma amostra de 600 µl de sobrenadante e adicionava-se uma mistura de clorofórmio e heptano (5:1 v/v), e 1,0 ml do reagente de cobalto. O reagente de cobalto era constituído de 1,32 vol. de trietanolamina + 10 vol. de solução A + 7 vol. de solução B. A solução A era formada por uma solução saturada de  $K_2SO_4$  e 6 gramas  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  mais 0,8 ml de ácido acético glacial em água fervente. A solução B era constituída de solução saturada de  $Na_2SO_4$ . Após a adição, a mistura era agitada fortemente por 30 segundos e centrifugada por 2 minutos 3.000 x G. Eram retirados 600µl aos quais se adicionava 600 µl de solução indicadora. Esta solução era constituída de 0,4% de alfa-nitroso beta-naftol em etanol, diluído 12,5 vezes na hora do uso. Utilizou-se uma solução de ácido palmítico 4 mM como padrão. A leitura óptica era realizada em 500 nm.

### **Uréia**

A uréia foi determinada conforme Rahmatullah & Boyde (1980). Eram utilizados 200 µl de plasma em mistura contendo 100 µl de sobrenadante, 900 µl de água destilada, 500 µl de mistura constituída de duas partes de reativo A (100 ml continham: 60 ml de água destilada, 30 ml ácido sulfúrico concentrado, 10 ml de ácido fosfórico) e uma parte de reativo B (100ml de água destilada, 0,1 grama de tiosemicarbazida e 0,5 grama de butanodionamoxima). A mesma mistura era levada à fervura por 10 minutos na ausência de luz. O padrão utilizado continha 1mM de uréia, e a leitura óptica era realizada em 525 nm.

### **Amônia**

A concentração de amônia era determinada por nesslerização (Gentzkon & Masen, 1942), pela transferência de um volume adequado de extrato plasmático ou de fígado em um volume final de 2,0 ml, ao qual se adicionava 0,5 ml de reativo Nessler. A leitura óptica era realizada em 420 nm e a concentração foi estimada contra um padrão contendo 1mM

de cloreto de amônio e expressa em  $\mu\text{moles/ml}$  de plasma e/ou por mg de tecido.

### **Determinações enzimáticas**

Para a determinação das enzimas digestivas e da arginase, foi utilizado tampão de homegeneização composto de duas soluções: Solução I (tampão fosfato 10 mM, tampão Tris 20 mM, pH 7.0). Solução II (glicerina) na proporção de 1:1 das soluções.

#### **Amilase**

A atividade amilohidrolítica foi estimada segundo o método proposto por Bernfeld (1955) modificado. Em 1,0 ml de solução de amido (2%) em tampão tris 0,1 M pH 7,0 contendo NaCl 0,02 M era adicionado volume adequado de homogeneizado celular e a mistura da reação era incubada por 15 minutos a 37°C. Decorrido o tempo de reação, era adicionado 100  $\mu\text{l}$  de PCA 6% sendo a mistura da reação centrifugada a 3.000 x G por 2 minutos. No sobrenadante era estimada a concentração de glicose pelo método de Park-Johnson.

#### **Protease ácida**

Na determinação da atividade proteolítica ácida foi utilizada solução de caseína 1% como substrato da reação. A mistura de incubação era composta de 400  $\mu\text{l}$  de caseína 1 % em água, 600  $\mu\text{l}$  de tampão glicina/HCl 0.1 M pH 2.0 e 50  $\mu\text{l}$  de homogeneizado celular. Após a incubação da mistura por 30 minutos a 35°C, a reação era interrompida pela adição de 1 ml TCA 15 % e centrifugada a 3.000 x G por 3 minutos. A absorbância do sobrenadante era medida em 280 nm e o cálculo da atividade proteolítica foi realizado segundo Walter, (1984).

#### **Protease alcalina**

Na determinação da atividade proteolítica alcalina era utilizado tampão Tris/HCl 0.1 M pH 8.5, tendo como substrato azocaseína 1 % (Sarath et al., 1989). Uma alíquota de extrato era incubada por 30 minutos, 35 °C e a reação era interrompida com TCA 15 %, e logo

centrifugada 1800 x G por 10 minutos. A leitura era realizada em 420 nm. A tirosina foi usada como padrão para protease alcalina e a atividade expressa em micromole de substrato hidrolizado/min./mg proteína (U/mg de proteína). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1 $\mu$ g de tirosina / minuto.

Os pHs do meio de incubação, quantidade de substrato e volume de homogeneizado foram ajustados segundo as curvas de padronização para as diferentes regiões do trato digestório para as protease inespecíficas (ácida e alcalina).

### **Lipase**

A atividade de lipase não-específica foi determinada segundo método descrito por Gawlicka et al (2000). A reação era incubada a 35 °C em meio contendo 0,4 mM p-nitrofenil meristato em solução tampão 24 mM de bicarbonato de amônio pH 7.8 e 0,5% Triton X-100. Após 30 minutos, as reações eram interrompidas pela adição de NaOH 25 mM. A densidade óptica era registrada a 405 nm.

### **Tripsina**

A atividade proteolítica da tripsina foi determinada conforme Hummel (1959). Era utilizado tampão TRIS 0,2M e CaCl<sub>2</sub> 0,01M, com pH ajustado para 8.1, sendo o substrato (1,04mM) TAME (p-toluenesulfonil-L-arginine etilester) diluído no tampão. A temperatura de incubação foi de 25 °C por dois minutos. Uma unidade de atividade da tripsina é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu$ mole de TAME por minuto. A atividade da tripsina foi expressa em nmol de arginina hidrolisada / minuto / mg de proteína. A leitura da absorbância das amostras era realizada em 247nm.

### **Quimiotripsina**

A atividade proteolítica da quimiotripsina foi determinada conforme Hummel (1959). Foi utilizado tampão TRIS- HCl 0,10M e CaCl<sub>2</sub> 0,10M, com pH ajustado para 7.8, utilizando-se o substrato (0,001M) BTEE (N-

benzoil-L-tirosine etilester). A temperatura de incubação foi de 25 °C por 1 minuto. A unidade de atividade da quimiotripsina foi estabelecida pela absorbância do substrato após hidrólise completa expressa em tirosina / minuto / mg de proteína. A leitura da absorbância das amostras era realizada em 256 nm.

#### **Arginino hidrolase (arginase)**

A arginase foi determinada pelo método descrito por Archibald (1946). O método baseia-se na conversão de arginina em uréia, na presença de  $Mn^{2+}$  como co-fator de reação, a qual é medida colorimetricamente. A preparação enzimática era feita a partir de 50 mg de fígado homogeneizado em 0.5 ml de tampão de homogeneização. O meio de incubação continha em 1,2 ml: arginina 250 mM em tampão Tris 50 mM pH 8.0, cloreto de manganês ( $MnCl_2$ ) 1 mM e 50  $\mu$ l de homogeneizado celular. A mistura de reação era incubada a 25°C por 30 minutos e a reação interrompida pela adição de 100 $\mu$ l de PCA 70%. Após a reação, as amostras eram centrifugadas a 12.000 x G por 3 minutos e feita a leitura contra o branco de reação de acordo Rahmatullah and Boyde (1980) para a determinação de uréia.

O tampão de homogeneização utilizado nas determinações das atividades enzimáticas de PFK -1, PK, FBPasa, G6-PDH, 6-PGDH, ALAT, ASAT e GDH tinha a seguinte composição: Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5, EDTA 4 mM, fluoreto de sódio 50 mM, sacarose 250 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 1mM.

Para as determinações destas enzimas, eram pesados em tubos de ensaio, 50mg de fígado congelado (na proporção de 1:5 peso:volume) imediatamente homogeneizados durante 30 segundos, e centrifugados a 9.000 x G. As análises das enzimas do metabolismo intermediário foram realizadas a 30°C, com tempo de reação específico para cada enzima, utilizando-se uma alíquota apropriada de homogeneizado. As leituras ópticas eram realizadas a 340 nm.

### **Alanina aminotranferase (ALAT) e Aspartato aminotranferase (ASAT)**

A determinação das atividades de ALAT e ASAT foi feita com Kits comercial. O princípio de reação da ALAT baseia-se na conversão de alanina em piruvato por transaminação, seguida da sua redução a lactato, pela enzima auxiliar LDH, que é acompanhada opticamente pela extinção do NADH. O coquetel de reação para a ALAT continha: Tampão TRIS-HCl, pH 7.5 - 100mM, 2-oxoglutarato 13,7 mM, NADH 0,18 mM, L-alanina 0,5 mM, LDH 21 mKat / L, volume adequado de enzima.

O princípio de reação da ASAT baseia-se na conversão aspartato em 2-oxoglutarato por transaminação, seguido da sua redução a malato, pela enzima auxiliar MDH, que é acompanhada opticamente pela extinção do NADH. O coquetel de reação para a ASAT continha: Tampão TRIS-HCl, pH 7.8 – 100 mM, 2-oxoglutarato 12,6 mM, NADH 0,18 mM, L-aspartato 220mM, LDH 15 mKat / L, MDH 10 mKat / L, volume adequado de enzima.

### **Glutamato desidrogenase (GDH)**

A atividade enzimática GDH foi determinada segundo Hochachka et al. (1978). O princípio de reação baseia-se na redução de 2-cetoglutarato em glutamato acompanhado pela extinção em paralelo do NADH. O coquetel de reação continha: tampão imidazol-HCl pH 7,7- 50 mM, acetato de amônio 250 mM, NADH 0,1 mM, ADP 1 mM, NADP 0,5 mM, 2-cetoglutarato 5 mM, volume adequado de enzima.

### **Glicoquinase (GK)**

Para a determinação da GK foi utilizado o mesmo tampão de homogeneização da PFK1 e PK, sendo adicionado 100 mM KCL. O homogeneizado celular era filtrado (aproximadamente 200 µl) em uma coluna sephadex G25, 1000 rpm por 1 minuto. Tampão utilizado foi TRIS-HCl 100 mM, pH 7,75, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM, KCl 100mM, DTT 2.5 mM, NADP 1 mM, G6PDH 1 um/ml. A reação era iniciada com adição ATP 6 mM com glicose 100 mM e 0,5 mM. A atividade da GK foi calculada na

taxa de formação de NADPH até 100 mM de glicose menos a glicose 0,5 mM que representa a atividade da hexoquinase. Após fazíamos a correção descontando a atividade da glicoquinase com a presença de 2mM de NADP e a ausência de ATP (Tranulis et al. 1996).

### **Fosfofructoquinase-1 (PFK1)**

Esta enzima foi ensaiada segundo Castaño et al. (1979). O princípio de reação baseia-se na conversão de frutose 6-P em frutose 1,6 bi-P seguida de sua quebra em glicerol 3-P e dihidroxi acetona-P por ação da enzima auxiliar aldolase. O glicerol 3-P produzido é transformado em dihidroxi acetona-P por ação da enzima auxiliar triose-P isomerase. A dihidroxi acetona-P é convertida em glicerol 3-P por ação da enzima auxiliar glicerol 3-P DH acompanhada pela extinção do NADH. Essa reação é ensaiada na presença dos co-fatores  $Mg^{2+}$ , frutose 2,6 bi-P, PPI e glicose 6-P para deslocamento da reação. O coquetel de reação era composto de: Tampão TRIS-HCl, pH 8.25 – 100 mM,  $MgCl_2$  2 mM, NADH 0,15 mM, frutose 6-P 2,5 mM, glicose 6-P 17,5 mM, frutose 2,6 bi-P 1 mM, triose-P isomerase 2,14 U / ml, glicerol 3-P DH 0,53 U / ml, aldolase 0,28 U / ml, PPI 2,5 mM.

### **Piruvatoquinase (PK)**

A atividade da piruvatoquinase foi ensaiada de acordo com Staal et al. (1975). O princípio de reação baseia-se na transformação de fosfoenol piruvato em piruvato seguida de sua conversão em lactato, pela enzima auxiliar LDH, que é acompanhada pela oxidação do NADH. O coquetel de reação era composto de: Tampão glicilglicina 70 mM pH 7,4, KCl 100 mM,  $MgCl_2$  10 mM, NADH 0,15 mM, fosfoenolpiruvato 2,8 mM, LDH 21 U, ADP 2,5 mM.

### **Frutose 1,6 bifosfatase (FBP1)**

A determinação da atividade da FBP1 era utilizado tampão imidazol-HCl 85 mM e pH 7.7,  $MgCl_2$  5 M, NADP 0,5 mM, 12 mM-2- mecarcapto etanol, e as enzimas auxiliares, 2,5 U/ml fosfoglicose isomerase 2,5 U/ml, 0,48 U/ml glicose 6-fosfato desidrogenase 0,05 mM frutose 1,6 difosfato.

A reação baseia-se no incremento de absorvância a 340 nm devido a formação de NADPH (Bartrons et al. 1983).

#### **Glicose 6 fostato desidrogenase (G6-PDH)**

As determinações de G6-PDH foram feitas segundo método descrito por Metón (1996). A reação baseia-se na oxidação de glicose 6-P em 6-P gluconato acompanhada pela extinção de NADP. O coquetel de reação continha: Tampão imidazol-HCl 78mM pH 7,7, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NADP 1mM e glicose 6-P 1mM. A reação produz aumento de NADPH e a atividade foi definida como a quantidade necessária de enzima para produzir 1 μmol de NADPH.

#### **6-Fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH)**

Os ensaios desta enzima foram realizados segundo Bergmeyer (1984). A reação baseia-se na oxidação de 6-P gluconato em 6-P glucono-δ-lactona acompanhada pela extinção de NADP. O coquetel de reação continha: Tampão imidazol-HCl 83mM pH 7,7, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NADP 0,5 mM e 6-P gluconato 2mM.

A determinação de proteína nos tecidos foram realizados de acordo com Lowry et al. (1951) e o método de Bradford (1976).

#### **Delineamento experimental e análise estatística**

Os experimentos foram delineados em blocos incompletos com 4 níveis de proteína e 10 repetições. Foram realizadas as análises de variância, tendo sido aplicado o teste F com nível de significância de 5 %. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey no mesmo nível de significância. O programa estatístico utilizado foi SAS (1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parâmetros imunológicos e hematológicos

Os valores médios e o desvio padrão da contagem de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM do *R. quelen* estão relacionados na Tabela 3. O aumento de proteína na dieta levou a uma significativa redução do número de eritrócitos ( $P < 0,05$ ). Os níveis de hemoglobina, assim como o hematócrito, aumentaram ( $P < 0,05$ ) com até 27 % de proteína da dieta mostrando uma redução a partir desse valor. Essas alterações ocorreram de tal forma que o VCM e CHCM permaneceram constante entre os tratamentos. Esses dados hematimétricos mostram uma discreta eritropenia normocítica resultante do aumento de proteína na dieta.

A redução observada do número de eritrócitos em jundiá parece ter sido causada por hemólise ou inibição da eritropoiése. O aumento observado dos teores circulantes de amônia pode ter sido o responsável por um quadro de intoxicação que tenha resultado nessas observações. Contudo, as razões desta eritropenia são ainda desconhecidas e precisam ser investigadas. Resultados semelhantes são reportados no teleósteo *Cyprinus carpio* (Sakthivel, 1998). Nesta espécie, o aumento do nível de proteína na dieta resulta em eritropenia ocasionada por hemólise. Entretanto, observa-se um aumento do VCM resultante de macrocitose, e de hipocromia com a presença de eritroblastos (Sakthivel, 1998).

**Tabela 3.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão das variáveis eritrocitárias e percentual de células sangüíneas de defesa orgânica em juvenis de *Rhamdia quelen*, alimentados com diferentes níveis de proteína da dieta.

Parâmetros	Níveis de proteína das dietas (%)			
	20	27	34	41
Eritrócitos				
( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	2,22 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	2,56 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	1,95 $\pm$ 0,40 <sup>ab</sup>	1,85 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>
Hemoglobina				
(g/dL)	7,58 $\pm$ 1,57 <sup>b</sup>	9,07 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup>	6,73 $\pm$ 1,48 <sup>b</sup>	7,74 $\pm$ 1,52 <sup>b</sup>
Hematócrito (%)	27,13 $\pm$ 3,86 <sup>ab</sup>	32,53 $\pm$ 2,85 <sup>a</sup>	26,50 $\pm$ 5,29 <sup>b</sup>	24,96 $\pm$ 5,52 <sup>b</sup>
VCM (fL)	127,72 $\pm$ 28,78 <sup>a</sup>	136,46 $\pm$ 43,27 <sup>a</sup>	139,03 $\pm$ 34,78 <sup>a</sup>	144,22 $\pm$ 56,44 <sup>a</sup>
CHCM (g/dL)	28,30 $\pm$ 5,66 <sup>a</sup>	28,48 $\pm$ 4,00 <sup>a</sup>	25,94 $\pm$ 4,72 <sup>a</sup>	31,78 $\pm$ 6,80 <sup>a</sup>
Trombócitos (%)	76,85 $\pm$ 7,96 <sup>a</sup>	78,27 $\pm$ 12,18 <sup>a</sup>	79,62 $\pm$ 5,95 <sup>a</sup>	79,08 $\pm$ 5,25 <sup>a</sup>
Linfócitos (%)	13,92 $\pm$ 6,91 <sup>a</sup>	10,33 $\pm$ 9,08 <sup>a</sup>	11,31 $\pm$ 4,82 <sup>a</sup>	11,08 $\pm$ 4,10 <sup>a</sup>
Neutrófilos (%)	4,00 $\pm$ 2,24 <sup>a</sup>	6,73 $\pm$ 2,76 <sup>a</sup>	6,23 $\pm$ 2,62 <sup>a</sup>	7,08 $\pm$ 4,89 <sup>a</sup>
C.G.E. (%)	2,08 $\pm$ 2,71 <sup>a</sup>	1,47 $\pm$ 2,23 <sup>a</sup>	0,46 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>
Monócitos (%)	1,77 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 1,23 <sup>ab</sup>	0,92 $\pm$ 0,95 <sup>b</sup>	0,42 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>
Células imaturas				
(%)	1,69 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	1,87 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	1,46 $\pm$ 2,26 <sup>a</sup>	1,75 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>

C.G.E. = Célula granulocítica especial; Letras diferentes na mesma linha as médias diferem significativamente entre si pelo teste de TUKEY (P < 0,05). (n.-10, 60 dias de alimentação).

Diferentemente do observado em jundiá, no teleósteo marinho *Paralichthys dentatus* ocorre aumento no número de eritrócitos e redução do hematócrito (eritrocitose microcítica) com o aumento de proteína na dieta (Daniels & Gallagher, 2000), sem afetar os níveis séricos de proteína total. Em *Takifugu obscurus* a concentração de hemoglobina e o hematócrito não são influenciados pelos diferentes níveis protéicos da dieta (Bai et al., 1999).

As proteínas são macronutrientes importantes para o desenvolvimento animal, desde que participam de diversas atividades celulares e são os principais componentes musculares. Assim, a principal evidência da deficiência de proteína é a perda de peso. Isso ocorre principalmente devido à falta de aminoácidos na dieta, impossibilitando a formação de tecido muscular e de outros compostos importantes do metabolismo. A deficiência nutricional (Kori-Siakpere, 1985) e a privação de alimentos (Stoskopf, 1993) podem afetar ainda as características sangüíneas dos peixes, principalmente o sistema imunológico. Por outro lado, com o excesso de proteína na dieta aumenta-se a excreção nitrogenada, principalmente na forma de amônia. De acordo com os estudos de Dabrowska & Wlasow (1986) esse catabólito pode ser altamente tóxico para os peixes e causar leucopenia.

A contagem relativa de células sangüíneas de defesa não mostrou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos em juvenis de jundiá (Tabela 3). Nestes ensaios, o percentual de trombócitos e leucócitos não foi influenciado pelo nível de proteína na dieta. Resultados semelhantes são descritos em *C. carpio* alimentadas com 14, 28, 38, 48 e 58 % de proteína (Sakthivel, 1998).

### **Ganho de peso e crescimento**

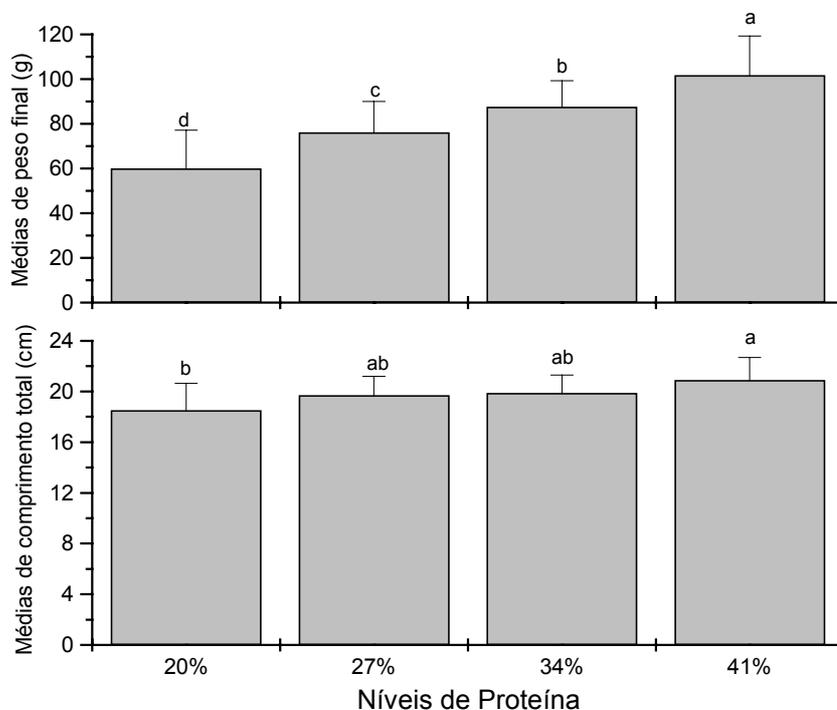
O peso médio dos jundiás alimentados com teores crescentes de proteína aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) ao longo de 60 dias de

regime (Figura 1). O peso médio inicial dos peixes deste experimento era 32,6 gramas. O crescimento (comprimento total) apresentou pouca variação (Figura 1), o que significa aumento de massa muscular.

O aumento no ganho de peso dos peixes obtidos em nosso trabalho em relação ao aumento de proteína na dieta pode ser atribuído à disponibilidade de nutrientes para síntese. Todavia, parte desta proteínas pode ter sido utilizada como fonte calórica. Lovell (1979) relata que a carência relativa de proteína na dieta pode reduzir o consumo alimentar, prejudicando assim o crescimento. O uso de energia a partir de fontes não protéicas pode inibir a utilização de outros nutrientes (Winfrey & Stickeney, 1981).

Trabalho realizado por Ai et al. (2004), mostram que o aumento de proteína e lipídio na dieta, até 41 % de proteína bruta e 12 % de lipídio, para *Lateolabrax japonicus* aumenta o ganho de peso. Esses autores atribuem esses resultados a uma melhor relação proteína/energia.

Salhi et al. (2004) estudaram o efeito dos níveis de proteína e lipídios em *R. quelen* e obtiveram maiores ganhos no peso com dietas entre 38-43 % de proteína e 14 % de lipídios. Segundo Garling & Wilson (1976), os níveis de proteína da dieta para o máximo de crescimento do bagre do canal oscilam entre 22 e 40 %. Li et al. (1998) precisaram o nível ótimo de proteína (35 %) para *Ictalurus punctatus*. Henken et al. (1986) verificaram que esse valor para *Clarias gariepinus* é 50 %, enquanto Degani et al. (1989) obtiveram um requerimento menor (40%) para a mesma espécie. Esses autores atribuem esta variação na exigência protéica às diferentes técnicas de criação e à composição das dietas. De acordo com Lovell (1980), o nível de proteína dietética deve atender às exigências de crescimento, reprodução e reposição dos tecidos. E as proteínas não devem ser utilizadas como fonte de energia. O teor de proteína requerido para um ótimo ganho de peso para juvenis de *R. quelen* foi obtido em nosso com 41 %.



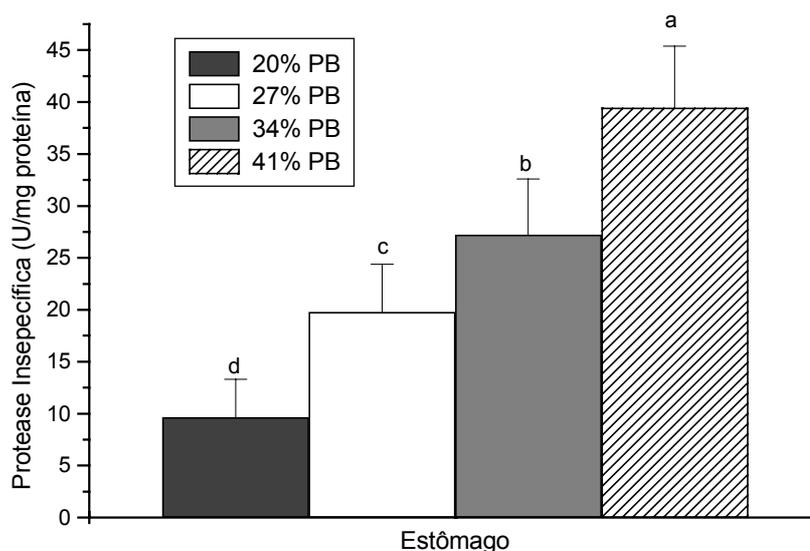
**Figura 1.** Média de peso (em gramas) e crescimento (em cm) do jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Médias ( $\pm$ DP) de n-30 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Embora teor de proteína de 41 % seja alto para esta espécie de hábito alimentar onívoro, se faz necessário o ajuste da quantidade de energia proveniente de carboidratos e/ou lipídios para que se possa verificar a possibilidade de reduzir o teor de proteína preservando-se o ganho de peso.

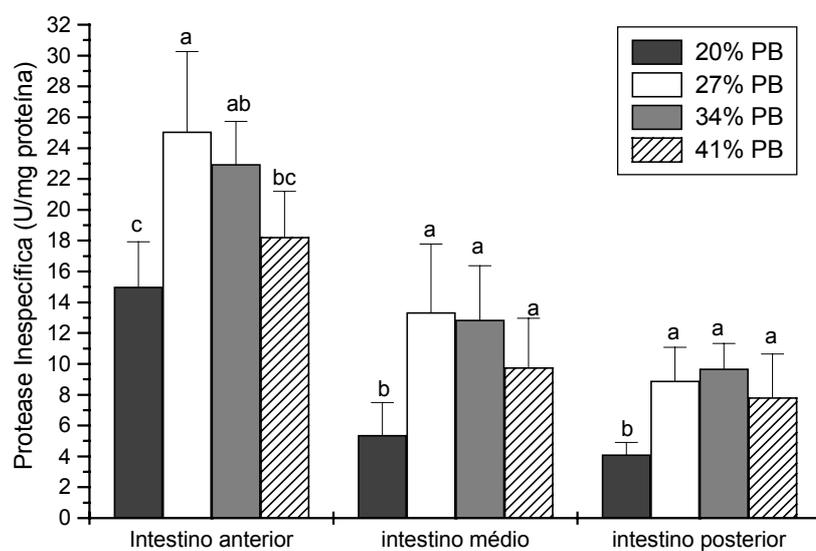
### Enzimas digestivas

As enzimas do trato digestório de jundiá foram responsivas ao tratamento alimentar com diferentes níveis de proteína. A atividade específica de protease ácida inespecífica no estômago aumentou significativamente ( $P < 0,01$ ) em relação aos níveis crescentes de proteína da dieta (Figura 2). A hidrólise gástrica das proteínas da dieta em juvenis de jundiá deve ocorrer proporcionalmente ao seu teor nas dietas até um nível de 41 %.

A atividade específica de protease alcalina inespecífica no intestino anterior, médio e posterior, aumentou a partir de 27 % de proteína



**Figura 2.** Atividade proteolítica ácida inespecífica no estômago de jundiá *Rhamdia quelen* alimentado com teores crescente de proteína. Os ensaios foram realizados em pH 2,0 a 35°C por 30 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 3.** Atividade proteolítica alcalina inespecífica no intestino anterior, médio e posterior de jundiá *Rhamdia quelen* alimentado com teores crescentes de proteína. Os ensaios foram realizados em pHs 8,0; 8,5 ou 9,0 a 35°C por 30 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

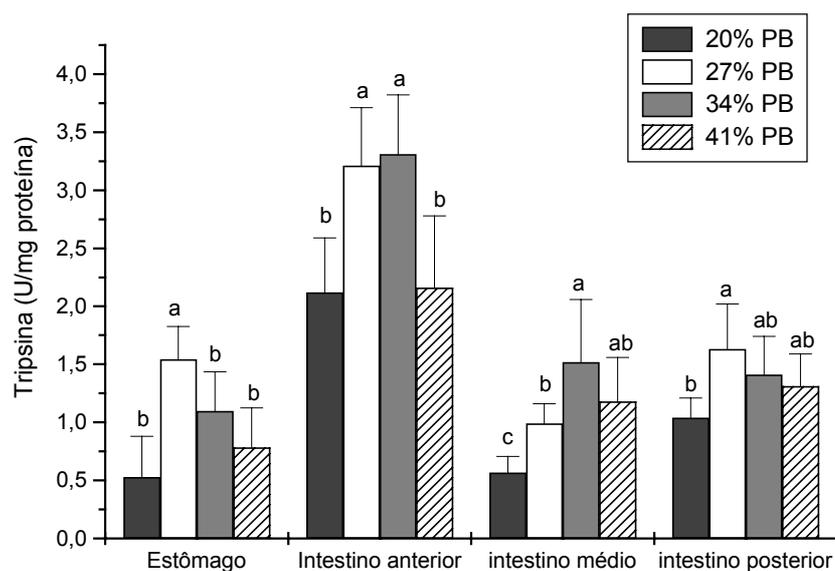
( $P < 0,05$ ) (Figura 3). As maiores atividades ocorreram no intestino anterior.

A atividade específica de tripsina aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) no estômago, intestino anterior, médio e posterior, com o conteúdo de proteína. Porém, na maior concentração de proteína (41 %) observamos que há uma tendência de redução da atividade nos quatro compartimentos do trato digestório (Figura 4).

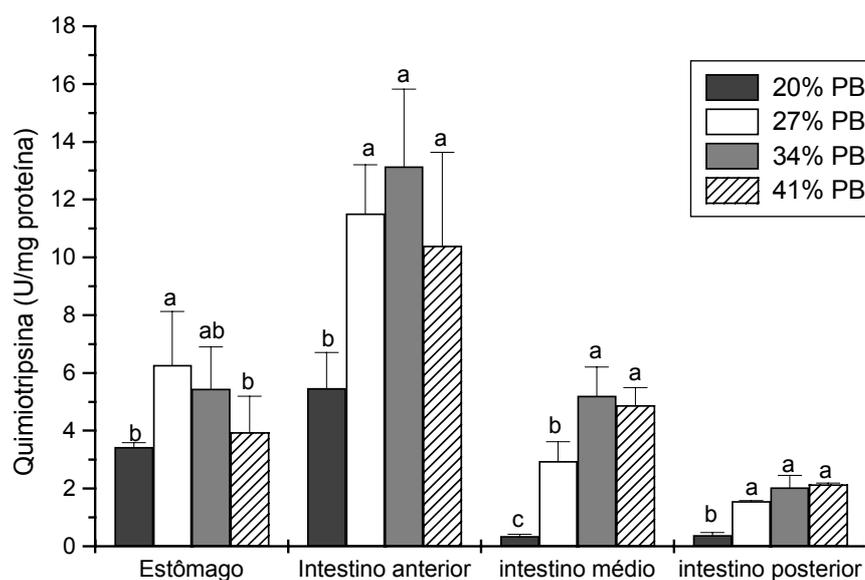
A atividade específica da quimiotripsina apresentou no estômago um perfil semelhante ao da tripsina. Nos demais compartimentos ela aumentou ( $P < 0,05$ ) e manteve-se constante para os teores de 27, 34 e 41 % de proteína na dieta (Figura 5).

A atividade específica da amilase decresceu ( $P < 0,05$ ) com o aumento do conteúdo de proteína da dieta em todos segmentos do trato digestório (Figura 6). O mesmo tipo de resposta foi observado com a lipase (Figura 7). Ambas enzimas apresentaram atividade maior no intestino anterior.

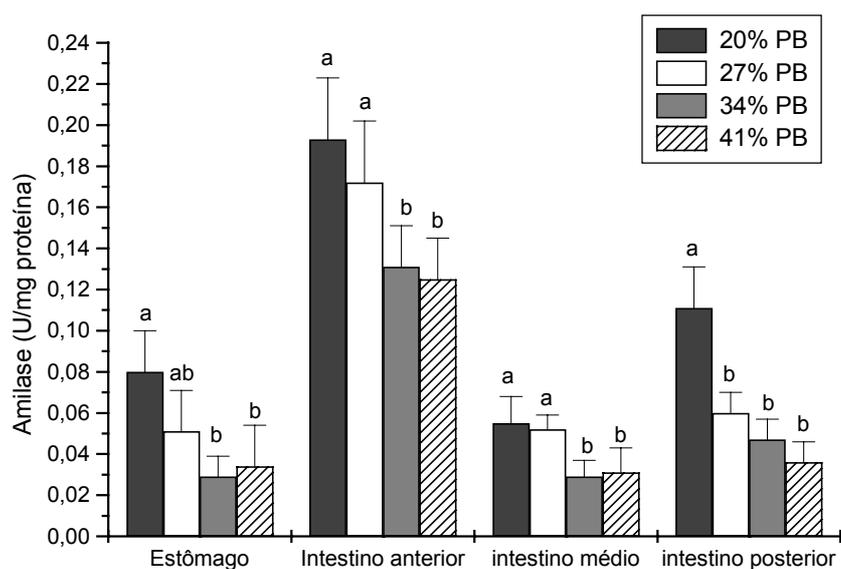
Esse potencial digestivo ao longo do trato digestivo dos peixes, parece ligado a certos fatores tais como mudanças de pH, morfologia do trato digestório, oferta de alguns nutrientes, aumento de síntese pelas células produtoras de enzimas. Em geral, a morfologia do trato digestório e a distribuição e a intensidade da atividade das enzimas digestivas ao longo dele, podem variar com o hábito alimentar (Hofer & Shiemer, 1981).



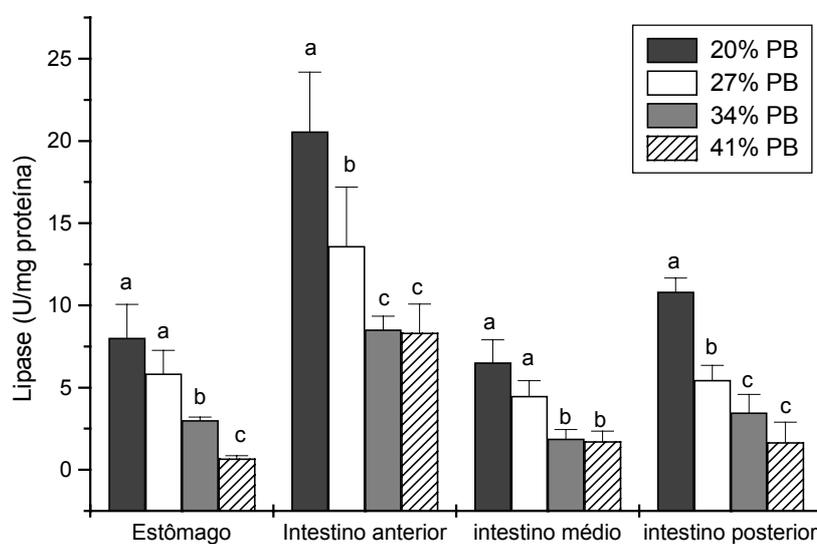
**Figura 4.** Atividade enzimática da tripsina no estômago, intestino anterior, médio e posterior de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Os ensaios foram realizados em pHs 8,1 a 25°C e a hidrólise de TAME foi acompanhada em 247nm por 2 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 5.** Atividade enzimática da quimiotripsina no estômago, intestino anterior, médio e posterior de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Os ensaios foram realizados em pHs 7,8 a 25°C e a hidrólise de BTEE foi acompanhada em 256nm por 1 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 6.** Atividade enzimática da amilase no estômago, intestino anterior, médio e posterior de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Os ensaios foram realizados em pHs 7,0 a 35°C por 30 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 7.** Atividade enzimática da lipase no estômago, intestino anterior, médio e posterior de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Os ensaios foram realizados em pHs 7,8 a 35°C por 30 min. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

A atividade da pepsina depende do substrato empregado, do pH do meio, da temperatura, além de outros fatores. A atividade proteolítica ácida desta enzima tem sido descrita em vários teleósteos: *Anguilla japonica* (Morishita et al. 1964), *Tilapia mossambica* (Fish, 1960; Nagasse, 1964), *Oncorhynchus mykiss* (Kitamikado & Tachino 1960) *Ictalurus sp* (Nordlie, 1966, Smit, 1967). De acordo com Kohla et al. (1992), a quantidade e a qualidade de proteína de origem animal e vegetal não altera a atividade de pepsina no estômago de *Colossoma macropomum*. Nossos resultados mostram que em jundiá a atividade proteolítica ácida inespecífica aumenta de forma linear com o aumento do conteúdo proteína da dieta. Esta resposta mostra um caráter indutivo desta enzima. A aumento dessa atividade enzimática face ao conteúdo de proteína ofertada demonstra seu caráter adaptativo e portanto a possibilidade de ajuste de nutrientes para otimização das dietas.

A atividade proteolítica alcalina inespecífica e a atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina no intestino anterior, médio e posterior, apresentam um perfil semelhante. Esta observação sugere que as atividades determinadas no intestino com metodologia inespecífica correspondam de fato às atividades específicas de quimiotripsina e tripsina. O perfil observado dessas enzimas indica que seu potencial hidrolítico é limitado. Existe uma atividade proteolítica que é máxima próxima de 34 % de proteína na dieta. A redução da atividade com como a manutenção da atividade das proteases inespecíficas e específicas nos intestinos podem ser atribuídos a diferentes fatores. Primeiro pode ter ocorrido pela presença de inibidores, pois houve aumento de soja na dieta para aumentar os níveis protéicos da ração. Segundo, pode ter ocorrido pelo aumento de substrato dentro do trato digestório. Também pode estar relacionado ao tempo de passagem dos nutrientes, visto que a inibição da atividade destas enzimas não alterou o crescimento dos peixes.

Outra observação que tivemos em nosso trabalho, foi da atividade de duas proteases alcalinas, tripsina e quimiotripsina, no estômago de jundiá. Este fato já foi reportado anteriormente (Chackrabarti 1995). A presença destas enzimas devido à contaminação das preparações pode ser imediatamente descartada desde que os homogeneizados celulares são feitos a partir de frações de tecido de animais que estavam em jejum prévio de 24 horas. A discussão da função biológica destas enzimas exige antes a determinação dos valores de pH durante os processos digestivos da espécie.

As atividades da amilase e lipase do trato digestório tiveram perfis semelhantes em todo ele. Observou-se redução dessas atividades enzimáticas como o aumento de proteína da dieta. Este fato pode ser explicado pela redução relativa dos teores de carboidratos e lipídios nas dietas experimentais. Analisando desta forma, poderíamos entender que estas enzimas apresentam um caráter indutivo, tal como observado para a atividade de protease do estômago. O caráter adaptativo da amilase já foi descrito em outras espécies (Corrêa 2002, Vieira 2002, Lundstedt 2003; Moraes & Bidinotto 2000). A combinação apropriada entre as atividades das enzimas de caráter adaptativo é fundamental no estabelecimento dos níveis adequados de macronutrientes, tanto para prevenir as perdas quanto para otimizar o crescimento e desenvolvimento.

Atualmente, os estudos sobre digestão enzimática em peixes continuam sem maiores definições, quer sobre os padrões das enzimas digestivas quer sobre seus teores e características bioquímicas. Isto se deve a diferenças nas técnicas analíticas utilizadas para determinação das enzimas, nas diferenças de hábito alimentar das espécies, na composição das dietas experimentais. No entanto, já é possível concluir que a alimentação interfere na atividade das enzimas no trato digestório de algumas espécies, entre elas *R. quelen*.

### Metabolismo protéico

As condições alimentares impostas ao jundiá por um período de 15 dias produziram adaptações metabólicas significativas. Verificamos que as enzimas relacionadas com a síntese e/ou catabolismo de aminoácidos foram influenciadas pelos níveis de proteína da dieta. O aumento do conteúdo de proteína elevou significativamente ( $P < 0,05$ ) a atividade específica da alanina aminotransferase (ALAT), aspartato aminotransferase (ASAT) e da glutamato desidrogenase (GDH), enquanto que no jejum observou-se redução da atividade (Figura 8).

O aumento da atividade das enzimas envolvidas na síntese protéica está associado à produção de massa muscular (síntese protéica) bem como à utilização de proteína como fonte de energia. De acordo com Sánchez-Muros et al. (1998) os aminoácidos derivados das proteínas da dieta, ou de tecidos, podem ter dois destinos: primeiro, a desaminação ou transaminação para posterior conversão em um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. E segundo, a utilização deste metabólito.

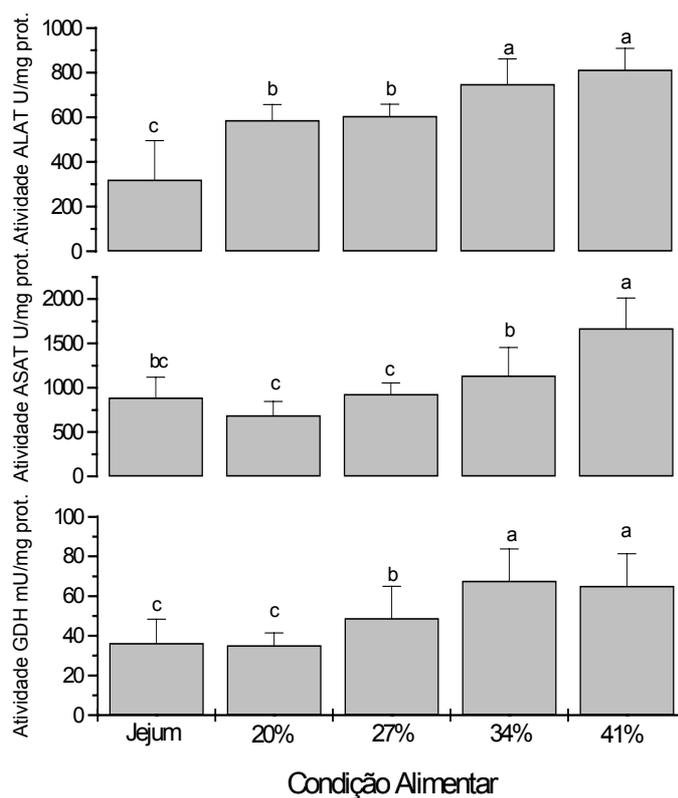
Estudando o efeito da composição da dieta no metabolismo de *Sparus aurata*, Metón et al. (1999) verificaram que as dietas que continham alta concentração de proteína e baixa concentração de carboidratos levavam a um aumento na atividade enzimática da ALAT e ASAT. Segundo esses autores, isso denota um eficiente uso dos aminoácidos da dieta para o crescimento e como substrato para gliconeogênese. Além disso, verificaram que no grupo de peixes submetidos ao jejum por 19 dias houve redução significativa principalmente na atividade da ALAT. A redução da atividade das enzimas ALAT, ASAT e GDH também foi verificada em nossos estudos.

Sánchez-Muros et al. (1998) verificaram em *Oncorhynchus mykiss*, alimentados com dietas contendo alto conteúdo de proteína, um aumento da atividade da ALAT e GDH do fígado, e que no grupo de peixes submetidos ao jejum também aumenta a atividade destas enzimas.

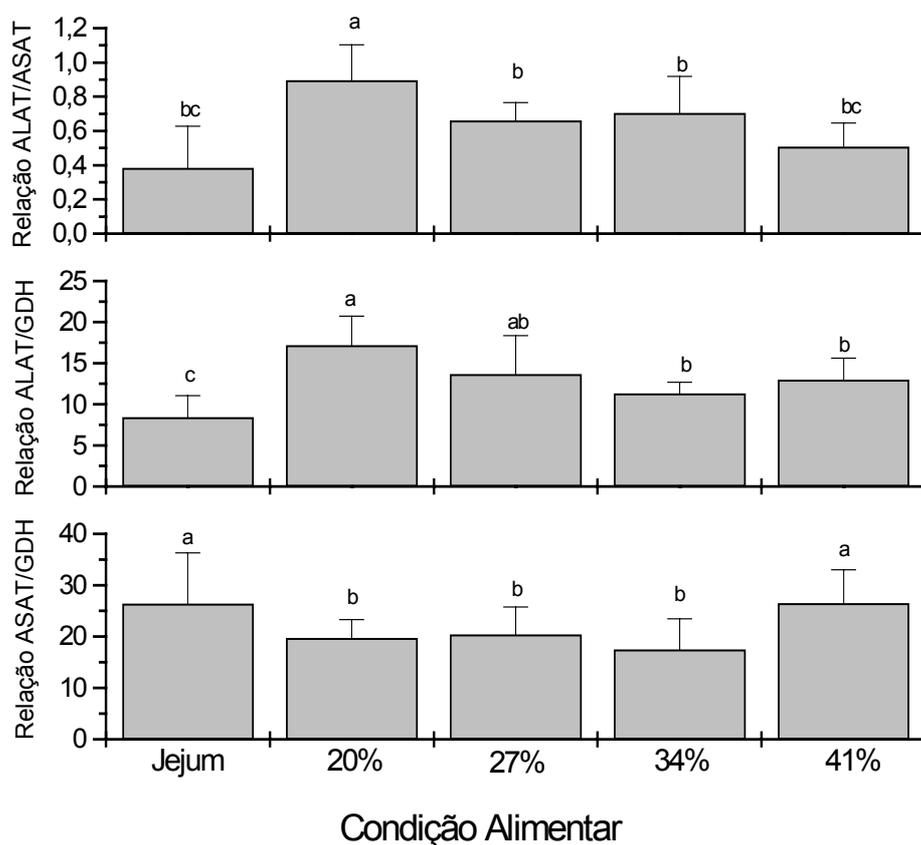
Suárez et al. (1995), estudaram o metabolismo intermediário no fígado de *Anguilla anguilla* e verificaram que dietas com alta relação proteína-carboidratos aumentam a atividade enzimática da GDH. Isso indica que há correlação entre a atividade desta enzima e o nível de proteína da dieta. Sánchez-Muros et al., (1998) associam a alta atividade da GDH e da ALAT ao aumento da gliconeogênese no jejum.

O aumento da atividade destas enzimas envolvidas no metabolismo protéico, de acordo com alguns autores, está diretamente relacionado com o aumento da gliconeogênese. Alexis & Paparaskeva-Papatsoglo (1986) e Moyano et al., (1991) sugerem que a quantificação de transaminases e desaminases podem ser indicadora metabólica do excesso de aminoácidos em peixes. O excedente dos aminoácidos requeridos para a biossíntese de proteínas é desaminado e os resíduos de carbonos são convertidos no ciclo de Krebs em gordura ou carboidrato (Driedzic & Hochachka, 1978).

As enzimas ALAT, ASAT e GDH, apesar de aumentarem suas atividades com o aumento de proteínas a dieta, apresentaram eficiências diferentes (Figura 9). As relações entre as atividades enzimáticas de ALAT/ASAT, ALAT/GDH e ASAT/GDH nas condições alimentares testadas são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). As relações ALAT/ASAT e ALAT/GDH com o aumento de proteína na dieta indicam que a ASAT e a GDH têm um papel preponderante, inclusive no jejum. Na relação ASAT/GHD, sugere que a enzima ASAT tenha um papel relevante que a GDH, aumentando sua atividade na maior concentração de proteína (41 %), e mesmo no jejum. Com esses dados podemos inferir o trabalho conjunto destas enzimas no metabolismo protéico de jundiá, ainda que com características diferentes em relação à condição alimentar e com relevâncias também distintas.



**Figura 8.** Atividade enzimática da Alanina aminotransferase (ALAT), Aspartato aminotransferase (ASAT) e da Glutamato desidrogenase (GDH) no fígado de jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (15 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

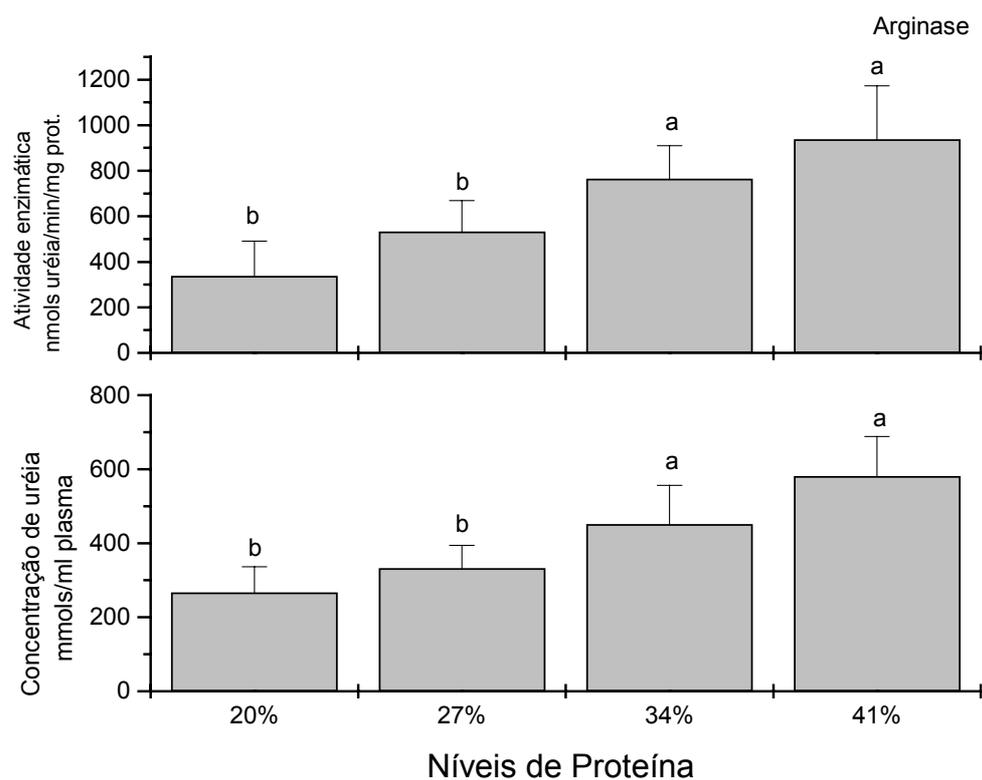


**Figura 9.** Relação entre as atividades enzimáticas da Alanina aminotransferase/Aspartato aminotransferase (ALAT/ASAT), Alanina aminotransferase/Glutamato desidrogenase (ALAT/GDH), Aspartato aminotransferase/Glutamato desidrogenase (ASAT/GDH) no fígado de jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (15 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

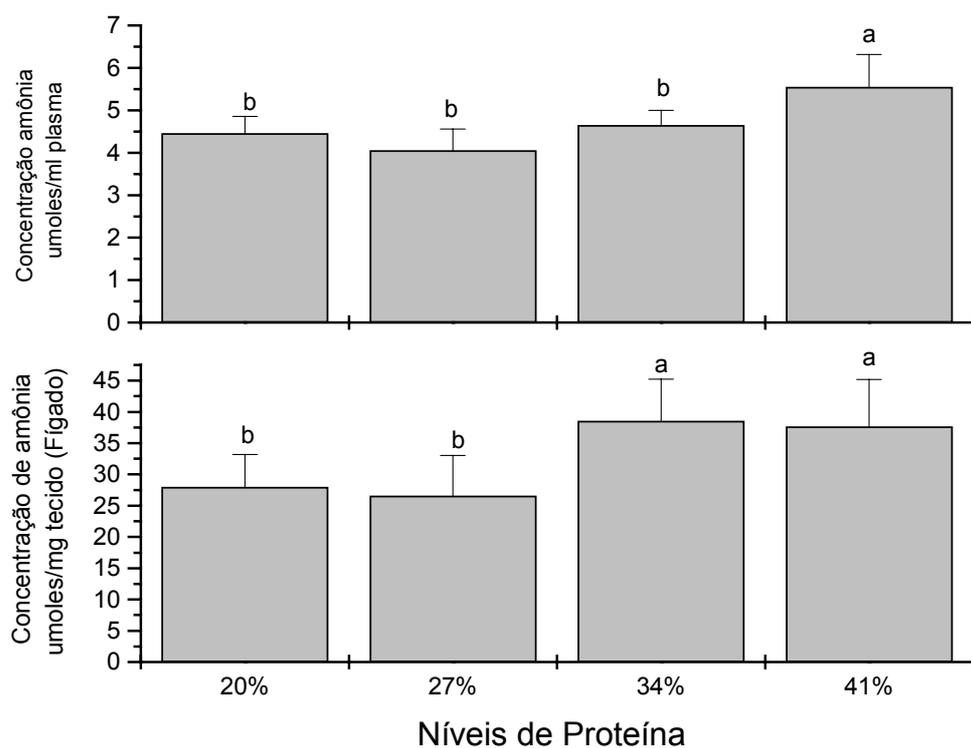
A excreção de compostos nitrogenados aumentou com o teor de proteína na dieta. A concentração de uréia no plasma subiu significativamente. O mesmo ocorreu, a partir de 27 % de proteína da dieta, com a atividade hepática da arginase (Figura 10). Também verificamos que a amônia aumentou tanto no plasma quanto no fígado ( $P < 0,05$ ) em relação ao aumento da proteína da dieta (Figura 11).

De acordo com Van Waarde, (1983) o aumento do catabolismo de proteínas tem como consequência um aumento nos teores de amônia plasmática. Em algumas espécies quando em situações ambientais que dificultam a excreção de amônia, pode ocorrer um aumento da produção de uréia via ciclo da uréia (Wood et al., 1995; Saha & Ratha, 1998). Entretanto, em condições normais, o excesso de amônia produzido pelo catabolismo de proteínas é prontamente excretado pelas brânquias.

Os dados de Chiu et al. (1986) sugerem que as atividades das enzimas do ciclo da uréia respondem ao alimento, mas não aos níveis de proteína da dieta. Recentemente, foi demonstrado em trutas de diferentes espécies, alimentadas com diferentes níveis de arginina, uma relação linear entre esse aminoácido e: a uréia no plasma, a excreção de uréia e a atividade da arginase (Gouillou-Coustans et al. 2002; Fournier et al. 2003).



**Figura 10.** Atividade enzimática da arginase no fígado e concentração de uréia no plasma de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 11.** Concentração de amônia no plasma e fígado do jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Médias ( $\pm$ DP) de n-8 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

O aumento de compostos nitrogenados, principalmente a amônia, associada ao aumento da atividade da ALAT, ASAT e GDH neste trabalho, sugere que para manter os processos de produção energia houve transaminação e desaminação, aumentando o catabolismo de aminoácidos para uma atividade de gliconeogênese.

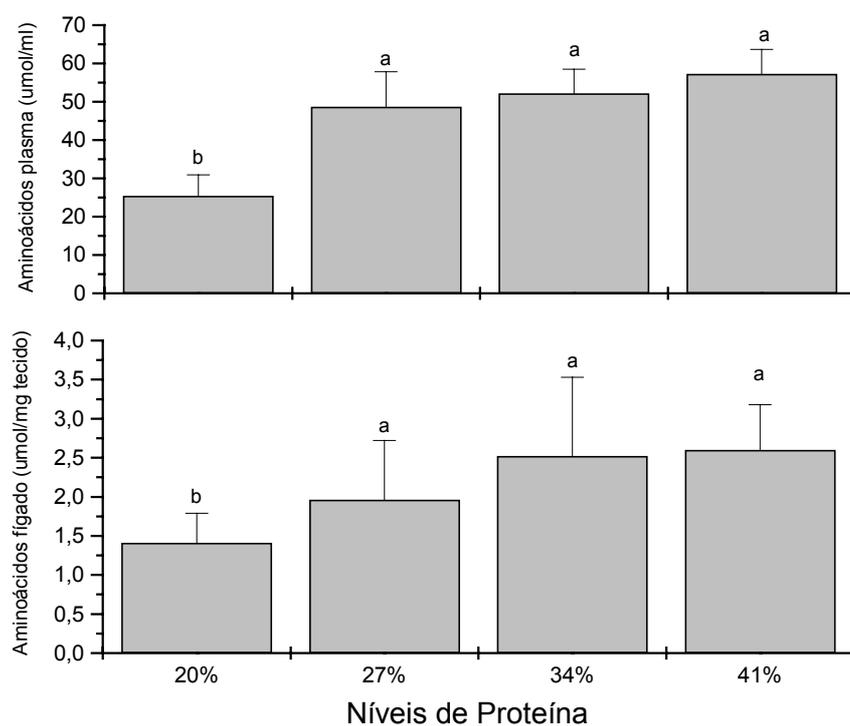
Yang et al., (2002) verificaram que o aumento de proteína na dieta de *Bidyanus bidyanus* elevava a excreção de amônia. O aumento da excreção de compostos nitrogenados ocorre pelo uso de proteína como fonte de energia (Hidalgo & Alliot, 1988; Kim et al., 1991). Peres & Oliva-Teles (2001) estudaram os efeitos dos níveis de proteína e lipídios em duas temperaturas sobre *Dicentrarchus labrax* e verificaram aumento na excreção de amônia em relação ao aumento de proteína nas dietas.

Engin & Carte (2001) sugerem que o aumento de energia digestível não protéica aumenta a retenção de nitrogênio pelo decréscimo de sua perda. Rychly (1980) relata que o aumento da excreção de nitrogênio ocorre com o aumento de proteína e decréscimo de carboidratos e lipídeos na dieta para trutas. Em nosso trabalho, fato foi semelhante foi observado. A excreção de compostos nitrogenados diminuiu nas dietas com menor conteúdo de proteína.

Em relação ao aumento da atividade da arginase e dos teores de uréia plasmática obtido neste trabalho, a partir de 27 % de proteína, sugerimos que deva-se ao aumento da concentração de arginina proveniente da dieta, e não pela síntese de novo de arginina via ciclo da uréia. A indução do ciclo da uréia pode ainda ocorrer por outras situações como jejum, desidratação (Polez et al., 2003; Walsh et al. 1990), confinamento, estresse (Hopkins et al. 1995), alcalinidade da água (Polez et al., 2004) e pela concentração de amônia (Saha & Hatha, 1994).

Verificamos um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de aminoácidos livres no plasma e fígado, em relação ao aumento do teor de proteína da dieta (Figura 12). Essa observação é compatível com os aumentos

observados das transaminases e da GDH. Lone et al., (1982), observaram tendência de aumento de aminoácidos e da glicose sérica com o aumento de proteína da dieta em *Oncorhynchus mykiss*. Corrêa (2002) verificou que o aumento no teor de proteína na dieta para *Colossoma macropomum* aumentou a disponibilidade de aminoácidos livres no plasma e músculo branco. Estudos realizados com trutas *European eel* alimentadas com altos teores de proteína na dieta, mostram um aumento nas concentrações de aminoácidos livres (Suárez et al. 1995). Yamamoto et al. (1999) estudando a influência dos níveis de proteína e lipídios na alimentação de *Oncorhynchus mykiss*, verificaram um aumento no teor de aminoácidos livres com o aumento de proteína nas dietas.

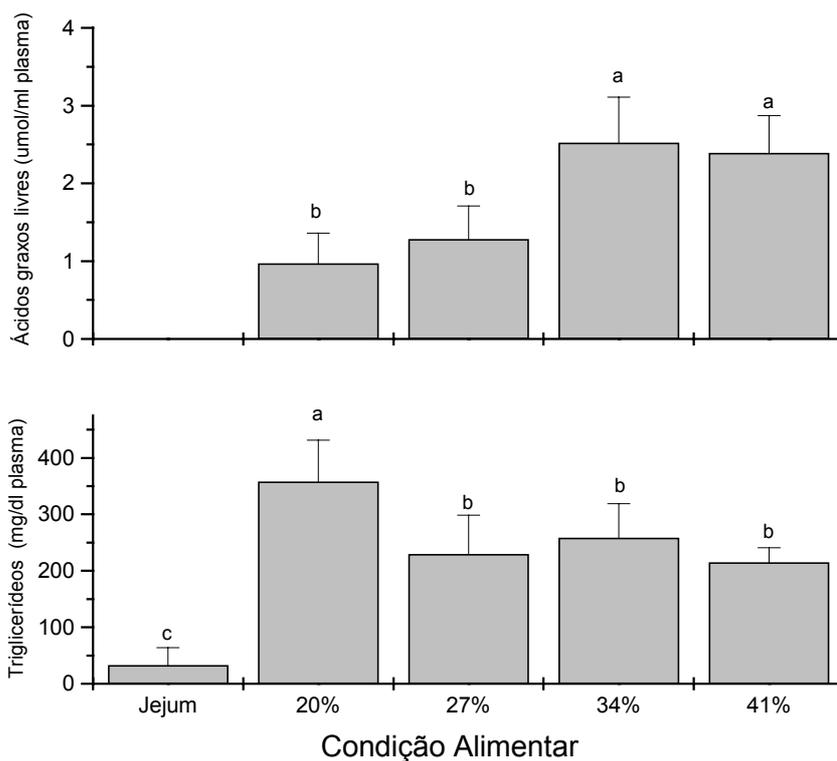


**Figura 12.** Concentração de aminoácidos livres no plasma e fígado do jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Os aminoácidos não podem ser estocados da mesma forma como o são os carboidratos (glicogênio) e as gorduras (triglicerídeos), entretanto, sua disponibilidade aumentada pode favorecer sua utilização como fonte de energia. O aumento de aminoácidos livres, principalmente no plasma do *R. quelen* pode estar associado também ao aumento da absorção destes metabólitos, pois no trato digestório houve aumento das atividades das enzimas proteolíticas em relação ao teor de proteína da dieta.

Os ácidos graxos livres apresentaram aumento significativo no plasma a partir de 27 % de proteína, enquanto que a concentração de triglicerídeos diminuiu ( $P < 0,05$ ) com o aumento de proteína (Figura 13). Além do aumento no conteúdo de proteína na dieta promover o uso de energia do catabolismo de aminoácidos, o perfil dos lipídios analisados sugeriu a mobilização destes para serem metabolizados. A redução da concentração de triglicerídeos no plasma também foi bem acentuada no grupo de peixes onde permaneceu em jejum. Brauge et al., (1994; 1995) observaram em *Oncorhynchus mykiss*, um aumento de triglicerídeos quando as dietas continham altos níveis de carboidratos e lipídeos enquanto que Del Carratore (2001) verificou que os níveis crescentes de amido na dieta para *Pseudoplatystoma coruscans* não influenciaram nas concentrações de triglicerídeos. Daniels & Gallaguer (2000) estudando os efeitos da proteína na dieta de *Paralichthys dentatus*, não encontraram variação na concentração de triglicerídeos.

Em nosso trabalho, relacionamos dois aspectos importantes referentes ao aumento da atividade enzimática da ALAT, ASAT e GDH versus aumento da proteína. O primeiro, é que houve uma relação direta entre o aumento de peso dos peixes e a atividade destas enzimas. Isso significa que a síntese protéica para formação de massa muscular pode ser associada à atividade destas enzimas como indicadores deste estado fisiológico.



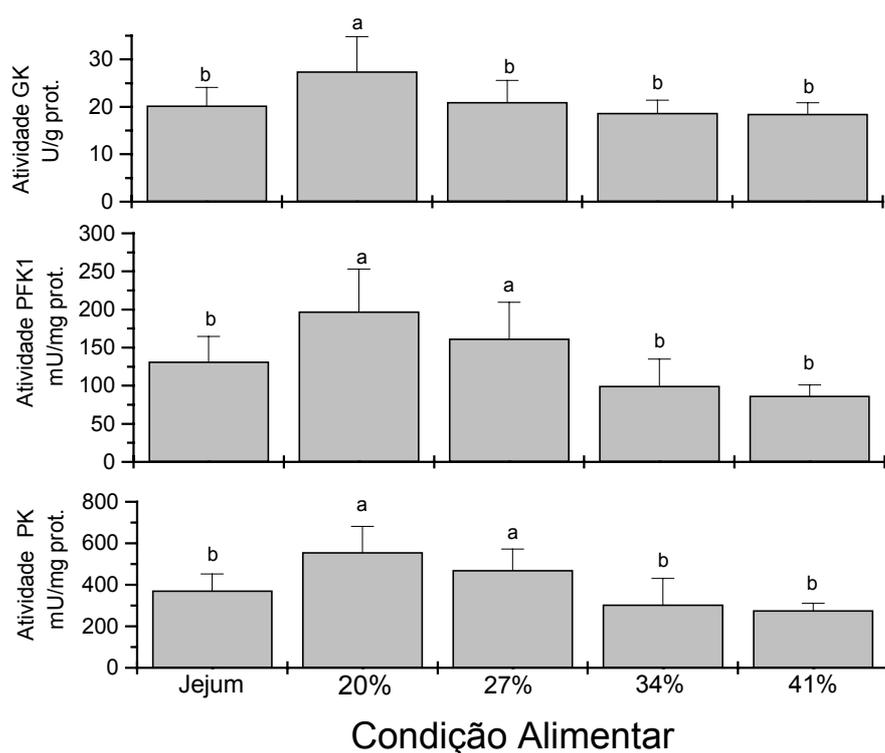
**Figura 13.** Concentração de ácidos graxos livres e triglicérides no plasma de jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Em segundo, verificamos que as respostas metabólicas, como a produção e excreção de nitrogenados, e a disponibilidade de aminoácidos e lipídios para a produção de energia, podem ser igualmente ensaiados através de determinações simples e seguras para acompanhamento do estado fisiológico do animal.

### **Metabolismo glicídico**

A análise das três enzimas envolvidas na via glicolítica (glicoquinase, fosfofrutoquinase 1 e piruvatoquinase) mostrou alteração das atividades com o aumento da concentração de proteína da dieta (Figura 14). Observamos redução significativa da atividade destas enzimas em todos os tratamentos, inclusive no jejum.

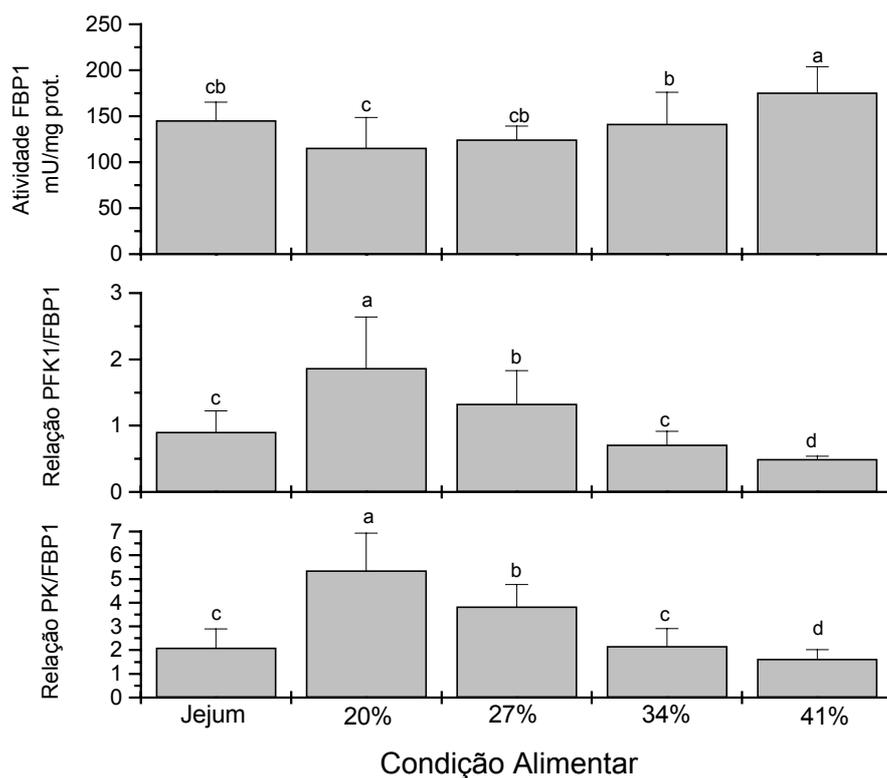
A atividade de frutose 1,6-bifosfatase, enzima envolvida na gliconeogênese, aumentou significativamente com o aumento de proteína na dieta, inclusive no jejum (Figura 15). A relação PFK1/FBP1 e PK/FBP1 mostrou que o sentido predominante da via glicolítica, com o aumento da proteína na dieta, foi a gliconeogênese (Figura 15). No jejum, esperávamos que esta relação fosse maior que a observada. Esse resultado pode ser devido a um período de jejum insuficiente para uma resposta adaptativa mais evidente desta enzima.



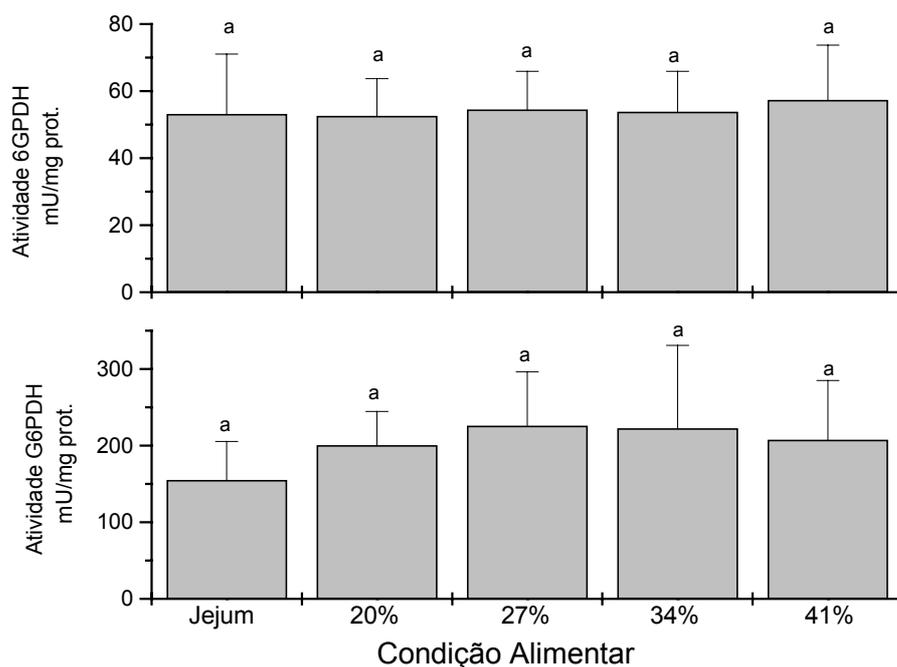
**Figura 14.** Atividade enzimática da glicoquinase (GK), fosfofrutoquinase-1 (PFK1) e piruvatoquinase (PK) no fígado e concentração de uréia no plasma de jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 para PFK1 e PK, n-5 para GK. (15 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

A atividade das enzimas envolvidas no desvio das pentoses fosfato não foi alterada pelas concentrações de proteína da dieta (Figura 16). Esses resultados podem ser entendidos por um quadro metabólico lipolítico. Considerando-se que estas enzimas estão diretamente envolvidas no desvio da via glicolítica para a produção de NADPH utilizados em processos de biossíntese, seria de se esperar que a diminuição da atividade destas enzimas ocorresse em paralelo a um quadro metabólico de hidrólise de triglicerídios e aumento de ácidos graxos livres (Fig.13). De fato, este quadro lipolítico foi observado nos jundiás alimentados com teores crescentes de proteína, tal como será complementarmente exposto e discutido adiante. Um quadro metabólico semelhante já foi descrito em outras espécies. Fideu et al., (1983) verificaram que dietas com alto teor de proteína na alimentação de *Oncorhynchus mykiss* diminuíram as atividades das enzimas da glicólise, piruvatoquinase e hexoquinase. Metón et al., (1999) observaram um aumento da atividade de enzimas que participam da via glicolítica e do desvio das pentoses (PFK-1, PK G6P-DH e 6PG-DH) em *Sparus aurata* alimentado com teores crescentes de carboidratos e baixos teores de proteína.

Os dados obtidos com as enzimas envolvidas na glicólise, gliconeogênese e produção de NADPH para os processos de biossíntese de ácidos graxos, corroboram os dados obtidos com as enzimas do metabolismo de proteínas e confirmam uma situação metabólica de gliconeogênese, além de apontarem para um processo lipolítico nas condições de experimentação.



**Figura 15.** Atividade enzimática da frutose 1,6 bifosfatase (FBP1) hepática, relação fosfofrutoquinase-1/frutose 1,6 bifosfatase (PFK1/FBP1) e relação piruvatoquinase/ frutose 1,6 bifosfatase (PK/FBP1) do jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (15 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 16.** Atividade enzimática da fosfogluconato desidrogenase e glicose, 6 fosfato desidrogenase no fígado do jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (15 dias de alimentação). Letras diferentes representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

### Perfil metabólico

Com a determinação das concentrações dos intermediários metabólicos pretendemos avaliar a dinâmica do perfil metabólico de jundiá em função das variações de proteína na dieta. Os intermediários metabólicos analisados no plasma, fígado, músculo branco e rins estão contidos nas tabelas 4 e 5. As reservas hepáticas de glicogênio não foram alteradas ( $P > 0,05$ ) pelos teores de proteína da dieta em *R. quelen*. A redução das reservas hepáticas foi observada somente no jejum (Figura 17).

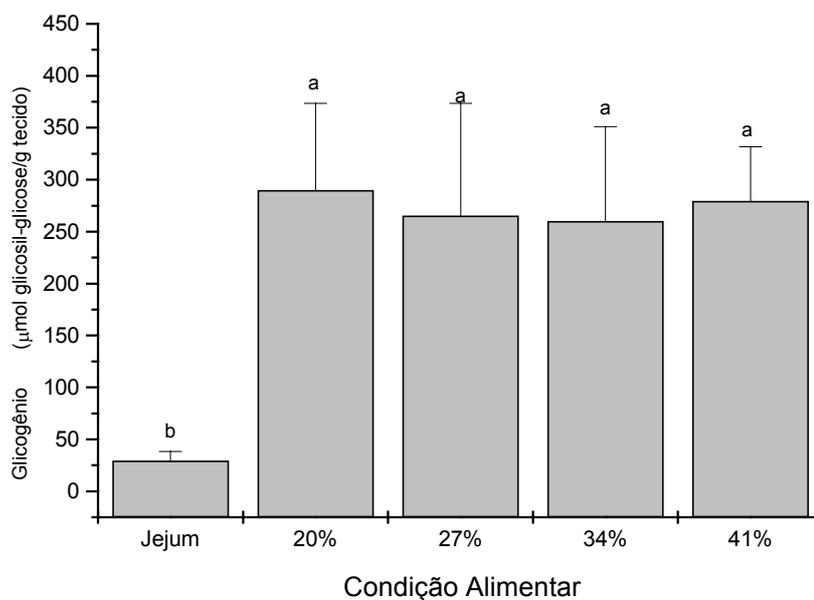
A concentração de glicogênio hepático nos peixes pode variar entre as diferentes espécies, além de poder estar relacionada a outros fatores além da alimentação. De acordo com Corrêa (2002) o *Colossoma macropomum* não sofre alteração nas concentrações de glicogênio hepático com o aumento de proteína na ração. Resultado semelhante foi obtido em nosso trabalho.

Estudos realizados por Vieira (2002) mostram que houve redução nas reservas hepáticas de glicogênio em *Brycon cephalus* e *Brycon orbignyanus* quando aumentam as concentrações de proteína da dieta. O mesmo foi verificado em trabalho realizado por Lundstedt (2003) em *Pseudoplatystoma coruscans* alimentado com conteúdos crescentes de proteína. Inversamente, Fine et al., (1996) obtiveram redução no glicogênio hepático com o aumento de proteína nas dietas de *C. carpio*. Kohla et al., (1996) obtiveram maiores concentrações de glicogênio hepático em *Colossoma macropomum* alimentado com baixos teores de proteína. O glicogênio hepático e muscular de *Gadus morhua* aumentou com o aumento de proteína na dieta (Von Der Decken & Lied, 1992). A redução do estoque de glicogênio foi verificado em *C. carpio* na condição de jejum (Shimeno et al. 1997) e em *Asparus aurata* (Metón et al. 1999)

Hemre et al., (1989) sugerem que possa ocorrer a gliconeogênese a partir de aminoácidos e triglicerídeos para manutenção dos teores de glicogênio na espécie *Gadus morhua* alimentada com dietas contendo 0

% de amido. A manutenção dos estoques de glicogênio em jundiá alimentado com teores crescentes de proteína, em função das discussões e dos dados já apresentados, deve-se, muito provavelmente, a processos de gliconeogênese a partir de aminoácidos.

No fígado observamos um aumento significativo de glicose e redução na concentração de ácidos graxos livres ( $P < 0,05$ ), com o aumento de proteína e com a redução de carboidratos e lipídios nas dietas. Esse quadro, associado ao aumento de glicose plasmática, é sugestivo de gliconeogênese hepática com exportação da glicose para outros tecidos. A forte redução na concentração de ácidos graxos livres no fígado aponta para um processo oxidativo de lipídios para atendimento da demanda energética. Esta proposição é corroborada pela diminuição dos níveis plasmáticos de lactato e da redução da razão láctico / pirúvico.



**Figura 17.** Concentração de glicogênio no fígado do jundiá *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes condições alimentares. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (15 dias de alimentação). Letras diferentes nas colunas do gráfico representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Médias dos intermediários metabólicos analisados no fígado e plasma do jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína da dieta. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes nas linhas da tabela representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

	Níveis de proteína da dieta (%)			
	20	27	34	41
<b>Plasma</b>				
Lactato ( $\mu\text{mol/ml}$ )	$7.72 \pm 2.25^a$	$4.38 \pm 1.96^b$	$4.15 \pm 1.95^b$	$2.71 \pm 1.35^b$
Piruvato ( $\mu\text{mol/ml}$ )	$2.26 \pm 0.53^b$	$3.10 \pm 0,53^a$	$3.70 \pm 0,55^a$	$3.66 \pm 0.65^a$
Glicose ( $\mu\text{mol/ml}$ )	$9.76 \pm 1.30^c$	$12.02 \pm 1.93^{ab}$	$15.41 \pm 4.96^a$	$13.11 \pm 3.08^{ab}$
<b>Fígado</b>				
Lactato ( $\mu\text{mol/g tecido}$ )	$5.26 \pm 1.50^a$	$5.42 \pm 1.20^a$	$5.26 \pm 0.65^a$	$4.33 \pm 1.10^a$
Piruvato ( $\mu\text{mol/g tecido}$ )	$0.173 \pm 0.072^a$	$0.182 \pm 0.037^a$	$0.183 \pm 0.024^a$	$0.174 \pm 0.089^a$
Glicose ( $\mu\text{mol/g tecido}$ )	$35.63 \pm 12.81^b$	$56.02 \pm 15.20^a$	$60.53 \pm 11.88^a$	$60.47 \pm 14.62^a$
Proteína ( $\mu\text{g de proteína/mg de tecido}$ )	$44.56 \pm 16.12^a$	$42.12 \pm 14.23^a$	$45.88 \pm 13.05^a$	$57.24 \pm 13.54^a$
Ácidos graxos livres ( $\mu\text{mol/g tecido}$ )	$12.30 \pm 3.91^a$	$8.66 \pm 2.56^{ab}$	$8.31 \pm 2.56^{ab}$	$7.70 \pm 3.41^b$

O músculo branco de jundiá alimentado com teores crescentes de proteína mostra um aumento nos níveis de glicogênio (Tabela 5). Este perfil pode ser considerado igualmente gliconeogênico, entretanto, como esta estrutura não é glicemiante, a glicose excedente é armazenada. Considerando-se que os níveis de lactato, piruvato, glicose e aminoácidos livres são constantes, a formação de glicogênio pode estar sendo feita a partir de glicose importada do plasma. Ficam portanto duas possibilidades para a formação de glicogênio hepático, através de um processo gliconeogênico ou simplesmente glicogênico. Tal como no fígado, no músculo a demanda metabólica é suprida por processos oxidativos de lipídios.

O rim apresentou um perfil metabólico particular. O aumento na concentração de lactato para os níveis mais altos de proteína na dieta, considerando-se a redução da lactemia, sugere que, tal qual o tecido hepático, este também é capaz de captar o lactato plasmático. É provável que o lactato renal seja transformado em glicose. Entretanto, se isso acontece no jundiá alimentado com altos teores de proteína, a glicose formada deve ser exportada para o plasma, visto que os níveis de glicose e glicogênio renais permanecem constantes. Esta possibilidade de que o rim de jundiá seja uma estrutura glicemiante deve ser confirmada posteriormente pelo ensaio da atividade de glicose 6-P fosfatase nesta estrutura. O aumento nas concentrações de aminoácidos livres ( $P < 0,05$ ) deve ser unicamente o reflexo dos teores de proteína na dieta. Considerando-se que os níveis de proteína renal são constantes permanece em discussão se o excesso de aminoácidos segue um caminho gliconeogênico ou se é utilizado para suprir as demandas metabólicas. Lundstedt et al., (2001; 2003) estudaram a influência do conteúdo de proteína no metabolismo de *Pseudoplatystoma coruscans*, e reportaram no rim e fígado um perfil metabólico que caracteriza gliconeogênese. Vieira et al., (2002) testaram diferentes conteúdos de

proteína para juvenis de *Brycon cephalus*, e propuseram que o perfil metabólico do tecido renal parece apresentar como estratégia a gliconeogênese a partir do aumento de piruvato e aminoácidos livres.

Alguns estudos fazem a relação entre o perfil metabólico nos peixes e aspectos nutricionais. Por exemplo, o perfil metabólico apresentado nos diferentes tecidos pelo *R. quelen* submetidos a diferentes concentrações de proteína da dieta é um reflexo dessas alterações e uma adaptação para manter os processos de produção de energia e crescimento. O aumento de glicose plasmático foi reportado por Brauge et al., (1994; 1995) em *Oncorhynchus mykiss* alimentado com dietas contendo altos níveis de carboidratos e lipídeos. Também foi observado o aumento deste metabólito por Del Carratore (2001), em *Pseudoplatystoma coruscans* alimentado com níveis crescentes de amido na dieta. Corrêa (2002) obteve aumento do teor de triglicerídeos pelo aumento de proteína na dieta de *Colossoma macropomum*. Entretanto, Daniels & Gallaguer (2000) não encontraram variações de glicose e outros intermediários em relação aos efeitos da proteína da dieta em *Paralichthys dentatus*. Lundstedt et al., (2001; 2003) verificaram que o aumento no conteúdo de proteína na dieta de *P. corruscans* leva a gliconeogênese no fígado.

**Tabela 5.** Médias dos intermediários metabólicos analisados no músculo branco e rins do jundiá *Ramdia quelen* alimentados com diferentes conteúdos de proteína da dieta. Médias ( $\pm$ DP) de n-10 (60 dias de alimentação). Letras diferentes nas linhas da tabela representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

	Níveis de proteína da dieta (%)			
	20	27	34	41
<b>Músculo branco</b>				
Lactato ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$8.24 \pm 2.86^a$	$8.57 \pm 0.80^a$	$9.51 \pm 2.85^a$	$10.25 \pm 2.42^a$
Piruvato ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$0.779 \pm 0.180^a$	$0.610 \pm 0.225^a$	$0.617 \pm 0.163^a$	$0.722 \pm 0.276^a$
Glicose ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$11.86 \pm 0.88^a$	$12.15 \pm 1.90^a$	$10.80 \pm 5.24^a$	$10.04 \pm 4.02^a$
Glicogênio ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$13.93 \pm 2.90^b$	$17.41 \pm 2.72^{ab}$	$18.84 \pm 4.59^{ab}$	$19.67 \pm 5.21^a$
Aminoácidos livres ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$1.32 \pm 0.60^a$	$1.58 \pm 0.50^a$	$1.63 \pm 0.75^a$	$1.75 \pm 0.56^a$
Proteína ( $\mu\text{g}$ de proteína/ $\text{mg}$ de tecido)	$208.81 \pm 42.30^a$	$202.00 \pm 37.20^a$	$171.98 \pm 48.91^a$	$168.31 \pm 49.77^a$
Ácidos graxos livres ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$2.25 \pm 0.98^a$	$2.30 \pm 1.46^a$	$1.96 \pm 0.77^a$	$2.88 \pm 1.18^a$
Triglicerídeos ( $\text{mg/g}$ tecido)	$108.24 \pm 15.61^a$	$13.99 \pm 4.40^b$	$4.39 \pm 1.52^b$	$9.25 \pm 4.66^b$
<b>Rins</b>				
Lactato ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$0.076 \pm 0.021^b$	$0.070 \pm 0.036^b$	$0.125 \pm 0.048^a$	$0.122 \pm 0.039^a$
Piruvato ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$0.513 \pm 0.107^a$	$0.480 \pm 0.126^a$	$0.531 \pm 0.278^a$	$0.533 \pm 0.139^a$
Glicose ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$21.43 \pm 3.77^a$	$18.32 \pm 2.86^a$	$16.07 \pm 3.24^a$	$15.53 \pm 2.04^a$
Glicogênio ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$25.06 \pm 4.00^a$	$26.19 \pm 3.26^a$	$27.99 \pm 4.84^a$	$25.46 \pm 6.00^a$
Aminoácidos livres ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	$0.96 \pm 0,22^b$	$1.44 \pm 0.51^a$	$1.28 \pm 0.64^a$	$1.39 \pm 0.48^a$
Proteína ( $\mu\text{g}$ de proteína/ $\text{mg}$ de tecido)	$6.52 \pm 2.23^a$	$8.51 \pm 2.96^a$	$7.87 \pm 3.84^a$	$8.93 \pm 2.49^a$

O perfil de metabólitos nos tecidos de peixes ainda é pouco utilizado nos estudos de nutrição. Alguns trabalhos (Lundstedt, 2003; Vieira 2002; Moraes & Bidinotto, 2000; Corrêa, 2002) sugerem que estes intermediários podem se constituir em importante ferramenta para conhecer as relações metabólicas entre os tecidos e sua correspondência com as concentrações de macronutrientes. Nesse trabalho, o perfil metabólico foi concordante com os resultados obtidos das análises enzimáticas em tecido hepático, e ampliou o desenho metabólico de jundiá para outros tecidos, mostrando-se mais uma vez como ferramenta útil, de fácil acessibilidade e confiabilidade na avaliação metabólica de estados nutricionais. Entretanto, o conhecimento preciso dos valores tissulares e sanguíneos de intermediários metabólicos chave para as diferentes espécies de peixes é ainda um vasto campo a ser explorado. A partir de um conhecimento preciso destes valores, em situações consideradas normais, poder-se-á ter em mãos uma ferramenta de valor diagnóstico inquestionável em diferentes áreas da ictiologia.

## CONCLUSÕES

O sistema imune não é alterado pela variação de proteína da dieta entre 20 e 41 %;

As enzimas digestivas no estômago, intestino anterior, médio e posterior são indutivas e respondem às variações de proteína;

O aumento de proteína na dieta gera um catabolismo aumentado de aminoácidos para manter os processos de produção de energia;

Há aumento de produção de compostos nitrogenados de excreção pelo aumento de proteína da dieta;

O aumento de proteína com a redução de carboidratos e lipídios na dieta reduz a glicólise e induz a gliconeogênese hepática como estratégia metabólica para disponibilizar energia, manter as reservas metabólicas e a glicemia;

Os intermediários metabólicos dos tecidos são responsivos às variações de proteína da dieta;

O requerimento de proteína para juvenis de jundiá é de 41 % para o maior ganho de peso.

As concentrações de intermediários metabólicos e a atividade das enzimas do metabolismo estudadas neste trabalho podem ser utilizadas como indicadores do estado nutricional.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ai, Q., Mai, K., Li, H., Zhang, C., Zhang, I., Duan, Q., Tan, B., Ma, H., Xu, W., Zhang, W., Liufu, Z. 2004. Effects of dietary protein to energy ratios on growth and body composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*. 230: p.507–516.
- Alexis, M.N. and Paparaskeva-Papatsoglo, E. 1986. Aminotranferase activity in the liver and white muscle of *Mugil capito* fed diets containing different levels of protein and carbohydrate. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 245-249.
- Archibald, R.M. 1946. Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *J. Biol. Chem.* 156: p.121-142.
- Baanante, I.V., García de Frutos, P., Bonamusa, L. Fernández, F. 1991. Regulation of fish glycolysis- gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P<sub>2</sub> and PFK-2. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: p.11-17.
- Bai, S.C., Wang, X., Cho, E. 1999. Optimum dietary protein level for maximum growth of juvenile wellow puffer. *Fisheries Science*. 65(3): p. 380-383.
- Bartrons, R., hue, L., Schaftingen, E. Van, Hers, H.G. 1983. Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 214: p. 829-837.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases  $\alpha$  e  $\beta$ : colorimetric assay methods *In: Methods in Enzymology*. Ed. Colowich, S.P. & Kaplan. New York: Academic Press Inc. 10: p.149-158.
- Bergmeyer, H.U. 1984. *Methods of enzymes analysis*. Academic Press. New York.

- Bidinotto, P.M., Souza, R.H.S., Moraes, G. 1998. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of microsamples. *Bol. Tec. CEPTA*. 10: p.53-60.
- Bonamusa, L., García de Frutos, P., Fernández, F., Baanante, I.V. 1989. Enzymes as indicators of nutritional conditions in the gilthead sea bream fish, *Sparus aurata*. En. International Aquaculture Conference. *Aquaculture Europe '89*. p.37.
- Bonamusa, L., García de Frutos, P., Fernández, F., Baanante, I.V. 1992. Nutritional effects on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1 (2): p.113-125.
- Bradford, M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: p.248-254.
- Brauge, C., Corraze, G., Médale, F. 1995. Effects of dietary levels of carbohydrate and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in freshwater or in sea water. *Comp. Biochem. Physiol.* 111A: p.117-124.
- Brauge, C., Corraze, G., Médale, F. 1994. Effects of dietary levels of carbohydrate levels on growth, body composition and glycemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in sea water.
- Caseras, A., Metón, I., Fernández, F., Baanante, I.V. 2000. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biochim. Biophys. Acta*. 1493: p.135-141.
- Castaño, J., Nieto, A., Feliu, J.E. 1979. Inactivation of phosphofructokinase by glucagon in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 265: p. 5576-5579.
- Collier, H.B. 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, Vancouver, 50: p.550-552.

- Copley, N.G. 1941. Alloxan and ninhydrin test. *Analyst*. 66: p.492-493.
- Corrêa, C.F. *Estudo dos padrões de digestão enzimática e perfil metabólico em tambaqui, Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) alimentado com diferentes teores de proteína e carboidratos em regime de confinamento*. Tese (doutorado) – São Carlos: UFSCar. 115p. 2002.
- Chakrabarti, I., Gani, M.D.A., Chaki, K.K., Sur, R., Misra, K.K., 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and nich segregation. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A, p.167-177.
- Chernecky, C.C., Krech, R.L., Berger, B.J. 1993. *Laboratory tests and diagnostic procedures*. p.932-933.
- Chiu, Y.N., Austic, R.E., Rumsey, G.L. 1986. Urea cycle activity and arginine formation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.* 116: p.1640-1650.
- Cowey, C.B., De La Higuera, M., Sdrón, J.W. 1979. The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 38: p. 385-395.
- Cowey, C.B. and Walton, M.J. Intermediary metabolism. 1989. In: HALVER, E. (Ed). *Fish Nutrition*. New York: p.259-329.
- Cowey, C.B., Adron, J.W., Brown, D.A, Shanks, A.M. 1975. Studies on the nutrition of marine flatfish. The metabolism of glucose by plaice *Pleuronectes platessa* and the effect of dietary energy source on protein utilization in plaice. *Br. J. Nutr.*, 33, 219-231.
- Daniels, H.V. and Gallagher, M.L. 2000. Effect of dietary protein level on growth and blood parameters in summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *J. Appl. Aquacult.* 10 (1): p.45-52.
- Dabrowska, H. and Wlasow, T. 1986. Sublethal effect of ammonia on certain biochemical and haematological indications indicators in

- common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 83C (1): p.179-184.
- Das, K.M. and Triphata, S.D. 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp *Ctenopharingodon idella*. *Aquaculture*. 92: p.21-32.
- Degani, G., Ben-Zvi, Y., Levanon, D., 1989. The effect of different protein levels and temperature on feed utilization, growth and body composition of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture*. 76: p.293–301.
- De Silva, S.S. and Anderson, T.A. 1995. Fish Nutrition in Aquaculture. Chapman and Hall, London. 319p.
- Del Carrote, C.R. 2001. Desempenho produtivo, digestibilidade e metabolismo energético de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) alimentados com níveis crescentes de amido. Tese (doutorado). Jaboticabal; Centro de Aqüicultura da UNESP, 60p.
- Do Carmo de Sá, M.V., S Fracalossi, D.M. 2002. Exigência protéica e relação energia/proteína para alevinos de piracanjuba *Brycon orbignyanus*. *Rev. Brás. Zootec.* 31 (1): p.1-10.
- Dubois, M.G., Gilles, K.A., Hamilton, J.K. Rebers, P.A., Smith, F. 1960. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ana. Chem.* 28: p.350-358.
- Driedzic, W.R. and Hochachka, P.W. 1978. Metabolism in fish during exercise. *In Fish Physiology* (Edited by Hoar W.S.eRandall D.J.) vol. VII. academic Press, New York. p. 503-543.
- Engin, K. and Karter, C.G. 2001. Ammonia and urea excretion rates of juvenile Australian Short-finned eel (*Anguilla australis australis*) as influenced by dietary protein level. *Aquaculture*. 194: p.123-136.
- Fideu, M.D., Soler, G., Ruiz-Amil, M. 1983. Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout *Salmo gairdneri* R. *Comp. Biochem. Physiol.* 4: p.795-799.

- Fine, M., and Azilberg, D. The effect of dietary protein level, water temperature and growth hormone administration on growth and metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.* 114A, (1): p.35-42.
- Fish, G.R. 1960. The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of tilapia and perch. *Hydrobiol.* 15: p.161-179.
- Fournier, V., Gouillou-Coutans, M.F., Métailler, R., Vachot, C., Moriceau, J., Le Delliou, H., Huelvan, C., Desbruyeres, E., Kaushik, S.J. 2003. Excess dietary arginine affects urea excretion but does not improve N utilization in rainbow *Oncorhynchus mykiss* and turbot *Psetta maxima*. *Aquaculture.* 217: p.559-576.
- Fynn-AiKins, K., Hung, S.S.O., Liu, W., Li, H. 1992. Growth, lipogenesis and liver composition of juvenile White sturgeon fed different levels of D-glucosa. *Aquaculture.* 105: p.61-72.
- Galvão, M.S.N.; Yamanaka, N.; Fenerich-Verani, N., Pimentel, C.M.M. 1997. Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* Gunter, 1980 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. *Bol. Inst. Pesca.* 24: p.101-110.
- Garcia de Frutos, P., Bonamussa, L. Fernández, F., Baanante, I.V. (1990) Fructose 2,6-bisphosphatate in liver of *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 96B: p.63-65.
- Garling, D.L. and Wilson, R.P. 1976. Optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.* 116 (9): p.1368-1375.
- Gawlicka, A., Parent, B., Horn, H.M., Ross, N., Opstad, I., Torrissen, J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossu hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture.* 184: p.303-314.

- Gentzkon, C.J. and Masen, J.M. 1942. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *J. of Biolog. Chemest.* 143: p.531-544.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology.* New York, 56: p.35-39.
- Glass, H.J., MacDonald, N.L., Moran, R.M. Stark, JR. 1989. Digestion of protein in different marine species. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B (3): p. 607-611.
- Guedes, D.C. *Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiá (Rhamdia spp) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae).* Santa Maria - UFSM. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Santa Maria. 99 p. 1980.
- Gouillou-Coutans, M.F., Fournier, V., Métailler, R., Vachot, C., Desbruyeres, E., Huelvan, C., Moriceau, J., Le Delliou, H., Kaushik, S.J. 2002. Dietary arginine degradation is a major pathway in ureogenesis in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Comp. Biochem. Physiol.* 132: p. 305-319.
- Harrower, J.R., Brown, C.H. 1972. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.* 32(5): 224-228.
- Henre, G.I., Lie, O., Lied, E., Lambertsen, G. 1989. Starch as an energy source on feed for cod (*Gadus norhua*): Digestibility and retention. *Aquaculture.* 80: p.261-270.
- Henken, A.M., Machiels, M.A.M., Dekker, W., Hogendoorn, H. 1986. The effect of dietary protein and energy content on growth rate and feed utilization of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture.* 58: p.55-74.

- Hidalgo, F. and Alliot, E. 1988. Influence of water temperature on protein utilization in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*. 72: p.115-129.
- Hochachka, P.W., Guppy, H.E., Guderley, Storey K.B., Hulbert, W.C. 1978. Metabolic biochemistry of water vs air-breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructures. *Can. J. Zool.* 56: p.736-750.
- Hoffer, R. and Schiemer, F. 1981. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia*, 48: p.342-345.
- Hopkins, T.E.; Wood, C.M., Walsh, P.J. 1995. Interactions of cortisol and nitrogen metabolism in the urcogenic gulf toafish *Opsanus beta*. *J. Exp. Biol.* 198: p.2229-2235.
- Houlihan, D.F., Mathers, E., Foster, A. 1994. Biochemical correlates of growtrate in fish. *Fish Ecophysiology*, Chapman & hall, London. pp. 45-71.
- Hummel, B.C.W. 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (12): p.1393-1399.
- Ihering, R. V. 1938. A cerca do regime alimentar dos peixes. *O campo*. 9 (105): p.71-73.
- Jauncey, K. 1982. The effects of varying dietary protein level on the growth, food conversion, protein utilization, and body composition of juvenile tilapias *Sarotherodon mossambicus*. *Aquaculture*. 27: p.43-45.
- Kim, K., Kyes, T.B., Amundson, C.H. 1991. Purified diet development and re-evaluation of the dietary protein requirement of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 96: p.57-67.

- Kitamikado M. and Tachino S. 1960. Studies on the digestive enzymes of the rainbow trout II. Proteases. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 26: p.685-690.
- Kohla, U.; Saint Paul, U.; Friebe, J.; Wernicke, D.; Hilge, V.; Braum, E., Gropp, J. 1992. Growth, digestive enzyme activities and hepatic glycogen levels in juvenile *Colossoma macropomum* Cuvier from South America during feeding, starvation and refeeding. *Aquacult. Fisher. Managem.* 23: p.189-208.
- Kori-Siakpere, 1985. O. Haematological characteristics of *Clarias isheriensis* Sydenham. *Journal of Fish Biology*. 27: p.259-263.
- Kubitza, F. *Nutrição e alimentação de peixes*. 1998. Campo Grande-MS, 108p.
- Kuz'mina, V.V. 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquacult.* 148: p.25-37.
- Li, M.H., Robinson, E.H., Wolters, W.R., 1998. Evaluation of three strains of channel catfish *Ictalurus punctatus* fed diets containing three concentrations of protein and digestible energy. *J. World Aquac. Soc.* 29: p.155-160.
- Ling, S.W. 1973. *Foods and feeding of warm-water fishes in ponds in Asia and Far East*. Bangkok, Thailand, 201p.
- Lone, K.P., Ince, B.W., Matty, A.J. 1982. Changes in the blood chemistry of rainbow trout, *Salmo gairdneri* fish, in relation to dietary protein level, and an anabolic steroid hormone, ethylestrenol. *J. fish Biol.* 20: p. 597-606.
- Lovell, R.T. Nutrition and feeding. In: Brown, E. E. e Gratzek, J.B. 1980. *Fish farming Handbook: Food, bait, tropicals and goldfish*. Westport, Connecticut. p.207-236.

- Lovell, R.T., 1979. Factors affecting voluntary food consumption by channel catfish. Proc. World Symp. *Finfish Nutr.* Fishfeed Technol. 1: p.555-564.
- Lowry, D.H. Rosenbrough, N.J., Far, A.L., Randal, R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*193: p.265-275.
- Lu, G.D. 1939. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. *Biochem. J.* 33: p.249-254.
- Luchini, L. 1990. *Manual para el cultivo del bagre sudamericano Rhamdia sapo*. Santiago do Chile. FAO. 63 p.
- Lundstedt, L.M. 2003. *Aspectos adaptativos dos processos digestivo e metabólico de juvenis de pintado Pseudoplatystoma corruscans arraçados com diferentes níveis de proteína e energia*. (Tese de Doutorado) Universidade Federal de São Carlos- São Carlos-SP. 140p.
- Lundstedt, L.M., Melo, J.F.B., Moraes, G. 2001. The influence of different protein levels on the metabolism of *Pseudoplatystoma coruscans*. In *IV Workshop in Comparative Animal Physiology*. p. 59-60.
- Melo, J.F.B., Radünz Neto, J., Silva, J.H.S. and Trombetta, CG. 2002. Desenvolvimento e composição corporal de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes fontes de lipídios. *Rev. Ciência Rural*. 32 (32) p.323-327.
- Melo, J.F.B., Radünz Neto, J.R., Da Silva, J.H.S., et al. 1999. Estudos preliminares sobre a utilização de diferentes fontes de lipídios na dieta para o jundiá *Rhamdia quelen* dos 21 aos 45 gramas de peso vivo. In: XXXVI Reunião Anual da Soc. Bras. de Zoot. *Anais...*, Porto Alegre-RS. p.317.

- Melo, J.F.B. *Efeitos da utilização de diferentes fontes e níveis de lipídios na composição corporal e desenvolvimento de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen**. Santa Maria - UFSM. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Santa Maria. 63 p., 2000.
- Metón, I., Mediavilla, D., Casearas, A., Cantó, E. Fernández, F., Baanante, I.V. 1999. Effect of diet composition na ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate patway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition*. 82: p.223-232.
- Metón, I., Mediavilla, D., Baanante, I.V. 1995. Automated assay for fructose 2,6 bisphosphat. *Anal. Leet*. 28: p.1919-1935.
- Metón, I., Egea, M., Baanante, I.V. 2003a. New insights into regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Recent. Res. Devel. Biochem*. 4: p.125-149.
- Metón, I., Fernández, F. Baanante, I.V. 2003b. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 225: p.99-107.
- Metón, I. *Regulacion nutricional de enzimas clave en la glucolisis-gluconeogenesis: expresión del gen 6-PF 2-K/FRU 2,6-P2ASA en hígado de Sparus aurata*. 1996. (tesis doctorado) Universidad de Barcelona- Facultad de Farmàcia. -179p.
- Meurer, S. and Zaniboni Filho, E. 1997. Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces , Pimelodidae, Siluriforme), na Região do Alto do Rio Uruguai . In: XII Encontro Brasileiro de Ictiologia. *Anais...*, São Paulo -SP. p.29.
- Moares, G., Bidinotto, P.M. 1995. Induced changes en the amylogydrolitic profile of the gut of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1885) fed different levels of soluble carbohydrates its correlation with metabolic aspects. *Revista de Ictiologia*. 8(1-2): p. 47-51.

- Moraes, G. and Bidinotto, P.M. 2000. induced changes in the amylohydrolitic profile of the gut of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1885) fed different levels of soluble carbohydrate: its corelations with metabolic aspects. *Revista de Ictiologia*. 8 (1/2): p. 47-51.
- Moon, T.W., Foster, G.D. 1995. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: Hochachka, T.P. (Eds), *Metabolic Biochemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp.65-100.
- Moon, T.W. 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol.*, Part b Biochem. Mol. Biol. 129: p.243-249.
- Morishita, T., Noda, H., Kitamikado, M. 1964. On the activity of the digestive enzymes in cultured fish. *Journal of the Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie, Tsu*. 6: p.239-246.
- Moyano, F.J., Cardente, G., Higuera, M. 1991. Nutritive and metabolic utilization of proteins with glutamic acid content by the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A: p.759-762.
- Nagasse, G. 1964. Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters. Digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Z. Vergl. Physiol.* 49: p.270-284.
- Newgard, C.B., Hirsch, L.J., Foster, D.W., McGarry, J.D. 1983. Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in rat. A direct or an indirect pathway? *J. Biol.Chem.* 258: p.8046-8052.
- Nordlie, F.G. 1966. Thermal acclimation and peptic digestive capacity in the black bullhead, *Ictalurus melas*. *American Midland Naturalist*. 75: p. 416-424.
- Norvák, M. 1965. Colorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. *J. of Lipid Research*. 6: p.431-433.

- NRC - National Research Council, *Nutrients requeriments of fish*. National Academy Press. 114 p. 1993.
- Park, J.T. and Johnson, M.J. Submicro determination of glucose. 1949. *J. Biol. Chem.* 249: p.149-151.
- Pelletier D, Dutil JD, Blier P, and Guderley H. 1994. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *Journal of Comparative Physiology B.* 164: 179-190.
- Peres H. and Oliva-Teles, A. 2001. Effect of dietary protein lipid level on metabolic utilization od diets by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenales. *Fish Physiology and Biochemitry.* 25: p.269-275.
- Peres H., Gonçalves, P., Oliva-Teles, A. 1999. A glucose tolerance in gilthead seabream *Sparus aurata* and Euro seabass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture.* 179: p.415-423.
- Pilkis, S.J., and Claus, T.H. 1991. Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Annual Review of Nutrition.* 11: 465-515.
- Polez, V.L.P., Moraes, G., Santos Neto, C. 2003. Different biochemical strategies of two neotropical fish to cope with the impairment of nitrogen excretion during air exposure. *Brazilian J. of Medical Research.* 36: p.279-285.
- Polez, V.L.P., Iwama G.W., Moraes, G. 2004. Ureotelism is inducible in the neotropical freshwater *Holpias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae). *Brazilian J. Biology.* 64(2): p.101-113.
- Pongmaneerat, J., Watanabe, T. 1993. Nutritional evolution of the soybean meal for rainbow trout and carp. *Nipp. Suis. Gakkaishi.* 59(1): p.157-163.
- Quoy, J.R.C. and Gaimard, J.P. 1824. In Freycinet, Louis de. *Voyage autor du monde executé sur les corvettes de S.M. l'Uranie et la*

- Physicienne pendant les années 1817-1820. Zool., pt. 2, Paris, Chapter 11, Description des Mollusques: 410-516, pls 66-72, 75, 87.*
- Radünz Neto, J. *Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas e alevinos de jundiá (Rhamdia quelen)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 77 p. 1981.
- Rahmatullah. M. and Boyde, T.R.C. 1980. Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime: methods with and without desproteinization. *Clin. Chim. Acta.* 107: p.3-9.
- Rychly, J. 1980. Nitrogen balance in trout. II. Nitrogen excretion after feeding diets with varying protein and carbohydrate levels. *Aquaculture.* 20: p.343-350.
- SAS (Statistical Analysis System). Institute, SAS/STAT. *User's guide: statistical.* Cary, North Carolina: Versão 6.08, 4 ed., (2): 846 p. 1996.
- Saha, N. and Ratha, B.K. 1998. Ureogenesis in Indian air-breathing teleosts: adaptation to environmental constraints. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120A: 195-208.
- Saha, N. and Ratha, B.K. 1994. Induction of ornithine-urea cycle in a freshwater teleost, *Heteropneustes fossilis*, exposed to high concentrations of ammonium chloride. *Comp. Biochem. Physiol.* 108B: p. 315-325.
- Salhi, M., Bessonart, M., Chediak, G., Bellagamba, M., Carnevia. D. 2004. Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. *Aquaculture.* 231: p.435–444.
- Sakthivel, M. 1988. Effects of varying dietary protein level on the blood parameters of *Cyprinus carpio*. *Proc. Indian Acad. Sci. (Anim. Sci.)*. 97: p.363-366.
- Sánchez-Muros, M.J., García-Rejón, L., García-Salguero, L., Higuera, M., Lupiánes, J.A. 1998. *Biochemistry & Cell Biology.* 30: p.55-63.

- Silfvergrip, A.M.C. *A sistematic revision of the neotropical catfish genus Rhamdia (Teleostei, Pimelodidae)*. Department of zoology, Stockholm University and Departement of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History – Stockholm, 156 p. 1996.
- Shimeno, S., Takafumi, S. Hidetsuyo, H., Masumoto, T., Kheyyali, D. 1997. Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. 151: p.371-377.
- Smit, H. 1967. Influence of temperature on the rate of gastric juice secretion in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 21: p.125-132.
- Stoskopf, M. K. Fish medicine. 1993. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 882p.
- Staal, G.E., Koster, J.F., Veeger, C. 1975. Human erythrocyte pyruvate kinase. *Meth. Enzymol*. 42: p. 182-186.
- Suarèz, M.D., Hidalgo, M.C., Callego, M.G. Sanz, A., Higuera, M. De La. 1995. Influence of relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the *European ell*. *Comp. Biochem. Physiol*. 111 (3): p.421-428.
- Tacon, A. G. J. 1989. *Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados – Manual de capacitacion*. FAO, Doc 4. Brasília-DF. 136p.
- Tavares-Dias, M., Tenani, R.A., Gioli, L.D., Faustino, C.D. 1999a. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sangüíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. *Revista Brasileira de Zoologia*. Curitiba,16 (2): p.423-431.
- Tavares Dias, M., Melo, J.F.B., Moraes, G., Moraes, F.R. 2002. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*. 32: p.693-698.

- Van Waarde, A., Van Den Thillart, G., Kesbeke, F. 1983. Anaerobic energy metabolism of the European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Comp. Biochem. Physiol.* 149: 469-475.
- Vieria V.L.P. 2002. *Estudo do processos digestivos em Brycon cephalus (Matrinxa) e Brycon orbignyanus (Piracanjuba) alimentados com diferentes teores de proteína: Aspectos adaptativos e resposta metabólica.* (Tese Doutorado) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-P. 94p.
- Vieira, V.L.P., Melo, J.F.B., Moraes, G. Metabolic responses of matrinxã *Brycon cephalus*, fed different protein levels. *In IV Workshop in Comparative Animal Physiology.* p.75-76. 2001.
- Von Der Decken, A., Lied, E. 1992. Dietary protein levels affect growth and protein metabolism in trunk muscle of cod, *Gadus morua*. *J. Comp. Physiol.* 162: p.351-357.
- Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed). *Methods of enzymatic analysis.* Verlag Chemie, Weinheim. 5: p.270-277.
- Walsh, P.J., Danulat, E., Mommsen, T.P. 1990. Variation in urea excretion in the gulf toadfish *Opsanus beta*. *Mar. Biol.* 106: p.323-328.
- Wang, K.W., Takeuchi, T., Watanabe, T. 1985. Effect of dietary protein level of growth of *Tipalia nilotica*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 5: p.133-140.
- Winfrey, R.A., Stickney, R.R., 1981. Effects of dietary protein and energy on growth, feed conversion efficiency and body composition of *Tilapia aurea*. *J. Nutr.* 111: p.1001-1012.
- Wintrobe, M.M. 1934. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica.* Leipzig, 51: p.32-49.

- 
- Wood, C.M., Hopkins, T.E., Hogstrand, C. and Walsh, P.J. 1995. Pulsatile urea excretion in the toadfish *Opsanus beta*: an analysis of the rates and routes. *J. Exp. Biol.* 198: p.1729-1741.
- Yang, S., Liou, C. Liu, F. 2002. Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture.* 213: p.363-372.
- Yamamoto, T., Unuma, T. and Akiyama, t. 1999. The influence of dietary protein and fat levels on tissue free amino acid levels of fingerling raibow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 182: p.353-372.