

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

Luciana Cristina de Almeida

**DESEMPENHO PRODUTIVO, EFICIÊNCIA DIGESTIVA E PERFIL
METABÓLICO DE JUVENIS DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum*
(CUVIER, 1818), ALIMENTADOS COM DIFERENTES TAXAS
CARBOIDRATO/LIPÍDIO**

São Carlos

2010

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

Luciana Cristina de Almeida

**DESEMPENHO PRODUTIVO, EFICIÊNCIA DIGESTIVA E PERFIL
METABÓLICO DE JUVENIS DE TAMBAQUI, *Colossoma macropomum*
(CUVIER, 1818), ALIMENTADOS COM DIFERENTES TAXAS
CARBOIDRATO/LIPÍDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolução 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 Genética e Evolução.(campo de pesquisa: bioquímica).

São Carlos

2010

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

A447dp

Almeida, Luciana Cristina de.

Desempenho produtivo, eficiência digestiva e perfil metabólico de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), alimentados com diferentes taxas carboidrato/lipídio / Luciana Cristina de Almeida. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

103 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Genética. 2. Nutrição de peixes. 3. Digestão. 4. Metabolismo. 5. Crescimento. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

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

**DESEMPENHO PRODUTIVO, EFICIÊNCIA DIGESTIVA E PERFIL
METABÓLICO DE JUVENIS DE TAMBAQUI, *C. MACROPOMUM*
(CUVIER, 1818), ALIMENTADOS COM DIFERENTES TAXAS
CARBOIDRATO/LIPÍDIO.**

Tese de Doutorado de Luciana Cristina de Almeida

Banca Examinadora

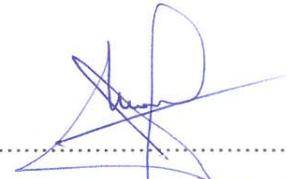
Prof. Dr. Gilberto Moraes

Profa. Dra. Ive Marchioni Avilez

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho

Profa. Dra. Cláucia Aparecida Honorato da Silva

Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino


.....
Ive Marchioni Avilez
.....

.....
Orlando Moreira Filho
.....

.....
Cláucia Aparecida Honorato da Silva
.....

.....
José Eurico Possebon Cyrino

Dedico este trabalho
ao meu querido, corajoso e valente pai, José,
um exemplo de compaixão, bondade e honestidade.
Que sua força de vontade continue me inspirando.

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu anjo da guarda por toda a inspiração, calma, paciência e perseverança na realização deste trabalho.

Professor Gilberto, por todos esses anos compartilhados de aprendizado, apoio e, principalmente de amizade. Pela oportunidade de fazer parte da equipe e a confiança depositada. Aprendi muito e espero poder continuar aprendendo junto à essa pessoa maravilhosa.

Lu, meu parceiro, amigo, amor, por toda a compreensão, paciência e ajuda imprescindíveis durante os dois últimos anos deste trabalho. Sem ele com certeza tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada pela leveza que me trouxe na vida.

Minha família que faz parte de todo esse processo: mãe (Silvia), pai (José), Roberto e André que sempre me apoiaram nos meus sonhos e com certeza fizeram parte dessa realização. Muito obrigada.

Aos meus avós por todo o carinho e cuidado. Vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Ive, minha grande amiga presente em todos os momentos e dividindo todas as horas tristes e felizes. Meu anjo da guarda em forma de amiga.

Claucia, minha outra grande amiga, por toda a ajuda em relação ao trabalho e por todas as horas agradáveis que pudemos compartilhar juntas. Sinto sua falta por aqui. Luisinho, querido amigo que, mesmo de longe, sei que torceu muito para meu sucesso. Você também faz muita falta por aqui.

Todos os amigos do laboratório: Fernando, Cleujosi, Francine, Lucas, Fernanda, Priscila, Rodrigo, Araceli, Gustavo, Lívia, por toda a força e ajuda durante esses anos. Pela amizade prazerosa, pelas horas compartilhadas no laboratório e fora dele. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Sr. Toninho pela disposição, carinho, amizade e ajuda durante esse trabalho.

Aos meus demais amigos que fizeram parte da minha história nesses últimos quatro anos. Cada um teve sua parcela de contribuição e apoio na realização dessa conquista.

RESUMO

O aumento de carboidrato e lipídio dietários com concomitante redução do nível de proteína é uma perspectiva promissora para suprir a demanda energética em peixes e poupar a proteína da dieta para o crescimento. O estudo da secreção de enzimas digestivas associado com parâmetros de crescimento e metabolismo pode contribuir para solucionar diversos problemas nutricionais na aquicultura. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, onde propusemo-nos a estudar o crescimento e os aspectos digestivos e metabólicos de juvenis de tambaqui, *C. macropomum*, alimentados com três dietas isoenergéticas e isoprotéicas com diferentes taxas carboidrato/ lipídio (CHO/L): 30,5/13,7% para a dieta I, 40,5/9,1% para a dieta II, 50,0/4,8% para a dieta III. Foram analisados os parâmetros de crescimento, as atividades das enzimas digestivas (proteases inespecíficas, tripsina, quimiotripsina, lipase inespecífica, amilase e fosfatase alcalina), os intermediários metabólicos (glicose, lactato, piruvato, amônia, proteína, ácidos graxos livres, triglicerídeos livres, aminoácidos e glicogênio) de fígado, músculo branco e plasma e três enzimas do metabolismo intermediário (LDH, MDH e GDH). A diminuição do conteúdo de lipídio e o aumento concomitante do teor de carboidrato nas dietas experimentais resultaram em diferenças significativas nos parâmetros de crescimento. As maiores porcentagens de ganho em peso, ganho em comprimento, consumo relativo e fator de condição foram observadas nos animais alimentados com a dieta II (40,5% CHO e 9,1% lipídio). Os peixes alimentados com a dieta III apresentaram diminuição significativa do crescimento e do IHS em relação aos peixes alimentados com as outras dietas. As enzimas digestivas foram responsivas à mudança nas taxas CHO/L. Os peixes alimentados com a dieta III apresentaram redução significativa da atividade de protease ácida estomacal, de fosfatase alcalina e da taxa T/Q. Os peixes que receberam a maior taxa carboidrato:lipídio apresentaram aumento da atividade da lipase em todo o trato gastrointestinal e da amilase de estômago e intestino anterior. Em relação ao metabolismo, observou-se aumento de lipólise com o aumento da taxa CHO/L. O músculo branco aumentou a glicogênese, a proteólise, e a neoglicogênese a partir de aminoácidos, além de realizar lipólise para atender a demanda energética quando a taxa CHO/L aumentou. O perfil metabólico do plasma refletiu seu papel de transporte dos diversos intermediários metabólicos entre os tecidos, mostrando ajustes bioquímicos frente às mudanças na composição das dietas. Concluímos que as enzimas digestivas de tambaqui são induzidas pela taxa CHO/L da dieta; que o aumento da taxa

CHO/L da dieta diminuiu o crescimento dos peixes; e que aumentou a lipólise hepática, e a glicogênese, lipólise e a neoglicogênese musculares. A preferência metabólica para manutenção dos processos de produção de energia foi lipolítica, nas condições ensaiadas, sugerindo que, nesta espécie, os lipídios são mais eficientemente usados para estocar energia que os carboidratos. A dieta III privou o peixe de recurso energético, resultando em utilização da proteína para este fim e o tambaqui poupou proteína para o crescimento quando alimentado com a dieta II.

Palavras-chave: nutrição de peixes, digestão, metabolismo, crescimento.

ABSTRACT

Increase of dietary lipid and carbohydrate with concomitant reduction of protein level is a promising prospect to supply the fish energetic demand and to spare dietary protein to the growth. Study of digestive enzymes secretions combined with growth parameters and metabolism can help solve many nutritional problems in the aquaculture. The aim of this work was investigating growth, digestive efficiency and metabolic responses of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed with 3 carbohydrate/lipid ratios (CHO/L): 30,5/13,7% (diet I); 40,5/9,1% (diet II); 50,0/4,8% (diet III). The diets were isoenergetic and isoproteic. The experiment was carried out in the facilities of the Adaptive Biochemistry Laboratory, Genetics and Evolution Department at Federal University of São Carlos. The following parameters were assayed: fish growth, digestive enzymes (unspecific proteases, trypsin, chymotrypsin, unspecific lipase, amylase and alkaline phosphatase), metabolites (glucose, lactate, pyruvate, ammonia, protein, fat acids, triglycerides, amino acids and glycogen), and the enzymes LDH, MDH and GDH. Fish fed with the diet II presented the highest values of weight gain, length gain, relative food-intake ratio, and condition factor. However, fish fed with diet III depicted the worst performance and the lowest HIS when compared to fish fed with other diets. Tambaqui digestive enzymes were responsive to dietary carbohydrate/ lipid ratios. Fish from diet III showed significantly reduction of alkaline phosphatase activity and T/C ratio; moreover showed increased of lipase activity (in all gastrointestinal tract) and amylase activity (stomach and anterior intestine). In relation to metabolism, it was detected lipolysis in livers in accordance with the increase of the dietary CHO/L ratio. Muscular glycogenesis, lipolysis and gluconeogenesis from amino acids to energetic supply were observed in fish fed with higher dietary CHO/L ratio. The plasma metabolic profile reflected the blood metabolite delivery function among tissues underlining biochemical adaptations due to alterations in the fish feeding. In conclusion, dietary carbohydrate to lipid ratios induced digestive enzymes of tambaqui. The increase of CHO/L ratio resulted in fish growth decrease, augmented the liver lipolysis, increase the muscular gluconeogenesis, lipolysis and the gluconeogenesis. The fish metabolism seemed to be predominantly lipolytic suggesting that, in this species, lipids are more efficiently used to energy storage than carbohydrates. Diet III deprived the fish of energy resource resulting in

protein utilization for this purpose. Tambaqui spared protein to growth utilizing mainly carbohydrate and lipid when fed with diet II.

Keywords: fish nutrition, digestion, metabolism, growth.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Exemplar de juvenil de tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	30
FIGURA 2: Desempenho produtivo em % de tambaquis alimentados com diferentes taxas carboidrato/lipídio.....	43
FIGURA 3: Índice hepato-somático (IHS) de tambaquis alimentados com diferentes taxas carboidrato/lipídio.....	44
FIGURA 4: Atividades de protease ácida inespecífica, amilase e lipase do estômago de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.....	45
FIGURA 5: Atividades de protease inespecífica, tripsina, quimiotripsina, amilase e lipase de cecos pilóricos de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.....	46
FIGURA 6: Atividades de tripsina, quimiotripsina, amilase e lipase do intestino anterior de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.....	46
FIGURA 7: Atividade específica da fosfatase alcalina do intestino posterior de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.....	47
FIGURA 8: Taxa tripsina:quimiotripsina (T/Q) de cecos pilóricos de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.....	48
FIGURA 9: Perfil glicídico, protéico e lipídico do fígado de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.....	50
FIGURA 10: Perfil glicídico, protéico e lipídico do músculo branco de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.....	53
FIGURA 11: Perfil glicídico, protéico e lipídico do plasma de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Composição das dietas experimentais.....	34
TABELA 2: Atividades específicas das enzimas digestivas nas porções do trato gastrintestinal de tambaqui (<i>C. macropomum</i>) alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.	47
TABELA 3: Média \pm erro padrão da média dos intermediários metabólicos e enzimas, analisados no fígado de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.	51
TABELA 4: Média \pm erro padrão da média dos intermediários metabólicos e enzimas, analisados no músculo branco de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.	54
TABELA 5: Média \pm erro padrão da média dos intermediários metabólicos analisados no plasma de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Considerações gerais.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Nutrição de peixes	3
2.1.1	Proteína.....	4
2.1.2	Lipídio	5
2.1.3	Carboidrato	6
2.2	Efeito Pougador de Proteína.....	7
2.3	Digestão.....	8
2.4	Trato Gastrintestinal.....	10
2.4.1	Estômago	10
2.4.2	Cecos Pilóricos.....	10
2.4.3	Pâncreas e Fígado ou Hepatopâncreas	11
2.4.4	Intestino	11
2.5	Enzimas Digestivas.....	12
2.5.1	Digestão de proteínas: Proteases.....	13
2.5.2	Digestão de carboidratos: amilohidrolases	15
2.5.3	Digestão de lipídio: lipases	16
2.6	Absorção	17
2.7	Metabolismo	17
2.7.1	Metabolismo protéico.....	19
2.7.2	Metabolismo de carboidrato	20
2.7.3	Metabolismo de lipídios	22
2.8	<i>Colossoma macropomum</i> : aspectos gerais e importância da espécie.....	23
2.8.1	Nutrição de tambaqui	26
3	JUSTIFICATIVA	29
4	OBJETIVOS.....	31
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1	Material biológico e manejo.....	33
5.2	Desenho Experimental	33
5.3	Condições Ambientais	34

5.4	Variáveis de desempenho.....	35
5.5	Índice Hepato-somático (IHS).....	35
5.6	Preparação dos homogeneizados celulares: extratos enzimáticos.....	35
5.7	Determinações enzimáticas	36
5.7.1	Enzimas digestivas	36
5.7.1.1	Protease Inespecífica	36
5.7.1.2	Tripsina.....	36
5.7.1.3	Quimiotripsina	37
5.7.1.4	Lipase	37
5.7.1.5	Amilase.....	37
5.7.1.6	Fosfatase alcalina (FALC).....	37
5.7.2	Enzimas do Metabolismo	38
5.7.2.1	Desidrogenases.....	38
5.8	Intermediários metabólicos	39
5.8.1	Preparação dos extratos ácidos	39
5.8.2	Preparação dos extratos alcalinos.....	39
5.8.3	Preparação dos extratos neutros.....	39
5.9	Determinação dos intermediários metabólicos.....	39
5.9.1	Glicose	39
5.9.2	Glicogênio.....	40
5.9.3	Lactato	40
5.9.4	Piruvato.....	40
5.9.5	Aminoácidos livres (AAL)	41
5.9.6	Proteínas solúveis.....	41
5.9.7	Amônia	41
5.9.8	Triacilgliceróis	41
5.9.9	Ácidos graxos livres	42
5.10	Análise estatística	42
6	RESULTADOS	43
6.1	Desempenho Produtivo	43
6.2	Índice Hepato-Somático.....	44
6.3	Enzimas Digestivas.....	44
6.3.1	Estômago	44
6.3.2	Cecos Pilóricos.....	45

6.3.3	Intestino Anterior	46
6.3.4	Intestino Posterior	47
6.4	Taxa Tripsina/ Quimiotripsina (T/Q).....	48
6.5	Metabolismo Intermediário	48
6.5.1	Fígado	48
6.5.2	Músculo Branco	51
6.5.3	Plasma.....	54
7	DISCUSSÃO.....	57
7.1	Desempenho Produtivo	57
7.2	Enzimas Digestivas.....	60
7.2.1	Proteases	61
7.2.2	Lipase	63
7.2.3	Amilase	64
7.2.4	Intestino Posterior	65
7.3	Tripsina, quimiotripsina e T/Q <i>versus</i> crescimento	66
7.4	Absorção	69
7.5	Metabolismo	71
7.5.1	Metabolismo protéico.....	71
7.5.2	Metabolismo lipídico.....	73
7.5.3	Metabolismo glicídico	74
7.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
7.6.1	Dieta I: 30,5% de CHO e 13,7% de L (CHO/L=2,22)	76
7.6.2	Dieta II: 40,5% de CHO e 9,1% de L (CHO/L=4,45).....	77
7.6.3	Dieta III: 50% de CHO e 4,8% de L (taxa CHO/L=10,41)	77
8	CONCLUSÕES	78
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A demanda mundial por alimentos de origem aquática está crescendo devido à preferência por alimentos mais saudáveis, além do aumento da população. Neste contexto, peixes são conhecidos por serem excelentes fontes de proteína e, além disso, a sua gordura tem recebido muita atenção por causa do seu alto teor em ácidos graxos poli-insaturados n-3 (LIE, 2001). Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2003), o cultivo de organismos aquáticos em condições controladas é uma das atividades mais importantes para o futuro imediato na produção de alimento.

A aquicultura mundial domina todos os setores de produção de alimento de origem animal, apresentando uma taxa de crescimento médio anual de 6,9%, ultrapassando a pesca por captura, e com o aumento do consumo *per capita* de 0,7kg em 1970 para 7,8kg em 2006. A partir de uma produção de menos de um milhão de toneladas por ano no começo dos anos 50, a aquicultura cresceu dramaticamente, alcançando uma produção 51,7 milhões de toneladas com um valor de 78,8 bilhões de dólares e foi responsável por 47% da oferta mundial de alimentos em 2006. A contribuição média da aquicultura para o consumo humano *per capita* de peixe aumentou de 14% em 1986, para 30% em 1996 e para 47% em 2006, e espera-se alcançar 50% nos próximos anos (FAO, 2009).

No Brasil este cenário não é diferente. É um país que possui imenso potencial para a piscicultura, tanto pela sua condição edafoclimática quanto pelo elevado número de propriedades rurais que possuem área inundada (VIDAL JR et al., 2004). A produção brasileira de pescado aumentou 25% nos últimos oito anos passando de 990.899 toneladas anuais para 1.240.813 no ano passado. Somente nos últimos dois anos, houve um crescimento de 15,7%, conforme os dados estatísticos de 2008 e 2009, sendo que a aquicultura apresentou uma elevação 43,8%, passando de 289.050 toneladas/ano para 415.649 toneladas/ano. A produção da pesca extrativa, tanto marítima quanto continental (rios, lagos, etc) passou no mesmo período de 783.176 toneladas para 825.164 toneladas/ano no mesmo período, um aumento em torno de 5,4% (BRASIL, 2010). A aquicultura teve um papel de destaque no crescimento da produção de pescado no país. Somente a piscicultura teve uma elevação de 60,2% em 2008 e 2009, na comparação com 2007. A criação de tilápia chegou a 132 mil toneladas/ano sendo o carro chefe da produção aquícola e representa 39% do total de pescado cultivado. Outra espécie que também apresentou um crescimento significativo de produção foi o tambaqui, que passou de 30.598 toneladas para 46.454 toneladas/ano. O Nordeste, de

acordo com os dados de 2009, é a maior região produtora de pescado do Brasil, seguida da região Sul. A região Norte está em terceiro lugar, a Sudeste em quarto e, por último, Centro-oeste (BRASIL, 2010).

Várias espécies tropicais de peixes Teleostei de água doce são criadas em confinamento, tanto para manutenção da biodiversidade, por meio de programas de repovoamento, quanto para criação comercial. Contudo, por falta de maior entendimento sobre suas necessidades nutricionais, essas espécies ainda recebem arraçoamento de maneira imprópria (SEIXAS FILHO et al., 2000; ARBELÁEZ-ROJAS; FRACALOSSO; FIM, 2002). Segundo Krajnovic-Ozretic et al. (1994) as dietas para peixes de água doce, na sua essência, foram empiricamente adaptadas daquelas formuladas em função das exigências nutricionais dos peixes marinhos e podem induzir sérias modificações e alterações metabólicas que geralmente resultam em acúmulo de lipídios no fígado e na cavidade abdominal, mesmo que satisfaçam as necessidades de crescimento. Dentro deste contexto, a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias que irão viabilizar o cultivo de espécies nativas gerou um aumento na produção da pesquisa brasileira, principalmente no que diz respeito a estudos sobre a alimentação e nutrição, já que os gastos com o alimento podem atingir até 60% do custo total da produção (KRAJNOVIC-OZRETIC; NAJDEK; OZRETIC, 1994; ABIMORAD; CARNEIRO, 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nutrição de peixes

Segundo Carter e Houlihan (2001), nutrição de peixes é um ramo da fisiologia que se destina ao estabelecimento da relação entre ração e crescimento, à comparação entre possíveis ingredientes alimentares e à determinação das exigências nutricionais das espécies. Além disso, tem-se dado bastante ênfase à avaliação adequada do significado das respostas obtidas, pois a nutrição fornece matérias primas para a manutenção da vida.

Até a metade do século XX os estudos em nutrição de peixes abordavam, principalmente, a anatomia do trato digestivo e os aspectos fisiológicos dos animais em seu ambiente natural. Com o início da criação de peixes em sistemas de cultivo, apareceu a necessidade de estudos sobre suas exigências nutricionais (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001). A determinação das necessidades qualitativas e quantitativas dos nutrientes essenciais na dieta é de fundamental importância para a adequada formulação de rações para peixes (PEZZATO et al., 2004). Dessa forma, a rápida expansão da aquicultura depende fundamentalmente de sistemas que utilizam dietas balanceadas e de boa qualidade, a fim de permitir um aumento na produtividade de espécies com valor econômico, com menor impacto ambiental possível (CHO; BUREAU, 2001; CRAIG; HELFRICH, 2002). Entretanto, a diferença entre os hábitos alimentares das várias espécies de peixes cultivados dificulta a elaboração de dietas específicas, que atendam as exigências nutricionais nas diferentes fases de cultivo (ABIMORAD, 2004).

A dieta deve conter os nutrientes e recursos energéticos essenciais ao crescimento, reprodução e saúde e, seu valor nutricional é avaliado, em primeira instância, pela presença dos elementos necessários e catalíticos (minerais e vitaminas), um abundante suprimento em alimentos auxiliares (água) e um balanço adequado entre alimentos energéticos e construtores (carboidratos, lipídios e proteínas). A oxidação metabólica de carboidratos, lipídios e proteínas liberam das ligações químicas, quantidades variáveis de energia que são utilizadas na manutenção do metabolismo basal antes de se tornarem disponíveis para o crescimento (WEATHERLEY; GILL, 1987). Por isso, o balanceamento adequado da dieta é muito importante já que 1) uma deficiência em energia poderá levar à utilização de proteínas como recurso energético e, 2) o excesso poderá restringir o consumo de alimento, impedindo a ingestão de quantidades necessárias de proteínas e outros nutrientes, além de reduzir o crescimento devido à alta demanda metabólica da excreção nitrogenada

(WINFREE; STICKNEY, 1981). Nos peixes, taxas excessivamente altas de energia/nutriente podem ainda acarretar a deposição de grandes quantidades de gordura corporal, causando a redução na qualidade da carne (LOVELL, 1988; N.R.C, 1993). Portanto, o balanço entre proteína e energia é, obviamente, o ponto central para o máximo crescimento (CARTER; HOULIHAN, 2001) e a taxa proteína/energia deve ser determinada separadamente para cada espécie para o desenvolvimento de uma dieta ótima (CRAIG; FRIEDCH, 2002).

2.1.1 Proteína

Segundo Weatherley e Gill, (1987) as proteínas são consideradas pilares da construção celular, e os diferentes tipos de proteínas das dietas variam muito em seu valor nutricional para o crescimento na dependência de sua composição em aminoácidos. As proteínas de maior valor nutricional apresentam um conteúdo maior de aminoácidos essenciais, por exemplo, proteínas animais como a farinha de peixe, possuem valores nutricionais mais elevados que as proteínas vegetais, porque satisfazem melhor a demanda de aminoácidos. A farinha de peixe tem, portanto, grande demanda resultando em custo crescente e oferta decrescente. Estes fatos contribuíram para os preços mais altos de alimentos para peixes, desde que farinha de peixe é utilizada na maior parte das formulações de rações.

A proteína consumida pelo peixe é utilizada por duas rotas metabólicas, (1) *catabolismo* com excreção principalmente de amônia, produzindo energia para manutenção e (2) *anabolismo*, principalmente para a síntese de proteínas do corpo, função na qual a sua composição em aminoácidos desempenha um papel crucial (HEPHER, 1989). Segundo Carter et al. (2001), a quantidade de proteína sintetizada depende não somente da quantidade de proteína absorvida, mas também do seu balanço em aminoácido e energia digestível. Os autores ainda ressaltam que somente uma proporção relativamente pequena das proteínas ingeridas em uma refeição é retida para o crescimento.

O aumento da excreção de amônia para o ambiente, devido ao catabolismo protéico, contribui para a deterioração da qualidade da água se o ambiente estiver em desequilíbrio e, esse problema é uma das maiores preocupações dos piscicultores em relação à qualidade de água dos tanques de cultivo (CRAIG; FRIECH, 2002). Por isso tanta atenção tem sido dada, por parte dos pesquisadores em nutrição de peixes, para a questão da redução do teor de proteína das dietas com concomitante maximização da utilização protéica para o crescimento (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009), através da inclusão cuidadosa de fontes de energia não-protéicas (carboidratos e lipídios).

2.1.2 Lipídio

Os lipídios são a principal reserva de energia para os animais (9,4 kcal/g de energia bruta) e seu papel principal é gerar energia metabólica na forma de ATP através da β -oxidação. Esse macronutriente é representado principalmente pelos triacilgliceróis (ésteres de ácido graxo e glicerol). Os lipídios da dieta exercem grandes funções, pois são fontes de energia e ácidos graxos essenciais necessários ao desenvolvimento adequado (CHOU; SU; CHEN, 2001), proporcionam maior palatabilidade ao alimento, servem como veículo para a absorção de vitaminas lipossolúveis e esteróis e, além disso, desempenham um importante papel na estrutura das membranas biológicas na forma de fosfolipídios e ésteres de esteróis (HEPHER et al., 1989; HERTRAMPF; PIEDAD-PASCUAL, 2000; WEIRICH; REIGH, 2001; JOHNSON; WATANABE; ELLIS, 2002). Para os peixes, os lipídios não são apenas as maiores fontes de energia metabólica para o crescimento, do ovo até o animal adulto, mas também a maior fonte de energia metabólica para a reprodução (HALVER; HARDY, 2002). Além disso, são considerados os nutrientes mais importantes ao lado das proteínas, pois desempenham um papel principal na utilização ótima das proteínas da dieta para fins de crescimento (MOHANTA et al., 2008).

Os triacilgliceróis são segregados em gotículas lipídicas que não aumentam a osmolaridade do citosol devido à sua hidrofobicidade e extrema insolubilidade em água e, diferentemente dos carboidratos, não contêm peso extra como água de solvatação. Essa relativa inércia química dos triacilgliceróis permite sua estocagem em grandes quantidades dentro das células sem o risco de ocorrerem reações químicas não desejadas com outros componentes celulares. Além disso, como os átomos de carbono dos ácidos graxos estão mais reduzidos que os dos açúcares, sua oxidação fornece mais que o dobro em energia, grama por grama, que a oxidação dos açúcares (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Os lipídios das dietas, principalmente na forma de triacilgliceróis, são hidrolisados por lípases inespecíficas em ácidos graxos livres e glicerol (DE SILVA; ANDERSON, 1995), que são absorvidos e usados para processos biossintéticos de vários componentes celulares, ou então, catabolizados para obtenção de energia. Geralmente são absorvidos pelo intestino superior e cecos pilóricos; parte como ácidos graxos e a grande maioria como mono e di-glicerídios (quilomícrons).

Apesar da sua importância nutricional, dietas com altos teores de lipídio podem influenciar o metabolismo animal e a composição da carcaça, com acúmulo indesejável de gordura corporal nos peixes (RIBEIRO et al., 2008). Além disso, altos teores de lipídio podem criar problemas associados com a peletização e desenvolvimento de rancidez da ração

quando armazenada (JAUNCEY, 1982¹ citado por ERFANULLAH; JAFRI, 1998). No Brasil, a produção de rações extrusadas com conteúdo de lipídios acima de 4%, esbarra em dois problemas: 1) limitações de ordem técnica das extrusoras e equipamentos acessórios, 2) baixo custo e grande disponibilidade das fontes de carboidratos (TOLEDO, 2004) para a confecção das dietas.

Devido à interação metabólica entre proteínas, lipídios e carboidratos, a definição da exata exigência em lipídios na dieta não é considerada particularmente importante (HALVER; HARDY, 2002). Entretanto, é amplamente sabido que quantidades de lipídios variando entre 10 e 20% do peso seco da dieta sejam suficientes para atender a demanda energética e permitir o direcionamento eficiente da fração protéica para o crescimento, sem que haja excessiva deposição de gordura na carcaça (COWEY; SARGENT, 1979). Apesar disto, a quantidade precisa de lipídio depende do nível de proteína da dieta e, em alguns casos, também do nível de carboidrato (WATANABE, 1982), porém tais estudos ainda são escassos.

2.1.3 Carboidrato

Os carboidratos desempenham importantes funções biológicas, como por exemplo, o fornecimento de energia aos tecidos na forma de glicose, precursor metabólico de ácidos nucléicos e integrante de mucopolissacarídeos. Alguns carboidratos exibem propriedades aglutinantes, relevantes na produção das dietas. Embora os carboidratos constituam um dos três principais componentes das dietas de peixes, sendo utilizados como fontes de energia para o crescimento do animal, as funções biológicas e a metabolização deste nutriente em peixes ainda não são totalmente compreendidas (PERAGÓN et al., 1999). Admite-se que os peixes não tenham exigência dietética para carboidratos por serem capazes de sintetizá-los a partir de substratos protéicos e glicerol (TACON, 1989). Entretanto, a falta deste nutriente na dieta pode deprimir o crescimento (NRC, 1993; WILSON, 1994), enquanto o excesso pode afetar negativamente os parâmetros morfológicos e fisiológicos, causando níveis glicêmicos altos e constantes e, conseqüentemente, prejudicando a função hepática por causa do aumento da deposição de glicogênio (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002).

¹ Jauncey, K. 1982. Carp (*Cyprinus carpio*) nutrition-a review. Pages 215–263 in J. E Muir and R. J. Roberts, editors. *Recent advances in aqua-culture*. Croom Helm, London, England.

Os carboidratos absorvidos podem ser usados imediatamente como energia, estocados como glicogênio no fígado e músculo, sintetizados em compostos como triacilgliceróis e em esqueletos carbônicos de aminoácidos não essenciais, entre outros (LOVELL, 1988). Eles são o principal recurso de energia para os mamíferos, mas não são usados eficientemente pelos peixes. Por exemplo, mamíferos podem extrair cerca de 4 kcal de energia a partir de 1g de carboidrato, enquanto os peixes podem extrair somente cerca de 1,6 kcal a partir da mesma quantidade de carboidrato (CRAIG; FRIEDCH, 2002). Embora os peixes não usem o carboidrato tão eficientemente quanto os mamíferos e as aves, seu valor nutricional depende da espécie e tem sido associado a fatores tais como o teor na dieta, origem, complexidade molecular e estado físico (WILSON, 1994; STONE; ALLAN; ANDERSON, 2003; KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005). Entretanto, diferenças metabólicas na utilização de carboidrato entre as espécies ainda são pouco conhecidas (SÁ; POUSÃO-FERREIRA; OLIVA-TELES, 2007). Se os carboidratos não são fornecidos na dieta, outros nutrientes tais como proteína e/ou lipídio devem ser catabolizados para satisfazer a demanda energética corporal e também para gerar intermediários metabólicos para a síntese de outros compostos importantes para o crescimento e proliferação celular. Quando adicionados na dieta, eles podem substituir os aminoácidos utilizados para neoglicogênese, favorecendo a geração de energia ao mesmo tempo em que poupa proteína (BARROSO et al., 2001). Sabe-se que ingredientes ricos em carboidratos são excelentes recursos poupadores de proteína, especialmente em espécies onívoras (SATPATHY; MUKHERJEE; RAY, 2003). Em geral, assume-se que o teor de carboidrato digestível não deve ultrapassar 20% para espécies carnívoras, incluindo salmonídeos e peixes marinhos, enquanto para espécies herbívoras ou onívoras de água doce níveis com até 40% são recomendados (WILSON, 1994). Por ser um recurso de energia mais barato que o lipídio, é muito importante estabelecer a relação carboidrato/lipídio ideal a ser utilizada na dieta (CATACUTAN; COLOSO, 1997).

2.2 Efeito Poupador de Proteína

Os peixes são conhecidos por utilizar proteína preferencialmente ao carboidrato e lipídio como recurso de energia, entretanto, a proteína é o ingrediente mais caro em dietas formuladas. Em vista disso, nutricionistas de peixes buscam alcançar o “efeito poupador de proteína” que, nada mais é do que a maximização do direcionamento da fração protéica da dieta para o crescimento e não para o atendimento da demanda energética; reduzindo assim o conteúdo de proteína da dieta sem perda de potencial de crescimento. Além disso, a adequação da proteína dietária ao nível mínimo exigido pode resultar em redução dos compostos

nitrogenados para o ambiente, além de maior produção por unidade de fontes protéicas resultando na economia dos recursos disponíveis (HILLESTAD; JOHNSEN; ÅSGÅRD, 2001; WU et al., 2007). A estratégia nutricional básica para alcançar tal efeito é aumentar adequadamente as quantidades de lipídio e carboidrato nas dietas para reduzir a inclusão de proteínas sem comprometer o crescimento e a eficiência alimentar dos peixes (NYINA-WAMWIZA et al., 2005).

A capacidade de poupar proteína varia entre as espécies, tanto no que diz respeito à quantidade de proteína poupada, quanto ao recurso energético utilizado para poupar (DE SILVA et al., 2002). Além disso, estudos mostram que o balanço entre o carboidrato e o lipídio da dieta afeta a poupação de proteína (NYINA-WAMWIZA et al., 2005). Em termos de utilização alimentar, efeito poupador de proteína e estimulação do crescimento, as espécies onívoras ou herbívoras geralmente toleram maiores níveis de carboidratos, usando-o com maior eficiência como fonte de energia que as espécies carnívoras (WILSON, 1994). Por outro lado, peixes carnívoros utilizam os lipídios muito melhor que carboidratos devido à baixa atividade específica de enzimas para digeri-lo e à deficiências metabólicas (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHK, 2002; KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005).

No Brasil, muitos estudos visam otimizar as condições de cultivo das espécies e aperfeiçoar o desempenho produtivo dos peixes com a mínima utilização necessária de proteína na dieta (FERNANDES; CARNEIRO; SAKOMURA, 2000; FERNANDES; CARNEIRO; SAKOMURA, 2001; IZEL et al., 2004; ABIMORAD; CARNEIRO, 2007). Porém, só nos últimos anos é que estão sendo apresentados dados que correlacionam efeito poupador de proteína e composição da dieta versus adaptação das enzimas digestivas e metabolismo (MORAES; BIDINOTTO, 2000; LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; MELO et al., 2006; CORRÊA et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2010). Estas abordagens vêm apresentando respostas satisfatórias e estão sendo usadas como ferramentas para otimizar a composição dos nutrientes das dietas e desvendar a estratégia alimentar das diferentes espécies de peixes.

2.3 Digestão

Após a ingestão, a digestão e a absorção pelo sistema digestório são os primeiros passos no aproveitamento de nutrientes pelos animais. Como os alimentos ingeridos são constituídos, em grande parte, por moléculas de alto peso molecular, os nutrientes não podem ser absorvidos diretamente pela mucosa gastrintestinal, sendo necessária sua decomposição em moléculas de baixo peso molecular que podem ser absorvidas. Esse

processo é catalisado por enzimas digestivas secretadas pelo pâncreas ou hepatopâncreas para a luz do tubo digestório (JOBILING, 1994; DE SILVA; ANDERSON, 1995). As proteínas são hidrolisadas em aminoácidos livres ou cadeias polipeptídicas curtas; os carboidratos são hidrolisados em açúcares simples; e os lipídios em ácidos graxos e glicerol.

O potencial de assimilação dos nutrientes da dieta é determinado pelas características do trato digestório de cada espécie. A habilidade fundamental dos peixes em processar o alimento depende também de características específicas como o perfil enzimático do trato digestório (FAGBENRO et al., 2000) e das características adaptativas destas enzimas (MORAES; BIDINOTTO, 2000; LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; MELO et al., 2006; CAMILO, 2007; CORRÊA et al., 2007; HONORATO, 2008; DE ALMEIDA et al., 2010). Além disso, a eficiência de absorção do alimento e a conversão alimentar também podem depender da capacidade de transporte trans-epitelial no trato digestivo (JOBILING, 1995). Portanto, para o melhor entendimento da estratégia de digestão de uma espécie, é necessário o conhecimento claro sobre a dieta, o hábito alimentar, o nicho ecológico e a fisiologia da digestão.

A eficiência global do processo de digestão é determinada pelo conjunto das características deste processo (secreções enzimáticas, tempo de trânsito e absorção) e depende da regulação da inter-relação destes 3 fatores, principalmente dos mecanismos de absorção. O período de adaptação despendido nesses ajustes de regulação é na maioria dos casos da ordem de um dia. O balanço digestivo final quase sempre permanece inalterado, mostrando a existência de um equilíbrio entre ingestão, secreção enzimática (digestão propriamente dita), tempo de trânsito e absorção. Entretanto, estudos relacionados à interação destes fatores ainda são escassos (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001).

Sabe-se que a capacidade para o crescimento é limitada pela digestão e transporte de nutrientes da dieta. Considerando a digestão, a eficiência da absorção e conversão dos nutrientes alimento podem limitar potencialmente o crescimento dos peixes (WEATHERLEY; GILL, 1987) e, desde que estes fatores (eficiência de absorção e conversão do alimento) dependem da disponibilidade de enzimas digestivas e da capacidade para o transporte trans-epitelial dos nutrientes no trato digestivo (JOBILING, 1995; LEMIEUX; BLIER; DUTIL, 1999), é necessário um melhor entendimento acerca dos mecanismos básicos de digestão e utilização de nutrientes para alcançar o balanço nutricional adequado da dieta (SUNDE, 2006). Neste sentido, a taxa máxima de crescimento do peixe deve ser parcialmente definida pela capacidade digestiva, disponibilidade de oxigênio ou capacidade necessária para manter a síntese de proteína nos tecidos (BLIER, 2002). É provável que diferenças em relação

ao desempenho produtivo (crescimento) entre as espécies se devam às diferenças nas características de seus trato digestórios e à eficiência com que o alimento ingerido é digerido e absorvido (WEATHERLEY; GILL, 1987). Portanto, a otimização dos níveis de nutrientes fornecidos, está relacionada ao aproveitamento adequado dos mesmos, ou seja, se está havendo digestão e absorção adequadas.

2.4 Trato Gastrintestinal

Os órgãos envolvidos na alimentação e no processo digestivo dos peixes apresentam variações em consequência da ampla diversidade de alimentos consumidos, os quais podem diferir muito em suas propriedades físico-químicas e na composição (JOBILING, 1995).

2.4.1 Estômago

O estômago possui pH entre 2 e 3 permitindo assim a desnaturação de proteínas e o começo da hidrólise, além de provocar a morte de bactérias (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001). Além de células mucosas, glândulas gástricas com células fúndicas secretam HCl e pepsinogênio, que é o zimogênio da pepsina, uma protease ácida (GARRIDO; OLLER; EQUISOAIN, 1996). O aumento na produção e secreção deste ácido pode ocorrer tanto pelo estímulo de mecanorreceptores (distensão gástrica) como de quimiorreceptores (peptídeos, aminoácidos) na parede do estômago (LOVELL, 1988; JOBILING, 1995). A forma inativa da pepsina, o pepsinogênio, é ativada quando entra em contato com o suco gástrico (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001). Outras enzimas além de pepsinas, como amilases, lipases e quitinases têm sido detectadas no estômago de várias espécies de peixes, mas sua eficácia continua sendo pouco investigada (SABAPATHY; TEO, 1993; CHAKRABARTI et al., 1995; LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; CAMILO, 2007; CORRÊA et al., 2007). Em peixes agástricos, onde não há produção de HCl nem atividade proteásica ácida, o papel da pepsina é realizado pelas proteases alcalinas presentes no intestino (DE SILVA; ANDERSON, 1995).

2.4.2 Cecos Pilóricos

Somente nos peixes com estômago, o intestino proximal possui um divertículo de fundo cego chamado ceco. O número de cecos pode variar de zero até milhares e estudos histológicos não revelam nenhuma diferença marcante entre o intestino verdadeiro e os cecos. Por isso, pode ser considerado como uma extensão da área superficial do intestino possuindo, desse modo, função absorptiva (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001). Além disto, também

apresentam a função relacionada à digestão enzimática (possuem endo e exopeptidases de origem pancreática) (COWEY, 1988). Como os cecos pilóricos são embriologicamente equivalentes ao pâncreas exócrino, podem ter um papel fisiológico semelhante em alguns casos, podendo suprir parcialmente no que diz respeito à secreção enzimática no caso de peixes que não apresentam pâncreas (CHESLEY, 1934). Logo, essa estrutura é de grande relevância no processo digestivo dos peixes, já que pode produzir um grande número de enzimas como tripsina, quimiotripsina, carboxi-peptidases (proteolíticas), amilases, lipases e quitinases (DE SILVA; ANDERSON, 1995).

2.4.3 Pâncreas e Fígado ou Hepatopâncreas

O fígado de peixes apresenta funções similares às dos vertebrados superiores; é sempre bem desenvolvido, com abundante secreção de bile e anatomia diversa de acordo com o táxon (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001). Este órgão secreta emulsificadores que são carregados pela bile até o intestino e auxiliam na digestão de lipídios (WEATHERLEY; GILL, 1987).

O pâncreas em condríctes e alguns poucos osteíctes (enguia, bagre do canal, peixes pulmonados e celacantos) forma um órgão compacto como em vertebrados superiores. A grande maioria restante apresenta o pâncreas como tecido difuso e geralmente localizado ao longo da veia porta. Esse pâncreas difuso é composto por ilhotas ou pequenas glândulas que podem penetrar órgãos vizinhos e formar um “hepatopâncreas” (como encontrado na carpa comum, *Cyprinus carpio*). As secreções pancreáticas incluem o bicarbonato, cuja função é neutralizar o quimo ácido, e zimogênios, cujas enzimas digerem proteínas, polissacarídeos, lipídios, quitina e nucleotídeos (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001). As secreções enzimáticas extravasam pelo duto biliar para a luz do intestino (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001). O tecido pancreático secreta a maior variedade e quantidade de enzimas no aparelho digestório (LOVELL, 1988).

2.4.4 Intestino

As funções do intestino são completar a digestão iniciada no estômago e cecos pilóricos e absorver os nutrientes, água e eletrólitos para disponibilizá-los ao metabolismo. Para isso, este órgão contém microvilosidades que aumentam a área superficial para a absorção, permitindo maior contato entre células e nutrientes do lúmen. As micro vilosidades são estruturas típicas de tecidos absorptivos e constituem o local onde ocorre a maior parte da digestão enzimática dos alimentos (LOVELL, 1988).

O pH intestinal varia entre 7 e 8. Quando o quimo ácido vindo do estômago entra no intestino, estimula a produção de secretina que alcança o tecido pancreático pela corrente sanguínea e estimula a produção da bile pelos hepatócitos e a secreção de bicarbonato no intestino, provocando um aumento no pH até próximo de 7,0. A liberação de colecistoquinina (CCK) é estimulada pela presença de aminoácidos e lipídios no intestino. Ela então estimula a secreção de várias enzimas pancreáticas que são ativas em pHs entre 7 e 8 e promove a liberação da bile dentro do intestino (LOVELL, 1988; JOBLING, 1995).

Sabe-se que o comprimento do intestino apresenta estreitas relações com as características dos alimentos utilizados pelos peixes. Espécies herbívoras geralmente apresentam intestinos mais longos quando comparadas com as carnívoras, possibilitando o consumo de alimentos de difícil digestão (KAPOOR; SMIT; VERGHINA, 1975; FERRARIS; AHEARN, 1984).

2.5 Enzimas Digestivas

Enzimas digestivas vêm sendo investigadas há muito tempo como uma maneira de entender a exigência nutricional dos peixes (DIVAKARAN; KIM; OSTROWSKI, 1999). A habilidade de um organismo para digerir partículas de alimento depende tanto da presença quanto da quantidade apropriada de enzimas digestivas (SMITH, 1989). Geralmente, a distribuição e a intensidade de atividade dessas enzimas variam em função do hábito alimentar e da morfologia digestiva da espécie (FAGBENRO et al., 2000). A distribuição das enzimas digestivas está descrita para várias espécies, dentre elas dourada *Sparus aurata* (DEGUARA; JAUNCEY; AGIUS, 2003), pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004), tambaqui *Colossoma macropomum* (KOHILA et al., 1992; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; CORRÊA et al., 2007), bagre *Rhamdia quelen* (MELO et al., 2006), matrinxã *Brycon amazonicus* (VIEIRA; INOUE; MORAES, 2005; CAMILO, 2007), pacu *Piaractus mesopotamicus* (MORAES; BIDINOTTO, 2000; HONORATO, 2008).

Os processos digestivos em peixes são menos conhecidos que em mamíferos, embora os dados mostrem que as enzimas digestivas estudadas são qualitativamente similares às observadas em outros vertebrados (HIDALGO; UREA; SANZ, 1999). A secreção destas enzimas em peixes também é similar à que ocorre nos vertebrados superiores. Gastrina, colecistoquinina e outros hormônios atuam na secreção de zimogênios e bile seguindo um padrão pós-prandial e existe evidente adaptação das enzimas às condições de pH no estômago e duodeno. A temperatura ótima de atividade de quase todas as enzimas varia entre 30 e 40°C.

Entretanto, peixes de água fria apresentam enzimas particularmente ativas em baixas temperaturas (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001). Geralmente, a distribuição e a atividade delas variam com o hábito alimentar e a morfologia do intestino (HOFER; SCHIEMER, 1981; SABAPATHY; TEO, 1993; TENGJAROENKUL et al., 2000). Mesmo assim, espécies com hábitos alimentares iguais apresentam diferenças na habilidade de digerir o alimento trazendo implicações para a formulação de dietas práticas (DIVAKARAN; KIM; OSTROWSKI, 1999). Além disso, a capacidade digestiva dos peixes depende, além do nível de enzimas digestivas, do tempo em que os nutrientes permanecem sujeitos à ação destas (FOUNTOULAKI et al., 2005).

Os peixes possuem a capacidade de modular seu perfil digestivo diante de diferentes fontes (EL-SAYED; NMARTÍNEZ; MOYANO, 2000; GARCÍA-CARREÑO et al., 2002), qualidades (CHIU; PAN, 2002; EUSEBIO; COLOSO, 2002) e quantidades (MORAES; BIDINOTTO, 2000; LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; MELO et al., 2006; CAMILO, 2007; CORRÊA et al., 2007; DEBNATH et al., 2007; HONORATO, 2008) de nutrientes na dieta, sendo esta uma característica adaptativa favorável às atividades de cultivo (MORAES; BIDINOTTO, 2000). Entretanto, esta habilidade parece variar entre as espécies. Os carnívoros parecem ter uma capacidade limitada de alterar sua função digestiva e de transporte de nutrientes quando comparados aos onívoros (BUDDINGTON; KROGDHAL; BAKKE-MCKELLEP, 1997). Sendo assim, o padrão enzimático digestivo reflete, além de o hábito alimentar (herbivoria, onivoria ou carnivoria), a capacidade digestiva dos peixes. Desse modo, o estudo das enzimas digestivas é um passo crucial em direção ao entendimento do mecanismo de digestão e de como o organismo se adapta às mudanças nutricionais (SUNDE et al., 2004). Considerando-se o caráter indutivo das enzimas digestivas, a flexibilidade fenotípica das espécies pode permitir não só os ajustes necessários à otimização dos nutrientes da dieta, mas também explorar a capacidade adaptativa dos peixes frente a fontes alternativas de energia metabólica (MORAES et al., 2007; HONORATO, 2008). Entretanto, informações sobre peixes de clima tropical são escassas quando comparadas às dos peixes de regiões temperadas (MELO et al., 2006).

2.5.1 Digestão de proteínas: Proteases

A digestão das proteínas começa por ação hidrolítica da pepsina, tripsina e quimiotripsina (FANG; CHIOU, 1989). Essas enzimas são endopeptidases com ações muito específicas, pois atuam somente num ponto particular da molécula de proteína. Além delas, as

exopeptidases (carboxi-peptidases, aminopeptidases e tripeptidases) completam a digestão protéica.

A pepsina hidrolisa as proteínas nas ligações peptídicas do lado aminoterminal dos resíduos dos aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), rompendo as longas cadeias polipeptídicas em uma mistura de peptídeos menores (FANGE; GROVE, 1979). Esta enzima é responsável pela hidrólise inicial e parcial de proteínas no estômago, com a participação do ácido clorídrico secretado e este processo é completado pela ação combinada da tripsina e quimiotripsina no intestino (SABAPATHY; TEO, 1993).

A atividade da pepsina em algumas espécies parece pouco influenciada pelos níveis de proteína da dieta e, considerando que algumas espécies não apresentam estômago, sua presença é colocada como não determinante para a digestão protéica (ZAMBONINO INFANTE; CAHU, 2007). Todavia, essa concepção deve ser olhada com cautela visto que, em alguns peixes com estômago, a pepsina mostra um caráter indutivo frente a diferentes níveis de proteína e/ou lipídio e/ou carboidrato da dieta, o que sugere sua relevância nessas espécies (LUNDSTEDT, 2003; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; MELO et al., 2006; HONORATO, 2008). Além disso, proteases digestivas de diferentes espécies apresentam variações (RATHORE; KUMAR; CHAKRABARTI, 2005), que podem influenciar sua capacidade digestiva e seu hábito alimentar (KUMAR et al., 2007).

A digestão de proteína prossegue no intestino em um meio alcalino pela ação de serino-proteases, tripsina e quimiotripsina (pancreáticas ou hepatopancreáticas). A tripsina hidrolisa as ligações peptídicas cujos grupos carbonila pertencem aos resíduos de lisina ou arginina, enquanto a quimiotripsina hidrolisa ligações peptídicas cujos grupos carbonila provêm de fenilalanina, triptofano e tirosina (DE SILVA; ANDERSON, 1995), como também amidas e ésteres destes aminoácidos aromáticos (RICK, 1965). O tripsinogênio, forma inativa da tripsina, é liberado pelo pâncreas e ativado pela enteroquinase secretada pela mucosa intestinal ou pela própria forma ativa da enzima (auto-ativação). A secreção desta enzima no lúmen intestinal está relacionada à entrada do alimento nesta porção do trato (EINARSSON; DAVIES; TALBOT, 1996). Em relação à quimiotripsina, o quimiotripsinogênio é ativado quando entra em contato com a tripsina (LOVELL, 1988). Einarsson e Spencer Davies (1996) observaram que, tanto nos peixes como nos vertebrados superiores, o tripsinogênio e o quimiotripsinogênio estão contidos nos grânulos secretores das células acinares pancreáticas, sendo estimulados pelo hormônio colecistoquinina, causando secreção endócrina dessas pré-enzimas no intestino. Essas serino-proteases são ativas nos cecos pilóricos e intestino anterior (SANTIGOSA et al., 2008).

Quando comparamos as duas enzimas (tripsina e quimiotripsina) vemos que a quimiotripsina apresenta um espectro para atividade proteolítica muito maior (LUNDSTEDT, 2003). Porém, uma série de estudos tem focado no papel da tripsina como um indicador nutricional por ser considerada um enzima chave no processo da digestão (CARA et al., 2007), pois ativa sua própria forma precursora (tripsinogênio), assim como várias outras proteases, incluindo a quimiotripsina (SUNDE; TARANGER; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2001; SUNDE et al., 2004). A atividade específica da tripsina e a taxa de atividade tripsina/quimiotripsina (T/Q) são afetadas geneticamente e ambientalmente e são consideradas como parâmetros biológicos chave que afetam o processo digestivo e, conseqüentemente, o crescimento (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2006; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009). A taxa tripsina/quimiotripsina tem sido relacionada com o desempenho produtivo de algumas espécies (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2000; SUNDE; TARANGER; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2001; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2002; SUNDE et al., 2004; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2006; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN; FOSSEIDENGEN, 2007).

2.5.2 Digestão de carboidratos: amilohidrolases

Da mesma forma que as proteínas, a digestão dos carboidratos é realizada por uma variedade de enzimas. A amilase é considerada a principal amilohidrolase pela sua ampla presença e distribuição entre os organismos. É encontrada em todos os peixes, até mesmo em carnívoros marinhos que naturalmente nunca se alimentam de amido. Esta enzima, $\alpha 1 \rightarrow 4$ -glicosidase, hidrolisa ligações glicosil- $\alpha 1 \rightarrow 4$ -glicose em fragmentos lineares de amilopectina, fragmentos ramificados de amilose ou de glicogênio (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001). Ao contrário dos mamíferos, onde a amilase é produzida pelas células salivares e pancreáticas, a única fonte de α -amilase em peixes parece ser o pâncreas exócrino (KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005). O aumento na produção de amilase pancreática pode ocorrer em resposta à presença de carboidratos no lúmen do trato digestório ou dos produtos de sua hidrólise. A glicose pode influenciar diretamente a produção enzimática pelo tecido pancreático ou indiretamente, estimulando a liberação da insulina do pâncreas, que, por sua vez, aumenta a produção amilásica (JOBBLING, 1995). A digestão final dos carboidratos é realizada por oligossacaridasas associadas às microvilosidades do epitélio intestinal, como é o caso da maltase (TENGGJAROENKUL et al., 2000).

Junto com outras enzimas pancreáticas, a atividade da amilase é detectada dentro do lúmen intestinal, no quilo, bem como ligada à mucosa da membrana (UGOLEV;

KUZ'MINA, 1994). A α -amilase tem sido localizada em todo o trato gastrointestinal de muitas espécies de peixes (SABAPATHY; TEO, 1993; CHAKRABARTI et al., 1995; KUZ'MINA, 1996; PÉRES; ZAMBONINO INFANTE; CAHU, 1998; HIDALGO; UREA; SANZ, 1999; SEIXAS FILHO et al., 1999; FAGBENRO et al., 2000; MORAES; BIDINOTTO, 2000; TENGJAROENKUL et al., 2000; ALARCÓN; GARCÍA-CARREÑO; NAVARRETE DEL TORO, 2001; LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; MELO et al., 2006; CAMILO, 2007; CORRÊA et al., 2007; HONORATO, 2008).

Até ao presente, pouco se sabe sobre a regulação da atividade da amilase, sua secreção ou biossíntese em peixes (KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005). Sabe-se que a atividade amilásica de tecidos e do conteúdo intestinal varia entre as espécies e parece maior em peixes herbívoros e onívoros que em carnívoros (SABAPATHY; TEO, 1993; CHAKRABARTI et al., 1995; HIDALGO; UREA; SANZ, 1999; MORAES; BIDINOTTO, 2000). Além disso, a habilidade de adaptar a secreção da amilase para o nível de carboidrato da dieta e ingestão de alimento parece ser restrita aos peixes onívoros e herbívoros (KROGDAHL; HEMRE; MOMMSEN, 2005). Alguns autores afirmam que a produção da α -amilase é independente da dieta (HOFER, 1979; CHAN et al., 2004). Porém, outros estudos mostram que o aumento de amido da dieta resulta em aumento de sua atividade (KAWAI; IKEDA, 1972; REIMER, 1982; MORAES; BIDINOTTO, 2000; CORRÊA et al., 2007), revelando a capacidade de modulação desta enzima frente à composição da dieta em algumas espécies.

2.5.3 Digestão de lipídio: lipases

O lipídio das dietas, principalmente na forma de triacilgliceróis, é hidrolisado por lipases inespecíficas em ácidos graxos livres e glicerol (DE SILVA; ANDERSON, 1995), que são absorvidos e usados para processos biossintéticos de vários componentes celulares ou então catabolizados para obtenção de energia. A digestão dos lipídios ocorre no estômago, nos cecos e no intestino pela ação de uma variedade de lipases e colipases (SMITH, 1989). Vários tipos de lipase têm sido relatados no trato digestório de peixes juvenis e adultos (IZQUIERDO et al., 2000) e os padrões de distribuição de atividade lipolítica ao longo dos diversos segmentos do trato gastrointestinal de peixes, juvenis e adultos parecem divergir entre espécies (KOVEN; HENDERSON; SARGENT, 1994; CHAKRABARTI et al., 1995; LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; MELO et al., 2006; CAMILO, 2007; CORRÊA et al., 2007; HONORATO, 2008).

A lipase e a amilase são as únicas enzimas pancreáticas secretadas já na forma ativa, apesar de a lipase se tornar significativamente ativa em presença de uma molécula chamada colipase. A lipase age nos grânulos de lipídios que ficam suspensos na fase aquosa e é ajudada por sais biliares e pela colipase. A colipase auxilia no “ancoramento” da lipase na molécula de lipídio, pois possui afinidade por ambos. Depois do “ancoramento” a colipase descobre o sítio da lipase ativando completamente esta enzima (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001).

2.6 Absorção

Os estágios finais de digestão e absorção acontecem na região de borda em escova do intestino como resultado da atividade das enzimas digestivas (HAKIM; HARPAZ; UNI, 2009). A absorção é um passo crucial no processo digestivo e as atividades de enzimas da borda em escova podem ser indicadoras da intensidade de absorção de nutrientes nos enterócitos de peixes (HARPAZ; UNI, 1999; GAWLICKA et al., 2000). Dentre essas enzimas, a fosfatase alcalina intestinal está envolvida na absorção de nutrientes tais como lipídios, glicose, cálcio e fosfato inorgânico (FRAISSE et al., 1981; TENGJAROENKUL et al., 2000). As seções anterior e posterior do intestino estão envolvidas na função de absorção (DAS; GHOSH, 1987; TENGJAROENKUL et al., 2000).

Visto a importância do processo de absorção para a real utilização e aproveitamento dos nutrientes, o entendimento da capacidade digestiva enzimática da borda em escova de diferentes espécies de peixes pode ajudar no ajuste das dietas (HARPAZ; UNI, 1999). Sabe-se, por exemplo, que em peixes adultos, mudanças nos ingredientes da dieta, manipulação da alimentação (incluindo jejum) e horário da alimentação atuam sobre a atividade das enzimas da borda em escova intestinal (KROGDAHL; SUNDBY, 1999; KROGDAHL; BAKKE-MCKELLEP; BAEVERFJORD, 2003; HARPAZ et al., 2005; HAKIM et al., 2006). Entretanto, a capacidade enzimática da borda em escova de espécies peixes utilizadas na aquicultura não tem sido investigada cuidadosamente (HARPAZ; UNI, 1999).

2.7 Metabolismo

Segundo Lehninger (2002), o metabolismo é uma atividade celular altamente organizada, onde vias metabólicas com sistemas multienzimáticos atuam juntos para a obtenção de energia, conversão de moléculas para formação de precursores, formação de macromoléculas a partir de precursores e síntese e degradação de biomoléculas necessárias. O autor ainda registrou que:

O metabolismo, o somatório de todas as transformações químicas que ocorrem em uma determinada célula ou organismo, compreende uma série de reações catalisadas enzimaticamente, as quais constituem as vias metabólicas. Cada uma das etapas consecutivas em uma via metabólica produz uma alteração química pequena e específica, geralmente a remoção, a transferência ou a adição de um átomo ou grupo funcional. O precursor é convertido em produto por meio de uma série de intermediários denominados metabólitos. O termo metabolismo intermediário refere-se às atividades combinadas de todas as vias metabólicas que interconvertem precursores, metabólitos e produtos de baixo peso molecular. O catabolismo é a fase degradativa do metabolismo na qual moléculas nutrientes orgânicas (carboidratos, gorduras e proteínas) são convertidas em produtos finais menores e mais simples. As vias catabólicas liberam energia. No anabolismo, também denominado biossíntese, moléculas precursoras pequenas e simples são ligadas formando moléculas maiores e mais complexas, inclusive lipídios, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. As reações anabólicas requerem um fornecimento de energia.

Nesse sentido, o metabolismo intermediário responde pelo destino dos produtos da dieta após a digestão e a absorção, sendo os nutrientes absorvidos utilizados como substrato para a produção de energia livre de reação para o crescimento. As quantificações de atividade das enzimas chaves no controle de diferentes rotas metabólicas 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 a obtenção de energia (MELO, 2004). Alguns estudos têm mostrado estreita relação entre o estado nutricional e as atividades enzimáticas envolvidas no metabolismo intermediário (BAANANTE et al., 1991; MOON; FOSTER, 1995; METÓN et al., 1999). Um exemplo interessante é a medida das atividades da GDH, ALAT e ASAT, enzimas que são centrais para o metabolismo de aminoácidos e são indicadoras da utilização metabólica dos aminoácidos da dieta.

Em relação aos tecidos, o fígado é central para muitos processos no metabolismo intermediário já que muitos nutrientes absorvidos do trato são levados pelo plasma e pelo sistema porta hepático para este órgão. Provavelmente o fígado reflete a escolha da dieta por meio da sua capacidade regulatória para processos anabólicos e catabólicos (WILLMOTT; CLEMENTS; WELLS, 2005). Muitos dos efeitos regulatórios na utilização dos nutrientes e metabolismo ocorrem inicialmente no fígado, afetando conseqüentemente a cascata de eventos em outros órgãos e tecidos (ENES et al., 2009). As taxas de síntese protéica são bastante altas neste órgão, que é extremamente sensível a qualquer variação na dieta (CARTER; HOULIHAN, 2001). Ele é responsável pela manutenção do “pool” de aminoácidos corpóreo (LOVELL, 1988), desempenhando um papel fundamental no metabolismo e na regulação do transporte destes aminoácidos para os tecidos (CARTER;

HOULIHAN, 2001). Somado a isto, o fígado representa o principal sítio de produção de amônia do organismo (ALEXIS; PAPAPARASKEVA-PAPOUTSOGLIO, 1986).

O músculo branco possui um pool de aminoácidos que funciona como um reservatório para o metabolismo de proteína (CARTER et al., 1995) e também está envolvido na regulação dos processos de crescimento (MILLWARD, 1989² citado por SUNDE; TARANGER; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2001). Por isso, o músculo branco desempenha papel de destaque no metabolismo de proteínas. Salvo algumas diferenças, apresenta a maior quantidade relativa de aminoácidos essenciais do organismo, representando o maior volume de massa corpórea (CARTER; HOULIHAN, 2001). O perfil metabólico do plasma reflete os eventos ocorridos nos tecidos devido ao seu papel de transporte de intermediários metabólicos.

De modo geral, o perfil de metabólitos nos tecidos de peixes ainda é pouco utilizado nos estudos de nutrição e Alguns trabalhos (MORAES; BIDINOTTO, 2000; LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; VIEIRA; INOUE; MORAES, 2005; MELO et al., 2006; CORRÊA et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2010) 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 macro nutrientes das dietas. Dessa forma, a avaliação do metabolismo intermediário do fígado, músculo branco e plasma pode ser usada como importante bioindicadora da condição nutricional (utilização dos nutrientes), da saúde e do crescimento dos peixes.

2.7.1 Metabolismo protéico

Os aminoácidos, oriundos da dieta ou da quebra de proteínas, desempenham numerosas funções em peixes e uma das principais é que são as unidades de formação de proteínas (BALLANTYNE, 2001). No entanto, os aminoácidos são também necessários para a síntese de outros compostos associados com o metabolismo como os hormônios, os neurotransmissores e nucleotídeos. Além disso, podem ser catabolizados para suprir a demanda energética metabólica (HALVER; HARDY, 2002). As mudanças na concentração dos aminoácidos são sequenciais e refletem as rotas metabólicas através dos tecidos de acordo com a digestão, absorção, metabolismo e crescimento (CARTER; HOULIHAN, 2001).

² Millward, D.J. The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover. *Aquaculture* 79: 1-28, 1989.

Diferentemente dos carboidratos e lipídios, os aminoácidos não podem ser estocados. Quando em excesso, são desaminados e os resíduos de carbono são oxidados e convertidos em lipídios ou carboidratos ou ainda em outros compostos. O grupamento amino é removido dos aminoácidos principalmente por transaminação ou por desaminação oxidativa. A transaminação parece ser a principal rota inicial para desaminação em peixes, envolvendo a transferência da amônia do grupo amino para um α -ceto ácido, usualmente α -cetoglutarato. O ceto ácido formado na transaminação inicial pode ser oxidado, convertido em lipídio ou ainda ser usado na síntese de outros compostos (LOVELL, 1988). As principais enzimas envolvidas neste processo são a alanina aminotransferase (ALAT) e a aspartato aminotransferase (ASAT). A enzima mitocondrial GDH está envolvida no processo de desaminação oxidativa do glutamato ocorrida nas reações de transaminação de grupos alfa-amino de vários aminoácidos. Esta controla o catabolismo de aminoácidos podendo resultar em uma substancial produção de amônia (COWEY; WALTON, 1989). A desaminação pela GDH representa um meio para remover o nitrogênio dos aminoácidos e utilizar as cadeias carbonadas como energia no ciclo de Krebs. A GDH é muito similar em peixes e mamíferos e apresenta as maiores atividades nas brânquias, rim, músculo vermelho e fígado (CHRISTIANSEN; KLUNGSOIR, 1987).

O principal produto final do catabolismo de proteínas em teleósteos é a amônia e uma proporção significativa dos compostos nitrogenados é também excretada como uréia (WOOD et al., 1995). Conseqüentemente, medidas da excreção de amônia e uréia têm sido usadas como indicadores dos efeitos de vários fatores ambientais e nutricionais no metabolismo protéico e podem dar uma idéia do balanço de nitrogênio do peixe (RYCHLY; MARINA, 1977; BEAMISH; THOMAS, 1984; PEREIRA; VIJAYAN; MOON, 1995). Portanto, a quantificação da excreção de amônia para espécies de peixes em relação à nutrição é importante para operações em cultivo intensivo, pois o metabolismo protéico define parcialmente o sucesso de um regime nutricional particular (DOSDAT et al., 1996; GÉLINEAU; CORRAZE; BOUJARD, 1998). De acordo com Van Waarde (1983), o aumento do catabolismo de proteínas tem, como conseqüência, um aumento nos teores de amônia plasmática e, em condições normais, o excesso de amônia produzido é prontamente excretado pelas brânquias.

2.7.2 Metabolismo de carboidrato

A glicose, resultado do catabolismo de carboidratos, é o principal combustível da maioria dos organismos e, por isso, ocupa uma posição central no metabolismo. Ela pode

ser armazenada como glicogênio e, dessa forma, a célula pode acumular grandes quantidades de unidades de hexose. Quando as demandas energéticas do organismo aumentam subitamente, a glicose pode ser liberada rapidamente desses polímeros de armazenamento intracelulares e ser utilizada para produzir ATP (energia) de maneira aeróbica ou anaeróbica. Além de ser um excelente combustível, é também um precursor versátil, capaz de suprir uma ampla gama de intermediários metabólicos que são os materiais primários necessários para as reações biossintéticas. Nos animais, dentre eles os peixes, a glicose tem três destinos principais: pode ser armazenada, pode ser oxidada a compostos de três átomos de carbono (piruvato), por meio da glicólise, ou pode ser oxidada a pentoses, por meio do desvio das pentoses fosfato, produzindo NADPH (reductor universal nas vias anabólicas) e ribose-5-fosfato (empregada na biossíntese dos ácidos nucléicos). Na maioria dos tecidos animais, a maior parte da glicose consumida é catabolizada por meio da glicólise até piruvato e a maior parte do piruvato é oxidada por meio do ciclo de Krebs. A principal função do catabolismo da glicose por essa via é gerar ATP (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

O metabolismo de carboidratos é uma rota central do fluxo energético em peixes (DABROWSKI; GUDERLEY, 2002) e o fígado desempenha papel fundamental neste metabolismo. Para Moon e Foster (1995), o principal papel do fígado no metabolismo glicídico é a conversão de substratos constituídos de três carbonos, provenientes da dieta, em compostos energéticos a serem nele estocados, ou para a formação de glicose a ser exportada para os demais tecidos. Sendo assim, ao invés de funcionar como um órgão intermediador na manutenção do ciclo de carbono, o fígado também pode funcionar suprindo os estoques de reserva energética (convertendo glicose em triacilglicerol) ou glicogênio.

A quantidade de massa muscular branca do corpo representa um estoque substancial de glicogênio, aproximadamente vinte vezes maior do que o do fígado (MOVES et al., 1995), entretanto, em proporções relativas, o fígado estoca mais glicogênio que o músculo branco. O conteúdo de glicogênio hepático é extremamente variável entre indivíduos e espécies de peixes. Em muitas espécies de peixes o glicogênio muscular não é mobilizado, exceto em condições extremas, sendo mantido à custa da glicose sanguínea, que por sua vez, é provida pelos processos hepáticos de gliconeogênese e glicogenólise (NAVARRO et al., 1995). Van Den Thillart e Van Raaij (1995) destacam que os estoques de glicogênio do músculo branco são, normalmente, direcionados para queima repentina suprindo a demanda energética do exercício natatório e não rotineiramente, como para manutenção de energia do tecido. A glicogenólise é uma fonte de glicose, mas não parece ser a maior fonte de glicose

para o fígado ou músculo quando os níveis de precursores na dieta são adequados. Logo, representa uma estratégia emergencial (COWEY; WALTON, 1989).

Em peixes, a glicose ainda pode ser sintetizada a partir de proteína e lipídio e esse processo denomina-se neoglicogênese. Segundo Moon (1988), a neoglicogênese é a rota responsável pela síntese de glicose *de novo* e síntese de glicogênio a partir de precursores como lactato, aminoácidos, glicerol e frutose. O tempo de aparecimento da glicose (e outros açúcares simples) no plasma, em relação à alimentação, vai depender de vários fatores, entre eles: o conteúdo total de carboidratos e dos outros ingredientes da dieta, sua forma de processamento, hábito alimentar da espécie, histórico nutricional do indivíduo e temperatura da água (BERGOT; BREQUE, 1983; HUNG, 1991).

2.7.3 Metabolismo de lipídios

Os vertebrados podem obter lipídio via alimentação e/ou mobilizam lipídios armazenados no tecido adiposo e, no fígado, podem converter o excesso de carboidratos da dieta em lipídios, exportando-os para outros tecidos. A oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa em acetil-CoA é uma via central liberadora de energia nos animais e, os elétrons removidos durante essa oxidação, passam através da cadeia respiratória mitocondrial e a energia assim liberada é utilizada na síntese de ATP. O produto dessa oxidação, o acetil-CoA, pode ser completamente oxidado até CO₂ por meio do ciclo do ácido cítrico, resultando na conservação de mais energia (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Em peixes, a absorção de lipídios oriundos da dieta é um processo que se assemelha ao observado em mamíferos (IZQUIERDO et al., 2000). Entretanto, alguns aspectos do metabolismo de lipídios em peixes, incluindo transporte e deposição, parecem ser um pouco diferente dos observados para vertebrados homeotérmicos. Conforme proposto por Sheridan (1988), os peixes apresentam um modelo diferenciado de distribuição de ácidos graxos do plasma para os tecidos composto por componentes de liberação rápida e lenta. O mecanismo de liberação rápida é representado por ácidos graxos livres (AGL) de cadeia curta, solúveis no plasma e AGL de cadeia longa que estariam ligados a proteínas carreadoras. O componente de liberação mais lenta, similar aos de mamíferos, representa um sistema de liberação de triacilgliceróis (TG), que consiste na agregação, extrusão e transporte de partículas em TG. Os lipídios são estocados em muitos órgãos de depósitos e, segundo Van Den Tillart e Van Raaij (1995), os sítios de estocagem mais importantes em peixes são o mesentério adiposo, o fígado e o músculo. Além disso, os lipídios corpóreos refletem os

lipídios da dieta, em termos de qualidade e composição de ácidos graxos, embora possam ser sintetizados a partir de carboidratos e aminoácidos (CARTER et al., 2001).

2.8 *Colossoma macropomum*: aspectos gerais e importância da espécie

Tambaqui (Figura 1) pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, que inclui as piranhas, a pirapitinga e os pacus (ARAUJO-LIMA; GOMES, 2005); família Characidae e gênero *Colossoma*. Na América do Sul, ele é conhecido por outros nomes, como cachama (Venezuela e Colômbia) e guamitana (Peru). A área de vida do tambaqui é caracterizada por águas ricas em nutrientes com temperaturas médias entre 25 e 34°C e abundância de áreas alagáveis.

Segundo Araújo-Lima e Goulding (1998), o tambaqui *C. macropomum* (Cuvier, 1818), é o segundo maior peixe da Bacia Amazônica. Este peixe alcança pelo menos 30 kg e 1 m de comprimento depois de 13 anos no Rio Solimões/Amazonas (GOULDING; CARVALHO, 1982). A região é conhecida por possuir a mais diversa fauna de peixes de água doce do mundo, com de cerca de 2.000 espécies e o tambaqui é a principal espécie cultivada nessa região (VAL; ROLIM; RABELO, 2000) e também nos países da América do Sul, como Equador, Panamá, Peru, Venezuela e Colômbia (CHELLAPPA et al., 1995), principalmente pela fácil obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, alta produtividade e rusticidade (ARAUJO-LIMA; GOULDING, 1998). Além disso, é um dos peixes mais apreciados da culinária amazônica e amplamente aceito em outras regiões, devido ao seu excelente sabor, consistência e coloração branca da carne, pouca presença de espinhas e facilidade para obtenção de filés. De acordo com Araújo-Lima e Goulding (1998), o tambaqui é reconhecido como um alimento de primeira classe tendo boas perspectivas no mercado nacional e internacional.

Uma característica marcante da espécie é a grande plasticidade genotípica e fenotípica, que lhe permite sobreviver no heterogêneo ambiente amazônico. A espécie apresenta arcos branquiais com rastros longos e numerosos, característica de peixes planctófagos. Estes rastros branquiais formam uma verdadeira rede filtradora, permitindo que o peixe aproveite bastante material planctônico. A característica anatômica mais impressionante da espécie é a sua forte mandíbula e a dentição capazes de quebrar e triturar frutos e sementes grandes e muito duras. Apresenta trato digestivo característico de uma alimentação diversificada, com esôfago curto e estômago alongado em forma de saco e muito elástico. Após o estômago, há um grande número de cecos pilóricos seguido por um longo intestino (HONDA, 1974; GOULDING; CARVALHO, 1982; SAINT-PAUL, 1984). Um

tambaqui adulto pode ter até 75 cecos pilóricos, ou apêndices ligados ao estômago e acredita-se que este grande número de cecos ajude na digestão de material vegetal. O comprimento do intestino no tambaqui adulto alcança em média cerca de 5 a 5,5 vezes o comprimento do corpo e isto é similar a muitas espécies de peixes detritívoros e herbívoros (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998).

No ambiente natural, a oferta de alimentos aos peixes da Bacia Amazônica sofre flutuação sazonal. Durante períodos de cheia, o tambaqui habita as regiões de florestas inundadas de várzea, que se transforma num pomar nos quais essa espécie se alimenta de frutos e sementes que caem das árvores e arbustos. Com a diminuição no volume d'água, no período de vazante, a espécie adulta migra para os rios de água-branca até o fim da estação reprodutiva e os juvenis permanecem nos lagos de várzea o ano todo. Com o volume d'água baixo, eles se alimentam de zooplâncton (particularmente Cladóceras) e quando o nível d'água começa a se elevar, a alimentação é composta principalmente pela gramínea *Oryzia perennis* (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998). Todas essas características permitem classificar o tambaqui como um peixe onívoro, com tendência a frugivoria (HONDA, 1974; GOULDING; CARVALHO, 1982; VAL; HONCZARYK, 1995).

De acordo com Araújo-Lima e Goulding (1998), a estratégia de vida do tambaqui pode ser sintetizada em seis características principais: uso de vários habitats de uma grande região; alta fecundidade; investimento energético relativamente baixo em reprodução; maturidade sexual tardia; alto investimento energético em crescimento e habilidade de utilizar as cadeias tróficas baseadas no plâncton e na vegetação inundável.

O tambaqui se tornou uma alternativa viável e sustentável para substituição da atividade pecuária na região amazônica, evitando e diminuindo o desmatamento que essa atividade causa. Um mercado de exportação foi aberto para espécies de peixes amazônicos e isto oferece grande oportunidade para o desenvolvimento da aquicultura nesta região (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998). De 2007 para 2008 e 2009, a produção de tambaqui passou de 30.598 para 46.454 toneladas/ano (BRASIL, 2010). Um aspecto que torna o tambaqui uma espécie promissora é o alto rendimento (70 a 72%) do principal corte comercial, que, geralmente, é comercializado em duas partes – com e sem espinho (RUIVO,

1998³ citado por VIDAL JR et al., 2004). De acordo com Valenti et al. (2000)⁴ citado por ARAUJO-LIMA e GOMES (2005), o tambaqui é criado em todos os estados da Federação, com exceção do Tocantins, porém já existem registros de criação da espécie naquele Estado. A produção de tambaqui em outras regiões, como a Sudeste, é tão alta como na região Norte, chegando a 10 ton/ha/ano. A grande demanda por sua carne é a principal razão pela qual muitos pesquisadores e produtores têm intensificado esforços para estabelecer um pacote tecnológico para a criação da espécie (ARAUJO-LIMA; GOMES, 2005).

Esse grande potencial para aquicultura também é devido à fácil adaptação ao confinamento e arraçoamento desta espécie. Por ser um peixe rústico, o tambaqui suporta bem variações na qualidade da água. No ambiente natural, esse peixe normalmente habita áreas com água rica em nutrientes, como o rio Amazonas. Porém, também é encontrado nas águas pobres do rio Negro e, por isso, é resistente à ação tóxica da amônia e é capaz de resistir a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (~1 mg/L) (VAL; ALMEIDA-VAL, 1995; ARAUJO-LIMA; GOMES, 2005).

A carne do tambaqui é magra. O teor de gordura nos músculos do tambaqui silvestre é menos de 1,5 %, mas aumenta no peixe cultivado para 2 a 6 %. A gordura saturada soma de 0,4 % e 1,6 % do peso dos tambaquis cultivados e silvestres, respectivamente. Apenas 1,5 % da gordura acumulada pelo tambaqui é armazenada nos músculos. O teor de proteína do tambaqui em várzea varia conforme a estação hidrológica, sendo 10% do corpo na vazante e 20% na cheia, enquanto que água corresponde à maioria do peso (72-88 %) (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998).

Há poucas décadas, a forma mais comum de criação dessa espécie era o cultivo extensivo, sem a adição de alimento suplementar, em que apenas a produtividade natural sustentava uma baixa densidade de indivíduos, o que resultava numa baixa eficiência de produção (NUNES et al., 2006). Um considerável decréscimo nos registros de desembarques pesqueiros dessa espécie e, por outro lado, um significativo aumento de sua produção em confinamento nas últimas décadas exigem esforços para gerar mais informações que

³ RUIVO, U.E. Introdução aos princípios de industrialização de pescados de águas interiores. In: SEMINÁRIO DE PISCICULTURA DA ZONA DA MATA MINEIRA, 1., 1997, Muriaé. Anais. Viçosa, MG: EPAMIG, 1998. p.33-44.

⁴ VALENTI, W. C., POLI. C. R., PEREIRA. J. A, BORGHETTI. J. R. Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq, 2000.

subsidiem tanto o manejo ecológico como o de cultivo em tempo cada vez menor (OLIVEIRA, 2003).

2.8.1 Nutrição de tambaqui

Segundo Araújo-Lima e Goulding (1998), as preferências dietéticas do tambaqui mudam de zooplâncton para sementes e frutas conforme o crescimento do peixe e a época do ano. A quantidade de proteína ingerida diminui conforme o peixe cresce. A quantidade média na dieta cai de 42 % nas larvas para apenas 20 % nos jovens e adultos. Por outro lado, a quantidade de carboidratos e lipídios consumidos pelos jovens e adultos são inversamente relacionados. Os adultos necessitam de alimentos mais energéticos para contrabalançar seus altos custos metabólicos. Por causa do seu hábito onívoro, o tambaqui tem adaptações para digerir alimentos de origem animal e vegetal e é de fácil adaptação à alimentação fornecida.

O tambaqui possui um comportamento alimentar oportunista: quando as frutas e sementes não estão disponíveis eles se alimentam de itens de origem animal, particularmente zooplâncton. Embora consuma frutas e/ou sementes contendo baixos teores de proteína, tambaqui consegue balancear a taxa proteína/energia e crescer. Para isso, tambaqui consome itens de composição variada para alcançar uma dieta balanceada e atender suas necessidades metabólicas (SILVA; PEREIRA-FILHO; OLIVEIRA-PEREIRA, 2000). Silva et al. (2003) concluíram que pelo menos 133 espécies de árvores produzem frutos e sementes que já foram encontrados (inteiros ou triturados) no conteúdo estomacal de tambaqui. A grande disponibilidade desses itens leva a espécie a incluí-los em sua dieta de forma variada para conseguir melhor equilíbrio de proteína, carboidratos, gorduras e vitaminas (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998).

Em relação às condições de cultivo, em temperaturas equivalentes, o metabolismo de rotina do tambaqui é aproximadamente igual em tanques e ambientes naturais (SAINT-PAUL, 1984). Com o oxigênio dissolvido a níveis inferiores a 2 mg/L e a 30°C, o tambaqui começa a deprimir sua taxa metabólica. Em alimentação *ad libitum* de tambaqui, somente 80 % da ração é consumida (VAN DER MEER; ZAMORA; VERDEGEM, 1997). Para manutenção dos indivíduos adultos e jovens, é necessário que o tambaqui consuma, respectivamente, 23 e 19-20 kJ/g de alimento seco (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998). Considera-se que a concentração ótima de proteína para a ração de tambaqui com mais de 100 g de peso deve variar entre 20-25 %, o teor de energia deve oscilar entre 12-15 kJ/g (2.800-3.500 kcal/kg) (SILVA; PEREIRA FILHO; OLIVEIRA-PEREIRA, 2003).

Tambaquis cultivados são alimentados com ração peletizada ou extrusada, muito embora essa seja suplementada com frutas, restos de vegetais ou mesmo alimentos industrializados, além de zooplâncton produzido no próprio viveiro. A quantidade de proteína nas rações varia de 19% a 40% e são mais ricas em proteína que a dieta natural (ARAUJO-LIMA; GOMES, 2005). Atualmente, o teor calórico nas rações para tambaqui é de 12 a 17 kJ/g (53-67 kJ/g de proteína) e esses valores são bastante próximos dos encontrados na dieta do tambaqui silvestre (ARAUJO-LIMA; GOMES, 2005).

Segundo Van der Meer et al. (1997) altos níveis de crescimento de tambaqui obtidos dentro de condições laboratoriais sugerem que esta espécie pode ser um candidato apropriado para produção dentro de condições de aquicultura intensiva. Entretanto, as taxas de crescimento para tambaqui registradas são, muitas vezes, de difícil comparação, por causa dos protocolos experimentais utilizados. Aparentemente, experimentos conduzidos em aquários levam a taxas de crescimento menores que tanques e viveiros. Os resultados obtidos com peixes maiores são menos claros (ARAUJO-LIMA; GOMES, 2005). Outras fontes alternativas de alimentos para o tambaqui, apesar de serem mais baratas, levam a taxas de crescimento inferiores às obtidas com rações balanceadas. Tambaquis alimentados com rações feitas com pupunha, milho, frutas da floresta, tortas de babaçu, em geral apresentaram taxas de crescimento inferiores aos alimentados com as rações granuladas balanceadas (ARAUJO-LIMA; GOULDING, 1998).

Embora vários estudos com essa espécie sobre aspectos de sua auto-ecologia tenham delimitado seu hábito alimentar onívoro (HONDA, 1974; GOULDING; CARVALHO, 1982; SILVA; PEREIRA-FILHO; OLIVEIRA-PEREIRA, 2000) e tentado eleger uma dieta adequada e que atenda a suas exigências nutricionais (MACEDO, 1979; ECKMANN, 1987; SAINT-PAUL, 1991; MORI, 1993; ROUBACH; SAINT-PAUL, 1994; VAN DER MEER; ZAMORA; VERDEGEM, 1997; SILVA; PEREIRA-FILHO; OLIVEIRA-PEREIRA, 2000; SILVA; PEREIRA FILHO; OLIVEIRA-PEREIRA, 2003; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; CORRÊA et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2010), pouco pôde ser concluído sobre sua nutrição, sua capacidade digestiva e seu metabolismo e, os resultados até aqui gerados não são suficientes para o entendimento completo de sua nutrição.

3 JUSTIFICATIVA

O cultivo do tambaqui, assim como da maior parte dos organismos aquáticos, depende principalmente de alimentos artificiais, e a alimentação geralmente constitui a fração mais significativa nos custos operacionais das empresas dedicadas ao cultivo semi-intensivo ou intensivo de peixes (TACON, 1989). Isso torna os estudos sobre as exigências nutricionais das espécies aquáticas indispensável ao desenvolvimento da aquicultura. Além disso, o conhecimento sobre a biologia de tambaqui pode possibilitar o estabelecimento de metodologias adequadas ao manejo desses animais no nosso país, visto que a criação artificial envolve o manejo e o desenvolvimento das espécies em condições diversas daquelas do habitat natural (SAINT-PAUL, 1984). Neste contexto, pesquisas sobre o mecanismo digestivo e o destino dos produtos finais da digestão podem contribuir para a utilização de dietas com melhor custo-benefício, bem como beneficiar o estudo comparativo entre peixes tropicais. Também, dados que relacionam taxa carboidrato/lipídio da dieta com eficiência digestiva, metabolismo e desempenho produtivo em peixes tropicais de água-doce permanecem escassos.

Em prévios estudos com tambaqui foram investigados os efeitos dos teores de proteína e lipídio nas atividades das enzimas digestivas (DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006), no metabolismo e ganho em peso (DE ALMEIDA et al., 2010) e os efeitos de diferentes teores de carboidrato na atividade das enzimas digestivas e no metabolismo intermediário (CORRÊA et al., 2007). Entretanto, a carência de informações sobre a utilização de fontes energéticas não protéicas na dieta dessa espécie considerando seu hábito frugívoro-herbívoro, motivou o presente estudo já que, torna-se necessário avaliar o potencial de utilização de lipídios e carboidratos como poupadores de proteína para seu crescimento. Desde que qualquer desbalanço nos recursos de energia não-protéicos e/ou seus teores de inclusão na dieta afetam diretamente o desempenho e metabolismo dos peixes, é primordial determinar a taxa carboidrato/lipídio que produza os melhores resultados de crescimento e utilização de nutrientes.

Desse modo, o presente trabalho o tambaqui foi estudado com o propósito de se obter informações sobre seu desempenho, processo digestivo e perfil metabólico em resposta a diferentes taxas carboidrato/lipídio das dietas, visando adequar suas exigências nutricionais. As ferramentas escolhidas para avaliar a eficiência digestiva (enzimas digestivas) e a utilização dos nutrientes da dieta (metabolismo) vêm apresentando respostas satisfatórias

em outras espécies (MORAES; BIDINOTTO, 2000; LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; MELO et al., 2006; CORRÊA et al., 2007; DE ALMEIDA et al., 2010) e estão sendo usadas para otimizar a composição dos nutrientes das dietas e desvendar sua estratégia alimentar.



FIGURA 1: Exemplar de juvenil de tambaqui, *Colossoma macropomum*.

4 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal escolher a taxa carboidrato/lipídio adequada à dieta de tambaqui, que permita o efeito poupador de proteína. Para atingir este objetivo, alguns parâmetros foram avaliados nos peixes alimentados com as diferentes dietas experimentais, como:

- Desempenho produtivo, através de parâmetros de crescimento;
- Eficiência digestiva, através do perfil das atividades enzimáticas digestivas: proteases, amilase, lipase e fosfatase alcalina;
- Perfil metabólico, através da quantificação de intermediários metabólicos e da atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo intermediário.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material biológico e manejo

O experimento e as análises bioquímicas foram realizados no Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução, na Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, no período de janeiro de 2009 a julho de 2010. Cem exemplares de juvenis de tambaqui foram doados pela Piscicultura Polettini, localizada em Mogi Mirim/São Paulo. Os peixes passaram por um período de aclimação de uma semana em tanques de 2000L com temperatura controlada e aeração constante, recebendo ração extrusada comercial contendo 27% de proteína bruta, antes do início do experimento.

5.2 Desenho Experimental

Após o período de aclimação, setenta e dois peixes pesando $52,82 \pm 12,9\text{g}$ e $14,94 \pm 1,2\text{cm}$ foram igualmente distribuídos em nove caixas de 250 litros (oito peixes por caixa), em um sistema fechado, com água termostalizada sob fluxo contínuo e aeração constante. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia até a saciedade com dietas extrusadas, isoprotéicas (26,4% de proteína bruta) e isocalóricas ($\sim 3.900\text{kcal/kg}$), com diferentes taxas carboidrato/lipídio (CHO/L): 30,5/13,7% na dieta I, 40,5/9,1% na dieta II, 50,0/4,8% na dieta III (Tabela 1) durante 45 dias. Cada tratamento (dieta) foi feito em triplicata (três caixas por tratamento). A taxa Energia Bruta/Proteína Bruta (EB:PB) (15) e a porcentagem de proteína bruta (26,5%) utilizadas nas dietas experimentais foi escolhida com base em estudos prévios com a espécie (DE ALMEIDA et al., 2010). Os ingredientes utilizados foram analisados quanto à composição bromatológica (AOAC., 2000).

Após o período experimental, a alimentação foi interrompida 24 horas antes do abate dos peixes. Foram coletados oito peixes por caixa (vinte e quatro exemplares de cada dieta) que foram anestesiados em solução de benzocaína (100mg/L de água). Imediatamente após foi realizada a biometria final e quinze peixes de cada dieta foram puncionados na veia caudal com seringas heparinizadas, para a coleta de sangue, e posteriormente abatidos por secção medular. O sangue foi centrifugado a $13.400 \times g$ por três minutos para obtenção do plasma. O plasma foi congelado em nitrogênio líquido. O fígado e o músculo branco foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -20°C para posteriores determinações de atividades enzimáticas e intermediários metabólicos. O trato digestório foi extraído, dividido em estômago (E), cecos pilóricos (CP), intestino anterior (IA)

e posterior (IP) e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantidos a -20°C para as determinações das atividades das enzimas digestivas.

TABELA 1: Composição das dietas experimentais (baseada na matéria natural).

Ingredientes (%)	I(30/11)	II(40/9)	III(50/5)
Farinha de peixe ^A	32,0	30,0	29,5
Farelo de soja ⁷	8,0	8,0	8,0
Milho ^B	33,0	47,0	40,0
Amido de milho	0,0	0,0	16,5
Farelo de arroz	4,0	4,0	4,0
Óleo vegetal ^{2D}	9,0	4,0	0,0
Vitamina-mineral premix ¹	2,0	2,0	2,0
CMC ³	12,0	5,0	0,0
<i>Composição calculada</i>			
Matéria seca ⁴	91,2	89,8	89,1
Proteína Bruta ⁴	26,5	26,5	25,7
ENN ^{4F}	30,5	40,5	50,0
Extrato Etéreo ⁴	13,7	9,1	4,8
Fibra Bruta ⁴	12,9	6,5	1,5
Energia Bruta ^E	3992,5	3989,5	3947,1
EB:PB ⁵	15	15	15
CHO: L ⁶	2	4	10
Proteína Digestível*	22	22	21
Energia Digestível*	3223,7	3225,3	3240,8

¹-Composição 1000g: Vit. A 600000 IU; Vit. D3 600000 IU; Vit. E 12000 IU; Vit. K3 1200mg; Vit. B1 1200mg; Vit. B2 1536mg; Vit. B6 1287 mg; Vit. B12 4000 mg; Folato 198mg; Pantotenato 3800mg; Vit. C 48000mg; Biotina 20mg; Colina 30000mg; Niacina 19800mg; Ferro 25714mg; Cobre 1960mg; Manganês 13334mg; Zinco 6000mg; Iodo 948mg; Cobalto 2mg; Selênio 30,10mg. ²-Óleo de soja; ³-Carboximetilcelulose de sódio USP. Labsynth@Produts para Laboratório Ltda (Diadema-SP); ⁴-Expressa em %. ^A-Composição %: 93,08 matéria seca, 28,38 cinzas, 5,87 lipídio, 1,53 fibra bruta, 53,72 proteína bruta, Ca^{2+} 8,94, Fósforo 5,46 e energia bruta 3.795cal/g. ^B-O milho não foi previamente cozido. Composição em %: 88,45 matéria seca, 1,31 cinzas, 3,81 lipídio, 2,29 fibra bruta, 7,30 proteína bruta, cálcio 0,06, fósforo 0,24 e energia bruta 4.226cal/g. ^C-Composição em %: 95,00 matéria seca, 0,13 cinzas, 0,59 lipídio, 78,63 fibra bruta, 0,15 proteína bruta. ^D-Composição: energia bruta: 9.811 cal/g. ^E-Expressa em kcal/kg e foi calculada descontando a energia da celulose. ^F-ENN Extrato Não-Nitrogenado (carboidrato): em % e foi calculado como % MS - (PB+EE+MM+FB), sendo MS = matéria seca, PB = proteína bruta, EE = extrato etéreo, MM = matéria mineral e FB = fibra bruta. ⁵-Taxa Energia Bruta:Proteína Bruta. ⁶-Taxa carboidrato:lipídio. ⁷-Composição em %: 89,36 matéria seca, 5,17 cinzas, 0,89 lipídio, 4,59 proteína bruta e energia bruta de 18.40 MJ. *Digestibilidade dos ingredientes para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) de acordo com Abimorad e Carneiro (2004).

5.3 Condições Ambientais

A água foi continuamente recirculada através de um filtro de areia e mantida em $27,3 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; pH $6,5 \pm 0,1$; oxigênio dissolvido $4,2 \pm 0,4\text{mg/L}$ e NH_4^+ $0,1 \pm 0,01\mu\text{g/L}$. Os

parâmetros físico-químicos da água dos tanques experimentais foram mantidos dentro da faixa de conforto para a criação de peixes tropicais (VINATEA ARANA, 1997).

5.4 Variáveis de desempenho

Os valores de desempenho foram calculados para cada dieta experimental, de acordo com as fórmulas descritas a seguir:

- Ganho em peso (GP) = (peso final - peso inicial)
- Ganho em comprimento (GC) = (peso final - peso inicial)
- Consumo de dieta (CD) = consumo médio de alimento / tempo experimental
- Conversão alimentar (CA) = consumo de alimento / ganho em peso total
- Taxa de crescimento específico (TCE) = $(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) \times 100 / \text{tempo}$
- Taxa de eficiência protéica (TEP) = ganho em peso vivo/proteína bruta consumida
- Fator de condição(k) = $k = \text{peso} / \text{comprimento}^b$, sendo b obtido através da equação alométrica da relação peso / comprimento: $\text{peso} = a \times \text{comprimento}^b$

5.5 Índice Hepato-somático (IHS)

O IHS foi calculado a partir da seguinte equação:

$\text{IHS} = \text{PF} / \text{PT} \times 100$; sendo IHS=índice hepatossomático; PF=peso do fígado e PT=peso total

5.6 Preparação dos homogeneizados celulares: extratos enzimáticos

Os tecidos coletados foram amostrados sobre superfície gelada e pesados em quantidades apropriadas para os ensaios. As fatias de tecido pesadas foram homogeneizadas em tampão de homogeneização composto de fosfato de sódio 10mM e glicerina 50% (v/v) ajustado para pH 7,0. Os extratos brutos foram feitos adicionando-se quantidade previamente estabelecida (0,5 - 2,0g) de tecido a 1,0 mL de tampão e então homogeneizados em um homogeneizador tipo Potter Elvehjem por 1 minuto em banho de gelo. O homogeneizado foi transferido para tubos de plástico com capacidade de 2,0 mL.

A centrifugação de fígado e músculo branco foi realizada a 600 x g por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante foi centrifugado a 6.000 x g durante 8 minutos a 4°C. Um volume apropriado ($50 \pm 10 \mu\text{L}$) do sobrenadante, determinado por padronização prévia, foi utilizado como fonte de enzima para a determinação da atividade de glutamato desidrogenase (GDH) no fígado e de lactato desidrogenase e malato desidrogenase em fígado e músculo branco. A centrifugação das porções do trato digestório (estômago, cecos pilóricos, intestino anterior e intestino posterior) foi realizada a 4°C, a 13.400 x g por 3 minutos. O sobrenadante

foi utilizado como para determinação da protease inespecífica, tripsina, quimiotripsina, lipase, amilase e fosfatase alcalina.

5.7 Determinações enzimáticas

O teor de proteína total dos homogeneizados celulares para as determinações das atividades enzimáticas específicas foi determinado pelo método de Kruger (1994).

5.7.1 Enzimas digestivas

5.7.1.1 Protease Inespecífica

Para os ensaios da atividade proteolítica inespecífica foi utilizado o método de hidrólise da caseína, adaptado de Walter (1984). Tampões 0,2 M glicina/HCl com pH 2,0 para o estômago e pH 8,0 para cecos pilóricos e intestino anterior foram usados para as diferentes porções do trato gastrointestinal. A mistura de reação foi composta por tampão adequado (500µL), caseína 1% (500µL) como substrato e alíquota previamente ajustada do homogeneizado como fonte de enzima. Após 60 minutos de incubação a 25°C, a reação foi interrompida com 500µL de TCA 20% (ácido tricloroacético), mantida em gelo fundente por aproximadamente 30 minutos e o precipitado removido por centrifugação a 12.000 x g por 3 minutos para leitura do sobrenadante em 280nm. Todas os pontos foram ensaiados em duplicata e, comparados a dois brancos, um de enzima (onde a quantidade de enzima foi substituída por água) e outro de substrato (onde o substrato foi substituído por água destilada). A tirosina foi utilizada como padrão e uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µg de tirosina, por minuto (U), e expressa em miligrama de proteína (U/mg de proteína).

5.7.1.2 Tripsina

A atividade proteolítica de tripsina foi determinada conforme metodologia proposta por Hummel (1959) nos homogeneizados celulares de cecos pilóricos e intestino anterior. Foi utilizado tampão TRIS 0,2M e CaCl₂ 0,01M com pH ajustado para 8,1 sendo que o substrato (1,04mM) TAME (p-toluenossulfonil L-arginina-etilester) foi diluído em tampão. A reação era incubada a 25°C por um minuto. Uma unidade de tripsina foi estabelecida como a variação de absorbância do substrato em 274nm após sua hidrólise completa e expressa como 1µmol de arginina/minuto/mg de proteína.

5.7.1.3 Quimiotripsina

A atividade proteolítica de quimiotripsina foi determinada conforme Hummel (1959) nos homogeneizados celulares de cecos pilóricos e intestino anterior. Foi utilizada a mistura de reação contendo tampão TRIS 0,2M e CaCl₂ 0,01M pH 7,8 e 0,001mM de BTEE (benzolib-L-tirosina etilester) como substrato de reação. A reação era incubada a 25°C por um minuto. Uma unidade de quimiotripsina foi estabelecida como a variação de absorbância do substrato em 256nm após sua hidrólise completa e expressa como 1µmol tirosina/minuto/mg de proteína.

5.7.1.4 Lipase

A atividade de lipase não-específica foi determinada segundo metodologia adaptada de Albro et al. (1985) nos homogeneizados celulares de estômago, cecos pilóricos e intestino anterior. A reação foi incubada em meio contendo 0,4mM p-nitrofenil miristato em solução tampão 24mM de bicarbonato de amônio pH 7,8 e 0,5% Triton X-100. Após trinta minutos, a reação era interrompida pela adição de NaOH 25mM. A densidade óptica era registrada a 405 nm e uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µmol de substrato hidrolisado por minuto (U) por mg de proteína (U/min/mg proteína).

5.7.1.5 Amilase

A atividade amilohidrolítica foi estimada nos homogeneizados celulares de estômago, cecos pilóricos e intestino anterior segundo método proposto por Bernfeld (1955) após modificação. Na mistura de reação contendo 1,0mL de solução de amido 5% em tampão citrato/fosfato 0,2M (pH 7,0) e 0,5mL de solução de NaCl 0,5% como cofator enzimático, era adicionado um volume adequado de homogeneizado celular. A reação era incubada a 25°C por 30 minutos e interrompida com 1,0mL de solução 5% ZnSO₄:Ba(OH)₂ 0,3N. Posteriormente, a mistura de reação era centrifugada a 12.000 x g por 3 minutos e no sobrenadante determinava-se a concentração de glicose livre em 690nm pelo método colorimétrico de Park e Johnson (1949). A atividade específica foi expressa em µmoles de açúcares redutores totais/minuto/mg de proteína (U/mg proteína).

5.7.1.6 Fosfatase alcalina (FALC)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos homogeneizados celulares de intestino total pelo método modificado de Bretaudiere e Spilman segundo Bergmeyer (1983). A uma alíquota de homogeneizado celular era adicionada 100µL de p-

nitrofenilfosfato (0,12M) em uma mistura contendo 2,7mL de tampão glicina pH 8,5 (0,05M) e MgCl₂ (0,01M). Após incubação a 30°C por tempo previamente padronizado, a reação era interrompida pela adição de 400µL de NaOH (2.0N) e os tubos eram centrifugados a 5000 x g por três minutos. O sobrenadante era lido em 405 nm contra um branco de reação e o produto de reação foi quantificado pelo coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol ($\epsilon_{405} = 18,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) previamente determinado. A atividade enzimática foi expressa em nmoles de p-nitrofenolato/min/mg de proteína (U/mg proteína).

5.7.2 Enzimas do Metabolismo

5.7.2.1 Desidrogenases

A atividade das três desidrogenases foi determinada por uma adaptação do método de Hochachka et al. (1978) que se baseia na oxidação do NADH determinada cineticamente em 340nm. O coeficiente de extinção molar do NADH (6,2/mM/cm) foi determinado previamente e utilizado no cálculo de atividade específica.

Lactato desidrogenase (LDH)

A reação da LDH foi monitorada durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos a 340nm, em meio de reação contendo 200µL de ácido pirúvico (0,05M), 100µL de NADH (2mM) e 1,7mL de tampão Tris pH 7,5 (0,05M), ao qual era adicionado o homogeneizado celular. A atividade enzimática de fígado está expressa em nmoles/minuto/mg proteína (mU/mg proteína) e de músculo branco em µmol/minuto/mg proteína (U/mg proteína).

Malato desidrogenase (MDH)

A reação da MDH foi monitorada durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos em 340nm, em um meio de reação contendo tampão imidazol pH 7,0 (0,05M), NADH 0,2mM e oxaloacetato 0,33mM, ao qual era adicionado o homogeneizado celular. A atividade enzimática de fígado está expressa em nmoles/minuto/mg proteína (mU/mg proteína) e de músculo branco em µmoles/minuto/mg proteína (U/mg proteína).

Glutamato desidrogenase (GDH)

A reação da GDH foi monitorada durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos a 340nm, em um meio de reação contendo 2mL de um coquetel constituído por tampão imidazol pH 7,0 (0,05M), NADH 0,1mM, ADP 1mM, α -cetogluturato 5mM, e

acetato de amônio 250mM, adicionado de homogeneizado celular. A atividade da enzima está expressa em nmoles/minuto/mg proteína (mU/mg proteína).

5.8 Intermediários metabólicos

5.8.1 Preparação dos extratos ácidos

Nas determinações de lactato, piruvato e amônia, os tecidos previamente congelados foram pesados e colocados em tubos de ensaio. Em seguida foram tratados com ácido tricloroacético (TCA) 20% em proporções variáveis para cada tecido, e homogeneizados durante 1 minuto, permanecendo a amostra sempre em gelo fundente. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 x g por 3 minutos e o sobrenadante foi utilizado nas determinações dos intermediários.

5.8.2 Preparação dos extratos alcalinos

Nas determinações de glicogênio, o tecido foi pesado e colocado em tubos de ensaio, ao qual era adicionado 1mL de KOH 6,0N. Em seguida, os tubos foram mantidos em banho fervente por 5 minutos e posteriormente agitados para a dissolução completa dos tecidos.

5.8.3 Preparação dos extratos neutros

Na determinação de glicose, aminoácidos livres, ácidos graxos, triglicerídeos e proteína, os tecidos foram homogeneizados em água destilada utilizando-se um homogeneizador tipo Potter Elvehjem e centrifugados a 12.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação dos intermediários.

5.9 Determinação dos intermediários metabólicos

5.9.1 Glicose

A quantificação de glicose foi realizada pelo método da Glicose Oxidase (TRINDER, 1969) nos homogeneizados de fígado e músculo branco e no plasma. Uma amostra de 10 μ L (plasma total ou extrato neutro dos demais tecidos) e 190 μ L de reagente do kit foram pipetados em uma micro-placa, incubados a 37°C no escuro por 10 minutos, seguido de leitura em espectrofotômetro a 525nm com um leitor de micro-placas (Termomax[®], Molecular Devices). Seu valor está expresso em mg/g de tecido ou mg/mL de plasma.

5.9.2 Glicogênio

O glicogênio foi quantificado segundo Bidinotto et al. (1998) nos homogeneizados celulares de fígado e músculo branco. Transferiam-se 250µL do extrato alcalino para um tubo limpo, ao qual eram adicionados 3ml de etanol P.A. Em seguida, adicionava-se 100µL de K₂SO₄ 10%. Após agitação, o tubo era centrifugado a 5000 x g por 3 minutos, e o sobrenadante era descartado, invertendo-se o tubo. O precipitado era ressuspenso em 2,5mL de água destilada, o tubo era agitado e as amostras, utilizadas para determinação de glicose pelo método de Dubois (1956). Esta análise consiste na adição de um volume adequado de dissolução a 500µL de fenol 4,1 % e 2,0mL 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 480nm. A concentração de açúcares totais foi estimada contra um padrão de glicose 1mM e está expressa em µmoles de glicosil glicose/mg de tecido.

5.9.3 Lactato

A concentração de lactato nos tecidos e no plasma foi determinada segundo o método de Harrower e Brown (1972), que se baseia na complexação do lactato com o CuSO₄, sendo o lactato revelado pelo p-fenilfenol em ácido sulfúrico. Para as determinações, o extrato ácido era diluído em 500µL de água destilada e em seguida 20µL de CuSO₄ 4% e 3,5mL de H₂SO₄ concentrado eram adicionados lentamente e depois os tubos eram agitados para a mistura das fases. Após fervura por 5 minutos, esfriavam-se e adicionavam-se 75µL de p-fenilfenol. Esperava-se 1 hora, agitando a cada 15 minutos, e após nova fervura por 1,5 minutos procedia-se à leitura óptica em 570nm. Utilizou-se como padrão uma solução de 100nmoles de ácido láctico e os valores estão expressos em µmoles/g tecido ou mL de plasma.

5.9.4 Piruvato

O piruvato foi determinado segundo Lu (1939) pela reação da dinitrofenilhidrazina nos extratos de fígado, músculo branco e plasma. O extrato ácido era diluído em 500µl de água destilada. À mistura eram adicionados 250µL de dinitrofenilhidrazina que permanecia em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, 3ml de NaOH (1,3N) eram adicionados à reação e a leitura óptica era feita em 440nm. A concentração de piruvato foi estimada contra um padrão de 100nmoles de piruvato de sódio sendo expressa em µmoles/g tecido ou mL de plasma.

5.9.5 Aminoácidos livres (AAL)

Os AAL foram determinados por uma modificação do método de Copley (1941) nos extratos celulares de fígado e músculo branco e no plasma. Os extratos neutros foram diluídos em 200 μ L de água destilada e posteriormente 2mL de ninhidrina 0,1% (em propanol) foram adicionados à reação. Os tubos de ensaio foram vedados para impedir a evaporação da ninhidrina e mantidos em banho-maria a 40°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em 570nm contra um padrão 100nmoles de ácido aminoacético sendo os valores expressos em μ moles/g tecido ou mL de plasma.

5.9.6 Proteínas solúveis

O teor de proteína das amostras de fígado, músculo branco e plasma foi determinado segundo Kruger et al. (1994) em 10 μ L de amostra (plasma total e demais tecidos preparados em extrato neutro) aos quais foram adicionados 190 μ L de reativo de Bradford (100mg de Coomassie blue G250 em 50mL de etanol 95% seguido de adição de 100mL de ácido fosfórico 85% e, volume completado para um litro com água destilada). Após esta mistura ser incubada à temperatura ambiente, no escuro, por 10 minutos, a leitura era feita a 620nm em um leitor de micro-placas (Termomax[®], Molecular Devices) contra um padrão de albumina (1mg/mL). Os valores estão expressos em mg/g de tecido ou mg/mL de plasma.

5.9.7 Amônia

A concentração de amônia foi determinada por Nesslerização (GENTZKOW, 1942), em um volume adequado de extrato ácido transferido para um tubo de ensaio contendo água destilada, em um volume final de 2,0mL ao qual se adicionava 0,5mL de reativo de Nessler. Após vinte minutos em repouso, a leitura óptica era realizada em 420nm. A concentração foi estimada contra um padrão contendo 100nmoles e os valores estão expressos em μ moles/g tecido ou mL de plasma.

5.9.8 Triacilgliceróis

A determinação de triacilgliceróis foi feita com o Kit Labtest Liquiform. Em um volume de 10 μ L de plasma total ou de extrato neutro de fígado e músculo branco, eram adicionados 190 μ L do reativo do Kit. Após esta mistura ser incubada a 37°C por 10 minutos, a leitura das amostras era feita em 525nm em um leitor de micro-placas (Termomax[®], Molecular Devices). A leitura era realizada contra um padrão de triacilgliceróis 200mg/dL. As concentrações de triacilglicerol das amostras estão expressas em mg/g de tecido ou mg/mL de plasma.

5.9.9 Ácidos graxos livres

As concentrações de ácidos graxos livres (AGL) foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Norvák (1965). Eram adicionados 1,0mL de solução Dole (heptana, álcool isopropílico e ácido sulfúrico na proporção de 1: 4:0,1) na amostra constituída de alíquotas adequadas de plasma, fígado e músculo branco, seguida de agitação por 2 minutos. Posteriormente, eram adicionados 1,0mL de heptano e 2,0mL de água destilada, agitando-se novamente por inversão. Uma amostra equivalente a 600 μ L da fase superior era retirada e adicionada a uma mistura de clorofórmio:heptano (5:1 v/v), e 1,0mL de reagente de cobalto. O reagente de cobalto é constituído por 1,32 volume de trietanolamina + 10 volumes de solução A (solução saturada de K_2SO_4 , 6g $CO(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ + 0,8mL de ácido acético glacial em água fervente) + 7 volumes de solução B (solução saturada de Na_2SO_4). Na seqüência, as amostras eram fortemente agitadas por 30 segundos e centrifugadas por 2 minutos a 3.000 x g. Desta mistura, retirava-se uma alíquota de 600 μ L à qual se adicionava 600 μ L de solução indicadora, constituída de 0,4% de α -nitroso β -naftal em etanol, diluída 12,5 vezes. A leitura óptica era realizada em 500nm e a concentração foi estimada contra um padrão de ácido palmítico 4mM e expressa em μ moles/g tecido ou mL de plasma.

5.10 Análise estatística

Os experimentos foram realizados considerando-se três tratamentos (3 dietas) com 3 repetições em um delineamento experimental totalmente casualizado. Foi aplicado o teste ANOVA one-way para cada tratamento para verificar a normalidade dos dados e similaridade de condições entre as repetições. O teste Kruskal-Wallis ANOVA on ranks foi aplicado para excluir a possibilidade de diferença aleatória entre as triplicatas ($P=1.00$). Subsequentemente, ANOVA one-way foi aplicada para todos os dados para comparar as médias entre os tratamentos. Quando foram encontradas diferenças significativas ($P<0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo pós-teste de Tukey. Todos os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. (erro padrão da média) (com $n=24$ para parâmetros de crescimento e $n=15$ para o restante dos dados).

6 RESULTADOS

6.1 Desempenho Produtivo

A diminuição do conteúdo de lipídio e o aumento concomitante do teor de carboidrato nas dietas experimentais resultaram em diferenças significativas nos parâmetros de crescimento dos tambaquis durante o período experimental de 45 dias (Figura 2). As maiores porcentagens de ganho em peso, ganho em comprimento, consumo relativo e fator de condição foram apresentadas pelos animais alimentados com a dieta II (40,5% CHO e 9,1% lipídio) seguidos pelos peixes alimentados com a dieta I (30,5% CHO e 13,7% lipídio).

A taxa de conversão alimentar e a TEP mantiveram-se constantes entre os peixes alimentados com diferentes dietas. Os peixes alimentados com a dieta I apresentaram os maiores valores de TCE seguidos pelos peixes alimentados com a dieta II (Figura 2).

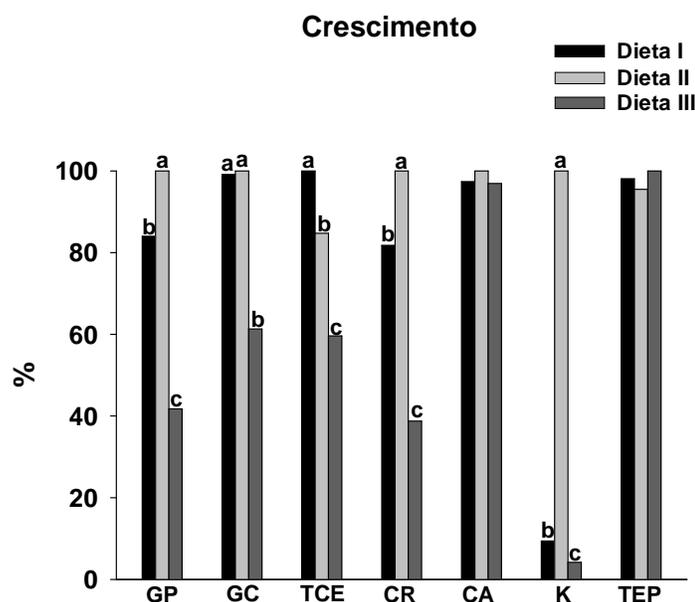


FIGURA 2: Desempenho produtivo em % de tambaquis alimentados com diferentes taxas carboidrato/lipídio(C/L) em três dietas experimentais: I (30,5C-13,7L), II (40,5C-9,1L), III (50,0C-4,8L). Diferentes letras significam diferenças estatísticas para $p < 0.05$. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=24). GP-ganho em peso, GC-ganho em comprimento, TCE-taxa de crescimento específico, CR-consumo relativo, CA-conversão alimentar, K-fator de condição, TEP-taxa de eficiência protéica.

6.2 Índice Hepato-Somático

Os peixes alimentados com a maior relação carboidrato/lipídio (dieta III) apresentaram redução significativa do índice hepato-somático quando comparados aos peixes alimentados com as outras dietas (Figura 3).

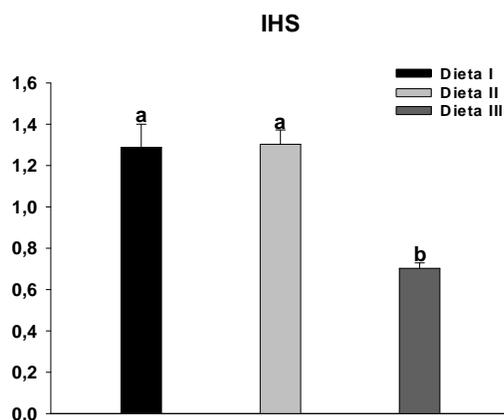


FIGURA 3: Índice hepato-somático (IHS) de tambaquis alimentados com diferentes taxas carboidrato/lipídio em três dietas experimentais: I (30,5C-13,7L), II (40,5C-9,1L), III (50,0C-4,8L). Diferentes letras significam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=24).

6.3 Enzimas Digestivas

Os dados de atividade das enzimas digestivas de tambaquis alimentados com diferentes taxas carboidrato/lipídio estão apresentados na Tabela 2. Foi detectada hidrólise de proteína, carboidrato e lipídio ao longo de todo o trato digestório (Figuras 4, 5 e 6).

6.3.1 Estômago

A atividade da protease inespecífica estomacal aumentou significativamente nos peixes alimentados com a dieta II em comparação aos peixes alimentados com as demais dietas (Tabela 2 – Figura 4). A menor atividade específica no estômago ocorreu ao nível máximo de carboidrato e mínimo de lipídio (tratamento III). Os peixes alimentados com as dietas II e III apresentaram as maiores atividades específicas de amilase e lipase em comparação aos peixes alimentados com a dieta I (Figura 4).

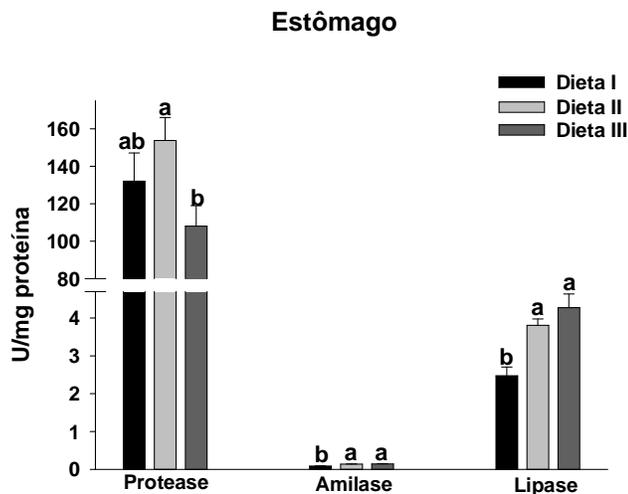


FIGURA 4: Atividades de protease ácida inespecífica, amilase e lipase do estômago de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio em três dietas experimentais: I (30,5C-13,7L), II (40,5C-9,1L), III (50,0C-4,8L). Diferentes letras significam diferenças estatísticas para $p < 0.05$. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. ($n=15$). $U = \mu\text{mol}/\text{minuto}$.

6.3.2 Cecos Pilóricos

Esta porção do trato digestivo de tambaquis apresentou alta atividade proteolítica. As atividades de protease inespecífica e de tripsina diminuíram significativamente nos peixes alimentados com a dieta II em comparação com as demais. A atividade de quimiotripsina aumentou significativamente nos cecos pilóricos dos peixes alimentados com a dieta III em relação às outras dietas (Figura 5).

A atividade amilohidrolítica aumentou significativamente nos cecos pilóricos dos peixes alimentados com a dieta I (menor quantidade de carboidrato) em relação aos demais, enquanto que a atividade lipolítica aumentou significativamente nos peixes alimentados com a dieta III quando comparados aos demais grupos (menor quantidade de lipídio) (Figura 5).

Cecos Pilóricos

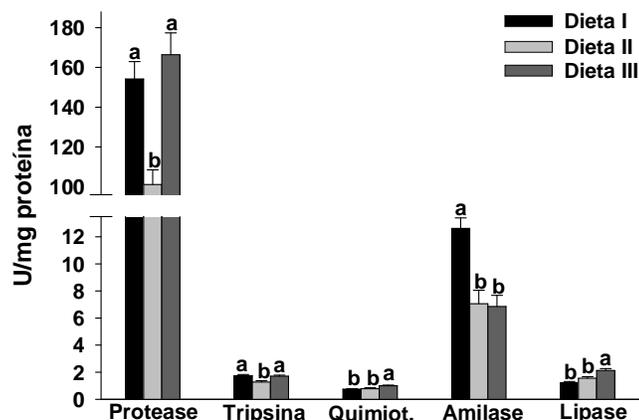


FIGURA 5: Atividades de protease inespecífica, tripsina, quimiotripsina, amilase e lipase de cecos pilóricos de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio em três dietas experimentais: I (30,5C-13,7L), II (40,5C-9,1L), III (50,0C-4,8L). Diferentes letras significam diferenças estatísticas para $p < 0.05$. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. ($n=15$). $U = \mu\text{mol}/\text{minuto}$.

6.3.3 Intestino Anterior

Não houve diferença significativa entre as atividades de tripsina do intestino anterior dos peixes alimentados com as diferentes dietas. Os peixes alimentados com as dietas II e III aumentaram as atividades de quimioitripsina e amilase em comparação à dieta I. Esta porção do trato digestivo apresentou aumento da atividade lipolítica conforme a taxa CHO/L das dietas experimentais (Figura 6).

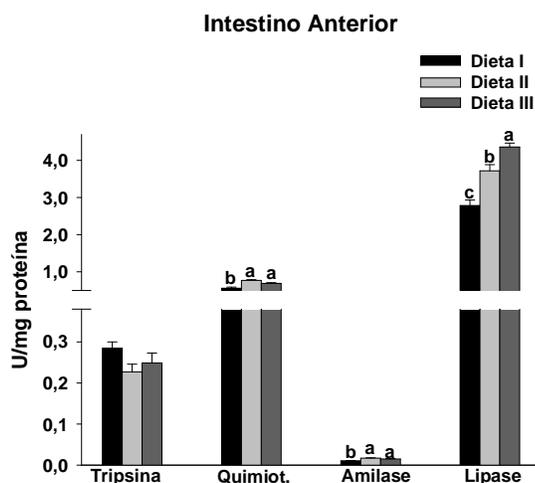


FIGURA 6: Atividades de tripsina, quimiotripsina, amilase e lipase do intestino anterior de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio em três dietas experimentais: I (30,5C-13,7L), II (40,5C-9,1L), III (50,0C-4,8L). Diferentes letras significam diferenças estatísticas para $p < 0.05$. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. ($n=15$). $U = \mu\text{mol}/\text{minuto}$.

6.3.4 Intestino Total

Esta porção do trato digestivo dos peixes alimentados com a dieta III apresentou redução significativa da atividade específica da fosfatase alcalina em relação aos peixes alimentados com as demais dietas (Figura 7).

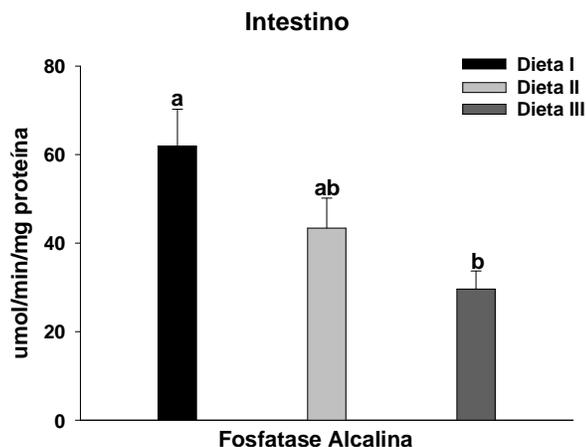


FIGURA 7: Atividade específica da fosfatase alcalina do intestino de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio em três dietas experimentais: I (30,5C-13,7L), II (40,5C-9,1L), III (50,0C-4,8L). Diferentes letras significam diferenças estatísticas para $p < 0.05$. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=15).

TABELA 2: Atividades específicas das enzimas digestivas nas porções do trato gastrointestinal de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio em três dietas experimentais.

Enzima	Porção	Dietas (CHO/L)		
		I (30,5/13,7)	II (40,5/9,1)	III (50,0/4,8)
Protease	E	132,05 \pm 15,01 ^{ab}	153,74 \pm 12,31 ^a	108,01 \pm 10,94 ^b
	C.P	154,20 \pm 8,71 ^a	101,06 \pm 7,38 ^b	166,39 \pm 10,95 ^a
Tripsina	C.P	1,74 \pm 0,08 ^a	1,27 \pm 0,09 ^b	1,70 \pm 0,07 ^a
	I.A	0,28 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,24 \pm 0,02
Quimiotripsina	C.P	0,75 \pm 0,03 ^b	0,78 \pm 0,07 ^b	1,00 \pm 0,05 ^a
	I.A	0,56 \pm 0,03 ^b	0,77 \pm 0,02 ^a	0,69 \pm 0,02 ^a
FALC	I.T	61,87 \pm 8,39 ^a	43,39 \pm 6,77 ^{ab}	29,62 \pm 4,07 ^b
Lipase	E	2,47 \pm 0,23 ^b	3,80 \pm 0,16 ^a	4,27 \pm 0,36 ^a
	C.P.	1,21 \pm 0,10 ^b	1,55 \pm 0,12 ^b	2,12 \pm 0,14 ^a
	I.A	2,78 \pm 0,15 ^c	3,71 \pm 0,17 ^b	4,36 \pm 0,11 ^a
Amilase	E	0,08 \pm 0,006 ^b	0,14 \pm 0,005 ^a	0,14 \pm 0,005 ^a
	C.P.	12,62 \pm 0,77 ^a	7,05 \pm 0,99 ^b	6,85 \pm 0,82 ^b
	I.A	0,01 \pm 0,001 ^b	0,01 \pm 0,001 ^a	0,01 \pm 0,0018 ^a

CHO = carboidrato, L = lipídio, E, estômago; C.P, cecos pilóricos; I.A, intestino anterior; I.T, intestino total; FALC, fosfatase alcalina. Letras diferentes na mesma linha significa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) (média \pm E.P.M.) (n=15). As atividades enzimáticas estão expressas em U/mg de proteína.

6.4 Taxa Tripsina/Quimiotripsina (T/Q)

Os cecos pilóricos de tambaquis alimentados com a dieta III (maior taxa CHO/L) apresentaram a menor taxa T/Q quando comparados aos peixes alimentados com as dietas I e II (Figura 8).

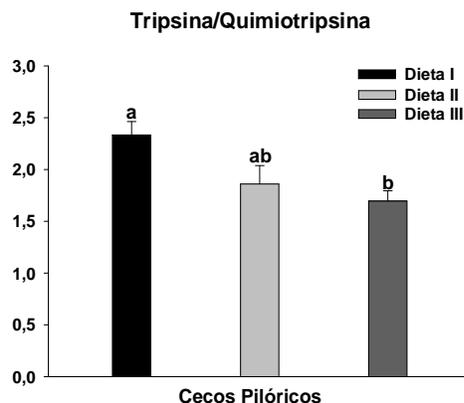


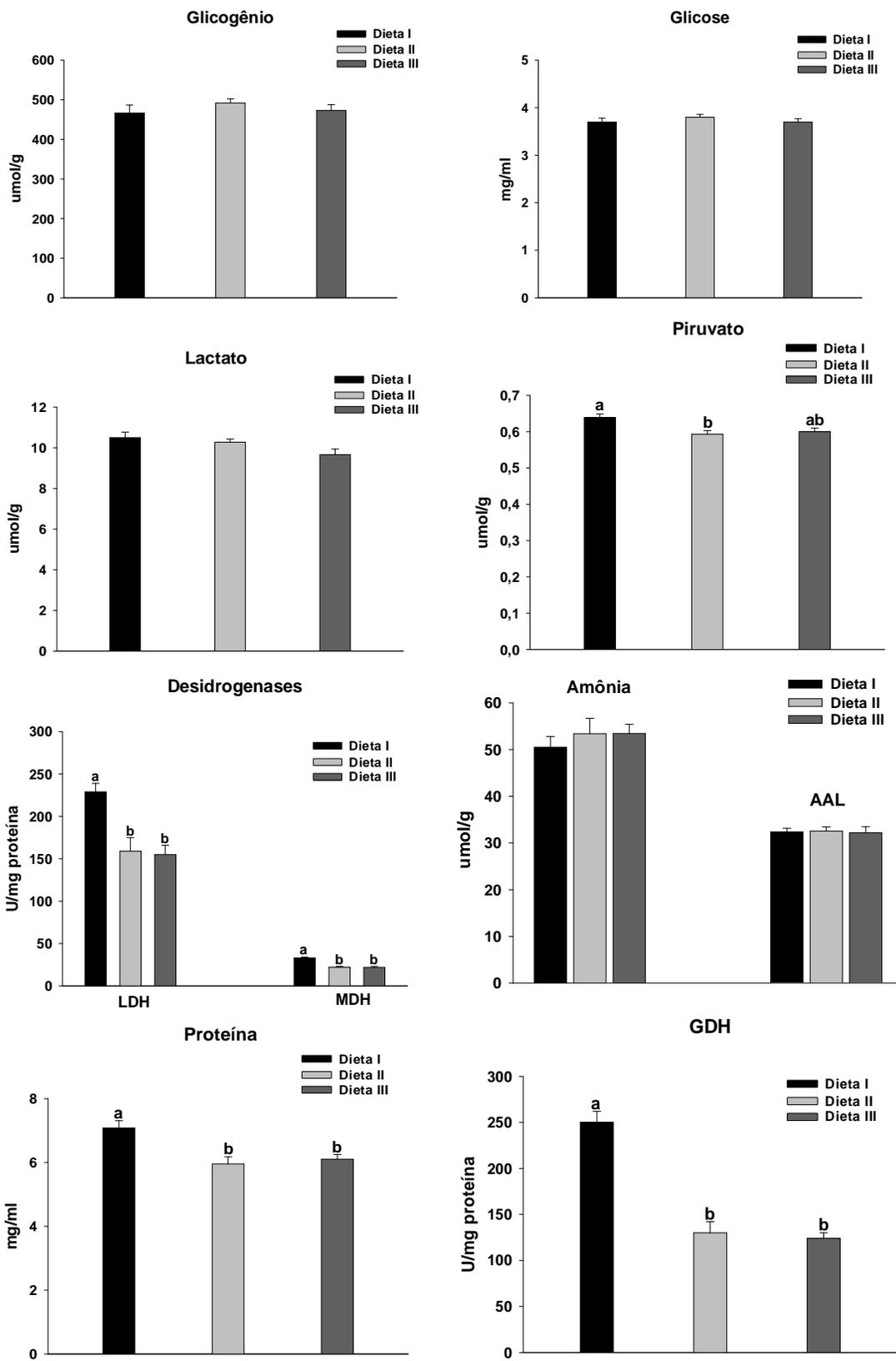
FIGURA 8: Taxa tripsina:quimiotripsina (T/Q) de cecos pilóricos de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio em três dietas experimentais: I (30,5C-13,7L), II (40,5C-9,1L), III (50,0C-4,8L). Diferentes letras significam diferenças estatísticas para $p < 0,05$. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=15).

6.5 Metabolismo Intermediário

6.5.1 Fígado

O perfil metabólico hepático frente às mudanças na composição das dietas experimentais está representado na Tabela 3 e na Figura 9. Neste tecido as concentrações de glicose, glicogênio e lactato não apresentaram diferença significativa entre os peixes alimentados com as diferentes dietas. O teor de piruvato diminuiu significativamente nos peixes alimentados com a dieta II em comparação aos alimentados com as dietas I e III. Este perfil foi acompanhado por uma diminuição significativa das atividades da LDH e MDH nos peixes alimentados com as dietas II e III.

Em relação ao metabolismo protéico, os teores de aminoácidos livres e amônia não apresentaram diferença significativa entre os peixes alimentados com as diferentes dietas experimentais. A concentração de proteína e a atividade da GDH diminuíram significativamente nos peixes alimentados com as dietas II e III quando comparados aos alimentados com a dieta I. No que diz respeito ao metabolismo lipídico, as concentrações de ácidos graxos livres (AGL) e triacilglicerol (TG) reduziram significativamente nos peixes alimentados com as maiores taxa CHO/L (dietas II e III) em relação à dieta I.



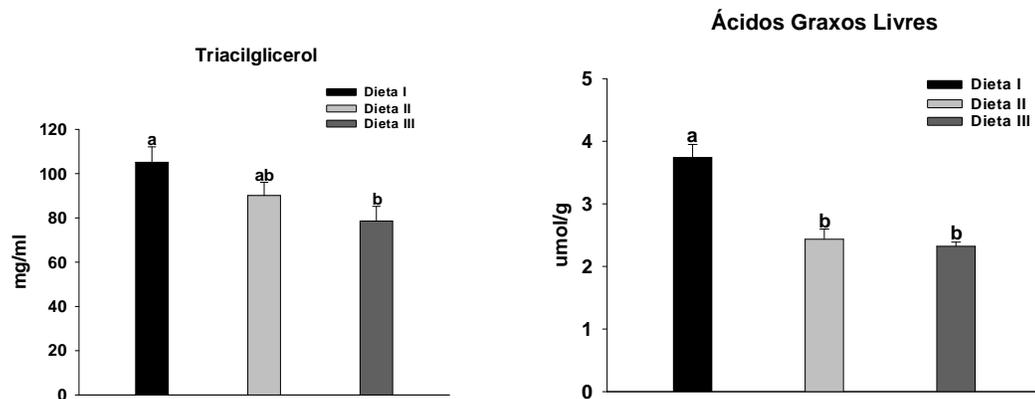


FIGURA 9: Perfil glicídico, protéico e lipídico do fígado de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio em três dietas experimentais: I (30,5C-13,7L), II (40,5C-9,1L), III (50,0C-4,8L). Diferentes letras significam diferenças estatísticas para $p < 0.05$. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=15). LDH-lactato desidrogenase, MDH-malato desidrogenase, AAL-aminoácidos livres, GDH-glutamato desidrogenase. U= μ mol/minuto.

TABELA 3: Média \pm erro padrão da média dos intermediários metabólicos e enzimas, analisados no fígado de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.

	Dietas (CHO/L)		
	I (30,5/13,7)	II (40,5/9,1)	III (50,0/4,8)
Glicogênio*	466,61 \pm 19,93	492,01 \pm 10,300	473,18 \pm 14,43
Glicose**	3,70 \pm 0,08	3,80 \pm 0,06	3,70 \pm 0,07
Lactato*	10,49 \pm 0,27	10,27 \pm 0,15	9,66 \pm 0,27
Piruvato*	0,64 \pm 0,01 ^a	0,59 \pm 0,01 ^b	0,60 \pm 0,01 ^{ab}
Amônia*	50,52 \pm 2,28	53,40 \pm 3,31	53,43 \pm 1,98
AAL*	32,38 \pm 0,77	32,56 \pm 0,86	32,20 \pm 1,28
Proteína**	7,08 \pm 0,22 ^a	5,95 \pm 0,22 ^b	6,10 \pm 0,15 ^b
AGL*	3,74 \pm 0,21 ^a	2,43 \pm 0,16 ^b	2,32 \pm 0,07 ^b
TG**	105,10 \pm 7,00 ^a	90,10 \pm 6,00 ^{ab}	78,60 \pm 6,60 ^b
LDH***	229,00 \pm 10,00 ^a	159,00 \pm 16,00 ^b	155,00 \pm 11,00 ^b
MDH***	33,00 \pm 1,00 ^a	22,00 \pm 1,00 ^b	21,80 \pm 1,00 ^b
GDH***	250,00 \pm 12,00	130,00 \pm 12,00	124,00 \pm 6,00

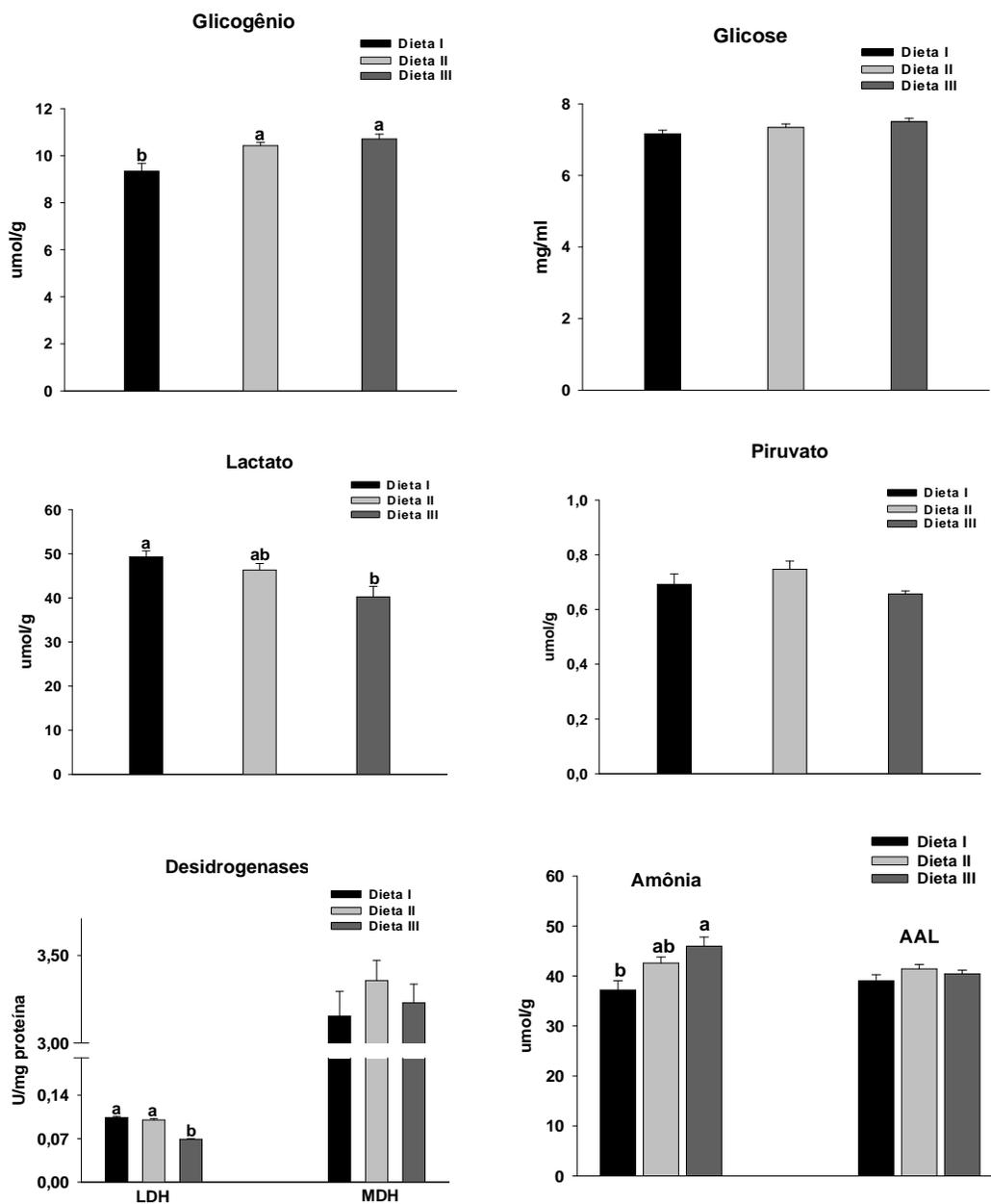
Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas ($P < 0,05$). CHO = carboidrato e L = lipídio. U = nmol/minuto. *Expressos em $\mu\text{mol/g}$ tecido; **Expressos em mg/ml; ***Expressos em U/mg proteína. AAL-aminoácidos livres; AGL-ácidos graxos livres; TG-triacilgliceróis; LDH-lactato desidrogenase; MDH-malato desidrogenase; GDH-glutamato desidrogenase.

6.5.2 Músculo Branco

O perfil metabólico do músculo branco frente às mudanças na composição das dietas experimentais está representado na Tabela 4 e na Figura 10. Neste tecido não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de glicose e piruvato. A concentração de glicogênio aumentou significativamente no músculo branco dos peixes alimentados com as dietas II e III (em função do aumento de carboidrato na dieta) quando comparados à dieta I. O teor de lactato diminuiu significativamente a partir da dieta I. Este perfil foi acompanhado por diminuição significativa da atividade de LDH no músculo dos peixes alimentados com a dieta III quando comparados às dietas I e II. A atividade da MDH manteve-se constante.

Em relação ao metabolismo protéico, a concentração de aminoácidos livres não apresentou variações significativas. A concentração de amônia aumentou no músculo dos peixes alimentados com a dieta contendo menos lipídio e mais carboidrato (dieta III) em

relação às dietas I e II, e este perfil foi acompanhado pela redução do teor de proteína neste grupo. Em relação ao metabolismo lipídico, a concentração de TG diminuiu enquanto que a de AGL aumentou significativamente no músculo dos peixes alimentados com a dieta III às dietas I e II.



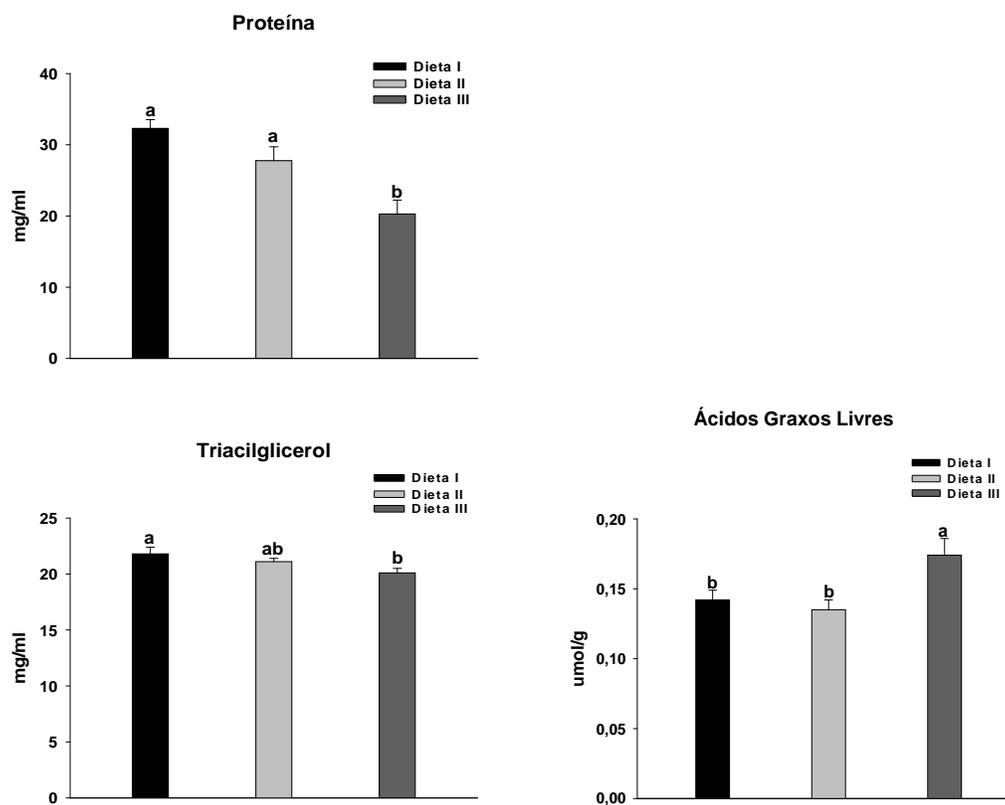


FIGURA 10: Perfil glicídico, protéico e lipídico do músculo branco de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio em três dietas experimentais: I (30,5C-13,7L), II (40,5C-9,1L), III (50,0C-4,8L). Diferentes letras significam diferenças estatísticas para $p < 0.05$. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. ($n=15$). LDH-lactato desidrogenase, MDH-malato desidrogenase, AAL-aminoácidos livres. U= $\mu\text{mol/segundo}$.

TABELA 4: Média \pm erro padrão da média dos intermediários metabólicos e enzimas, analisados no músculo branco de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.

	Diets (CHO/L)		
	I (30,5/13,7)	II (40,5/9,1)	III(50,0/4,8)
Glicogênio *	9,33 \pm 0,34 ^b	10,42 \pm 0,14 ^a	10,70 \pm 0,20 ^a
Glicose **	7,16 \pm 0,10	7,34 \pm 0,10	7,50 \pm 0,10
Lactato *	49,28 \pm 1,36 ^a	46,31 \pm 1,46 ^{ab}	40,23 \pm 2,38 ^b
Piruvato *	0,69 \pm 0,03	0,74 \pm 0,03	0,65 \pm 0,01
Amônia *	37,19 \pm 1,87 ^b	42,57 \pm 1,21 ^{ab}	45,96 \pm 1,81 ^a
AAL *	39,00 \pm 1,25	41,41 \pm 0,87	40,42 \pm 0,75
Proteína **	32,30 \pm 1,22 ^a	27,76 \pm 1,95 ^a	20,28 \pm 1,95 ^b
AGL *	0,14 \pm 0,01 ^b	0,13 \pm 0,01 ^b	0,17 \pm 0,01 ^a
TG **	21,80 \pm 0,60 ^a	21,10 \pm 0,30 ^{ab}	20,10 \pm 0,40 ^b
LDH ***	104,00 \pm 2,00 ^a	100,00 \pm 2,00 ^a	69,00 \pm 1,00 ^b
MDH ***	3154 \pm 140	3357 \pm 115	3229 \pm 107

Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas ($P < 0,05$). CHO = carboidrato e L = lipídio. U = nmol/minuto. * Expressos em $\mu\text{mol/g}$ tecido; ** Expressos em mg/ml; *** Expressos em U/mg proteína. AAL-aminoácidos livres; AGL-ácidos graxos livres; TG-triacilgliceróis; LDH-lactato desidrogenase; MDH-malato desidrogenase.

6.5.3 Plasma

O perfil metabólico do plasma frente às mudanças na composição das dietas experimentais está representado na Tabela 5 e na Figura 11. As concentrações de glicose e lactato não variaram significativamente. A concentração de piruvato aumentou nos peixes alimentados com as dietas II e III em comparação à dieta I. Em relação ao metabolismo protéico, a concentração de amônia plasmática aumentou significativamente nos peixes alimentados com a dieta III (maior teor de carboidrato com o menor teor de lipídio), ao mesmo tempo em que os teores de aminoácidos livres e proteína total diminuíram neste grupo em comparação às demais dietas. Em relação ao metabolismo lipídico, o no plasma observou-se aumento da concentração de TG e redução do teor de AGL nos peixes alimentados com a dieta III em relação às dietas I e II.

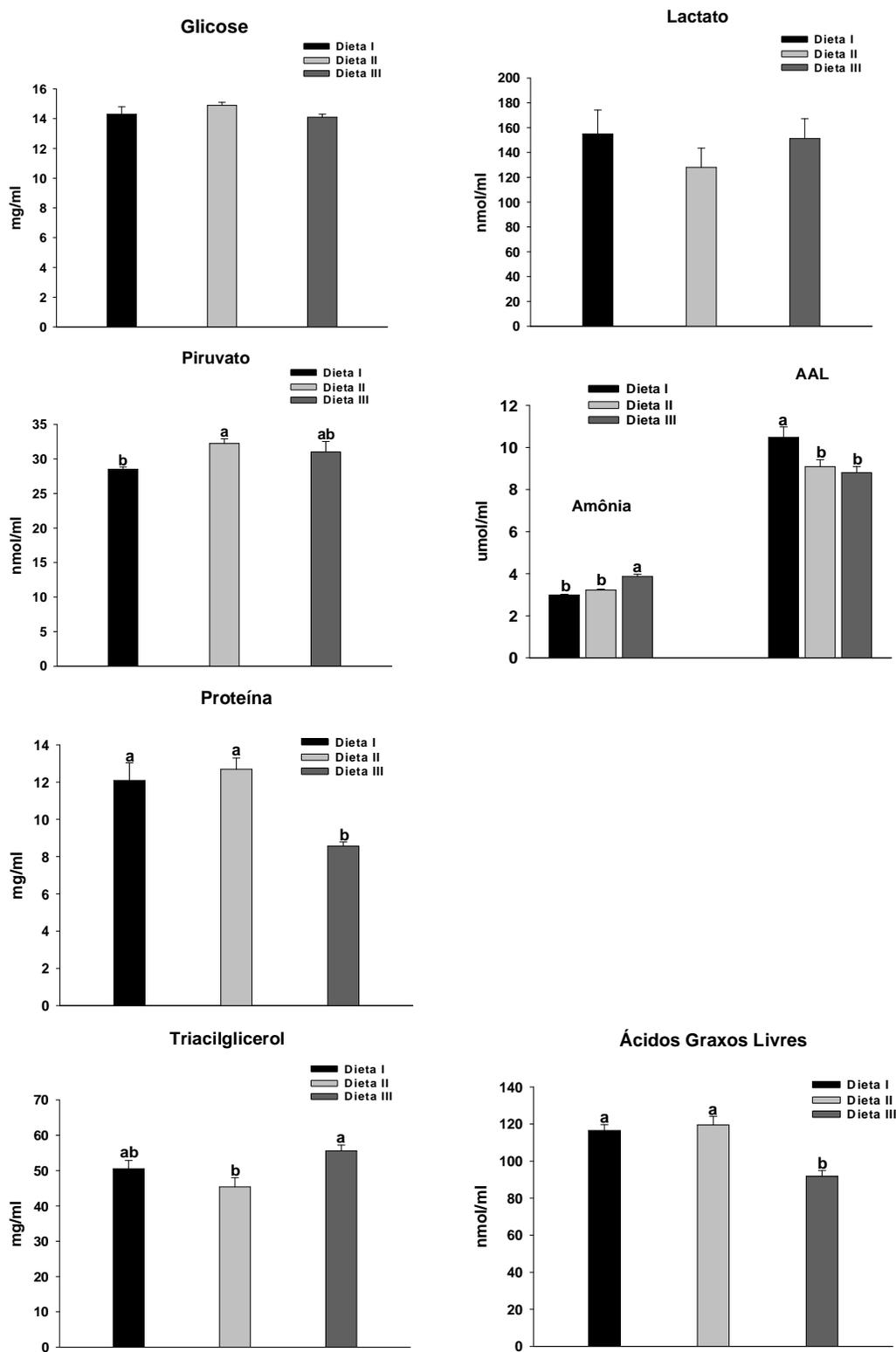


FIGURA 11: Perfil glicídico, protéico e lipídico do plasma de *C. macropomum* alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio em três dietas experimentais: I (30,5C-13,7L), II (40,5C-9,1L), III (50,0C-4,8L). Diferentes letras significam diferenças estatísticas para $p < 0.05$. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=15). AAL-aminoácidos livres.

TABELA 5: Média \pm erro padrão da média dos intermediários metabólicos analisados no plasma de tambaqui alimentado com diferentes taxas carboidrato/lipídio.

	Diets (CHO/L)		
	I (30,5/13,7)	II (40,5/9,1)	III(50,0/4,8)
Glicose ^{***}	14,30 \pm 0,50	14,90 \pm 0,20	14,10 \pm 0,20
Lactato [*]	154,96 \pm 19,19	128,02 \pm 15,43	151,27 \pm 15,89
Piruvato [*]	28,51 \pm 0,33 ^b	32,23 \pm 0,67 ^a	31,0 \pm 1,51 ^{ab}
Amônia ^{**}	2,98 \pm 0,03 ^b	3,22 \pm 0,04 ^b	3,86 \pm 0,11 ^a
AAL ^{**}	10,48 \pm 0,49 ^a	9,08 \pm 0,32 ^b	8,80 \pm 0,29 ^b
Proteína ^{***}	12,08 \pm 0,95 ^a	12,69 \pm 0,60 ^a	8,56 \pm 0,21 ^b
AGL [*]	116,52 \pm 3,18 ^a	119,47 \pm 4,65 ^a	91,76 \pm 3,14 ^b
TG ^{***}	50,50 \pm 2,40 ^{ab}	45,40 \pm 2,60 ^b	55,60 \pm 1,60 ^a

Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas ($P < 0,05$). CHO = carboidrato e L = lipídio. ^{*} Expressos em nmol/ml; ^{**} Expressos em μ mol/g tecido; ^{***} Expressos em mg/ml. AAL-aminoácidos livres; AGL-ácidos graxos livres; TG-triacilgliceróis.

7 DISCUSSÃO

Os peixes são conhecidos por utilizar preferencialmente proteína como recurso de energia ao invés de carboidrato e lipídio. Entretanto, além de ser este o recurso mais caro da ração, o uso de proteína para atender a demanda energética implica em maior excreção nitrogenada nos tanques de criação. Dessa maneira, a otimização da utilização de proteína da dieta com a inclusão cuidadosa de lipídios e/ou carboidrato é muito importante, tanto do ponto de vista nutricional, como econômico e ambiental (MOHANTA et al., 2008). Essa minimização da quantidade de proteína nas dietas com o aumento de carboidratos e lipídios para suprir a demanda energética tornou-se um dos principais objetivos de pesquisa em nutrição de peixes (FERNÁNDEZ et al., 2007); e uma das principais ferramentas para se avaliar a adequação nutricional da dieta é a medida do desempenho produtivo e dos parâmetros digestivos e metabólicos da espécie, como averiguados no presente estudo. Além disso, segundo Meton et al. (1999), fatores somáticos, tais como peso corporal e hepático, e fatores metabólicos, tais como concentração de metabólitos e determinação de atividade enzimática, são atualmente usados para se determinar a capacidade de adaptação metabólica de peixes à dieta oferecida; por exemplo, o índice hepato-somático (IHS), o teor de glicogênio hepático e a atividade de enzimas chave do metabolismo intermediário têm estreita relação com o estado nutricional e a taxa de crescimento em peixes (BASTROP; JÜRSS; WACKE, 1992; BONAMUSA et al., 1992; BRAUGE; MEDALE; CORRAZE, 1994; PELLETIER et al., 1994; HONORATO, 2008).

7.1 Desempenho Produtivo

O crescimento e a eficiência de deposição de nutrientes em peixes são as ferramentas mais importantes e precisas no estudo da eficiência alimentar e exigências nutricionais das espécies (BELAL, 2005), já que o conteúdo de lipídio, proteína e carboidrato e suas inter-relações influencia o seu crescimento (GAYE-SIESSEGER et al., 2007). Embora os níveis de proteína no crescimento dos peixes sejam importantes, a quantidade de energia deve ser considerada (HAKIM et al., 2006). Além disso, as condições de crescimento do peixe são muito importantes para a interpretação de parâmetros biológicos (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009) tais como a capacidade digestiva e o perfil metabólico.

Os tambaquis alimentados com a dieta contendo a maior taxa CHO/L (dieta III) tiveram crescimento reduzido, como evidenciado pelos menores valores de GP, GC, TCE e K. Essa resposta deveu-se provavelmente à diminuição significativa do consumo alimentar (Figura 2), reduzindo assim o consumo global de nutrientes, dentre eles as proteínas. Esta ingestão reduzida de proteínas resulta em uma deficiência de aminoácidos que, por sua vez, prejudica o crescimento (MELO et al., 2006). O crescimento reduzido pode ter sido devido ainda à baixa utilização de carboidratos como recurso energético quando o teor deste nutriente está acima de 40% na dieta. Por outro lado, os tambaquis alimentados com as dietas II apresentaram maior GP e GC; além de um fator de condição (K) maior quando comparado aos dos peixes alimentados com as dietas I e III, indicando que tiveram um crescimento mais saudável e fizeram bom uso do alimento oferecido. O fator de condição é uma medida de robustez e de saúde, utilizada como forma de avaliar o bem estar do animal além de refletir as reservas energéticas acumuladas, sendo considerado um bom indicador da condição fisiológica (NG et al., 2000; MIHELAKAKIS; TSOLKAS; YOSHIMATSU, 2002; CHAGAS et al., 2007; GAUTHIER; CAMPBELL; COUTURE, 2008; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009).

Tal como observado em tambaqui, o crescimento de juvenis de corvina *Sciaenopus ocellatus*, salmão do Atlântico *Salmo salar*, bacalhau de Murray *Maccullochella peelii peelii*, rohu *Labeo rohita*, piracanjuba *Brycon orbignyanus* e dourada, é maior nos animais alimentados com dieta que apresentavam menor taxa CHO/L comparados aos alimentados com maior taxa (CRAIG; WASHBURN; GATLIN, 1999; HEMRE; SANDNES, 1999; DE SILVA et al., 2002; SATPATHY; MUKHERJEE; RAY, 2003; BORBA; FRACALLOSSI; PEZZATO, 2006; COUTO et al., 2008). Entretanto, em enguia européia *Anguilla anguilla*, turbot (pregado) *Psetta maxima*, halibut *Paralichthys olivaceus* e pacu, o crescimento é reduzido com o aumento do teor de lipídio nas dietas em detrimento do teor de carboidrato (menor taxa CHO/L), indicando que, diferentemente de tambaqui, essas espécies utilizam mais carboidrato que lipídio para o crescimento (SUÁREZ et al., 1995; REGOST et al., 2001; LEE; KIM, 2005; ABIMORAD; CARNEIRO, 2007). Em outras espécies, tais como perca gigante *Lates calcarifer*, linguado *Solea senegalensis*, pintado, sargo *Diplodus sargus* e dourada, as diferentes taxas CHO/L das dietas não alteram o crescimento (CATACUTAN; COLOSO, 1997; DIAS et al., 2004; MARTINO et al., 2005; SÁ; POUSÃO-FERREIRA; OLIVA-TELES, 2007; ENES et al., 2008).

A taxa de conversão alimentar e a taxa de eficiência protéica (TEP) dos tambaquis não se alteraram, indicando que as diferentes taxas carboidrato/lipídio das dietas

não influenciaram a conversão do alimento e da proteína em peso corporal. A comparação dos parâmetros de crescimento entre as espécies é complexa visto que taxas de conversão alimentar e de eficiência protéica variam interespecificamente de acordo com o tamanho, o nível de atividade e os parâmetros ambientais (temperatura, concentração de amônia, oxigênio dissolvido e etc.) do sistema de cultivo.

Os peixes alimentados com as dietas I e II, além de apresentarem maiores valores de taxa de crescimento, também apresentaram os maiores índices hepato-somáticos (IHS) (Figura 3). Desde que mudanças morfológicas são resultantes da mobilização endógena de lipídios, proteínas e carboidratos, o IHS permite monitorar a dinâmica de utilização das reservas energéticas. Desse modo, os altos valores de IHS dos peixes alimentados com as dietas I e II podem indicar que o excesso de lipídio foi armazenado no fígado, corroborado pelo aumento de tamanho e pelos dados do metabolismo lipídico (Figura 9) deste órgão (lipogênese aumentada nos peixes alimentados com as dietas I e II); e, a redução do IHS dos tambaquis alimentados com maiores teores de carboidrato na dieta (dieta III) pode indicar que o excesso de carboidrato não foi estocado no fígado, também corroborado pela lipólise (Figura 9) acentuada no fígado dos peixes deste grupo. Entretanto, estudos têm demonstrado que, para alguns peixes, o aumento do tamanho do fígado ocorre com o aumento do nível de carboidrato da dieta em consequência do acúmulo de glicogênio como reserva energética (KIM; KAUSHIK, 1992; WILSON, 1994; HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHK, 2002). Mas, a importância dessa reserva não está ainda bem estabelecida (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHK, 2002). Muitos peixes dependem dos estoques de lipídio e proteínas durante a falta de alimento, e os lipídios corporais constituem o principal modo de estoque de energia, especialmente em espécie reofílicas como o tambaqui, que utilizam lipídio durante os períodos de migração (SUÁREZ et al., 1995; BORBA; FRACALOSSO; PEZZATO, 2006).

Tal como em tambaqui, o IHS de corvina, bacalhau de Murray, linguado e halibut é maior quando são alimentados com dieta contendo menor taxa CHO/L em comparação com os alimentados com a maior taxa (CRAIG; WASHBURN; GATLIN, 1999; DE SILVA et al., 2002; DIAS et al., 2004; LEE; KIM, 2005). Entretanto, em juvenis de dourada acontece o contrário; peixes alimentados com as maiores taxas CHO/L apresentam os maiores valores de IHS (METÓN et al., 1999; COUTO et al., 2008) ou não apresentaram diferença em relação a esse parâmetro frente à composição da dieta (ENES et al., 2008). Outras espécies, como perca gigante, *P. maxima*, pintado, piracanjuba e sargo, não apresentam o IHS afetado pelas diferentes taxas CHO/L das dietas (CATACUTAN; COLOSO, 1997; REGOST et al., 2001; MARTINO et al., 2005; BORBA; FRACALOSSO;

PEZZATO, 2006; SÁ; POUSÃO-FERREIRA; OLIVA-TELES, 2007). Isto indica que existem diferenças entre as espécies no que diz respeito à dinâmica de utilização das reservas energéticas, visto que algumas acumulam glicogênio como reserva no fígado, enquanto outras acumulam lipídio neste órgão.

7.2 Enzimas Digestivas

A habilidade dos peixes em transformar e usar os nutrientes da dieta depende da distribuição das enzimas digestivas no trato digestivo e do conteúdo enzimático do suco digestivo; crucial para a digestão química. O trato gastrointestinal é o sistema de órgãos que é inicialmente afetado por mudanças na ingestão de nutrientes (HAKIM; HARPAZ; UNI, 2009), já que a origem, o tipo e a quantidade desses podem alterar o perfil enzimático do trato digestório dos peixes (DEBNATH et al., 2007). Neste contexto, alguns estudos mostram que os peixes apresentam capacidade de modular seu perfil digestivo frente a diferentes recursos alimentares (EL-SAYED; NMARTÍNEZ; MOYANO, 2000; GARCÍA-CARREÑO et al., 2002), tipos de nutrientes (CHIU; PAN, 2002; EUSEBIO; COLOSO, 2002; GERMAN; HORN; GAWLICKA, 2004) e níveis de nutrientes (LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; MELO et al., 2006; CORRÊA et al., 2007; DEBNATH et al., 2007) da dieta, sendo essa uma característica adaptativa das espécies para melhor utilização da dieta oferecida (MORAES; BIDINOTTO, 2000). Além disso, a digestão do alimento parece ser um mecanismo de controle primário de regulação do crescimento (TORRISSEN; SHEARER, 1992), significando que a taxa de crescimento é dependente do sistema digestório, onde ocorrem os processos de digestão e absorção.

Dessa forma, o conhecimento da fisiologia digestiva e da capacidade de resposta à composição da dieta pode ajudar na escolha de ingredientes mais apropriados e no desenvolvimento de dietas direcionadas ao cultivo de peixes (MOHANTA et al., 2008; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2009). Além disso, análise das atividades de enzimas digestivas é um método fácil e confiável que pode ser usado como indicador do processo digestivo e da condição nutricional do peixe (EROLDOĞAN et al., 2008). Entretanto, só recentemente alguns dados acerca da composição da dieta *versus* adaptação de enzimas digestivas em teleósteos de água doce vêm sendo apresentados (LUNDSTEDT; MELO; MORAES, 2004; DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; MELO et al., 2006; CORRÊA et al., 2007).

No presente estudo, foi detectada a hidrólise de proteína, carboidrato e lipídio ao longo de todo o trato digestório de tambaqui e esse resultado era esperado já que a morfologia e a fisiologia do trato digestivo são mais flexíveis em peixes onívoros (HAKIM et

al., 2006). Além disso, os peixes onívoros e herbívoros apresentam uma combinação do comprimento intestinal com ampla distribuição das enzimas digestivas ao longo do intestino, o que aumenta a sua capacidade de utilização dos vários componentes da dieta (TENGGJARENKUL et al., 2000). O tambaqui, além de ser uma espécie onívora é também oportunista e isso deve influenciar fortemente seu perfil enzimático digestivo. Sabe-se que os peixes da Amazônia são oportunistas no que se refere ao seu hábito alimentar (VAL; ALMEIDA-VAL, 1995), pois, além das mudanças relacionadas ao seu ciclo biológico, os animais enfrentam uma mudança sazonal extrema na região, o que representa a introdução de variáveis extras na análise dos seus perfis enzimáticos digestivos. Segundo López-Vásquez et al. (2009), esses peixes apresentam todo o conjunto de enzimas digestivas sempre disponíveis, como uma estratégia útil para utilizar todos os alimentos, embora isto demande gasto energético extra para a manutenção deste ‘arsenal’ enzimático.

7.2.1 Proteases

Sabe-se que a utilização de aminoácidos pelos peixes é limitada pela taxa de produção de nutrientes pelas enzimas digestivas ou pela capacidade dos mecanismos de transporte destes nutrientes (TORRISSSEN; LIED; ESPE, 1994; LEMIEUX; BLIER; DUTIL, 1999). Nesse sentido, a avaliação da atividade das proteases digestivas frente à composição da dieta assume grande importância e a detecção destas enzimas nos principais órgãos dos peixes revela uma via comum de digestão das proteínas. Grandes polipeptídeos são quebrados pela pepsina no estômago, seguido pelas atividades de endopeptidases e exopeptidases para degradar a cadeia polipeptídica em aminoácidos para absorção (NATALIA et al., 2004).

No presente estudo, o onívoro tambaqui apresentou altas atividades proteolíticas no estômago e cecos pilóricos, colocando essas duas porções como as principais responsáveis pela maior parte da digestão de proteínas nesta espécie. Estudos prévios com tambaqui já haviam reportado alta atividade proteolítica nestas porções do trato digestório (DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; CORRÊA et al., 2007). A principal função do estômago em vertebrados é o início da digestão de proteína (CHAKRABARTI et al., 1995) e, os cecos pilóricos são, na verdade, uma extensão do intestino onde acontece vigorosa atividade de degradação de proteínas (HARPAZ; UNI, 1999). Segundo Eroldoğan et al. (2008), a digestão de proteínas é um processo complexo em peixes e ocorre não somente no estômago, mas também em outras partes do sistema digestivo tais como cecos pilóricos e intestino. Bezerra et al. (1999), estudando tambaqui, encontraram a maior atividade proteolítica em pH ácido no estômago, enquanto que a atividade alcalina foi maior nos cecos

pilóricos. A digestão de proteína em acará disco *Symphysodon aequifasciata* também ocorreu na região ácida do estômago e na região alcalina do intestino (CHONG et al., 2002). Como foi observado para tambaqui, alto potencial proteolítico também já foi datado em outros peixes não-carnívoros (KUZ'MINA, 1990; HIDALGO; UREA; SANZ, 1999). Esse potencial é plausível se considerarmos que as proteínas de origem vegetal são mais complexas que as de origem animal para serem digeridas. Além disso, o tambaqui possui alta capacidade digestiva proteolítica, visto que no seu ciclo anual de alimentação o zooplâncton (51,1% de proteína) é o recurso mais importante de proteína (SILVA; PEREIRA-FILHO; OLIVEIRA-PEREIRA, 2000).

A atividade da protease estomacal de tambaqui foi responsiva à composição da dieta (Figura 4), indicando que esta atividade proteolítica é influenciada pelos teores de carboidrato e lipídio da dieta. Os peixes alimentados com as menores taxas CHO/L (maiores teores de lipídio nas dietas) apresentaram aumento da atividade de protease inespecífica ácida em comparação aos peixes alimentados com as dietas I e III, além de também terem apresentado maior taxa de crescimento. Outros estudos também sugerem que a capacidade proteolítica é influenciada pela taxa CHO/L da dieta. Em um estudo prévio com a mesma espécie, a atividade de protease ácida diminuiu quando o carboidrato na dieta foi de 50% (maior taxa CHO/L) (CORRÊA et al., 2007). Resultado semelhante foi observado para o carnívoro pintado submetido a dietas com crescentes níveis de lipídio (LUNDSTEDT, 2003). Entretanto, foi observada maior capacidade proteolítica através de todo trato gastrointestinal em dentão *Dentex dentex* alimentado com dietas contendo maior taxa CHO/L (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2009). Em rohu e carpa comum, a atividade proteásica diminui com o aumento da suplementação de óleo na dieta (GANGADHAR et al., 1997; MANJAPPA; KESHAVANATH; GANGADHARA, 2002).

As altas atividades de tripsina e quimiotripsina observadas nos cecos pilóricos de tambaqui (Figura 5) confirmam a hipótese de que esta porção do trato digestivo é uma extensão do intestino onde a atividade de digestão de proteínas acontece (DE SILVA; ANDERSON, 1995; HARPAZ; UNI, 1999; KROGDAHL; SUNDBY, 1999). Segundo Sunde et al. (2001), a tripsina é a protease predominante nos cecos pilóricos. Em geral, peixes herbívoros e onívoros têm atividades de tripsina similares às aquelas encontradas em peixes carnívoros, possivelmente para utilizar plenamente o baixo teor de proteína nas suas dietas (HIDALGO; UREA; SANZ, 1999; CHAN et al., 2004).

A redução da atividade de protease inespecífica nos cecos pilóricos dos peixes alimentados com a dieta II em relação às dietas I e III coincide com a redução da atividade da

tripsina neste grupo (Figura 5). Provavelmente isto se deva ao papel pequeno da tripsina como protease, limitante para o crescimento de tambaqui, tendo em vista a maior taxa de crescimento dos peixes alimentados com essa dieta em relação aos outros. Em relação ao intestino anterior, esta porção do trato digestório de tambaqui apresentou baixa atividade de tripsina e esta enzima não foi responsiva às taxas CHO/L das dietas experimentais (Figura 6). Por outro lado, nessa porção do trato digestório a quimiotripsina apresentou alta atividade e responsividade à composição da dieta. Em um estudo prévio com a mesma espécie, tripsina e quimiotripsina não foram responsivas aos teores de carboidratos nas dietas (CORRÊA et al., 2007). Considerando-se que a regulação da atividade enzimática digestiva é complexa e que funciona simultaneamente em vários níveis- pela regulação da transcrição, da tradução, bem como por modificações pós-traducionais (SUNDE, 2006) a comparação dessas atividades entre os diferentes estudos torna-se difícil.

7.2.2 Lipase

O estômago e o intestino anterior foram as porções do trato digestório de tambaqui que apresentaram as maiores atividades específicas de lipase. Devido a esta resposta, essas duas porções são, provavelmente, as mais importantes no processo de digestão de lipídio nesta espécie. Esse perfil já foi previamente reportado para tambaqui (DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006). Entretanto, a distribuição dessa enzima parece variar entre as espécies. A atividade lipolítica de dourada é maior nos cecos pilóricos e no intestino do que no estômago, onde esta atividade é quase inexistente (EROLDOĞAN et al., 2008). Estudos *in vitro* e *in vivo* da digestão em diferentes segmentos do trato de turbot *Scophthalmus maximus* sugerem que a lipólise na região posterior do canal alimentar é a maior responsável pela digestão de lipídio (KOVEN; HENDERSON; SARGENT, 1997). No carnívoro dentão a atividade de lipase não foi detectada no estômago e os maiores valores foram encontrados nos cecos pilóricos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2009).

A lipase dos tambaquis foi responsiva às taxas CHO/L das dietas experimentais. A atividade da lipase estomacal e do IA aumentou nos tambaquis alimentados com as dietas II e III (menor teor de lipídio) em relação aos peixes da dieta I, e a dos cecos pilóricos aumentou nos peixes alimentados com a dieta III em relação aos peixes das dietas I e II (Figuras 4, 5 e 6), provavelmente como tentativa de maximizar a utilização de lipídio ofertado. Em geral, o aumento da atividade da lipase em peixes é um indicativo do uso de lipídios (EROLDOĞAN et al., 2008). Esta resposta já foi observada em outras espécies como no carnívoro dentão (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2009) e no onívoro carpa comum

(KESHAVANATH; MANJAPPA; GANGADHARA, 2002). Maior atividade de lipase quando o teor de lipídio oferecido é baixo também é observada em *Cebidichthys violaceus* e enguia cara-de-macaco *Xiphister mucosus* (ambos herbívoros quando adulto) e, segundo os autores, a alta atividade é para extrair todo o lipídio disponível das algas de que se alimentam, maximizando o uso de lipídio como recurso de energia (GERMAN; HORN; GAWLICKA, 2004). Entretanto, Das e Tripathi (1991) verificaram que a atividade lipolítica, tanto no intestino quanto no hepatopâncreas de carpa capim (*Cyprinus idella*), aumenta cerca de dez vezes quando a quantidade de lipídios da dieta sube de 2 para 8 %. A atividade lipolítica de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* reduz-se 2,2 vezes com a redução do teor de lipídio na dieta (DUCASSE-CABANOT et al., 2007). Por outro lado, em carpa comum alimentada com crescentes níveis de lipídio e baixos teores de proteína na dieta, a atividade lipásica não demonstra alteração frente à composição da dieta (MANJAPPA; KESHAVANATH; GANGADHARA, 2002).

7.2.3 Amilase

No estômago de tambaqui, onde a proteólise foi preponderante, a atividade amilohidrolítica foi baixa (Figura 4). A atividade amilohidrolítica estomacal aumentou nos peixes alimentados com as dietas II e III em comparação com a dieta I, sugerindo responsividade desta enzima ao carboidrato da dieta, com aumento desta atividade conforme aumentou o teor de CHO das dietas experimentais.

O cecos pilóricos de tambaqui foi o grande responsável pela digestão de carboidratos (Figura 5), e este comportamento já havia sido previamente reportado em outros estudos com a mesma espécie (DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006; CORRÊA et al., 2007). Segundo alguns autores, a maior atividade de enzimas digestivas geralmente é encontrada nos cecos pilóricos (HARPAZ; UNI, 1999; HARPAZ et al., 2005; TIBALDI et al., 2006; HAKIM; HARPAZ; UNI, 2009). As espécies dourada e dentão também apresentam maiores atividades da amilase nos cecos pilóricos (EROLDOĞAN et al., 2008; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2009). Alta atividade de amilase é esperada em tambaqui tendo em vista seu hábito alimentar onívoro, consumindo, além de zooplâncton, grandes quantidades de sementes, frutas e vegetais em sua dieta natural. Segundo Hsu e Wu (1979), para digerir carboidratos complexos e/ou polissacarídeos um grupo especial de enzimas deve ser crucial; e é esperada a indução destas enzimas para otimizar a digestão de alimento vegetal.

O cecos pilóricos de tambaqui apresentaram resposta diferente à composição da dieta quando comparado ao estômago. O aumento da atividade da amilase dos peixes

alimentados com a dieta I (menor taxa CHO/L, portanto menor teor de CHO) em relação aos peixes das demais dietas (Figura 5) pode ser indício de aumento do esforço do peixe para maximizar a utilização de carboidrato, visto o baixo teor deste nutriente nesta dieta (30,5%) quando comparada às outras (40,5% e 50%). Provavelmente, o aumento do nível de carboidrato acima de 40% inibiu a atividade desta enzima. O comportamento das atividades da lipase e amilase de cecos pilóricos frente às diferentes taxas CHO/L das dietas reflete a habilidade do tambaqui em administrar ambos os recursos de energia oferecidos na ração (carboidrato e/ou lipídio). Resultado semelhante é observado em um estudo com o híbrido de tilápia do Nilo e tilápia azul *Oreochromis mossambicus* × *O. Aureus*, onde é encontrada maior atividade de maltase (uma carboidratase) nos peixes alimentados com baixo teor de carboidrato (HAKIM et al., 2006).

A característica indutiva da amilase em peixes também já foi observada para outras espécies. Moraes e Bidinotto (2000), estudando o perfil enzimático digestivo do onívoro pacu alimentado com diferentes teores de carboidratos, encontraram mudanças na atividade da amilase frente à composição da dieta. Similarmente ao presente estudo, pintado (LUNDSTEDT, 2003) e carpa comum (MANJAPPA; KESHAVANATH; GANGADHARA, 2002) submetidos a dietas com diferentes níveis de lipídio, apresentaram aumento da atividade da amilase em resposta ao aumento de lipídio da dieta. Entretanto, a atividade da amilase de tambaqui aumentou em todo o trato digestório quando o carboidrato da dieta aumentou de 40 para 50% (CORRÊA et al., 2007). Em algumas espécies, parece que a atividade da amilase é influenciada não só pelo teor de carboidrato da dieta, mas também pelo nível de lipídio. Por exemplo, em dourada, a atividade da amilase é afetada tanto pelo teor de carboidrato quanto pelo de lipídio das dietas e, segundo os autores, isto indica que os teores de lipídio da dieta interferem na digestão de carboidratos (FOUNTOULAKI et al., 2005). Entretanto, em barba prateada *Puntius gonionotus* a atividade da amilase não muda frente ao aumento do teor de lipídio nas dietas (MOHANTA et al., 2008).

7.2.4 Intestino Posterior

Em um estudo prévio com tambaqui, o intestino posterior exibiu somente traços de atividades enzimáticas de protease, lipase e amilase (DE ALMEIDA; LUNDSTEDT; MORAES, 2006). Por esse motivo essa porção não foi testada em relação à atividade dessas enzimas no presente estudo. Segundo Das et al.(1987) e Tengjaroenkul et al. (2000), baixas atividades enzimáticas no intestino posterior de peixes são atribuídas à função

de reabsorção desta porção do trato, demonstrando seu papel secundário na produção de enzimas.

7.3 Tripsina, quimiotripsina e T/Q *versus* crescimento

As proteínas têm papel importante na reprodução, no desenvolvimento e no crescimento de todos os animais e, para digerir as proteínas ingeridas na dieta os órgãos digestivos dos animais secretam proteases ácidas e alcalinas (LIU; WANG; ZHANG, 2008). A digestão desse nutriente é um fator chave para o crescimento, não somente para os peixes carnívoros, mas também para os herbívoros, onde a digestão de carboidratos também está relacionada aos níveis de proteína da dieta (SUPANNAPONG et al., 2008). Dessa maneira, a eficiência da digestão de proteínas tem sido considerada o critério mais importante para a eficiência de crescimento de animais aquáticos (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009). Assim, a informação sobre proteases digestivas pode ajudar na formulação de uma dieta artificial ideal para espécies de peixes cultivados (KUMAR et al., 2007).

No presente estudo, o estômago de tambaqui apresentou altas atividades da protease ácida além de ter sido responsivo à composição da dieta, com aumento da atividade nos peixes alimentados com a dieta II em relação às demais. Isso indicaria maior eficiência de digestão protéica visto que os peixes alimentados com essa dieta também apresentaram os maiores valores nos parâmetros de crescimento em relação aos demais. As proteases digestivas e/ou os produtos da digestão de proteínas estão provavelmente envolvidos na regulação do processo de crescimento (SUNDE, 2006). Essa associação já foi relatada para outras espécies. Em salmão do Pacífico *Oncorhynchus tshawytscha*, o ganho em peso é positivamente relacionado com a habilidade das enzimas digestivas em hidrolizar os componentes da dieta (HAARD et al., 1996). Hidalgo et al. (1999) observaram uma relação direta entre a atividade digestiva proteolítica e a taxa de crescimento de carpa comum. Alevinos de barba prateada apresentam máximo ganho em peso em uma dieta contendo 8% de lipídio e os autores sugerem que isto possa ser devido à maior atividade de protease registrada neste nível de lipídio dietético (MOHANTA et al., 2008).

Neste contexto, tem sido proposto que as atividades relativas das principais proteases digestivas alcalinas, tripsina e quimiotripsina, sejam indicadoras da condição nutricional dos peixes (USCANGA; MOYANO; ALVAREZ, 2010) e que a atividade específica de tripsina e a taxa tripsina/quimiotripsina (T/Q) aumentam quando o crescimento é estimulado (CHAN, 2008). A explicação para tal correlação surgiu há mais de dez anos quando Torrissen et al. (1994) sugeriram que o crescimento é afetado pela taxa de digestão de

proteínas da dieta refletindo a quantidade e as taxas de absorção e o transporte de aminoácidos. Estes irão estimular a secreção de insulina no plasma e a síntese protéica e então, a atividade de tripsina poderia ser um fator limitante no suprimento de aminoácidos e peptídeos para os processos de crescimento. Essa hipótese foi confirmada mais tarde por outros autores (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 1999; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2000; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN; MALE, 2000; SUNDE; TARANGER; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2001). Desde que as proteases exercem diferentes funções na digestão (GUILLAUME; CHOUBERT, 2001), mudanças na taxa tripsina/quimiotripsina podem implicar em uma disponibilidade diferencial de oligopeptídeos e aminoácidos (SANTIGOSA et al., 2008), o que pode causar diferenças nas taxas de crescimento.

No presente trabalho, os peixes que cresceram mais (Figura 2) também apresentaram a maior taxa T/Q (Figura 8) e, segundo alguns estudos, para algumas espécies existe correlação positiva entre a eficiência digestiva (atividade de tripsina e taxa T/Q) e taxa de crescimento do peixe (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2000; SUNDE; TARANGER; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2001; SUNDE et al., 2004; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2006; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN; FOSSEIDENGEN, 2007; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009a; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009b). Por exemplo, em salmão do Atlântico, quando o crescimento é limitado ou reduzido observa-se aumento da atividade da quimiotripsina nos cecos pilóricos resultando em uma inversa relação entre atividade da tripsina e taxa T/Q (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2006). Ainda nesta espécie, o aumento da atividade específica da tripsina e da taxa T/Q resulta em aumento dos níveis de aminoácidos livres em plasma e músculo branco (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009a). Um aumento relativamente maior na atividade da quimiotripsina sobre o da tripsina, resultando em menor taxa T/Q, está relacionado com a redução da taxa de crescimento de truta arco-íris e os autores sugerem que existe uma clara associação entre atividade específica da tripsina e maior crescimento, e entre atividade específica de quimiotripsina e baixo crescimento (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009b). Tripsina, mas não quimiotripsina, tem sido relatada como enzima limitante para utilização de nutrientes e crescimento em bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua* (LEMIEUX; BLIER; DUTIL, 1999) e alevino de bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (EL-SAYED; NMARTÍNEZ; MOYANO, 2000).

Apesar do importante papel da tripsina na taxa de crescimento de algumas espécies de peixes, isto parece não ser regra geral visto que outras não apresentam o mesmo

padrão de comportamento em relação aos processos de crescimento. No presente estudo, por exemplo, tambaqui alimentado com a maior taxa carboidrato/lipídio apresentou a menor taxa T/Q, seguida pelos menores valores de parâmetros de crescimento e atividade de protease ácida estomacal e maior atividade de quimiotripsina nos cecos pilóricos. Entretanto, em relação à atividade da tripsina, os peixes que apresentaram os maiores valores de parâmetros de crescimento também apresentaram a menor atividade específica desta enzima. Desse modo, parece que a atividade da tripsina não é um fator que limita o crescimento para o tambaqui e que a atividade da quimiotripsina é muito importante para essa espécie. Segundo Jonas et al. (1983), a atividade de tripsina geralmente é maior que a de quimiotripsina em peixes carnívoros, enquanto que em espécies herbívoras e onívoras a atividade de quimiotripsina é maior. Tilápia do Nilo apresenta valores de atividade de quimiotripsina duas vezes maior que de tripsina (USCANGA; MOYANO; ALVAREZ, 2010). Os autores justificam esse padrão pelo hábito herbívoro da espécie. Segundo os autores, peixes herbívoros possuem produção mais constante de algumas enzimas como uma estratégia fisiológica ligada tanto à presença contínua de alimento no trato e sua contínua drenagem, como um resultado do curto tempo de trânsito do alimento. Ainda argumentam que, desse modo, não se deve esperar algum pico na atividade da tripsina resultando em maior taxa T/Q já que uma importante produção de quimiotripsina deve ser mantida como base para a hidrólise de proteína. Provavelmente, em tambaqui também ocorre uma produção constante de quimiotripsina como uma estratégia fisiológica devido ao seu hábito alimentar e, por isso, não ocorre pico de atividade de tripsina quando a taxa de crescimento é alta.

A importância maior da relação entre a atividade das duas enzimas para o crescimento em relação à atividade específica de cada uma também já foi reportada para outras espécies. Uma mudança na taxa T/Q (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2006; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2007; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN; FOSSEIDENGEN, 2007) indica uma direção de crescimento em salmão do Atlântico, independentemente do nível de atividade específica das duas enzimas (SUNDE; TARANGER; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2001; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009). Blier et al. (2002) sugerem que a limitação de crescimento em salmão do Coho *O. kisutch* não é mediada pelas atividades das enzimas digestivas, mas deve estar relacionado à taxa T/Q e, além disso, restrições fisiológicas no crescimento devem ser espécie-específica. Segundo Sunde et al. (2001), a atividade da tripsina sozinha não justifica mais que 11,5% da variância na taxa de crescimento específico de salmão do Atlântico cultivado sob diferentes regimes de luz. Quando estes autores utilizaram a taxa T/Q, uma correlação um pouco melhor

foi observada, mas ainda assim representou apenas 15,2% da variabilidade na taxa de crescimento específico. Entretanto, as taxas T/Q classificaram os quatro grupos corretamente de acordo com a sua taxa de crescimento médio e TCE e, segundo esses autores, esta taxa pode ser útil para estabelecer diferenças existentes no crescimento entre grupos de peixes. Assim, a taxa T/Q parece ser mais sensível e representativa do que a atividade específica da tripsina para a comparação entre peixes com taxas de crescimento potencialmente diferentes (SUNDE; TARANGER; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, 2001). Além disso, a taxa T/Q é associada ao crescimento do peixe independentemente se o crescimento foi em proteína ou em lipídio (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2009).

Para explicar os resultados contrastantes citados acima, Rungruangsak-Torrissen e Stensholt (2001) propuseram um modelo para entender as complexas interações entre atividade enzimática digestiva e crescimento. Estes autores sugeriram que os organismos durante o crescimento estão em um de dois estados fisiológicos distintos: o de crescimento contínuo dentro de condições estáveis, e aquele no qual o crescimento é interrompido devido a mudanças no ambiente e/ou nas condições fisiológicas, incluindo jejum. De acordo com essa hipótese, tripsina se correlaciona com taxa de crescimento dentro de condições onde não existe interrupção deste, enquanto quimiotripsina assume o papel quando a oportunidade de crescimento é limitada, tal como em períodos de jejum ou adaptação ao novo alimento (SUNDE et al., 2004). Isso pode explicar alta atividade de quimiotripsina nos tambaquis que cresceram mais no presente experimento, levando em conta que: é uma espécie de hábito alimentar onívoro e oportunista; que está sujeita a variações constantes em seu ciclo anual, tanto do ponto de vista nutricional como de qualidade da água; e que nas condições dos experimentos estavam confinados recebendo dietas experimentais e se adaptando ao novo alimento.

7.4 Absorção

O intestino de tambaqui apresentou altos níveis de fosfatase alcalina e um comportamento responsivo às taxas carboidrato/lipídio das dietas experimentais. Sire e Vernier (1992) mostraram que o intestino é o principal local de absorção de moléculas de proteína em peixes teleósteos, o que implica em que ele pode ter alguma função de absorção. Esta porção do trato digestório de tambaqui parece ser o principal local de absorção de nutrientes tendo em vista a indução (aumento) daquela atividade nos peixes alimentados com as dietas I e II em relação à dieta III (Figura 7), acompanhado pelo maior crescimento dos peixes destes grupos (Figura 2). Este crescimento é plausível já que sua taxa é o resultado da

utilização do alimento, que é dependente da sua digestão e absorção e que este processo é governado pela atividade das enzimas digestivas, inclusive aquelas da borda em escova, e pela sua disponibilidade e habilidade para digerir o alimento através da membrana do epitélio intestinal (KLEIN; COHN; ALPERS, 1998). Entretanto, em um estudo com bacalhau do Atlântico, Lemieux et al. (1999) não encontraram relação entre a atividade da fosfatase alcalina e a eficiência de conversão alimentar, e concluíram que a taxa de crescimento não é limitada por esta enzima nesta espécie.

No presente estudo, tambaquis alimentados com a dieta de maior taxa CHO/L (menor teor de lipídio) apresentaram atividade da fosfatase alcalina reduzida, indicando menor capacidade de absorção em peixes alimentados com alto teor de carboidrato (50%) e baixo teor de lipídio (4,8%). Similarmente ao tambaqui, em truta arco-íris a redução da tomada de lipídios induz redução de 40% na atividade da fosfatase alcalina que, de acordo com os autores, revela que a membrana do enterócito tem menor capacidade digestiva quando o peixe é alimentado com baixo teor de lipídio (DUCASSE-CABANOT et al., 2007). Além disso, alguns estudos investigam o efeito do nível de lipídio da dieta na atividade da fosfatase alcalina e mostram que a atividade da enzima aumenta com o aumento do teor desse nutriente (GAWLICKA et al., 2002; HAKIM et al., 2006). Entretanto, é observada uma tendência para maior atividade da fosfatase alcalina quando larvas de linguado são alimentadas com dietas contendo níveis menores de lipídios (MORAIS et al., 2007).

Sabe-se que a eficiência de absorção também depende do tempo no qual o nutriente fica disponível no trato gastrointestinal e que, geralmente, quanto maior o teor de fibra na dieta menor é o tempo de trânsito. No presente estudo, apesar das dietas I, II e III apresentarem quantidades decrescentes de fibra (celulose microfina), provavelmente não houve diferença no tempo de trânsito gastrointestinal dos peixes, visto que Silva et al. (2003) estudando o tambaqui, observaram que dietas contendo diferentes teores de fibra bruta tiveram a mesma velocidade de trânsito; fato esse observado entre a dieta contendo embaúba (21,2% de fibra bruta) e a dieta contendo a seringa barriguda (2,3% de fibra bruta). Isto sugere que no tambaqui, esta fração não interfere na permanência do alimento no intestino. Segundo Abimorad (2004), o efeito da fibra na dieta de peixes ainda é um assunto em discussão (PEREIRA-FILHO, 1992) e parece que a celulose microfina (utilizada nas dietas experimentais) apresenta pouca influência na velocidade de trânsito gastrointestinal (DREHER, 1987). Entretanto, tilápias do Nilo alimentadas com dietas incrementadas de celulose microfina (2-14%) apresentaram redução do tempo de trânsito gastrointestinal (SHIAU et al., 1988).

7.5 Metabolismo

Os nutrientes digeridos e absorvidos juntamente com eletrólitos através do epitélio do intestino são utilizados para atender a demanda metabólica do corpo (HAKIM; HARPAZ; UNI, 2009). Assim, mudanças nas concentrações dos metabólitos refletem ajustes bioquímicos do metabolismo quando existe variação na dieta (VIEIRA; INOUE; MORAES, 2005) e, considerando que a taxa de utilização dos estoques metabólicos é dependente de enzimas específicas, é provável que o metabolismo intermediário seja diferente entre os tecidos de acordo com a extensão da mobilização dos metabólitos (DE ALMEIDA et al., 2010). Com a determinação das concentrações dos intermediários metabólicos e das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo, avaliamos a dinâmica do perfil metabólico de tambaqui em função das variações das taxas CHO/L das dietas e, como esperado, o metabolismo intermediário de tambaqui mostrou um rearranjo frente à composição das dietas experimentais (Figuras 9, 10 e 11). Os diferentes perfis metabólicos apresentados pelos tambaquis em função da composição da dieta, sugerem alterações dinâmicas e trocas de intermediários metabólicos entre os tecidos; e estas trocas envolveram o plasma como veículo destes intermediários, visto que as alterações nas concentrações desses metabólitos neste veículo corroboraram as variações observadas no perfil bioquímico apresentado pelos tecidos.

Muito do que sabemos sobre a relação entre o gasto de energia metabólica e dieta em peixes deriva de estudos com carnívoros de água doce, principalmente salmonídeos. Além disso, embora as interações metabólicas entre carboidrato e ácidos graxos tenham sido estabelecidas para mamíferos, pouco sabemos sobre estas interações em peixes (WILLMOTT; CLEMENTS; WELLS, 2005). Daí, a importância de estudos utilizando essa abordagem em peixes, particularmente os tropicais de água doce.

7.5.1 Metabolismo protéico

A utilização da proteína da dieta tem sido avaliada em muitas espécies de peixes pela medida das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos. Uma delas é a glutamato desidrogenase (GDH), enzima chave de desaminação do glutamato formado pelas reações mediadas pelas aminotransferases (GAYE-SIESSEGGGER et al., 2007). A variação na atividade específica dessa enzima, relacionada às taxas CHO/L das dietas, indica uma adaptação do metabolismo protéico a diferentes situações nutricionais. Além disso, a avaliação da utilização de proteína também pode ser feita através da quantificação dos metabólitos relacionados ao metabolismo protéico (aminoácidos livres, proteína e amônia).

No presente estudo, a redução do teor de proteína no músculo branco e plasma junto à diminuição da concentração de aminoácidos livres e ao aumento do teor de amônia nos peixes alimentados com a dieta III (maior taxa CHO/L) em relação às outras dietas, sugerem catabolismo protéico neste grupo. O papel do plasma como transportador de nutrientes adicionado à inter-relação metabólica representa uma preferência proteolítica em tambaqui alimentado com 50% de carboidrato e 4,8% de lipídio. Este cenário reforça a discussão anterior sobre o crescimento e a taxa tripsina/quimiotripsina dos peixes alimentados com a dieta III. Esse perfil metabólico é indesejável porque implica no uso de proteína como recurso energético ao invés de catabolismo de lipídios e/ou carboidrato para este fim. Isto indica também que não houve efeito poupador de proteína nos peixes alimentados com a dieta III. Este quadro metabólico geralmente é observado em peixes e foi reportado em robalo *Dicentrarchus labrax* (PERES; OLIVA-TELES, 1999), perca prateada *Bidyanus bidyanus* (YANG; LIOU; LIU, 2002), bagre (MELO et al., 2006) e tambaqui (DE ALMEIDA et al., 2010).

Apesar da redução na concentração de proteína também no fígado, este tecido não mostrou indícios de atividade neoglicogênica quando houve aumento da taxa CHO/L nas dietas, já que as concentrações de aminoácidos e amônia mantiveram-se constantes e a atividade da GDH diminuiu. Esta diminuição provavelmente ocorreu por causa do aumento do teor de carboidrato na dieta indicando a não ocorrência do catabolismo de aminoácidos com fins energéticos, provavelmente porque esse tecido estaria usando carboidrato e/ou lipídio para suprir a demanda metabólica. Da mesma forma, dourada alimentado com diferentes taxas CHO/L apresenta menores atividades de GDH quando recebe dieta com maior taxa CHO/L, indicando uma diminuição do catabolismo protéico com a inclusão de CHO nas dietas (COUTO et al., 2008; ENES et al., 2008). Segundo MCGoogan e Gatlin (2000), dietas altamente energéticas podem diminuir o catabolismo de glutamina devido à diminuição da necessidade de gliconeogênese de aminoácidos para demanda energética.

Diferentemente do presente estudo, em tambaqui alimentado com níveis crescentes de carboidrato, a concentração de aminoácidos livres do plasma e do fígado diminuiu quando os peixes foram alimentados com 40 e 50% de carboidrato, enquanto que no músculo branco essa concentração aumentou com o aumento dos níveis de carboidrato (CORRÊA et al., 2007). Isso levou os autores a assumir a hipoaminocidemia como consequência da tomada de aminoácidos pelo músculo branco, sugerindo efeito poupador de proteína. Essas diferenças metabólicas em relação ao presente trabalho foram provavelmente

devido às diferentes taxas carboidrato/lipídio e ao nível de proteína utilizados nas dietas experimentais dos dois estudos.

7.5.2 Metabolismo lipídico

Os processos lipogênico e lipolítico em peixes são, em geral, comparáveis aos da maioria dos mamíferos. A taxa lipogênica em espécies teleósteas é regulada principalmente por fatores nutricionais e, a nutrição é o principal fator determinante da maior ou menor taxa lipogênica em tilápia do Nilo (RIBEIRO et al., 2008). O fígado é o principal local de estoque de lipídios (MOMMSEN, 1998) e este nutriente deve ser usado preferencialmente ao carboidrato como recurso de energia neste tecido (PHILLIPS; HIRD, 1977) e no músculo esquelético (COWEY; WALTON, 1989).

No presente estudo, as mudanças nas concentrações de TG e AGL tanto no fígado quanto no músculo branco e no plasma dos tambaquis sugere lipólise nos tecidos e uma possível exportação de ácidos graxos livres para o plasma conforme o aumento do teor de carboidrato e a diminuição do teor de lipídio nas dietas experimentais. Este resultado indica que a demanda metabólica nestes tecidos foi suprida pela oxidação de lipídios e, especificamente em relação ao fígado, essa discussão pode ser reforçada pela redução significativa do IHS dos peixes deste grupo (Figura 3). Os resultados apresentados no presente estudo concordam com Corrêa et al. (2007) ao observarem que tambaquis alimentados com teores crescentes de carboidrato em dietas experimentais apresentam aumento das concentrações de TG plasmático quando o teor de carboidrato da dieta subiu de 40 para 50%. Entretanto, os dados existentes na literatura sobre a concentração destes metabólitos em relação à composição das dietas são bastante controversos. Hemre e Sandnes (1999) testaram uma ampla faixa de inclusão de lipídios na dieta, de 31 a 47%, para salmão do Atlântico e verificaram que a variação lipídica na dieta não resulta em qualquer alteração na concentração de TG plasmático. Do mesmo modo, não foi observada lipogênese em sargo quando alimentado com níveis crescentes de carboidrato na dieta (SÁ; POUSSÃO-FERREIRA; OLIVA-TELES, 2007). Entretanto, juvenis de dourada alimentados com diferentes taxas carboidrato/lipídio apresentam lipogênese aumentada pelo excesso de carboidrato (ENES et al., 2008).

O músculo branco de tambaqui submetido à dieta III (maior teor de carboidrato e menor teor de lipídio) foi um grande consumidor de triacilgliceróis. Provavelmente o tambaqui usou lipídios como principal substrato energético quando alimentado com a dieta III devido à inabilidade de utilização do excesso de carboidrato oferecido nesta dieta. Moves et

al. (1995) destacam que as mitocôndrias do músculo branco de peixes, assim como em mamíferos, oxidam piruvato ou outro combustível elementar como o lactato, em preferência a ácidos graxos quando sozinhos. Entretanto, quando presente em conjunto, a oxidação dos ácidos graxos inibe a utilização de piruvato. Estes dados podem ser comparados às respostas observadas no músculo branco dos tambaquis que apresentaram teores de piruvato constantes e diminuição de ácidos graxos em relação ao aumento de carboidratos na dieta.

7.5.3 Metabolismo glicídico

O fígado dos peixes alimentados com as dietas contendo diferentes taxas CHO/L não apresentou diferença significativa em relação ao metabolismo glicídico (Figura 9), cumprindo assim seu papel como órgão regulador do metabolismo de glicose em peixes. A redução do teor de piruvato no fígado dos peixes alimentados com a dieta II em relação às demais, provavelmente indica que este substrato está sendo utilizado para gerar energia e manter a glicemia. A redução da atividade da LDH e do teor de piruvato no fígado dos peixes alimentados com as dietas II e III em comparação à dieta I sugere redução da conversão de lactato a piruvato provavelmente porque a energia já está suprida. Esse perfil metabólico coincide com a redução da atividade da LDH e do teor de lactato musculares. O fígado dos peixes alimentados com a dieta III também apresentou redução da atividade da MDH hepática em relação às demais sugerindo assim uma redução do metabolismo oxidativo. Parece que os peixes alimentados com esta dieta tiveram uma redução global do metabolismo, evidenciada pelas baixas atividades de MDH e LDH e pela baixa taxa de crescimento neste grupo.

Os peixes alimentados com a dieta III também apresentaram redução da atividade da LDH muscular (Figura 10) e isto pode estar relacionado à baixa taxa de crescimento destes peixes (Figura 2). Pelletier et al. (1994) reportaram que a atividade enzimática glicolítica no músculo branco de bacalhau está correlacionada com a taxa de crescimento. Também, a atividade específica de LDH está correlacionada positivamente com o fator de condição em perca amarela *Perca flavescens* (GAUTHIER; CAMPBELL; COUTURE, 2008). Segundo estes autores, como o músculo branco representa cerca da metade do peso do peixe e é o principal local de produção de proteína durante o crescimento, um aumento da capacidade aeróbica é essencial para sustentar o aumento no crescimento, visto que este é um processo exclusivamente aeróbico. Além disso, o aumento da LDH muscular tem sido interpretado como um reflexo de melhora da capacidade energética do tecido muscular (PELLETIER; GUDERLEY; DUTIL, 1993; DUTIL et al., 1998) e tem sido proposto que proteínas citoplasmáticas do músculo (como a LDH) devem ser usadas como

estoque de proteína em peixes (HOULIHAN et al., 1988). No presente estudo, os tambaquis que cresceram mais (dietas I e II) também apresentaram as maiores atividades de LDH muscular em comparação aos peixes alimentados com a dieta I e, segundo Blier et al. (2002), enzimas que são reflexo da condição energética dos peixes (por exemplo, LDH) também devem aumentar com o crescimento e o fator de condição.

O músculo branco dos peixes alimentados com as dietas II e III (maiores teores de CHO) apresentou aumento de glicogênese evidenciada pelo aumento da concentração de glicogênio (Figura 10). Provavelmente, o músculo branco importou glicose do fígado e realizou glicogênese e/ou uma possível neoglicogênese a partir de aminoácidos, indicada pelo aumento na concentração de amônia nos peixes alimentados com a dieta III, e sugerindo que o excesso de carboidrato está sendo estocado no músculo branco. Segundo Hickling e March (1982), quando a concentração de glicose na circulação excede a habilidade do fígado para lipogênese e síntese de glicogênio, ocorre uma elevação dramática na síntese de glicogênio muscular. Entretanto, em salmão do Atlântico alimentado com diferentes taxas CHO/L, não há diferença na concentração de glicogênio muscular (HEMRE; SANDNES, 1999).

Em relação ao perfil metabólico do plasma de tambaquis no presente estudo, o aumento do teor de piruvato observado nos peixes alimentados com as dietas II e III, (Figura 11), é resultado da glicemia mantida pelo fígado devido ao excesso de carboidrato nestas dietas. Além disso, esse aumento coincide com a lipogênese. Quando o consumo de energia excede o gasto, outros substratos que não glicose são catabolizados preferencialmente; então a utilização de glicose deve seguir várias vias alternativas que incluem: estoque como glicogênio, produção de NADPH via desvio das pentoses; esterificação como glicerol via conversão da glicose-3-fosfato; ou exportação como citrato a partir da mitocôndria, para síntese de palmitato no citosol (SUL; WANG, 1998). No presente estudo, foi observado aumento do teor de glicogênio muscular e aumento da lipogênese nos peixes que receberam maior quantidade de carboidrato. Em relação às outras espécies, a glicemia de truta arco-íris não é afetada pela composição da dieta (DUCASSE-CABANOT et al., 2007) e, segundo Willmott et al. (2005), metabólitos do sangue são susceptíveis à rápida mudança e não devem refletir precisamente a taxa de utilização para cada espécie. Entretanto, em salmão do Atlântico, a concentração de glicose plasmática é significativamente maior nos peixes alimentados com a menor taxa CHO/L (alto teor de lipídio) (HEMRE; SANDNES, 1999).

Similarmente aos dados apresentados, em um estudo prévio com essa espécie, tambaquis alimentados com teores crescentes de carboidrato em dietas experimentais não apresentaram mudanças no teor de glicose plasmática. Entretanto, o fígado claramente

sintetizou glicogênio a partir de glicose com o aumento do carboidrato nas dietas. Além disso, a concentração de piruvato hepático e glicogênio muscular permanecem constantes (CORRÊA et al., 2007). Estas diferenças metabólicas em relação ao presente estudo são provavelmente devido às diferentes taxas CHO/L utilizadas nos dois estudos; além de níveis de proteína diferentes. Diferentemente de tambaqui no presente estudo, em juvenis de dourada, o aumento da taxa CHO/L aumenta as vias glicolítica e lipogênica hepáticas ao mesmo tempo que deprime o catabolismo de proteína (ENES et al., 2008). Entretanto, os múltiplos fatores que regulam a capacidade do metabolismo de carboidratos em peixes dificultam extrapolar dados obtidos de uma espécie para outra, em função da diversidade sistemática da classe (LUNDSTEDT, 2003).

7.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a preferência por frutas em sua dieta natural, Menton (1989) supôs que o tambaqui pode digerir carboidratos melhor que muitos outros peixes. Entretanto, em um estudo com essa espécie, a utilização ótima de lipídio e carboidratos estimada (49% e 31%, respectivamente) indicou que, em tambaqui, os lipídios são mais eficientemente usados para estocar energia que carboidratos (VAN DER MEER; ZAMORA; VERDEGEM, 1997). O presente trabalho confirmou essa indicação visto que quando o tambaqui foi alimentado com alto teor de lipídio na dieta (dietas I e II), ele conseguiu utilizá-lo para a demanda energética e para estocar energia, poupando a proteína para o crescimento; entretanto, quando alimentado com o maior teor de carboidrato nas dietas experimentais, o tambaqui catabolizou proteína e lipídio ao invés de carboidrato para suprir a demanda energética e estocar energia. Além disso, o alto teor de carboidrato na dieta em relação ao lipídio inibiu o consumo alimentar e prejudicou a utilização dos nutrientes pelos peixes.

7.6.1 Dieta I: 30,5% de CHO e 13,7% de L (CHO/L=2,22)

Os peixes alimentados com essa dieta apresentaram resultados de crescimento, enzimas digestivas e metabolismo, parecidos com os peixes alimentados com a dieta II, com similar GC e maior TCE. Entretanto, esses peixes apresentaram menor fator de condição, indicando que o crescimento deve ser associado mais com acúmulo de gordura do que com deposição de proteína. Além disso, os peixes que receberam essa dieta mostraram aumento da atividade da enzima de catabolismo de proteína (GDH) e aumento da lipogênese hepática em comparação aos peixes alimentados com a dieta II.

7.6.2 Dieta II: 40,5% de CHO e 9,1% de L (CHO/L=4,45)

Os peixes alimentados com a taxa CHO/L média não apresentaram metabolismo prejudicado e conseguiram usar tanto lipídio como carboidrato para fins energéticos, poupando proteína para o crescimento. Além da alta taxa de crescimento, esses peixes também apresentaram maior fator de condição que os peixes alimentados com a dieta I. Também apresentaram maior atividade de protease ácida estomacal que os peixes da dieta I e uma taxa T/Q e atividade de fosfatase alcalina satisfatórias, indicando maior eficiência de digestão de proteína em relação aos peixes das dietas I e III.

7.6.3 Dieta III: 50% de CHO e 4,8% de L (taxa CHO/L=10,41)

O músculo branco de tambaqui alimentado com essa dieta consumiu proteína e lipídio para fins energéticos. O fígado também realizou lipólise e não conseguiu usar a quantidade de carboidrato ofertada para fins energéticos. O plasma refletiu a proteólise muscular com o aumento da excreção de amônia. Os peixes alimentados com essa dieta apresentaram baixo crescimento, o que é reflexo da inibição do consumo alimentar, do perfil metabólico proteolítico e da menor eficiência de digestão (redução da atividade da protease estomacal) e taxa de absorção de nutrientes (redução da atividade da fosfatase alcalina) em relação aos peixes alimentados com as dietas I e II.

8 CONCLUSÕES

- A taxa CHO/L da dieta afetou a digestão, a absorção e utilização dos nutrientes de tambaquis, influenciando o crescimento dos peixes.

- A capacidade digestiva de tambaqui foi modulada em resposta às taxas carboidrato/ lipídio das dietas e assumimos que esta espécie possui habilidade para usar maiores níveis de lipídio e carboidrato que aqueles testados previamente para suprir a demanda metabólica.

- A dieta III (maior taxa CHO/L) privou o peixe de recurso energético, resultando em utilização de proteína para este fim.

- A dieta II é candidata potencial para a alimentação de tambaqui dentro das condições impostas.

- Tambaqui alimentado com 26,5% de proteína, 40,5% de carboidrato e 9,1% de lipídio, numa dieta com 3990 kcal/kg consegue suprir a demanda metabólica e poupar proteína para o crescimento.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMORAD, E. G. **Relações entre níveis de proteína e energia digestíveis em dietas com diferentes proporções de lipídios e carboidratos para o crescimento do pacu, *Piaractus mesopotamicus***. (2004). 107 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura em Águas Continentais), Universidade Estadual Paulista-UNESP, Jaboticabal-SP, 2004.

ABIMORAD, E. G., CARNEIRO, D. J. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles — fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2007.

ALARCÓN, F. J.; GARCÍA-CARREÑO, F. L.; NAVARRETE DEL TORO, M. A. Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 179-189, 2001.

ALBRO, P. W. et al. Activation of non-specific lipase (EC 3.1.1.) by bile salts. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 835, p.477-490, 1985.

ALEXIS, M. N.; PAPAPARASKEVA-PAPOUTSOGLO, E. Aminotransferase activity in the liver and white muscle of *Mugil capito* fed diets containing different levels of protein and carbohydrate. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 83, n. B, p. 245-249, 1986.

ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia.: Brasília: MCT-CNPq, 1998.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p. 175-203.

ARBELÁEZ-ROJAS, G. A.; FRACALOSSO, D. M.; FIM, J. D. I. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1059-1069, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

BAANANTE, I. V. et al. Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P and PFK-2. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100, n. B, p. 1-17, 1991.

- BALLANTYNE, J. S. Amino acid metabolism. **Fish Physiology**, v. 20, p. 77-107, 2001.
- BARROSO, J. B. et al. Carbohydrate deprivation reduces NADPH-production in fish liver but not in adipose tissue. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 8, p. 785-796, 2001.
- BASTROP, R.; JÜRSS, K.; WACKE, R. Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 102, n. 1, p. 151-161, 1992.
- BEAMISH, F. W. H.; THOMAS, E. Effects of dietary protein and lipid on nitrogen losses in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture**, v. 41, n. 4, p. 359-371, 1984.
- BELAL, I. E. H. A review of some fish nutrition methodologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 4, p. 395-402, 2005.
- BERGMEYER, H. U., BEACH, W.D. **Methods of enzymatic analysis**. Weinhein Durfield Beach and Florida Bassel. 3.ed. 1983.
- BERGOT, F., BREQUE, J. Digestibility of starch by rainbow trout: Effects of the physical state of starch and of the intake level. **Aquaculture**, v. 34, n. 3-4, p. 203-212, 1983.
- BERNFELD, P. Amylases α and β : colorimetric assay method. In: COLOWICH, S. P.; KAPLAN, N. O. (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1955, pp. 149-154.
- BEZERRA, R. D. S. et al. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, n. 3, p. 189-199, 2000.
- BIDINOTTO, P. M., SOUZA, R. H. S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Bol. Tec. Cepta**, v. 10, p. 53-60, 1998.
- BLIER, P. U., LEMIEUX, H., DEVLIN, R. H. Is the growth rate of fish set by digestive enzymes or metabolic capacity of the tissues? Insight from transgenic coho salmon. **Aquaculture**, v. 209, n. 1-4, p. 379-384, 2002.
- BONAMUSA, L. et al. Nutritional effects on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Spaurus aurata*. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.**, v. 1, p. 113-124, 1992.

BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 183-191, 2006.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Informações e Estatística. Estatística da Pesca e aquicultura. **Estatística da Aquicultura e Pesca no Brasil 2008/2009**. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO> Acesso em setembro de 2010.

BRAUGE, C.; MEDALE, F.; CORRAZE, G. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. **Aquaculture**, v. 123, n. 1-2, p. 109-120, 1994.

BUDDINGTON, R. K.; KROGDHAL, Å.; BAKKE-MCKELLEP, A. M. The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. . **Acta Physiol. Scand.**, v. 161, p. 67-80, 1997.

CAMILO, R. Y. **Efeitos da adição de aminoácidos essenciais livres à dieta e da ausência de nutrientes na atividade de enzimas digestivas e no metabolismo intermediário de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. (2007). Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos, 2007.

CARA, B. et al. Development of a novel casein-protamine based microparticles for early feeding of fish larvae: In vitro evaluation. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. 6, p. 505-514, 2007.

CARTER, C. G. et al. Effect of feeding on the tissue free amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; Walbaum). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 14, n. 2, p. 153-164, 1995.

CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F. Protein Synthesis. In: WRIGHT, P.; ANDERSON, P. (Ed.). **Nitrogen excretion**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 31-75.

CARTER, C. G. et al. Physiological effects of feeding. In: HOULIHAN, D. F. et al (Ed.). **Food intake in fish**. Oxford, UK: Blackwell Science., 2001. p. 297-331.

CATACUTAN, M. R.; COLOSO, R. M. Growth of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture**, v. 149, n. 1-2, p. 137-144, 1997.

CHAGAS, E. C. et al. Produtividade de tambaqui criado em tanque-rede com diferentes taxas de alimentação. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1109-1115, 2007.

CHAKRABARTI, I. et al. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112, n. 1, p. 167 - 177, 1995.

CHAN, A. S. et al. Digestive enzyme activities in carnivores and herbivores: comparisons among four closely related prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae) from a California rocky intertidal habitat. **Journal of Fish Biology**, v. 65, n. 3, p. 848-858, 2004.

CHAN, C. R. et al. Feed deprivation and re-feeding on alterations of proteases in tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Zoological Studies**, v. 47, n.2, p. 207-214, 2008.

CHELLAPPA, S. et al. Growth and production of the Amazonian tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. **Aquaculture International**, v. 3, n. 1, p. 11-21, 1995.

CHESLEY, L. The concentration of proteases, amylase and lipase in certain marine fishes. **Bio. Bull.**, v. 66, p. 133-144, 1934.

CHIU, S.-T.; PAN, B. S. Digestive protease activities of juvenile and adult eel (*Anguilla japonica*) fed with floating feed. **Aquaculture**, v. 205, n. 1-2, p. 141-156, 2002.

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

CHONG, A. S. C. et al. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). **Aquaculture**, v. 203, n. 3-4, p. 321-333, 2002.

CHOU, R.-L.; SU, M.-S.; CHEN, H.-Y. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 193, n. 1-2, p. 81-89, 2001.

CHRISTIANSEN, D. C.; KLUNGSOIR, L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology (B)**, v. 88, n. 3, p. 701-711, 1987.

COPLEY, N. G. Alloxan and ninhydrin test. **Analyst.**, v. 66, p. 492-493, 1941.

CORRÊA, C. F. et al. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, n. 4, p. 857-862, 2007.

COUTO, A. et al. Effect of water temperature and dietary starch on growth and metabolic utilization of diets in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 1, p. 45-50, 2008.

COWEY, C. B. The Nutrition of Fish: The Developing Scene. **Nutrition Research Reviews**, v. 1, n. 01, p. 255-280, 1988.

COWEY, C. B.; SARGENT, J. R. Nutrition. In: HOAR, W. S. et al (Ed.). **Fish Physiology**. Orlando, FL: Academic Press, 1979. p. 1-69.

COWEY, C. B.; WALTON, M. J. Intermediary Metabolism. In: HALVER, J. E. (Ed.). **Fish Nutrition**. New York: Academic Press, 1989. p. 260-329.

CRAIG, S.; HELFRICH, L. A. **Understanding Fish Nutrition, Feeds and Feeding**. Virginia: U.S. Virginia Tech., 2002.

CRAIG, S. R.; WASHBURN, B. S.; GATLIN, D. M. Effects of dietary lipids on body composition and liver function in juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 249-255, 1999.

DABROWSKI, K.; GUDERLEY, H. Intermediary metabolism. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). **Fish Nutrition**. London: Academic Press, 2002. p. 309-365.

DAS, K. M.; GHOSH, A. Studies on the comparative activity of some digestive enzymes in fry and adult mullet *Liza parsia* (Ham.). **J. Aquac. Trop.** v 2, p 9–15, 1987.

DAS, K. M.; TRIPATHI, S. D. Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). **Aquaculture**, v. 92, p. 21-32, 1991.

DE ALMEIDA, L. C. et al. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p. e253-e262, 2011.

DE ALMEIDA, L. C.; LUNDSTEDT, L. M.; MORAES, G. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n. 6, p. 443-450, 2006.

DE SILVA, S. S., ANDERSON, T. A. **Fish nutrition in aquaculture**. London: Chapman & Hall, 1995. 319p.

DE SILVA, S. S. et al. Performance of juvenile Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell), fed with diets of different protein to energy ratio. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 2, p. 79-85, 2002.

DEBNATH, D. et al. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, n. 1, p. 107-114, 2007.

DEGUARA, S.; JAUNCEY, K.; AGIUS, C. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. **Journal of Fish Biology**, v. 62, n. 5, p. 1033-1043, 2003.

DIAS, J. et al. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). **Aquaculture Research**, v. 35, n. 12, p. 1122-1130, 2004.

DIVAKARAN, S.; KIM, B. G.; OSTROWSKI, A. C. Digestive enzymes present in Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis* (Bloch & Schneider 1801) and bluefin trevally *Caranx melampygus* (Cuvier 1833). **Aquaculture Research**, v. 30, n. 10, p. 781-787, 1999.

DOSDAT, A. et al. Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. **Aquaculture**, v. 141, n. 1-2, p. 107-127, 1996.

DREHER, M. L. **Handbook of dietary fiber: an applied approach**. Dekker: New York, 1987.

DUCASSE-CABANOT, S. et al. Reduced lipid intake leads to changes in digestive enzymes in the intestine but has minor effects on key enzymes of hepatic intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Animal**, v. 1, n. 09, p. 1272-1282, 2007.

DUTIL, J. D. et al. Nucleic acids and enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) differing in condition and growth rate trajectories. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 55, n. 4, p. 788-795, Apr 1998.

ECKMANN, R. Growth and composition of juvenile *Colossoma macropomum* (characoidei) feeding on artificial diets. **Aquaculture**, v. 64, p. 293-303, 1987.

EINARSSON, S.; DAVIES, P. S.; TALBOT, C. The effect of feeding on the secretion of pepsin, trypsin and chymotrypsin in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 15, n. 5, p. 439-446, 1996.

EL-SAYED, A. F. M.; NMARTÍNEZ, I.; MOYANO, F. J. Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using in vitro assays. **Aquaculture International**, v. 8, n. 5, p. 403-415, 2000.

ENES, P. et al. Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 101-108, 2008.

ENES, P. et al. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 519-539, 2009.

ERFANULLAH; JAFRI, A. K. Growth rate, feed conversion, and body composition of *Catla catla*, *Labeo rohita*, and *Cirrhinus mrigala* fry fed diets of various carbohydrate-to-lipid ratios. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 29, n. 1, p. 84-91, 1998.

EROLDOĞAN, O. T. et al. The effects of rate-restricted feeding regimes in cycles on digestive enzymes of Gilthead Sea bream, *Sparus aurata*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, p. 49-54, 2008.

EUSEBIO, P. S.; COLOSO, R. M. Proteolytic enzyme activity of juvenile Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch), is increased with protein intake. **Aquaculture Research**, v. 33, n. 8, p. 569-574, 2002.

FAGBENRO, O. et al. Haematological profile, food composition and digestive enzyme assay in the gut of the African bony-tongue fish, *Heterotis (Clupisudis) niloticus* (Cuvier 1829) (Osteoglossidae). **Trop. Zool.**, v. 13, p. 1-9, 2000.

FANG, L. S.; CHIOU, S. F. Effect of salinity on the activities of digestive proteases from the tilapia fish, *Oreochromis niloticus* in different culture environments. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 93, p. 439-443, 1989.

FANGE, R., GROVE, D. Digestion. In: HOAR, W. S. et al (Ed.). **Fish Physiology**. New York: Academic Press, 1979. p. 161-260.

FAO. **El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura**. In: NATIONS, F. A. A. O. O. T. U. (Ed.). Roma, Italia, 2003. p. 150.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. In: NATIONS, F. A. A. O. O. T. U. (Ed.). Rome, 2009. Cap. FAO Fisheries and Aquaculture Department. p. 6-10.

FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N. K. Crude protein sources and levels in diets for pacu fingerlings (*Piaractus mesopotamicus*). **Braz. J. Anim. Sci.**, v. 29, p. 646-653, 2000.

FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N. K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 617-626, 2001.

FERNÁNDEZ, F. et al. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 343, n. 1, p. 1-10, 2007.

FERRARIS, R. P.; AHEARN, G. A. Sugar and amino acid transport in fish intestine. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 3, p. 397-413, 1984.

FOUNTOULAKI, E. et al. Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 13, p. 1243-1251, 2005.

FRAISSE, M. et al. Distribution pattern of digestive enzyme activities in the intestine of the catfish (*Ameiurus nebulosus* L.) and of the carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 3, p. 443-446, 1981.

GANGADHAR, B. et al. Effect of varying protein and lipid levels on the growth of rohu, *Labeo rohita*. **Asian Fish Sci.**, v. 10, p. 139-147, 1997.

GARCÍA-CARREÑO, F. L. et al. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, n. 2, p. 343-352, 2002.

GARRIDO, M. V. O.; OLLER, C. G.; EQUISOAIN, M. A. A. Effect of diet on gastric mucosa cells in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). Histochemical and ultrastructural study. **Micron**, v. 27, n. 1, p. 25-34, 1996.

GAUTHIER, C.; CAMPBELL, P. G. C.; COUTURE, P. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 4, p. 526-532, 2008.

GAWLICKA, A. et al. Effects of dietary lipids on growth, fatty acid composition, intestinal absorption and hepatic storage in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* R.) larvae. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 18, n. 4-6, p. 673-681, 2002.

GAWLICKA, A. et al. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. **Aquaculture**, v. 184, n. 3-4, p. 303-314, 2000.

GAYE-SIESSEGGER, J. et al. Influence of dietary non-essential amino acid profile on growth performance and amino acid metabolism of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 1, p. 71-77, 2007.

GÉLINEAU, A.; CORRAZE, G.; BOUJARD, T. Effects of restricted ration, time-restricted access and reward level on voluntary food intake, growth and growth heterogeneity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on demand with self-feeders. **Aquaculture**, v. 167, n. 3-4, p. 247-258, 1998.

GENTZKOW, C. J., MAZEN, J. M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. Biol. Chem.**, v. 143, p. 531-544, 1942.

GERMAN, D. P.; HORN, M. H.; GAWLICKA, A. Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): Ontogenetic, Dietary, and Phylogenetic Effects. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, n. 5, p. 789-804, 2004.

GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, p. 107-133, 1982.

GUILLAUME, J. et al. **Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans**. Chichester UK: Springer Praxis Publishing, 2001. 408p.

HAARD, N. F. et al. Estimation of protein digestibility--IV. Digestive proteinases from the pyloric caeca of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed diets containing soybean meal. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 115, n. 4, p. 533-540, 1996.

HAKIM, Y.; HARPAZ, S.; UNI, Z. Expression of brush border enzymes and transporters in the intestine of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following food deprivation. **Aquaculture**, v. 290, n. 1-2, p. 110-115, 2009.

HAKIM, Y. et al. Relationship between intestinal brush border enzymatic activity and growth rate in tilapias fed diets containing 30% or 48% protein. **Aquaculture**, v. 257, n. 1-4, p. 420-428, 2006.

HALVER, J. E., HARDY, R. W. Nutrient flow and retention. In: HALVER, J. E., HARDY, R. W. (Ed.). **Fish Nutrition**: Academic Press, 2002. p. 755-770.

HARPAZ, S. et al. Effects of different feeding levels during day and/or night on growth and brush-border enzyme activity in juvenile *Lates calcarifer* reared in freshwater re-circulating tanks. **Aquaculture**, v. 248, n. 1-4, p. 325-335, 2005.

HARPAZ, S. et al. Effects of adding salt to the diet of Asian sea bass *Lates calcarifer* reared in fresh or salt water recirculating tanks, on growth and brush border enzyme activity. **Aquaculture**, v. 248, n. 1-4, p. 315-324, 2005.

HARPAZ, S.; UNI, Z. Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 124, n. 2, p. 155-160, 1999.

HARROWER, J. R.; BROWN, C. H. Blood lactic acid--a micromethod adapted to field collection of microliter samples. **J Appl Physiol**, v. 32, n. 5, p. 709-711, May 1, 1972.

HEMRE, G.I., SANDNES, K. Effect of dietary lipid level on muscle composition in Atlantic salmon *Salmo salar*. **Aquaculture Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 9-16, 1999.

HEMRE, G.-I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHK, Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 175-194, 2002.

HEPHER, B. Principles of fish nutrition. In: SHILO, M.; SARIG, M. (Ed.). **Fish culture in warm water systems: problems and trends**. Boca Raton: CRC, 1989. p. 121-141.

HERTRAMPF, J. W., PIEDAD-PASCUAL, F. **Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds**. Dordrecht: The Netherlands Kluwer Academic, 2000.

HICKLING, D. R.; MARCH, B. E. A comparative study of trout and chicks regarding dietary effects on glycogen concentration in liver and muscle during feeding and subsequent to feed withdrawal. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 72, n. 1, p. 115-123, 1982.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, v. 170, n. 3-4, p. 267-283, 1999.

HILLESTAD, M.; JOHNSEN, F.; ÅSGÅRD, T. Protein to carbohydrate ratio in high-energy diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture Research**, v. 32, n. 7, p. 517-529, 2001.

HOCHACHKA, P. W. et al. Metabolic biochemistry of water-vs-air breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 736-750, 1978.

HOFER, R. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus* L. and rudd *Scardinius erythrophthalmus* L. 1. Amylase. **Journal of Fish Biology**, v. 14, n. 6, p. 565-572, 1979.

HOFER, R.; SCHIEMER, F. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. **Oecologia**, v. 48, n. 3, p. 342-345, 1981.

HONDA, E. M. S. Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. II. Alimentação de tambaqui, *Colossoma bidens*. **Acta Amazônica**, v. 4, p. 47-53, 1974.

HONORATO, C. A. **Desempenho, enzimologia e metabolismo de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas peletizadas e extrusadas com níveis médio e alto de lipídeos e carboidratos.** 2008. 114p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas)- Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2008.

HOULIHAN, D. F. et al. Growth rates and protein turnover in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Can. J. Fish. Aquat. Sciences**, v. 45, p. 951-964, 1988.

HSU, Y. L.; WU, J. L. The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. **Bull. Inst. Zool.**, v. 18, p. 45-53, 1979.

HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 1393-1399, 1959.

HUNG, S. S. O. Carbohydrate utilization by white sturgeon as assessed by oral administration tests. **J. Nutr.**, v. 121, n. 10, p. 1600-1605, 1991.

IZEL, A. C. U. et al. Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). . **Acta Amazônica.**, v. 34, n. 6, p. 179-184, 2004.

IZQUIERDO, M. S. et al. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 97-107, 2000.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 1994.

JOBLING, M. **Environmental Biology of Fishes**. New York: Chapman & Hall, 1995.

JOHNSON, E. G.; WATANABE, W. O.; ELLIS, S. C. Effects of dietary lipid levels and energy: protein ratios on growth and feed utilization of juvenile nassau grouper fed isonitrogenous diets at two temperatures. **North American Journal of Aquaculture**, v. 64, n. 1, p. 47-54, 2002.

JÓNÁS, E. et al. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio* L.) fishes. **Aquaculture**, v. 30, n. 1-4, p. 145-154, 1983.

KAPOOR, B. G.; SMIT, H.; VERGHINA, I. A. The alimentary canal and digestion in fish. **Advances in Marine Biology**, v. 13, p. 109-239, 1975.

KAWAI; IKEDA, S. Studies on digestive enzymes of fishes — II. Effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, v. 38, p. 265-270, 1972.

KESHAVANATH, P.; MANJAPPA, K.; GANGADHARA, B. Evaluation of carbohydrate rich diets through common carp culture in manured tanks. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 169-174, 2002.

KIM, J. D.; KAUSHIK, S. J. Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oreochromis mykiss*). **Aquaculture**, v. 106, n. 2, p. 161-169, 1992.

KLEIN, S., COHN, S. M., ALPERS, D. H. The alimentary tract in nutrition. In: SHILS, M. E. et al (Ed.). **Modern nutrition in health and disease**. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1998. p. 605-630.

KOHLA, U. et al. Growth, digestive enzyme activities and hepatic glycogen levels in juvenile *Colossoma macropomum* Cuvier from South America during feeding, starvation and refeeding. **Aquaculture Research**, v. 23, n. 2, p. 189-208, 1992.

KOVEN, W.; HENDERSON, R.; SARGENT, J. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*). I: Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 13, n. 1, p. 69-79, 1994.

KOVEN, W. M.; HENDERSON, R. J.; SARGENT, J. R. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*): in-vivo and in-vitro studies of the lipolytic activity in various segments of the digestive tract. **Aquaculture**, v. 151, n. 1-4, p. 155-171, 1997.

KRAJNOVIC-OZRETIC, M.; NAJDEK, M.; OZRETIC, B. Fatty acids in liver and muscle of farmed and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 109, n. 3, p. 611-617, 1994.

KROGDAHL, Å.; BAKKE-MCKELLEP, A. M.; BAEVERFJORD, G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, n. 6, p. 361-371, 2003.

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

KROGDAHL, A., SUNDBY, A. Characteristics of pancreatic function in fish. . In: PIERZYNOWSKI, S. G., ZABIELSKI, R. (Ed.). **Biology of the Pancreas in Growing Animals**. Amsterdam: Elsevier, 1999. p. 437-458.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantification. In: WALKER, J. M. (Ed.). **Methods in Molecular Biology: Basic Protein and Peptide Protocols**. Totowa: Human Press Inc., 1994.

KUMAR, S. et al. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, p. 381-388, 2007.

KUZ'MINA, V. V. Temperature influence on the total level of proteolytic activity in the digestive tract of some species of freshwater fishes. **J. Ichthyol.**, v. 30, p. 97-109, 1990.

KUZ'MINA, V. V. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. **Aquaculture**, v. 148, n. 1, p. 25-37, 1996.

LEE, S. M.; KIM, K. D. Effect of various levels of lipid exchanged with dextrin at different protein level in diet on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 6, p. 435-442, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEMIEUX, H.; BLIER, P.; DUTIL, J. D. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 293-303, 1999.

LIE, Ø. Flesh quality – the role of nutrition. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 341-348, 2001.

LIU, Z.-Y.; WANG, Z.; ZHANG, J. An acidic protease from the grass carp intestine (*Ctenopharyngodon idellus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 149, n. 1, p. 83-90, 2008.

LÓPEZ-VÁSQUEZ, K.; CASTRO-PÉREZ, C. A.; VAL, A. L. Digestive enzymes of eight Amazonian teleosts with different feeding habits. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 7, p. 1620-1628, 2009.

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Chapman & Hall, 1988.

LU, G. D. 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.**, v. 33, p. 249-254, 1939.

LUNDSTEDT, L. M. **Aspectos adaptativos dos processos digestivo e metabólico de juvenis de pintado *Pseudoplatystoma corruscans* arraçados com diferentes níveis de proteína e energia**. 2003. 153p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2003.

LUNDSTEDT, L. M.; MELO, F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137, n. 3, p. 331-339, 2004.

MACEDO, E. M. **Necessidades protéicas na nutrição do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) (Pisces, Characidae)**. 1979. 71p. Dissertação- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1979.

MANJAPPA, K.; KESHAVANATH, P.; GANGADHARA, B. Growth performance of common carp, *Cyprinus carpio* fed varying lipid levels through low protein diet, with a note on carcass composition and digestive enzyme activity. **Acta Ichthyol. Et Piscat.**, v. XXXII, n. 2, p. 146-155, 2002.

MARTINO, R. C. et al. Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 131-137, 2005.

MCGOOGAN, B. B.; GATLIN, D. M. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*: II. Effects of energy level and nutrient density at various feeding rates. **Aquaculture**, v. 182, n. 3-4, p. 271-285, 2000.

MELO, J. F. B. **Digestão e metabolismo de jundiá *Rhamdia quelen* submetido a diferentes regimes alimentares**. 2004. 95p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

MELO, J. F. B. et al. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 145A, p. 181-187, 2006.

MENTON, D. J. Research considerations into the nutrition of *Colossoma* and *Piaractus* in relation to culture conditions. In: LATINA., R. R. D. E. Y. C. D. A. D. A. (Ed.). **Cultivo de Colossoma**. Bogotá, Colombia: Editora Guadalupe Ltda., 1989. p. 75-84.

METÓN, I. et al. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **British Journal of Nutrition**, v. 82, n. 3, p. 223-232, 1999.

MIHELAKAKIS, A.; TSOLKAS, C.; YOSHIMATSU, T. Optimization of feeding rate for hatchery-produced juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 33, n. 2, p. 169-175, 2002.

MOHANTA, K. N. et al. Protein requirement of silver barb, *Puntius gonionotus* fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, n. 2, p. 143-152, 2008.

MOMMSEN, T. P. Growth and metabolism. In: EVANS, D. H. (Ed.). **The Physiology of Fishes**. Boca Raton: CRC Press, 1998. p. 65-97.

MOON, T. W. Adaptation, constraint and function of the gluconeogenic pathway. **Can. J. Zool.**, v. 66, p. 1059-1068., 1988.

MOON, T. W.; FOSTER, G. D. Chapter 4 Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 4, p. 65-100, 1995.

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

MORAES, G. et al. Aspectos adaptativos metabólicos da nutrição de peixes neotropicais de água doce. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.**, v. 54, n. 2, p. 101-107, 2007.

MORAIS, S. et al. Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: Effects on digestive physiology and food intake. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 106-122, 2007.

MORI, L. A. P. **Estudo da possibilidade de substituição do fubá de milho, pela pupunha, na alimentação de alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 1993. 62p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, 1993.

MOVES, C. D. et al. Chapter 16 Exercise metabolism of fish. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**: Elsevier. p. 367-392, 1995.

NATALIA, Y. et al. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). **Aquaculture**, v. 233, n. 1-4, p. 305-320, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (N.R.C). **Nutrient requirements of fish**. Washington: National Academy Press, 1993.

NAVARRO, I. et al. Chapter 17 Fasting and starvation. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**: Elsevier, p. 393-434, 1995.

NG, W.-K. et al. Effects of feeding rate on growth, feed utilization and body composition of a tropical bagrid catfish. **Aquaculture International**, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2000.

NORVÁK, M. Colorimetric ultramicro method for the determination of here fatty acids. **J. of Lipid Research**, v. 6, p. 431-433, 1965.

NUNES, E. S. S. et al. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesq. Agropec. Bras., Brasília**, v. 41, n. 1, p. 139-143, 2006.

NYINA-WAMWIZA, L. et al. Effect of dietary protein, lipid and carbohydrate ratio on growth, feed efficiency and body composition of pikeperch *Sander lucioperca* fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 5, p. 486-492, 2005.

OLIVEIRA, A. C. B. **Isótopos estáveis de C e N como indicadores qualitativo e quantitativo da dieta do tambaqui (*Colossoma macropomum*) da Amazônia Central**. 2003. 86p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PELLETIER, D. et al. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 164, n. 3, p. 179-190, 1994.

PELLETIER, D.; GUDERLEY, H.; DUTIL, J.-D. Does the aerobic capacity of fish muscle change with growth rates? **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 12, n. 2, p. 83-93, 1993.

PERAGÓN, J. et al. Carbohydrates affect protein-turnover rates, growth, and nucleic acid content in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 179, n. 1-4, p. 425-437, 1999.

PEREIRA-FILHO, M. Importância da fibra na nutrição dos peixes. In: **Simpósio brasileiro de aquicultura**, Peruíbe: ABRAq, 1992. p.1-10.

PEREIRA, C.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. In vitro hepatocyte metabolism of alanine and glucose and the response to insulin in fed and fasted rainbow trout. **Journal of Experimental Zoology**, v. 271, n. 6, p. 425-431, 1995.

PÉRES, A.; ZAMBONINO INFANTE, J. L.; CAHU, C. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 145-152, 1998.

PERES, H.; OLIVA-TELES, A. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v. 179, n. 1-4, p. 325 - 334, 1999.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A. et al. Digestive enzymatic profile of *Dentex dentex* and response to different dietary formulations. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 154, n. 1, p. 157-164, 2009.

PEZZATO, L. E. et al. Nutrição de Peixes. In: CYRINO, J. E. P. et al (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Aquabil, 2004. p. 75-170.

PHILLIPS, J. W.; HIRD, F. J. R. Gluconeogenesis in vertebrate livers. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 57, n. 2, p. 127-131, 1977.

RATHORE, R. M.; KUMAR, S.; CHAKRABARTI, R. Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae) during early developmental stages. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, n. 1, p. 98-106, 2005.

REGOST, C. et al. Dietary lipid level, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). **Aquaculture**, v. 193, n. 3-4, p. 291-309, 2001.

REIMER, G. The influence of diet on the digestive enzymes of the Amazon fish Matrinchã, *Brycon melanopterus*. **Journal of Fish Biology**, v. 21, n. 6, p. 637-642, 1982.

RIBEIRO, P. A. P. et al. Efeito do uso de óleo na dieta sobre a lipogênese e o perfil lipídico de tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 1331-1337, 2008.

RICK, W. Trypsin and Chymotrypsin. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. New York and London: Academic Press, 1965. p. 800.

ROUBACH, R.; SAINT-PAUL, U. Use of fruits and seeds from Amazonian inundated forests in feeding trials with *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Pisces, Characidae). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 10, n. 2-3, p. 134-140, 1994.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill meal as an alternative protein source. **Journal of Food Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 509-540, 2007.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K., FOSSEIDENGEN, J. E. Effect of artificial feeding on digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte of maturing atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.). **Journal of Food Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 726-747, 2007.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K.; MALE, R. Seafood enzymes, utilization and influence on postharvest seafood quality. In: HAARD N.F, S. B. K. (Ed.). New York, USA: Marcel Dekker, 2000. p. 215-269.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 7-23, 2006.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 644-654, 2002.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K., STENSHOLT, B. K. Spatial distribution of Atlantic salmon post-smolts: Association between genetic differences in trypsin isozymes and environmental variables. In: **Proceedings of the International Symposium on Spatial Processes and Management of Fish Populations**. University of Alaska Sea Grant, AK-SG-01-02, Fairbanks. 2001. p.415-429.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. et al. Different dietary levels of protein to lipid ratio affected digestive efficiency, skeletal growth, and muscle protein in rainbow trout families. **Scholarly Research Exchange**, v. 2009, p. 1-13, 2009.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K., SUNDBY, A. Protease activities, plasma free amino acids and insulin at different ages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 22, n. 4, p. 337-347, 2000.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. et al. Digestive efficiency, free amino acid pools and quality of growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) affected by light regimes and vaccine types. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 255-272, 2009.

RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. et al. Disease resistance and immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 7, p. 557-568, 1999.

RYCHLY, J.; MARINA, B. A. The ammonia excretion of trout during a 24-hour period. **Aquaculture**, v. 11, n. 2, p. 173-178, 1977.

SÁ, R.; POUSÃO-FERREIRA, P.; OLIVA-TELES, A. Growth performance and metabolic utilization of diets with different protein:carbohydrate ratios by white sea bream (*Diplodus sargus*, L.) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 1, p. 100-105, 2007.

SABAPATHY, U.; TEO, L. H. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. **Journal of Fish Biology**, v. 42, n. 4, p. 595-602, 1993.

SAINT-PAUL, U. Ecological and physiological investigations of *Colossoma macropomum*, a new species for fish culture in Amazonia. **Memorias de la Association Latinoamericana de la Acuicultura.**, v. 5, p. 501-518, 1984.

SAINT-PAUL, U. The potential for *Colossoma* culture in Latin america. **Infofish International**, v. 2, p. 49-53, 1991.

SANTIGOSA, E. et al. Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. **Aquaculture**, v. 282, n. 1-4, p. 68-74, 2008.

SATPATHY, B. B.; MUKHERJEE, D.; RAY, A. K. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed conversion and body composition in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 17-24, 2003.

SEIXAS FILHO, J. T. et al. Atividade de amilase em quimo de três espécies de peixes Teleostei de água doce. **Bras. Zootc.**, v. 28, n. 5, p. 907-913, 1999.

SEIXAS FILHO, J. T. et al. Atividade de lipase em quimo de três espécies tropicais de peixes Teleostei de água doce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 6-14, 2000.

SHIAU, S. Y. et al. The influence of carboxymethylcellulose on growth, digestion, gastric emptying time and body composition of tilapia. **Aquaculture**, v. 70, n. 4, p. 345-354, 1988.

SILVA, J. A. M. D.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. D. Seasonal variation of nutrients and energy in tambaqui's (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) natural food. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, p. 599-605, 2000.

SILVA, J. A. M. D.; PEREIRA FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. D. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) incorporados em rações: digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1815-1824, 2003.

SIRE, M. F.; VERNIER, J. M. Comparative nutrition papers mini rev. Intestinal absorption of protein in teleost fish.rev. Intestinal absorption of protein in teleost fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 103, n. A, p. 771-781, 1992.

SMITH, L. S. Digestive functions in teleost fishes. In: HALVER, J. E. (Ed.). **Fish nutrition**. San Diego: Academic Press, 1989. p. 331-421.

STONE, D. A. J.; ALLAN, G. L.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 2, p. 123-134, 2003.

SUÁREZ, M. D. et al. Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 111, n. 3, p. 421-428, 1995.

SUL, H. S.; WANG, D. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. **Annual Review of Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 331-351, 1998.

SUNDE, J. **Digestive protease activities, growth and feed utilisation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)**. 2006. 96p. Tese (Doctor Scientiarum) - Institute of Marine Research (IMR)-Department of Aquaculture, University of Bergen, Bergen, Norway, 2006.

SUNDE, J. et al. Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture Nutrition**, v. 10, n. 4, p. 261-277, 2004.

SUNDE, J.; TARANGER, G. L.; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 335-345, 2001.

SUPANNAPONG, P. et al. Digestive enzymes and in-vitro digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*. **Aquaculture International**, v. 16, n. 5, p. 437-453, 2008.

TACON, A. J. **Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados: Manual de Capacitacion**. In: FAO (Ed.). Brasília, Brazil, 1989. p. 572.

TENGJAROENKUL, B. et al. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, n. 3-4, p. 317 - 327, 2000.

TIBALDI, E. et al. Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v. 261, n. 1, p. 182-193, 2006.

TOLEDO, M. P. **Processamentos de dietas práticas com diferentes fontes de energia para o crescimento e a digestibilidade da tilápia do Nilo.** 2004. 79p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

TORRISSEN, K. R.; LIED, E.; ESPE, M. Differences in digestion and absorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. **Journal of Fish Biology**, v. 45, n. 6, p. 1087-1104, 1994.

TORRISSEN, K. R.; SHEARER, K. D. Protein digestion, growth and food conversion in Atlantic salmon and Arctic charr with different trypsin-like isozyme patterns. **Journal of Fish Biology**, v. 41, n. 3, p. 409-415, 1992.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annal. Clin. Biochem.**, v. 6, p. 24-27, 1969.

UGOLEV, A. M.; KUZ'MINA, V. V. Fish enterocyte hydrolases. Nutrition adaptations. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 1, p. 187-193, 1994.

USCANGA, A.; MOYANO, F.; ALVAREZ, C. Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1079-1085, 2010.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Fishes of the Amazon and Their Environment.** Berlin: Springer, 1995.

VAL, A. L.; HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia.** Manaus: INPA, 1995.

VAL, A. L.; ROLIM, P. R.; RABELO, H. Situação atual da aquicultura na Região Norte. In: VALENTE, W. C. et al (Ed.). **Aquicultura no Brasil:** bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq; MCT, 2000. p. 247- 266.

VAN DER MEER, M. B.; ZAMORA, J. E.; VERDEGEM, M. C. J. Effect of dietary lipid level on protein utilization and the size and proximate composition of body compartments of *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 28, n. 6, p. 405-417, 1997.

VAN RAAIJ, M. T. et al. Effect of arterially infused catecholamines and insulin on plasma glucose and free fatty acids in carp. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 268, n. 5, p. 1163-1170, May 1, 1995.

VAN WAARDE, A. Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 74, n. 4, p. 675-684, 1983.

VIDAL JR, M. V. et al. Determinação da digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta do fubá de milho e do farelo de soja para tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizando-se técnicas com uso de indicadores internos e externos. **R. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.2193-220, 2004.

VIEIRA, V. P.; INOUE, L. A. K.; MORAES, G. Metabolic responses of matrinxã (*Brycon cephalus*) to dietary protein level. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 140, n. 3, p. 337-342, 2005.

VINATEA ARANA, L. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura**. Florianópolis: Da UFSC, 1997.

WALTER, H. E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. Verlag Chemie: Weinheim, 1984. p. 270-277.

WATANABE, T. Lipid nutrition in fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 73B, p. 3-16, 1982.

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S. **The biology of fish growth**. London: Academic Press, 1987.

WEIRICH, C. R.; REIGH, R. C. Dietary lipids and stress tolerance of larval fish. In: WEBSTER, C. D.; LIM, C. (Ed.). **Nutrition and Fish Health**. Binghamton: New York Haworth Press, 2001. p. 301-312.

WILLMOTT, M. E.; CLEMENTS, K. D.; WELLS, R. M. G. The influence of diet and gastrointestinal fermentation on key enzymes of substrate utilization in marine teleost fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 317, n. 1, p. 97-108, 2005.

WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v. 124, n. 1-4, p. 67-80, 1994.

WINFREE, R. A.; STICKNEY, R. R. Effects of dietary protein and energy on growth, feed conversion efficiency and body composition of tilapia aurea. **J. Nutr.**, v. 111, n. 6, p. 1001-1012, June 1, 1981.

WOOD, C. M. et al. Pulsatile urea excretion in the toadfish *Opsanus beta*: an analysis of the rates and routes. **J. Exp. Biol.**, v. 198, p. 1729-1741, 1995.

WU, G. et al. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. **Livestock Science**, v. 112, n. 1-2, p. 8-22, 2007.

YANG, S.-D.; LIOU, C.-H.; LIU, F.-G. Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 213, n. 1-4, p. 363-372, 2002.

ZAMBONINO INFANTE, J. L.; CAHU, C. L. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 98-105, 2007.