

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

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*).

Rodrigo Yamakami Camilo

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da
Saúde da Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências, área de concentração:
Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Moraes

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

C183ea

Camilo, Rodrigo Yamakami.

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*) / Rodrigo Yamakami Camilo. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

66 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Enzimas . 2. Enzimas digestivas. 3. Peixe - metabolismo. 4. *Brycon amazonicus*. 5. Aminoácidos. I. Título.

CDD: 574.1925 (20^a)

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

**“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*)”.**

Dissertação de Mestrado de Rodrigo Yamakami Camilo

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilberto Moraes.....

Profa. Dra. Cristina Ferro Correia Toniolo.....

Prof. Dr. José Fernando Bibiano Melo.....

“Para ser grande, sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha,
Porque alta vive.”

Fernando Pessoa

Ao meu pai, João, à minha mãe Cleusa, aos meus irmãos, Daniel e Luciana e à mulher que escolhi para estar ao meu lado e no meu coração, Priscilla, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

O resultado deste trabalho só foi possível graças ao esforço, ao trabalho e ao apoio de pessoas sérias e competentes que não podem, de forma alguma, ficar ocultos, por isso agradeço:

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Gilberto Moraes, por toda amizade e compreensão durante todos estes anos, pelo bom exemplo profissional e pessoal que o senhor nós dá e pelas horas doadas para realização deste trabalho.

Aos meus amigos de Laboratório (Araceli, Andressa, Ive, Luizinho, Luciana, Gustavo, Thori, Lícia, Alexandre Altran, Bibiano, Fernando, Juliana, Joyce, Guilherme, Lucas e Fernada, Livia, Japinha, Josi e Marcelo) por estarem sempre dispostos a me ajudar, me ensinar, me criticar e a me escutar durante as horas de trabalho.

À Cláucia (Timba) por ter me ajudado na formulação e na preparação das dietas e por ter lido este previamente.

Ao seu Toninho por todo o seu trabalho realizado no laboratório.

Ao meu grande amigo Joel por todos esses anos de convivência e por me emprestar seu ouvido durante meus desabafos.

Aos meus amigos de graduação (Mariana, Mariana, Lília, Cassiana, Karina, Flávio, Gustavo (Cabeça), Popples, Cassia, Grá, Maria e Ivanzinho), aos meus amigos de Ribeirão Preto (Leo, Edilaine, Ferezin, Mariana, Bueno, Mariana Ferezin, Gustavo, Ana Sílvia, Pancho, Dauane, Flávio, Hérica, Joãozinho, Sônia Henry, Cris, Mauro, Lúcia, Marisa, Wagner, Calcini, Lemão, Tião e Rafinha), aos meus primos (Xande, Lú, André, Amanda, Fábio, Andresa, Alexandra e Marcelo), ao Fernando e Elisandra pelo companheirismo e por todas as horas agradáveis que me proporcionaram durante todos esses anos.

Aos amigos do Cursinho da UFSCar pela companhia e pela possibilidade de aprendizado que tenho.

À Regiane e a Greice pelo seu bom trabalho desempenhado na secretaria de Pós-Graduação

Ao Departamento de Genética e Evolução e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução pelo suporte.

Ao CNPq e à FAPESP pelo financiamento.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Considerações gerais	01
1.2 Nutrição de peixes	02
1.2.1 Nutrientes	02
a) <i>Proteínas</i>	02
b) <i>Carboidratos</i>	04
c) <i>Lipídios</i>	05
1.2.2 Digestão e enzimas digestivas	06
1.3 Jejum	09
1.4 Metabolismo	10
1.5 A espécie	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Desenho experimental	17
3.2 Biometria	18
3.3 Análises do material coletado	18
3.3.1 Determinações enzimáticas	18
a) <i>Preparação dos homogeneizados celulares</i>	18
b) <i>Ensaio enzimáticos</i>	19
Amilase	19
Protease inespecífica	20
Tripsina	20
Lípases inespecíficas	21
c) <i>Proteínas totais do sobrenadante dos homogeneizados tissulares</i>	21
3.3.2 Preparação dos extratos ácidos	21
3.3.3 Preparação dos extratos neutros	22
3.3.4 Determinação dos intermediários metabólicos	22
a) <i>Triglicerídeos</i>	22
b) <i>Ácidos graxos livres</i>	22
c) <i>Glicose</i>	23
d) <i>Lactato</i>	23
e) <i>Piruvato</i>	23
f) <i>Glicogênio</i>	24
g) <i>Proteínas totais</i>	24
h) <i>Aminoácidos livres</i>	24

i) Amônia.....	24
3.4 <i>Análises estatísticas</i>	25
4. RESULTADOS	25
4.1 <i>Biometria</i>	25
4.2 <i>Enzimas digestivas</i>	25
4.3 <i>Perfil metabólico</i>	30
<i>Perfil lipídico</i>	30
<i>Perfil glicídico</i>	33
<i>Perfil protéico</i>	37
5. DISCUSSÃO	40
5.1 <i>Enzimas digestivas</i>	40
5.2 <i>Metabolismo intermediário</i>	46
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. Exemplar de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i>	16
Figura 2. Trato digestório de matrinxã (<i>B. amazonicus</i>) e suas subdivisões.	18
Figura 3. Atividade enzimática amilohidrolítica de cecos pilóricos, de intestino anterior e de intestino posterior de <i>B. amazonicus</i> em U/ mg de proteína. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.	28
Figura 4. Atividade enzimática proteolítica de estômago de cecos pilóricos, de intestino anterior e de intestino posterior de <i>B. amazonicus</i> em U/ mg de proteína. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.	28
Figura 5. Atividade enzimática trípica de cecos pilóricos, de intestino anterior e de intestino posterior de <i>B. amazonicus</i> em U/ mg de proteína. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.	29
Figura 6. Atividade enzimática lipolítica inespecífica de cecos pilóricos, de intestino anterior e de intestino posterior de <i>B. amazonicus</i> em U/ mg de proteína. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.	29
Figura 7. Concentração média de triglicerídeos no plasma, músculo branco e fígado de <i>B. amazonicus</i> em diferentes condições alimentares. Os valores da	

concentração de triglicerídeos do plasma são expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.....31

Figura 8. Concentração de ácidos graxos livres plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes condições alimentares. Os valores das concentrações de ácidos graxos livres do plasma estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.....31

Figura 9. Concentrações de glicose no plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materiais analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de glicose do plasma estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.....35

Figura 10. Concentrações de lactato de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materias analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de lactato do plasma estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.....35

- Figura 11.** Concentrações de piruvato de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materiais analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de piruvato do plasma estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.....36
- Figura 12.** Concentrações de glicogênio de músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materiais analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações glicogênio do músculo branco e do fígado estão expressos em μmol glicosil-glicose/g de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.36
- Figura 13.** Concentração de proteína de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materiais analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de proteína do plasma estão expressos em mg/ml de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em mg/mg de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam médias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.....39
- Figura 14.** Concentrações de aminoácidos de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materiais analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de aminoácidos do plasma estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam médias

estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.39

Figura 15. Concentrações de amônia de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materiais analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de amônia do plasma estão expressos em $\mu\text{mol/ ml}$ de plasma do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol/ mg}$ de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam médias estatisticamente diferentes para $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.....40

LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
Tabela 1. Composições bromatológicas das dietas experimentais.....	19
Tabela 2. Parâmetros biométricos.	25
Tabela 3. Atividades das enzimas digestivas nas diferentes porções do trato gastrointestinal de matrinxã (<i>B. amazonicus</i>) em diferentes condições alimentares.....	27
Tabela 4. Médias das concentrações das moléculas do perfil lipídico de plasma, músculo branco e fígado de <i>B. amazonicus</i> em diferentes condições alimentares.....	32
Tabela 5. Médias das concentrações das moléculas do perfil glicídico de plasma, músculo branco e fígado de <i>B. amazonicus</i> em diferentes condições alimentares.....	34
Tabela 6. Médias das concentrações de proteína, aminoácidos e amônia de plasma, músculo branco e fígado de <i>B. amazonicus</i> em diferentes condições alimentares.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AAEL	Aminoácidos essenciais livres
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
ATP	Adenosina tri-fosfato
CCK	Colecistocinina
cm	Centímetros
dl	Decilitros
EB	Energia bruta
ENN	Extrato não nitrogenado
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo forma reduzida
g	Gramas
g	Gravidade
kcal	kilocalorias
kg	kilogramas
l	Litros
LAP	Leucina aminopeptidase
mg	Miligramas
mM	Milimolar
n	Número de indivíduos
NADH+H ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida
nm	Nanômetro
nmols	Nanomols
PB	Proteína bruta
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
SEM	Erro padrão da média
SA	Dieta sem amido
SA+AAEL	Dieta sem amido mais aminoácidos essenciais livres
SO	Dieta sem óleo
SO+AAEL	Dieta sem óleo mais aminoácidos essenciais livres
TAME	<i>p</i> -toluenesulfonil-L-arginine etilester
TCA	Ácido tricloroacético
U	Atividade enzimática
U/ mg proteína	Atividade enzimática específica
ul	Microlitros
v/v	Volume por volume

RESUMO

Para que os nutrientes ingeridos pelo peixe sejam utilizados para o crescimento e para a manutenção do metabolismo energético, eles, primeiramente, precisam ser absorvidos pelo trato gastrointestinal do animal, porém a maioria dos alimentos ingeridos pelos peixes não podem ser absorvidos diretamente pela mucosa gastrointestinal, já que são constituídos em grande parte por moléculas de alto peso molecular. O processo de transformação em moléculas menores é catalisado por enzimas digestivas. Desta forma, um dos fatores que limita absorção do alimento é a disponibilidade dessas enzimas. Sua síntese e a secreção podem ser estimuladas pela presença de aminoácidos livres no lúmen gástrico e intestinal.

Neste trabalho avaliamos o efeito de aminoácidos essenciais livres (AAEL) adicionados à dieta sobre a síntese de enzimas digestivas e no metabolismo intermediário de matrinxã. Seis grupos de peixes foram submetidos a condições alimentares diferentes durante 15 dias. O grupo controle recebeu uma ração com 34% de proteína e 4.670 kcal por kg de ração de energia bruta. O segundo grupo, chamado SO, foi alimentado com uma ração que continha caseína e gelatina e amido de milho. O terceiro grupo, denominado SO+AAEL, foi alimentado com uma ração semelhante à anterior, porém 0,6% celulose foi substituída por uma mistura 0,1% de fenilalanina, 0,1% de triptofano, 0,1% de valina, 0,1% de histidina, 0,1% de arginina e 0,1% de leucina. O quarto grupo, chamado SA, foi alimentado com uma ração que continha caseína e gelatina e óleo de soja. O quinto grupo, denominado, SA+AAEL, foi alimentado com uma ração semelhante à anterior, porém a 0,6% celulose foi substituída por seis AAEL, tal como explicado acima. O último grupo ficou em jejum durante período experimental.

Após o período experimental, 9 peixes de cada tratamento foram amostrados para a coleta de sangue, músculo branco, fígado e trato digestório. As atividades amilolítica, proteolítica inespecífica, trípica e lipolítica ensaiadas no sobrenadante dos homogeneizados tissulares do trato digestório apresentaram ajustes devido à modificação da composição da dieta, principalmente devido a ausência de amido e à adição de AAEL. O presente conjunto de dados indica que o matrinxã é capaz de ajustar a secreção dessas enzimas para otimizar seu processo químico digestivo.

As alterações das concentrações dos intermediários metabólicos plasmáticos, musculares e hepáticos tornam evidente que o matrinxã é capaz de adaptar seu metabolismo intermediário frente à alteração da condição alimentar para manter suas funções vitais. Porém o aumento da atividade enzimática nos grupos que receberam uma dieta com AAEL não provocou modificação significativa do metabolismo intermediário.

ABSTRACT

For the nutrients ingested by fish are used for growth and maintenance of the energetical metabolism, they need firstly being absorbed by gastrointestinal tract. However, the most foods ingested cannot be absorbed directly through the gastrointestinal mucosa, since they are largely formed by high molecular weight molecules. The process of transforming large molecules into smaller is catalyzed by digestive enzymes. Therefore, a limiting factor to the food absorption is the availability of those enzymes. Their synthesis and the secretion can be stimulated by free amino acids in the gastric and intestinal lumen.

We have investigated the effect of free essential amino acids (AAEL) supplementing the diets on the synthesis of digestive enzyme and the intermediary metabolism of matrinxa. Six fish groups were submitted to different feeding condition for 15 days. The control group was fed with 34% of protein and 4.670 kcal of gross energy by kg of food. Maize starch and soy oil were used as energy source. The second group, called SO, was fed with casein and gelatin as protein source and maize starch as energy source. The third group, called SO+AAEL, was feed with a similar food wherein the 0.6% of cellulose, added as inert stuff, was replaced by a mixture containing 0.1% of phenylalanine, 0.1% tryptophane, 0.1% valine, 0.1% histidine, 0.1% arginine and 0.1% leucine. The fourth group, called SA, was feed with casein and gelatin as protein source and soy oil as energy source. The fifth group, called SA+AAEL, was feed with a similar food but 0.6% of cellulose was replaced by a mixture of six AAEL, just as above. The last group was kept in fast over the experimental period.

After the experimental period, 9 fish from each treatment were sampled. The blood was withdrawn and white muscle, liver and digesting treat were excised. The amylolytic, proteolytic and lipolytic activities assayed in digestive tract homogenates were responsive to diet composition, mainly to the absence of starch and the addition of FEAA. The present set of data indicates that the matrinxa is able to adjust these enzymes production toward digestive process optimization.

The alterations in plasmatic, muscular and hepatic metabolic intermediaries' concentration become evident that the matrinxa is able to adapt its intermediary metabolism to the changes on the feeding condition to preserve vital functions. However the increase of the enzymatic activity in the fed with the diet AAEL did not result in significant modification on the intermediary metabolism.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais.

Desde a segunda metade do século XX a aquicultura tem sido reconhecida mundialmente como um investimento viável e lucrativo, visto que além de proporcionar a manutenção dos estoques naturais, a produção pesqueira parece ser bem mais controlada através do cultivo de peixes sob condições de manejo, obtendo-se dessa forma maiores rendimentos.

No Brasil, a piscicultura é uma atividade comercial com grande potencial de crescimento, já que há uma grande variedade de espécies, que podem ser cultivadas, e há boas condições climáticas. Porém, o potencial para a expansão dessa atividade é pouco aproveitado. Isso se deve, entre outras razões, à falta de uma política efetiva para organizar e promover o desenvolvimento da aquicultura como produtora de alimentos (Resende, 2003) e, também, à falta de informações sobre as espécies nativas (Prieto, Logato *et al.*, 2006).

Para que essa atividade possa atingir toda a sua potencialidade, tornam-se importantes os estudos relacionados ao melhoramento de técnicas de reprodução, à nutrição, ao manejo e aos fatores físico-químicos que interferem na sobrevivência dos peixes nativos criados em cativeiro, visto que, muito do que se sabe sobre saúde, qualidade e crescimento de peixes vêm do estudo aplicado a outras espécies, principalmente salmão, *Salmo salar*, e truta, *Onchorinchus mykiss*, (Hachbarth, 2004).

Superados os problemas relativos às técnicas de reprodução fora do habitat da espécie, o que é um grande problema na piscicultura, os conhecimentos relativos às diferentes necessidades nutricionais e aos diferentes comportamentos alimentares possuem um papel fundamental no desenvolvimento da piscicultura. A alimentação é o componente mais relevante nos custos de produção da piscicultura (Kubitza, 1997; Scorvo Filho, Martin *et al.*, 1998) devendo suprir as necessidades nutricionais do animal para que haja um ganho satisfatório de biomassa. Além disso, um arraçamento adequado também contribui para a manutenção da qualidade da água de cultivo e dos efluentes de piscicultura (Azzaydi, Martnez *et al.*, 2000; Henry-Silva, Camargo *et al.*, 2006).

O crescimento e a eficiência alimentar de uma espécie são os fatores mais críticos para se determinar a viabilidade de sua produção em escala industrial (Hung, Fynn-Aikins *et al.*, 1989). Visando o sucesso da criação intensiva de uma espécie, existe a necessidade de se determinar suas necessidades nutricionais, práticas de alimentação e estratégias de manejo alimentar (Jørgensen, Baardvik *et al.*, 1996). Para a elaboração de uma ração adequada aos peixes atualmente cultivados, é preciso conhecer as variações da estrutura e fisiologia do seu

sistema digestório (Portz, 2001) e buscar parâmetros que reflitam o aproveitamento do alimento pela espécie cultivada (Melo, 2004).

1.2 Nutrição de peixes

A qualidade nutricional da dieta é importante para a criação de peixes e pode determinar em grande parte o sucesso desta criação. Atualmente, o estudo da nutrição de peixes tem o papel de reconhecer e entender a inter-relação entre os níveis de nutrientes da dieta, a digestibilidade, a absorção dos nutrientes, o crescimento e a saúde dos animais utilizados na aquicultura (Halver, 2001). Esses estudos têm demonstrado que qualquer dieta, que vise promover o crescimento, precisa incluir uma fonte de energia, aminoácidos essenciais e certas vitaminas e minerais (De Almeida, 2006). Porém, segundo PHILLIPS (1969), é necessário um balanço adequado entre alimentos energéticos e construtores (carboidratos, lipídios e proteínas), para se obter o máximo crescimento da espécie a um baixo custo

Os requerimentos nutricionais de todas as espécies aquáticas cultivadas estão compreendidos entre cinco grupos de nutrientes: proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais (Tacon, 1989). Dentre estes, os carboidratos, os lipídios e as proteínas podem ser usados como fonte de energia pelos peixes, mas esses compostos não proporcionam as mesmas taxas de crescimento (Jobling, 1995). Portanto, os peixes e animais terrestres necessitam, de modo geral, os mesmos nutrientes para o crescimento, reprodução e outras funções fisiológicas. Esses nutrientes geralmente são obtidos dos alimentos disponíveis no ambiente. Porém, se os peixes são mantidos em confinamento, onde o alimento natural se torna escasso, eles devem ser alimentados com uma ração nutricionalmente completa e balanceada (Rotta, 2003). A supressão de qualquer nutriente requerido pelo peixe reduzirá a taxa de crescimento, aumentará a taxa de conversão alimentar e poderá, ainda, causar doenças e mortalidade (Hepher, 1989).

1.2.1 Nutrientes

a) Proteína

A proteína da dieta é um dos fatores mais relevantes, já que ela é o ingrediente que mais afeta o crescimento dos peixes e o custo da alimentação (Van Den Thillart e Van Raaij, 1995; Lee, Cho *et al.*, 2000; Lee e Lee, 2004). Independente de seu hábito alimentar, em geral, os peixes necessitam de grandes quantidades de proteína para crescer (Hepher, 1989). Isto ocorre porque os aminoácidos oriundos da hidrólise de proteínas consumida na dieta dos

peixes podem ser utilizados em duas rotas metabólicas: catabolismo, que é o processo no qual os aminoácidos absorvidos são desaminados ou descarboxilados para serem utilizados como fonte de energia (Cowey, Mackie *et al.*, 1985; Wilson, 1989; De Silva e Anderson, 1995) ou anabolismo, que é o processo no qual os aminoácidos são utilizados para a síntese de proteínas do corpo. Neste caso a composição em aminoácidos da proteína consumida desempenha um papel crucial (Hepher, 1989). Sendo assim, a quantidade de proteína consumida pelos peixes afeta diretamente seu estado metabólico, já que altos níveis de proteína resultam em aumentos nas concentrações de aminoácidos livres circulantes, na excreção de amônia, na síntese proteica, na atividade das enzimas gliconeogênicas e na redução da atividade das enzimas globalísticas (De Silva e Anderson, 1995).

Para peixes, o requerimento protéico estimado que proporciona o melhor crescimento varia entre 25% e 50% do peso seco da ração dependendo da espécie (Nrc, 1993) e da idade. Porém, WILSON (1989) salientou que tais requerimentos podem ser muitas vezes superestimados e, como o excesso de proteína não pode ser estocado, as proteínas são, normalmente, catabolizadas e os aminoácidos liberados podem ser utilizados como fonte de energia. LEE e colaboradores (2000) relatam que altos níveis de proteína de boa qualidade na dieta, geralmente, resultam em um crescimento rápido. Entretanto, como a fração proteica é geralmente a parte mais cara, estas seriam mais eficientes, sob o ponto de vista econômico, se destinadas para o crescimento, para o qual são essenciais, enquanto as fontes não proteicas, como carboidratos e lipídios, seriam utilizadas para fins energéticos (Hepher, 1989), poupando o requerimento em proteínas da dieta (Chou, Su *et al.*, 2001a).

Alguns autores salientam que a quantidade de proteína sintetizada pelo peixe vai depender, não somente da quantidade de proteína ingerida, mas também do seu balanço entre aminoácido e energia digestível (Carter e Houlihan, 2001; Halver e Hardy, 2002) e principalmente da qualidade da proteína. A qualidade da proteína é baseada na proporção de aminoácidos essenciais (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) e não-essenciais presentes na fonte protéica. Uma proteína, que possui uma composição de aminoácidos bastante semelhante às necessidades de aminoácidos da espécie cultivada, é descrita como sendo de alto valor nutritivo. Portanto é importante conhecer e comparar o requerimento protéico e o requerimento aminoacídico de cada espécie criada (Craig e Helfrich, 2002) para que haja um bom aproveitamento deste nutriente pelo peixe.

b) Carboidratos

Os carboidratos possuem uma considerável importância como ingredientes da dieta de peixes, pois eles apresentam características físicas atrativas e são fontes energéticas de baixo custo para várias espécies (Erfanullah e Jafri, 1998; Craig e Helfrich, 2002; Rueda-Jasso, Conceicao *et al.*, 2004; Krogdahl, Hemre *et al.*, 2005). Os carboidratos utilizados na produção de rações para peixes vão desde açúcares simples facilmente digeridos e absorvidos até açúcares complexos que não são digeridos, como a celulose (Smith, R. R., 1980; Krogdahl, Hemre *et al.*, 2005). Alguns carboidratos, como o amido, podem ser utilizados como agentes aglutinantes na preparação das dietas. (Craig e Helfrich, 2002; Krogdahl, Hemre *et al.*, 2005).

Apesar dos carboidratos serem necessários aos organismos por desempenharem importantes funções biológicas, tais como fornecer energia para o cérebro e tecido nervoso na forma de glicose, e como precursor metabólico de ácidos nucléicos e mucopolissacarídeos (Cowey, Adron *et al.*, 1975; Peragon, Barroso *et al.*, 1999), eles ainda possuem, somente, um papel secundário em relação aos lipídios e às proteínas na composição da dieta (Hemre, Mommsen *et al.*, 2002), uma vez que os peixes tendem a oxidar aminoácidos mais eficientemente e preferencialmente à glicose (Lovell, 1988). Porém muitos trabalhos vêm sendo realizados buscando a otimização do seu uso como fonte de energia em substituição a fontes protéicas, já que estas são relativamente bem mais caras (Wilson, 1994; Lee e Lee, 2004; Vieira, Inoue *et al.*, 2005).

A habilidade de utilizar carboidratos pode variar muito entre as espécies de peixes (Wilson, 1994; Hutchins, Rawles *et al.*, 1998). A utilização deste componente da dieta pelos peixes parece estar relacionada com seu sistema metabólico, com o seu sistema digestório, com os diferentes ambientes aquáticos e com os diferentes níveis e tipos de carboidratos utilizados na preparação da dieta (Walton e Cowey, 1989; Thibault, Blier *et al.*, 1997; Medale, Poli *et al.*, 1999). Os peixes carnívoros apresentam uma pobre habilidade para digeri e metabolizar carboidratos (Moon e Foster, 1995; Kubitza, 1999; Moon, 2001; Lee e Lee, 2004). Já os peixes herbívoros e onívoros podem digerir e metabolizar carboidratos relativamente bem quando comparados com espécies carnívoras, como os salmonídeos (Furuichi e Yone, 1981; Weatherley e Gill, 1987; Lee e Lee, 2004). Em peixes de águas quentes, a utilização carboidratos da dieta é consideravelmente alta (Nrc, 1993; Wilson, 1994). Da mesma maneira, o amido cozido ou geleificado é mais digerível e têm um melhor efeito sobre o ganho em peso quando comparado ao amido cru (Steffens, 1987; Craig e Helfrich, 2002). Sendo assim, a incorporação deste nutriente pode provocar benefícios adicionais para o crescimento do peixe e para a qualidade do “pellet” de ração.

É importante ressaltar, também, que devido às poucas informações existentes a respeito das funções biológicas e da metabolização deste nutriente em peixes (Peragon, Barroso *et al.*, 1999) e ao fato dos carboidratos, geralmente, não serem tão bem aproveitados por algumas espécies (De Silva e Anderson, 1995), o consumo excessivo deste nutriente pode resultar em uma condição patológica (Lall, 1991; Kumar, Sahu *et al.*, 2005), afetar o crescimento, a conversão alimentar, a retenção de nutrientes e a composição corporal.

c) Lipídios

Os lipídios também representam um componente importante da dieta dos peixes. Seus estoques são relativamente grandes e, além da sua inclusão normalmente aumentar a palatabilidade do alimento, eles contêm mais energia por unidade de peso que qualquer outro produto biológico e são fonte de ácidos graxos essenciais necessários ao crescimento e desenvolvimento (Nrc, 1993; Chou, Su *et al.*, 2001b). Eles também desempenham um importante papel na estrutura das membranas biológicas, servem como veículo para a absorção de vitaminas lipossolúveis (Hepher, 1989; Hertrampf e Piedad-Pascual, 2000; Weirich e Reigh, 2001; Perez-Casanova, Murray *et al.*, 2006b) e são precursores de importantes compostos biologicamente ativos, como por exemplo: hormônios, pigmentos e fatores de crescimento (Jobling, 1994).

A utilização de fontes lipídicas em dietas para peixes tem proporcionado melhores resultados no desenvolvimento, sobrevivência e deposição de nutrientes (Melo, 2004). Além de poder influenciar significativamente o crescimento e a conversão alimentar dos peixes (Stickney e Mcgeachin, 1983), os lipídios da dieta influenciam significativamente a composição dos lipídios em termos de qualidade e composição de ácidos graxos (Carter, Houlihan *et al.*, 2001).

Uma tendência recente na nutrição de peixes é usar altos níveis de lipídios na dieta. Embora o aumento de lipídios na dieta possa ajudar a reduzir os custos da dieta, já que o seu uso pode diminuir a utilização de proteína como fonte de energia, altos níveis de lipídeos podem interferir na qualidade do “pellet” (Jauncey, 1982) e provocar uma deposição excessiva de gordura no fígado e na carcaça, comprometendo a saúde e a qualidade do peixe (Craig e Helfrich, 2002).

Sabe-se que quantidades de lipídios variando entre 10 e 20% do peso seco da dieta são suficientes para permitir o direcionamento eficiente da fração protéica da dieta para o crescimento, sem que haja excessiva deposição de gordura na carcaça (Cowey e Sargent,

1979; Watanabe, 1982). Porém, a quantidade precisa de lipídio depende do nível de proteína na dieta e, em alguns casos, também do nível de carboidrato (Watanabe, 1982).

1.2.2 Digestão e enzimas digestivas

Visto que o nutriente deve passar antes pelos processos de digestão e absorção para que ele seja utilizado metabolicamente (Nrc, 1993), o valor nutricional de um alimento não deve estar baseado somente em sua composição química, mas também na quantidade de nutrientes que o peixe pode absorver.

A digestão é um processo no qual o alimento com alto peso molecular ingerido é reduzido em moléculas de baixo peso molecular que podem ser absorvidas. Este processo é uma ação coordenada de processos físicos, microbiológicos e químicos que começa logo quando o alimento é ingerido e termina quando as fezes são excretadas.

As atividades físicas que geralmente se iniciam no esôfago incluem o pulsionamento, o esmagamento e a mistura do quimo. A ação microbiana dos alimentos é realizada por enzimas de bactérias e protozoários presentes geralmente na porção final do tubo digestivo. A principal atividade química é efetuada pelas enzimas digestivas secretadas pelo animal. A ação enzimática é a um processo específico para a hidrólise de proteínas, carboidratos e lipídeos, e envolve um grande número de enzimas distintas (Halver e Hardy, 2002). Dito isto, para a otimização dos níveis de nutrientes é preciso saber se está havendo aproveitamento adequado, ou seja, se está ocorrendo adequadamente a digestão e a absorção dos nutrientes. Como estes parâmetros estão diretamente relacionados à atividade das enzimas digestivas, já que a eficiência da absorção dos nutrientes e da conversão alimentar dependem da disponibilidade de enzimas digestivas e da capacidade de transporte trans-epitelial do trato digestório (Smith, L. S., 1980; Jobling, 1995), a determinação das atividades dessas enzimas tem uma grande importância na aquicultura (Hofer e Köck, 1989). Além disso, a disponibilidade das enzimas digestivas e o seu efeito na capacidade digestiva podem estabelecer um limite fisiológico na taxa de crescimento e na eficiência da conversão alimentar (Perez-Casanova, Murray *et al.*, 2006a). LEMIEUX e colaboradores (1999) reportaram que a atividade da tripsina de salmão do Atlântico, *Gadus morhua*, está relacionada à eficiência da conversão alimentar e possui um papel importante na regulação do crescimento.

Na maioria dos peixes, a maior parte da digestão ocorre no intestino (Rotta, 2003), porém, tanto o estômago quanto a mucosa intestinal, o pâncreas e os cecos pilóricos são fontes de enzimas proteolíticas (Phillips, 1969). CHESLEY (1934) ressalta que os cecos

pilóricos são embriologicamente equivalentes ao pâncreas exócrino e podem ter um papel fisiológico equivalente em alguns casos, sendo portanto muito importante no processo digestivo, já que um grande número de enzimas como tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidases (proteolíticas), amilases, lipases e quitinase são produzidas pelas células pancreáticas (De Silva e Anderson, 1995). O tecido pancreático também pode estar associado ao tecido adiposo que reveste os cecos pilóricos ou disperso no mesentério, assim como ocorre em muitos teleosteos (Kapoor, H. Smith *et al.*, 1975). Geralmente, a distribuição e a atividade dessas enzimas variam em função do hábito alimentar e da morfologia do trato digestório (Fagbenro, Adhdirh *et al.*, 2000).

A digestão de proteínas consiste na sua hidrólise em polipeptídeos que por sua vez são hidrolisados em aminoácidos livres. Os aminoácidos livres podem então ser absorvidos (Halver e Hardy, 2002). A digestão de proteínas começa pela ação da pepsina no estômago, sendo completada pela ação de proteases alcalinas, como tripsina e quimiotripsina, no intestino (Fange e Chiou, 1989).

A digestão dos lipídios pode ocorrer no estômago, no intestino e nos cecos pilóricos pela ação de uma variedade de lipases e colipases (Smith, 1989). As gorduras neutras são hidrolizadas em ácidos graxos e glicerol que podem ser utilizados como fonte de energia ou direcionados para processos biossintéticos.

A digestão de carboidratos ocorrer pela hidrólise de moléculas complexas no estômago, no intestino e nos cecos pilóricos (Wilson e Poe, 1985). Esta digestão é realizada por uma série de enzimas, sendo que a mais importante delas é a amilase, que é responsável pela produção de uma variedade de oligossacarídeos como produtos da reação (Lovell, 1988).

A secreção das enzimas digestivas é mediada por estímulos neurais e hormonais que geralmente provocam um aumento da secreção enzimática para a luz do tubo digestório. Os dois principais hormônios envolvidos no processo digestivo são a gastrina e a colecistocinina (CCK) (Rehfeld, 1978; Himick, Golosinski *et al.*, 1993; Suzuki, Kurokawa *et al.*, 1999; Vigna, 2000; Guilloteau, Le Meuth-Metzinger *et al.*, 2006).

A liberação do hormônio gastrina produzido pelas células gástricas do estômago provoca a liberação de ácido clorídrico pelas células parietais. O aumento da concentração de ácido clorídrico no estômago é um estímulo para a secreção de pepsinogênio (precursor da pepsina) pelas células pépticas (Biagini P, Monges G *et al.*, 1997; Vigna, 2000; Guyton e Hall, 2002).

A CCK produzida pelas células I do intestino anterior é a responsável pelo aumento da secreção de enzimas digestivas do pâncreas exócrino (Desbois, Le Huerou-Luron *et al.*, 1999;

Olsson, Aldman *et al.*, 1999; Vigna, 2000), pelo aumento da contração da vesícula biliar (Himick, Golosinski *et al.*, 1993; Cheeseman e Tsang, 1996), pelo peristaltismo intestinal e inibição da secreção do ácido gástrico e do hormônio gastrina (Liddle, 1997). A liberação destes hormônios esta diretamente relacionada com a ingestão de alimento (Rehfeld e Van Solinge, 1994). Entretanto, outros fatores de natureza química, distinta dos sinalizadores endógenos, podem estar relacionados ao estímulo de produção e/ou secreção das enzimas digestivas.

Os fatores que influenciam na atuação das enzimas digestivas têm sido investigados por muitos anos como um meio de entender o requerimento nutricional dos animais e o efeito dos constituintes da dieta na atividade destas enzimas (Divakaran, Kim *et al.*, 1999). O conhecimento desses fatores embasa as tentativas de adequação às mudanças da dieta. Some-se a isso o fato de os peixes também apresentarem capacidade de adaptação dos processos digestivos, tais como perfil de secreção enzimática, a absorção e o transporte de nutrientes (Kapoor, H. Smith *et al.*, 1975; Hofer, 1979). MELO e colaboradores (2002) verificaram aumento na atividade proteolítica ácida e alcalina, de tripsina e de quimotripsina no trato digestório de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen*, alimentados com teores crescentes de proteína. Resultados semelhantes foram observados com a atividade de tripsina, quimiotripsina, lipase e amilase em pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, alimentados com níveis crescentes de proteína e valores decrescentes de carboidratos (Lundstedt, Melo *et al.*, 2004). Para OWYANG (1994), os produtos da digestão de proteínas (proteoses, peptonas, peptídeos e aminoácidos), podem modular a ação de proteases pancreáticas, particularmente a tripsina.

A presença de aminoácidos no lúmen intestinal estimula a porção exócrina do pâncreas (Meyer, Kelly *et al.*, 1976; Thimister, Hopman *et al.*, 1996). Experimentos com ratos demonstram que uma dieta contendo uma mistura de aminoácidos induz o crescimento pancreático e a produção de proteases pancreáticas e que a substituição de uma dieta com 20% de aminoácidos livres por uma com 60% provoca um aumento da atividade da tripsina no pâncreas e no lúmen intestinal (Hara, Hashimoto *et al.*, 2000). Em larvas “sea bass”, *Dicentrarchus labrax*, a atividade da tripsina intestinal de exemplares alimentados com aminoácidos livres é 2,3 e 1,5 vezes maior do que a de peixes alimentados com caseína hidrolisada e com farinha de peixe, respectivamente (Cahu e Zambonino Infante, 1995).

NIJIMA (2000) e JEANNINGROS (1982) propuseram a possível existência de sensores para aminoácidos no duodeno, no jejuno e no sistema porta-hepático, capazes de estimular a síntese de enzimas digestivas. Esses aminoácidos ligados à nutrição poderiam

estar diretamente envolvidos nos processos de estimulação da síntese e da secreção de enzimas digestivas. Além disso, estudos recentes indicam que os nutrientes na circulação também contribuem para a regulação das funções gastrintestinais (Mearadji, Masclee *et al.*, 2001). A administração intravenosa de aminoácidos provoca um aumento da secreção gástrica (Lam, Masclee *et al.*, 1995) e do pâncreas exócrino (Konturek, Tasler *et al.*, 1979) e uma indução da contração da vesícula biliar (Boer, Masclee *et al.*, 1994; Gielkens, Eddes *et al.*, 1997; Liu, Pakala *et al.*, 2001).

O estudo da secreção de enzimas digestivas em peixes pode tornar mais claros alguns aspectos da fisiologia nutritiva e também auxiliar a resolver alguns problemas nutricionais (Hidalgo, Urea *et al.*, 1999), uma vez que o conhecimento da quantidade e especificidade de cada enzima presente no sistema digestório, assim como as condições em que ocorre a hidrólise dos alimentos, são importantes para se predizer o processo digestivo, compreendendo a digestibilidade de novos alimentos e a capacidade digestiva (Smith, L. S., 1980; Glass, Macdonald *et al.*, 1989).

1.3 Jejum

A energia necessária para a manutenção do metabolismo dos peixes provém de duas fontes: absorção dos nutrientes da dieta ou consumo de suas reservas. Devido à flutuação espacial e temporal da comida no ambiente aquático, os peixes experimentam períodos de redução do alimento disponível que podem durar muitos dias (Wieser, Krumschnabel *et al.*, 1992; Gerking, 1994; Van Dijk, Hardewig *et al.*, 2005). Os peixes em jejum podem poupar energia reduzindo a atividade locomotora ou de outras atividades (Wieser, Krumschnabel *et al.*, 1992). Alguns autores sugerem que o uso das reservas corpóreas do peixe inicia-se 48 horas após sua última refeição (Van Den Thillart e Van Raaij, 1995).

Estudos têm revelado que a restrição alimentar, em condições experimentais, envolve complexas alterações fisiológicas e metabólicas para promover o ajuste biológico do animal, e suas conseqüências finais são altamente dependentes da espécie considerada, da idade do peixe e das condições experimentais tais como temperatura da água, fotoperíodo, dieta pré-jejum e duração do período de jejum (Blasco, Fernández *et al.*, 1991; Moyes e West, 1995; Kieffer e Tufts, 1998).

Em uma revisão, LOVE (1980) mostra que certas espécies parecem utilizar proteínas (Stimpson, 1965; Butler, 1968; Narasimhan e Sundararaj, 1971) ou proteína e lipídio (Larsson e Lewander, 1973) enquanto outras espécies parecem poupar a proteína do corpo e mobilizar a gordura ou o estoque de glicogênio (Inui e Oshima, 1966; Kamra, 1966; Ince e So, 1984).

VAN DIJK (2005) trabalhado com “roach”, *Rutilus rutilus*, observou que, após um jejum de 21 dias, as concentrações glicogênio e de proteína no músculo branco são maiores no inverno do que no verão. Apesar de uma extensa literatura sobre as respostas metabólicas ao jejum prolongado em peixes, faltam estudos das mudanças metabólicas durante o período pós-prandial e jejuns curtos (Navarro e Gutiérrez, 1995).

A restrição alimentar prolongada, além de provocar uma diminuição das reservas energéticas e do metabolismo intermediário, afeta diretamente as atividades das enzimas digestivas e das enzimas metabólicas nos tecidos e no trato digestório (Krogdahl, Nordrum *et al.*, 1999; Krogdahl e Bakke-Mckellep, 2005). Um jejum de cinco semanas, em bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua*, causa um decréscimo da atividade das enzimas metabólicas de cecos pilóricos e do intestino e da atividade da tripsina de cecos pilóricos (Bélangier, Blier *et al.*, 2002). As atividades específicas da leucina aminopeptidase (LAP) e maltase de salmão do Atlântico, *Salmo salar*, diminuem rapidamente durante os primeiros cinco dias de jejum (Krogdahl e Bakke-Mckellep, 2005). MOMMSEN e colaboradores (2003) estudando tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, observaram um efeito diferente para um jejum de 5 dias. Neste caso houve um aumento da atividade de enzimas metabólicas da mucosa do estômago e do intestino dessa espécie.

A literatura a respeito dos efeitos do jejum na capacidade digestiva é limitada e algumas vezes fornece somente evidências circunstanciais sobre os efeitos do jejum na atividade das enzimas digestivas (Krogdahl, Hemre *et al.*, 2005). Isso torna importante a realização de estudos, principalmente em peixes nativos, sobre o efeito do jejum na atividade das enzimas digestivas.

1.4 Metabolismo

O perfil metabólico dos tecidos de peixes ainda é pouco utilizado nos estudos de nutrição. Alguns trabalhos sugerem que estes intermediários sejam uma importante ferramenta para se conhecer as relações metabólicas entre os tecidos e sua correspondência com nutrientes da dieta (Moraes e Bidinotto, 2000; Corrêa, 2002; Vieira, 2002; Lundstedt, 2003; Melo, 2004).

Os produtos da digestão que circulam no organismo são utilizados por uma variedade de tecidos e órgãos, nos quais estão sujeitos a diferentes reações químicas. Essas reações, que constituem o metabolismo intermediário, podem ter como destino a total degradação de moléculas para a liberação de energia para a realização de trabalho ou para a produção de constituintes teciduais, sejam eles estruturais ou de reserva. Sendo assim, o perfil metabólico

pode servir como excelente índice do estado fisiológico e nutricional do peixe. Segundo VIEIRA e colaboradores (2005), mudanças na concentração dos metabólitos plasmáticos refletem ajustes bioquímicos do metabolismo às mudanças nas dietas. O perfil metabólico plasmático reflete o papel do sangue de transportador dos diversos intermediários metabólicos entre os tecidos.

A quantidade de massa muscular branca do corpo do peixe representa um estoque substancial de glicogênio, aproximadamente vinte vezes maior que o do fígado (Moyes e West, 1995). Entretanto, em proporções relativas, o fígado estoca mais glicogênio que o músculo branco. Além disso, o músculo branco desempenha papel de destaque no metabolismo de proteínas. Salvo algumas diferenças, ele apresenta a maior quantidade relativa de aminoácidos essenciais do organismo, representando o maior volume de massa corpórea (Carter e Houlihan, 2001).

Dentre os tecidos do corpo o fígado desempenha papel fundamental no metabolismo intermediário, já que ele é um centro de distribuição de nutrientes provenientes do alimento (De Silva e Anderson, 1995; Lundstedt, Melo *et al.*, 2004) e é o principal local de ocorrência de várias reações químicas importantes. O fígado também é responsável pela manutenção do montante de aminoácidos corpóreo (Lovell, 1988), desempenhando um papel fundamental no metabolismo e na regulação do transporte destes aminoácidos para os tecidos (Carter, Houlihan *et al.*, 2001).

Os aminoácidos, oriundos da dieta ou da quebra de proteínas, desempenham numerosas funções nos peixes, e uma das principais é compor as proteínas (Ballantyne, 2001; Halver e Hardy, 2002). Porém, eles também são necessários para a síntese de outros compostos associados ao metabolismo, tais como hormônios, neurotransmissores e purinas. Além disso, quando em excesso, eles podem ser desaminados e os resíduos de carbono podem ser oxidados para suprir a demanda energética do metabolismo ou podem ser utilizados para a síntese de lipídios ou de carboidratos.

O principal produto final do catabolismo de proteínas em teleósteos é a amônia, porém uma porção significativa de perda nitrogenada é também excretada como uréia (Wood, Hopkins *et al.*, 1995), sendo que o fígado é o principal local de produção de amônia do organismo (Alexis e Paparaskeva-Papatsoglo, 1986). A amônia produzida nos tecidos é transportada pelo sistema sangüíneo até as brânquias, de onde é excretada para a água na forma de NH_4^+ . Esse metabólito é o resultado principalmente do catabolismo de aminoácido, indicando dessa forma proteólise (Waarde, Thillart *et al.*, 1983; Boyce, 1999). Além de dar uma idéia do balanço de nitrogênio do peixe, a quantificação das concentrações de amônia e

uréia nos tecidos tem sido usada como indicador dos efeitos dos fatores ambientais e nutricionais no metabolismo protéico (Rychly e Marina, 1977; Jobling, 1981; Beamish e Thomas, 1984; Pereira, Vijayan *et al.*, 1995; Lundstedt, Melo *et al.*, 2004; Melo, Lundstedt *et al.*, 2006).

A concentração de aminoácidos livres nos tecidos é relativamente baixa, pois a maior parte deles está compondo os tecidos protéicos do corpo (Halver e Hardy, 2002). As mudanças na concentração dos aminoácidos são seqüenciais e refletem as rotas metabólicas através dos tecidos de acordo com a digestão, absorção, metabolismo e conseqüentemente o crescimento (Jürs e Bastrop, 1995; Carter, Houlihan *et al.*, 2001). Portanto, a habilidade em regular o grande influxo de aminoácidos, presumivelmente para manutenção da homeostase tecidual, bem como para aperfeiçoar a utilização da energia e da proteína da dieta, é o ponto central para o sucesso da utilização deste nutriente (Carter, Houlihan *et al.*, 2001).

A glicose oriunda da dieta pode ser armazenada, como glicogênio, no fígado e nos músculos, através de uma série de reações enzimáticas; ou utilizada na síntese de componentes como triglicerídeos e aminoácidos não essenciais (Champe e Harvey, 1994). A glicose também pode ser utilizada como substrato para obtenção de energia (Dabrowski e Gunderley, 2002). Porém, apesar de ser uma molécula central no metabolismo da maioria dos vertebrados, especialmente em mamíferos, a glicose não parece ter o mesmo papel no metabolismo dos peixes (Hemre, Mommsen *et al.*, 2002), já que ela não é a fonte preferencial de energia, mesmo ocorrendo a maioria das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos.

A manutenção da glicemia é uma função básica do metabolismo de carboidratos e é controlada pelo fígado. Este órgão produz glicose a partir de precursores gliconeogênicos e reservas de glicogênio (Newgard, Hirsch *et al.*, 1983). A gliconeogênese é a rota responsável pela síntese de glicose *de novo* e síntese de glicogênio a partir de precursores como lactato, aminoácidos, glicerol e frutose. A importância desta via para a manutenção da homeostase dos carboidratos nos tecidos tem sido cada vez mais ressaltada em função dos altos requerimentos protéicos e, conseqüentemente, de aminoácidos pelos peixes (Suárez e Monnsen, 1987; Moon, 1988). A gliconeogênese é uma via importante nos estudos nutricionais, visto que ela tem como objetivo prover energia a partir de moléculas não glicídicas.

A glicogenólise é uma fonte de glicose devido à hidrólise do glicogênio, mas essa rota não parece ser a maior fonte de glicose para os tecidos quando os níveis de precursores na dieta são adequados. Ela representa uma estratégia emergencial quando a glicose não está

disponível a partir da dieta, ou pela gliconeogênese de aminoácidos provindos da digestão protéica (Walton e Cowey, 1989).

O tempo de aparecimento da glicose e de outros açúcares simples, oriundos dos alimentos, no plasma vai depender de vários fatores, como o conteúdo total de carboidratos e dos outros ingredientes da dieta, a forma de processamento, o hábito alimentar da espécie, o histórico nutricional do indivíduo e a temperatura da água (Bergot e Breque, 1983; Hung, Fynn-Aikins *et al.*, 1989).

A gordura é considerada a principal forma de armazenamento de energia corporal (Meurer, Hayashi *et al.*, 2002), sendo que os triglicerídeos, que são compostos formados pela esterificação de uma molécula de glicerol com três ácidos graxos (AG), são os principais tipos de lipídios que compõe as gorduras de reserva (Van Den Thillart e Van Raaij, 1995). Os lipídios são considerados grandes reservas energéticas, pois os átomos de carbono dos ácidos graxos são quimicamente mais reduzidos que os dos carboidratos e, portanto, a oxidação de um grama de triglicerídeos libera, aproximadamente, duas vezes mais energia que um grama de carboidratos (Lehninger, Nelson *et al.*, 1995).

Os lipídios oriundos da dieta e de outros substratos lipogênicos são processados e armazenados no fígado. Esses lipídios, armazenados no fígado, podem ser mobilizados rapidamente para que lipoproteínas e ácidos graxos livres (AGL) possam ser utilizados nos tecidos periféricos (Van Den Thillart e Van Raaij, 1995).

O primeiro passo para o uso de triglicérides como fonte de energia é sua hidrólise em AGL e glicerol, mediada pela lipase hormônio sensível. Em seguida, estes subprodutos são transportados para os tecidos ativos. O glicerol sofre transformações e é imediatamente aproveitado na glicólise sob a forma de 3-fosfogliceraldeído e degradado a piruvato que pode entrar no ciclo de Krebs. A degradação dos ácidos graxos ocorre nas mitocôndrias em um processo denominado beta-oxidação. As moléculas de ácidos graxos, que foram transformadas previamente em Acil-CoA no citoplasma, são degradadas em Acetil-CoA que em seguida entra no ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido cítrico), no qual são totalmente oxidadas à gás carbônico, com a produção de FADH_2 e $\text{NADH}+\text{H}^+$. As moléculas de FADH_2 e $\text{NADH}+\text{H}^+$ oriundas das reações anteriores são reoxidadas na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial para produção de mais ATP.

Diferentemente dos mamíferos, nos quais os lipídios são estocados quase exclusivamente no tecido adiposo, nos peixes os lipídios podem ser estocados em vários órgãos. Os principais locais de estocagem de lipídios em peixes são o mesentério adiposo, o fígado e o músculo (Van Den Thillart e Van Raaij, 1995). O transporte e a deposição de

lipídios em peixes aparentam ser um pouco diferente dos observados em vertebrados homeotérmicos. Os peixes apresentam um modelo diferenciado de distribuição de ácidos graxos do plasma para os tecidos, que é formado por dois componentes: o de liberação rápida e o de liberação lenta. O componente de liberação rápida ocorre com 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 triglicerídeos, que consiste na agregação, extrusão e transporte de partículas em triglicerídeos (Sheridan, 1988).

Sabe-se muito pouco sobre a concentração dos outros intermediários metabólicos nos diferentes tecidos e os múltiplos fatores que regulam o metabolismo em peixes o que dificulta extrapolar dados obtidos de uma espécie para outra, em função da diversidade na classe (De Almeida, 2006).

1.5 A espécie

Atualmente é inegável a necessidade de estudos sobre peixes neotropicais, uma vez que a procura por estas espécies vem crescendo de forma acelerada. Os peixes do gênero *Brycon*, que apresenta aproximadamente 67 espécies (Drewe, Horn *et al.*, 2004), têm sido incorporados com maior intensidade tanto nas criações experimentais como nas comerciais. Portanto, estudos com espécies desse gênero, que apresentem grande potencial para a piscicultura, tornam-se mais relevantes, já que há poucos trabalhos relacionando os componentes das dietas com aspectos metabólicos e digestivos com espécies deste gênero.

Neste trabalho, a espécie estudada foi o *Brycon amazonicus* (Figura 1), popularmente conhecido como matrinxã. *Essa espécie que* aqui denominamos de *B. amazonicus* foi erroneamente considerada como *Brycon cephalus* em trabalhos recentes. A distribuição de *B. amazonicus* restringe-se ao alto rio Amazonas no Peru e na Bolívia (Lima, 2003). A espécie estudada possui corpo alongado com pigmentação prateada nos flancos e na parte ventral, sendo a parte dorsal mais escura (Zaniboni-Filho, Carvalho *et al.*, 1988). Em ambiente natural, essa espécie apresenta hábito reofílico com período de reprodução entre dezembro e fevereiro. Apresenta desova total, porém a reprodução em cativeiro pode ser induzida por hormônios. O *B. amazonicus* é originário da Bacia Amazônica e do Araguaia-Tocantins, e vem sendo cultivada com sucesso na Região Sudeste do Brasil, atendendo ao crescente mercado (Gomiero, Ribeiro *et al.*, 2003). Este teleósteo de água doce apresenta um grande potencial econômico para a piscicultura, pois, além de aceitar facilmente ração artificial

(Castagnolli, 1992) e subprodutos agroindustriais (Izel, Pereira-Filho *et al.*, 2004), possui carne saborosa (Gomiero, Ribeiro *et al.*, 2003).

Em ambiente natural, o *B. amazonicus*, uma espécie reofilica, possui amplo espectro alimentar (Goulding, 1979) sendo considerada uma espécie onívora, já que sua alimentação natural consiste de frutos, sementes, flores, plantas herbáceas, insetos, restos de peixe, etc. (Val e Honczaryk, 1995; Pizango-Paima, 1997). Esta espécie acumula grandes reservas lipoprotéicas para fins reprodutivos e de sobrevivência na época seca (Leite, 2004). Além disso, é sabido que esta espécie responde às mudanças nutricionais (Reimer, 1982), possibilitando a otimização da composição das suas dietas através de inferências a partir do conhecimento dos mecanismos regulatórios envolvidos.

Esse peixe apresenta um grande potencial de crescimento e ao final de um ano de idade pode alcançar 0,8 kg a 1 kg de peso, com rendimento de 50% de filé com pele, o que lhe confere um rendimento de parte comestível muito maior que de outros peixes (Mendonça, 1996). Em média, o matrinxã adulto pode atingir até 4 kg e alcançar sua maturidade sexual com três anos de idade. Por apresentar rápido crescimento em cativeiro e alcançar bons preços no mercado, o matrinxã é a segunda espécie mais criada na Região Amazônica (Brandão, Gomes *et al.*, 2005).

Embora diversas instituições venham desenvolvendo pesquisas com matrinxã, persistem muitas dúvidas em relação à tecnologia de criação desta espécie, como a elaboração de dietas mais adequadas às várias fases de cultivo e, principalmente, do manejo alimentar na região sudeste do país (Frasca-Scorvo, Carneiro *et al.*, 2001). CYRINO e colaboradores (1986) ressaltaram que 35% de proteína bruta (PB) e 3.200 kcal de energia metabolizável por kg de ração podem ser suficientes para atender às exigências nutricionais desta espécie. Tais observações também foram obtidas em estudos realizados por MENDONÇA e colaboradores (1993). Sabe-se atualmente que esta espécie necessita de quantidades superiores a 27% de proteína e de 3900 kcal de energia bruta por kg de ração para um bom crescimento (Vieira, 2002; Izel, Pereira-Filho *et al.*, 2004). O matrinxã apresenta bom aproveitamento de ingredientes de origem animal e vegetal, sendo a farinha de peixe o ingrediente mais digestível (Cyrino, Castagnolli *et al.*, 1986; Sallum, Bertechini *et al.*, 2002). Porém, esta pode ser substituída pelo farelo de soja, sem acarretar prejuízos a qualidade do filé desta espécie (ANTUNES, 1994).

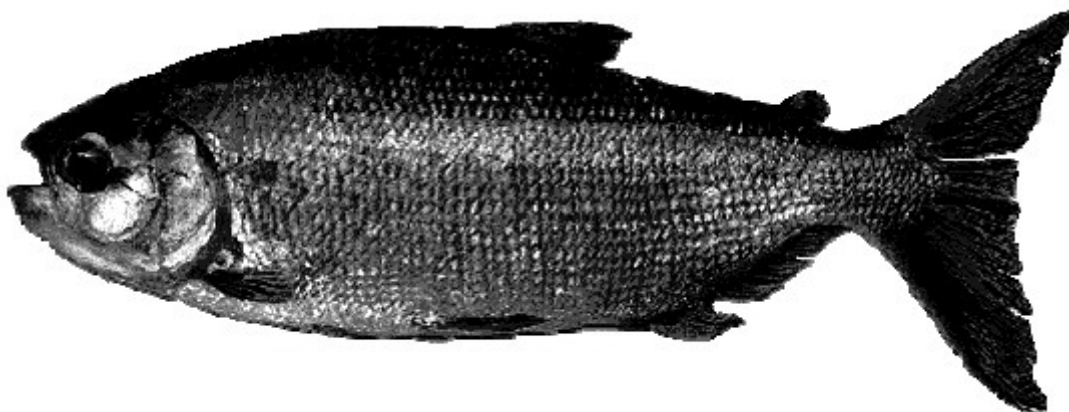


Figura 1. Exemplar de matrinxã, *Brycon amazonicus*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral.

O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações na atividade de enzimas digestivas de juvenis de matrinxã, *B. amazonicus*, as respostas metabólicas e o crescimento, em diferentes condições alimentares.

2.2 Específicos.

- Avaliar os efeitos do jejum sobre as atividades amilohidrolíticas, proteolíticas e lipolíticas digestivas e sobre o metabolismo intermediário de *B. amazonicus*.
- Avaliar os efeitos da adição de aminoácidos essenciais à dieta sobre as atividades amilohidrolíticas, proteolíticas e lipolíticas digestivas e sobre o metabolismo intermediário de *B. amazonicus*.
- Avaliar os efeitos de uma dieta com baixo teor de amido e de uma dieta com baixo teor de lipídios sobre as atividades amilohidrolíticas, proteolíticas e lipolíticas digestivas e sobre o metabolismo intermediário de *B. amazonicus*.
- Avaliar os efeitos de uma dieta de baixo teor de amido e de uma dieta de baixo teor de lipídios, ambas contendo aminoácidos essenciais livres, sobre as atividades amilohidrolíticas, proteolíticas e lipolíticas digestivas e sobre o metabolismo intermediário de *B. amazonicus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de matrinxã com aproximadamente 50g, oriundos da piscicultura São Geraldo, Sertãozinho, SP, foram transportados para o Laboratório de Bioquímica Adaptativa

do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, e mantidos em quarentena por 60 dias em caixas de 2000l em sistema fechado com fluxo contínuo e aeração constante. A qualidade da água foi monitorada e mantida durante a quarentena e o período experimental (temperatura 27 ± 1 °C, pH 7,2, oxigênio dissolvido $5,4\pm 1$ mg/l e amônia $0,12\pm 0,03$ mg/l). Durante este período, os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada contendo 27% de PB.

3.1 Desenho experimental

Depois de aclimatação, 162 peixes de ambos os sexos e de, aproximadamente, 100 gramas foram separados em 18 grupos semelhantes de 9 animais, e distribuídos em 18 tanques. Os tanques foram organizados de forma que cada condição alimentar fosse realizada em triplicata. Posteriormente, estas 18 caixas foram agrupadas aleatoriamente três a três em seis grupos distintos.

O primeiro grupo, denominado Jejum, permaneceu sem receber alimento durante o período experimental. O segundo grupo, denominado Controle, recebeu uma ração que continha, aproximadamente 36,3% de proteína e 4.670 kcal de energia bruta (EB) por kg de ração (Tabela 1). Caseína e gelatina foram as fontes protéicas dessa dieta. Amido de milho e óleo de soja foram utilizados como fonte de energia. O terceiro grupo (SO) foi alimentado com uma ração contendo caseína e gelatina como fonte de proteína e amido de milho como fonte de energia (Tabela 1). O quarto grupo (SO+AAEL) foi alimentado com uma ração semelhante à anterior, porém 0,6% de celulose, utilizada como matéria inerte na ração controle, foram substituídos por uma mistura contendo 0,1% de fenilalanina, 0,1% de triptofano, 0,1% de valina, 0,1% de histidina, 0,1% de arginina e 0,1% de leucina. O quinto grupo (SA) foi alimentado com uma ração contendo caseína e gelatina como fonte de proteína e óleo de soja como fonte de energia. O sexto grupo (SA+AAEL) foi alimentado com uma ração semelhante à anterior, porém os 0,6% de celulose foram substituídos por uma mistura de 0,1% de fenilalanina, 0,1% de triptofano, 0,1% de valina, 0,1% de histidina, 0,1% de arginina e 0,1% de leucina (Tabela 1).

Após um jejum de 24 horas, foi dado início ao período experimental no qual os peixes foram arraçoados durante 15 dias duas vezes ao dia, pela manhã e à tarde, até a saciedade. Decorrido o período de arraçoamento, os peixes foram anestesiados com 1,0 ppm de eugenol (Inoue, Santos Neto *et al.*, 2003). Três peixes de cada caixa, que somaram nove peixes por tratamento, foram amostrados para coleta de tecidos e sangue. Primeiramente, os peixes foram puncionados na veia caudal e imediatamente após a coleta de sangue, foram sacrificados por

secção medular e, depois de pesados e medidos (Tabela 2), uma amostra de fígado, de músculo branco e o trato digestório foram coletadas. O trato digestório foi dissecado sobre placa de Petri contendo solução salina gelada, descartando-se o conteúdo digestivo. O intestino foi subdividido em cecos pilóricos, porção anterior e posterior (Figura 2). Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e transferidos para $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises bioquímicas.

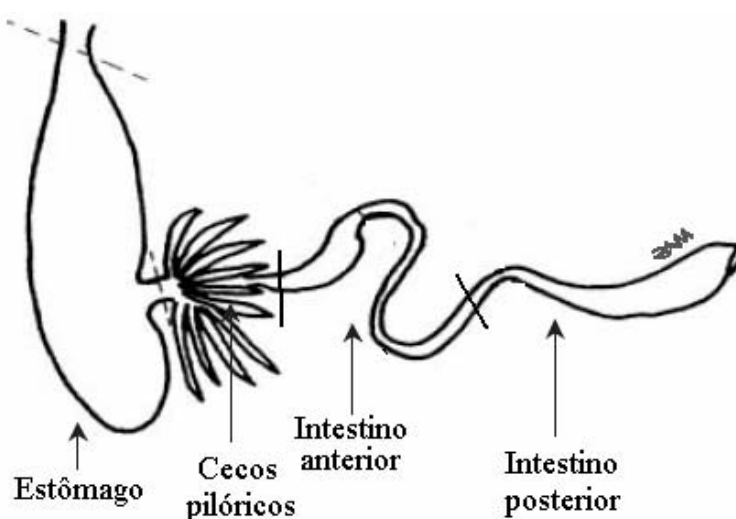


Figura 2. Trato digestório de matrinxã (*B. amazonicus*) e suas subdivisões.

3.2 Biometria

O peso e comprimento dos peixes do experimento foram aferidos no início e no final do período experimental.

3.3 Análises do material coletado.

3.3.1 Determinações enzimáticas

a) Preparação dos homogeneizados celulares.

Dos tecidos coletados eram retiradas amostras de aproximadamente 100mg as quais eram homogeneizadas em tampão de homogeneização (glicerol v/v em tampão fosfato de sódio 20mM e Tris 10mM - pH 7,0) em homogeneizador rotativo tipo Potter-Elvehjem com haste de Teflon, à 1.000rpm por aproximadamente dois minutos sob banho de gelo. O homogeneizado celular de estômago era centrifugado a 13.400xg por 3 minutos; o de cecos pilóricos, de intestino anterior e de posterior eram centrifugados a 13.400xg por 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados como fonte de enzima.

Tabela 1. Composição bromatológica das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dietas experimentais				
	Controle	SO	SO+AAEL	SA	SA+AAEL
Caseína	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Gelatina	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Celulose ¹	20,0	26,6	26,0	55,5	54,90
Óleo de soja	8,0	-	-	8,0	8,0
Amido	34,9	36,9	36,9	-	-
Vitamina-mineral premix ²	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Arginina	0,1	-	0,1	-	0,1
Histidina	0,1	-	0,1	-	0,1
Triptofano	0,1	-	0,1	-	0,1
Fenilalanina	0,1	-	0,1	-	0,1
Leucina	0,1	-	0,1	-	0,1
Valina	0,1	-	0,1	-	0,1
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Composição analisada					
Matéria seca (%)	92,76	92,16	92,38	94,27	94,63
Proteína bruta (%)	36,30	35,90	36,45	34,95	35,35
Fibra bruta (%)	10,71	11,98	11,19	33,42	32,96
Matéria mineral (%)	1,05	0,91	0,90	0,70	0,97
Extrato etéreo (%)	10,71	0,40	0,22	8,68	9,79
ENN ³ (%)	33,99	42,97	43,62	16,52	15,56
Energia bruta (kcal/kg de ração)	4670,41	4290,95	4297,83	4791,285	4845,49

¹ 5 Sodio carboximetilcelulose USP. Labsynth_ Produtos para Laboratorio Ltda (Diadema-SP-Brazil).

²Suprevit Peixes (Supramais), níveis de garantia por 1000g: Vit A 1.200.000UI; Vit. D3 200.000 UI; Vit. E 12.000 mg; Vit K3 2.400 mg; Vit B1 48.000 mg, Vit B2 4.800 mg; Vit B6 4.000 mg; Vit. B12 4.800 mg; Ácido fólico 1.200 mg; Pantotenato de Cálcio 12.000mg; Vit C 48.000 mg; Biotina 48 mg; Colina 65.000 mg; Niacina 24.000mg; Ferro 10.000mg; Cobre 600 mg; Manganês 4.000 mg; Zinco 6.000 mg; Iodo 20 mg; Selênio 20 mg.

³ENN (extrato não nitrogenado)= [MS-(PB+MF+MM+EE)], no qual MS, PB, MF, MM e EE são matéria seca, proteína bruta, matéria fibrosa, matéria mineral e extrato etéreo, respectivamente.

b) Ensaio enzimáticos

Amilase

As atividades amilohidrolíticas dos cecos pilóricos, do intestino anterior e do posterior foram estimadas segundo BERNFELD (1955) modificado. Em 1,0ml de solução de amido (5%) em tampão citrato-fosfato 0,2M, pH 7,0 contendo como co-fator 0,5ml de solução de NaCl 0,5%, era adicionado um volume adequado do sobrenadante do homogeneizado tissular. A mistura da reação era incubada por 30 minutos a 25°C. As alíquotas utilizadas de homogeneizado celular foram: 50µl para estômago, 10µl para cecos pilóricos, 20µl para

intestino anterior e 50µl para intestino posterior. Decorrido o tempo de reação, adicionava-se 0,5 ml de ZnSO₄ 5 % e 0,5ml de Ba(OH)₂ 0,3N. Essa mistura era então centrifugada a 13.400xg por 3 minutos e no sobrenadante era estimada a concentração de glicose pelo método de PARK & JOHNSON (1949). Esse método consiste na incubação, a 100°C por 15 minutos, de 10µl do sobrenadante da reação descrita acima em meio contendo 1ml de ferrocianeto de potássio 0,05% e 1ml de carbonato de sódio 0,53%. Após a incubação eram adicionados 5ml de sulfato férrico de amônio 0,15% em solução ácida com Duponol sódico. A leitura óptica era realizada em 690nm e depois comparada a um padrão de glicose 1mM. A atividade específica está expressa em µmol de glicose total por minuto (U) por mg de proteína (U/ mg de proteína).

Protease inespecífica

A atividade proteolítica total foi quantificada através da hidrólise de caseína, adaptado de HIDALGO e colaboradores (1999). Neste método, a mistura de reação era composta por tampão adequado segundo o pH ótimo de reação previamente estabelecido (500µl), caseína 1% como substrato (500µl) e uma alíquota do sobrenadante do homogeneizado tissular como fonte de enzima. Para o estômago utilizava-se tampão glicina-HCl 0,2M (pH 2,0) e uma alíquota de 20µl de homogeneizado. Para cecos pilóricos, intestino anterior e posterior, utilizava-se tampão Tris-HCl 0,1M (pH 9,0) e alíquotas de 50µl. Decorrido o tempo de incubação de 30 minutos para o estômago e de 60 minutos para os demais tecidos a 25°C, a reação era interrompida com adição de 500 µl de TCA 15% (ácido tricloroacético) e posteriormente centrifugada 13.400xg por 3 minutos para a leitura da absorbância do sobrenadante em 280nm. Tirosina foi utilizada como padrão, e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µg de tirosina por minuto (U). A atividade específica está expressa em unidades por miligrama de proteína (U/ mg de proteína).

Tripsina

A atividade proteolítica da tripsina foi determinada nos cecos pilóricos, no intestino anterior e no posterior conforme o método de HUMMEL (1959). Para a quantificação da atividade triptica, eram misturados 10µl do sobrenadante do homogeneizado tissular e o substrato TAME (*p*-toluenesulfonil-L-arginine etilester) 1,04mM diluído no tampão Tris-HCl 0,2 M e CaCl₂ 0,01 M, com pH ajustado para 8,1. A temperatura de incubação era de 25°C e a reação acompanhada por dois minutos. Uma unidade de tripsina foi definida como 1µmol de

arginina produzida por minuto por mg de proteína. A leitura da absorbância das amostras era realizada em 247nm.

Lipase

As atividades lipolíticas não-específicas dos cecos pilóricos, do intestino anterior e do posterior foram determinadas segundo ALBRO e colaboradores (1985). Para a quantificação da atividade lipolítica não-específica, eram incubados, a 25 °C por 30 minutos, uma mistura que continha 30 µl do sobrenadante do homogeneizado tissular e 500µl do substrato *p*-nitrofenil meristato 0,4mM diluído em tampão bicarbonato de amônio 24mM (pH 7.8) e Triton-X 100 0,5% (usado como emulsificante). Decorrido o tempo de incubação, as reações eram interrompidas pela adição de NaOH 25mM e a variação de densidade óptica era registrada em 405 nm. Para os cálculos, 1 unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µmol de substrato hidrolisado por minuto (U). A atividade específica está expressa em unidades por mg de proteína (U/ mg proteína).

c) Proteínas totais do sobrenadante dos homogeneizados tissulares

As concentrações de proteína total dos tecidos que constituem o trato digestório foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976). Este método consiste na mistura de 10µl do sobrenadante dos homogeneizados tissulares, que foram diluídos previamente em tampão de homogeneização, com o reativo de Bradford. Após essa mistura ter sido incubada à 25°C por 5 minutos, a leitura das amostras era feita em “Microplate Reader” (Molecular Devices) a 620nm. A concentração de proteína era estimada contra uma solução padrão de caseína 1mg/ml. O reagente de Bradford é composto de 100mg de Comassie blue G250 em 50ml de etanol 95%. A essa solução são adicionados 100ml de ácido fosfórico 85% e o volume completado para 1 litro com água destilada. Os sobrenadantes dos homogeneizados tissulares eram diluídos três vezes para a determinação de proteína no estômago e cecos pilóricos e diluídos quatro vezes para intestino anterior e posterior.

3.3.2 Preparação dos extratos ácidos

Alíquotas de plasma, fígado e músculo branco foram diluídas em de ácido tricloroacético (TCA) 20% na proporção de 1/10 para a quantificação de piruvato, lactato e amônia. O fígado e o músculo branco foram homogeneizados em homogeneizador mecânico tipo Potter Elvehjem com dois "strokes" de 30 segundos a 1.000rpm, sob banho de gelo. Após

a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 13.400xg por três minutos e os sobrenadantes foram utilizados como extratos celulares.

3.3.3 Preparação dos extratos neutros

Alíquotas de fígado e de músculo branco foram diluídas em água destilada na proporção de 1/10 para a quantificação de aminoácidos, glicose, triglicerídeos e ácidos graxos livres. Esse processo foi realizado como descrito na preparação de extratos ácidos, substituindo-se o TCA por água destilada.

3.3.4 Determinação dos intermediários metabólicos

a) Triglicerídeos

A análise de triglicerídeos foi realizada utilizando o Kit Labtest para Triglicerídeos Liquiform, que se baseia em método colorimétrico-enzimático (Trinder, 1969). Este método consiste na mistura de 10µl de plasma ou de extrato neutro hepático ou muscular, diluídos previamente em água (plasma 1:200, fígado 1:20 e músculo branco 1:10), com o reativo do Kit Labtest para Triglicerídeos. Após essa mistura ter sido incubada à 37°C por 10 minutos, a leitura das amostras era feita em “Microplate Reader” (Molecular Devices) com filtro de 525nm contra uma curva padrão com alíquotas conhecidas de concentração de triglicerídeos (0, 25, 50, 100 e 200mg/dl).

b) Ácidos graxos livres

As determinações das concentrações de AGL foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por NORVÁK (1965). Adicionava-se 1,0ml de solução Dole (heptana, álcool isopropílico e ácido sulfúrico na proporção de 1:4:0,1) a uma alíquota adequada de plasma, ou de fígado ou de músculo branco e agitava-se por 2 minutos. Posteriormente, adicionava-se 1,0ml de heptano e 2,0ml de água destilada, agitando-se novamente por inversão. Uma amostra equivalente a 600µl da fase superior era retirada e adicionada de uma mistura de clorofórmio e heptano (5:1 v/v), e 1,0ml de reagente de cobalto. O reagente de cobalto era constituído por 1,32 volumes de trietanolamina + 10 volumes de solução A + 7 volumes de solução B. A solução (A) era composta por uma solução saturada de K₂SO₄, 6g Co(NO₃)₂·6H₂O mais 0,8ml de ácido acético glacial em água fervente, e a solução (B) era constituída de uma solução saturada de Na₂SO₄. Na seqüência, as amostras eram fortemente agitadas por 30 segundos e centrifugadas por 2 minutos a 3.000rpm. Desta mistura, retirava-se

uma alíquota de 600µl à qual se adicionava 600µl de solução indicadora, constituída de 0,4% de α -nitroso β -naftol em etanol, diluída 12,5 vezes. A leitura óptica era realizada em um espectrofotômetro “Hach DR/2010” em um comprimento de onda de 500nm e a concentração de AGL foi estimada contra um padrão de ácido palmítico 4mM.

c) Glicose

A quantificação de glicose foi feita com o Kit Labtest de Glicose Oxidase (Trinder, 1969), cujo princípio é a oxidação da glicose e a determinação de produto resultante colorido em quantidades equimolares. Este método consiste na mistura de 10µl de plasma ou de extrato neutro hepático ou muscular, que foram diluídas previamente em água (plasma 1:200, fígado 1:20 e músculo branco 1:1), com o reativo do Kit Labtest para Glicose. Após essa mistura ter sido incubada à 37°C por 10 minutos, a leitura das amostras foi feita na “Microplate Reader” (Molecular Devices) com filtro de 525nm contra uma curva padrão com alíquotas conhecidas de concentração de glicose (0, 25, 50, 100 e 200mg/dl).

d) Lactato

A determinação da concentração de lactato total foi feita de acordo o método de HARROWER & BROWN (1972). Em um volume adequado de extrato ácido, eram adicionados 20µl de sulfato de cobre 4% 3,5ml de ácido sulfúrico. Posteriormente os tubos de reação eram agitados e colocados para ferver por cinco minutos. Após serem resfriados em gelo, eram adicionados 80µl e de p-fenilfenol (1,5g de p-fenilfenol em 100ml de solução aquosa de NaOH 2%). Os tubos eram então agitados periodicamente em vortex por uma hora. Passado este período, as amostras eram novamente fervidas por 90 segundos. Após o resfriamento em gelo, a leitura óptica das amostras era efetuada em espectrofotômetro “Hach DR/2010”, em 570nm, contra uma solução padrão de lactato de 20µmols.

e) Piruvato

O piruvato foi determinado segundo LU (1939), pela reação da dinitrofenilhidrazina. O homogeneizado 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. A leitura óptica era realizada em espectrofotômetro “Hach DR/2010” em um comprimento de onda de 440nm. A concentração de piruvato foi estimada utilizando-se um padrão de piruvato contendo 100µmols.

f) Glicogênio

A extração do glicogênio tecidual foi realizada segundo BIDINOTTO e colaboradores (1997). Esse método consiste na separação alcoólica do glicogênio seguida pela determinação direta de açúcares redutores totais (Dubois, Gilles *et al.*, 1956). Foram utilizados para as análises 50mg de fígado e 100mg de músculo branco. No método da separação alcoólica (Bidinotto, Souza *et al.*, 1997) utilizou-se como reagentes; hidróxido de potássio (KOH 6N), álcool etílico e sulfato de potássio 10% (K₂SO₄), enquanto que na determinação de açúcares redutores totais (Dubois, Gilles *et al.*, 1956) utilizou-se fenol 4,1% e de ácido sulfúrico concentrado. A leitura óptica foi realizada em espectrofotômetro “Hach DR/2010” em um comprimento de onda de 480nm, contra um padrão de glicose que continha 100μmols. O conteúdo de glicogênio foi expresso em μmols de glicosil-glicose/g de tecido.

i) Proteínas totais

As concentrações plasmáticas, hepáticas e musculares de proteínas totais foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976). Este método consiste na mistura de 10μl de plasma ou de extrato neutro hepático ou muscular, que eram diluídas previamente em água (plasma 1:200, fígado 1:20 e músculo branco 1:10), com o reativo de Bradford. Após essa mistura ter sido incubada à 25°C por 5 minutos, a leitura das amostras era feita em “Microplate Reader” (Molecular Devices) em 620nm e a concentração de proteína era estimada contra uma solução padrão de caseína 1mg/ml. O reagente de Bradford é composto de 100mg de Comassie blue G250 em 50ml de etanol 95%. A essa solução são adicionados 100ml de ácido fosfórico 85% e o volume completado para 1 litro com água destilada.

h) Aminoácidos livres

O teor de aminoácidos livres foi determinado nos tecidos segundo COPLEY (1941). Uma alíquota de plasma total, bem como dos extratos neutros, era adicionada a 2,0ml de solução de ninhidrina 0,1% em propanol. Os tubos de reação eram vedados e então colocados em banho-maria a 40°C, por 40 minutos. Após este período, a leitura óptica era realizada em um espectrofotômetro “Hach DR/2010” em um comprimento de onda de 570nm, contra um padrão de ácido α-aminoacético 1mM.

i) Amônia

A amônia plasmática, hepática e muscular foi quantificada por Nesslerização (Gentzkow e Mazen, 1942), utilizando-se um volume adequado de extrato ácido, completado

com água até atingir 2,0mL de solução, na qual era adicionado 0,5mL de reativo de Nessler. A leitura óptica era realizada em espectrofotômetro “Hach DR/2010” em 420nm. A concentração era estimada contra padrões de amônia contendo 100µmols de NH₄Cl.

3.4 Análises estatísticas

Para análise estatística dos dados foi utilizado o software Graphpad Instat. O teste estatístico ANOVA General Linear Model foi aplicado seguido de pós-teste de Tukey para comparação dos grupos. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$. Os gráficos foram construídos com auxílio do software Origin 6.0, baseado nas médias e erro padrão da média (SEM).

4 RESULTADOS

4.1 Biometria

Na tabela 2 pode-se observar que não houve diferenças significativas entre as médias de peso e de comprimento, tanto iniciais quanto finais.

Tabela 2. Biometria experimento.

	Jejum	Controle	SO	SO+AAEL	SA	SA+AAEL
Peso (g)						
Inicial	89,20±15	90,00±8,71	99,20±6,13	91,06±3,05	98,00±12,82	93,70±1,50
Final	75,08±13	99,54±4,81	102,63±5,0	99,16±8,74	97,04±11,50	96,50±2,50
Comprimento (cm)						
Inicial	18,5±1,5	17,57±1,17	19,10±0,30	18,35±0,36	18,63±0,81	18,62±0,33
Final	18,5±1,3	18,73±0,18	19,20±0,17	18,87±0,56	18,95±0,99	18,73±0,11

4.2 Enzimas digestivas

As respostas das enzimas digestivas às mudanças das dietas e à presença de aminoácidos estão apresentadas na Figura 3. As atividades enzimáticas aumentaram em algumas frações do intestino em relação direta com o nível de nutrientes. Os cecos pilóricos foram a secção menos responsiva das regiões gastrintestinal de matrinxã (Tabela 3). As atividades das enzimas digestivas dos matrinxãs em jejum foram consideravelmente menores do que as dos demais grupos (Tabela 3).

Os carboidratos são potencialmente hidrolisados em todas as secções do intestino. A mais alta atividade da amilase foi observada nos cecos pilóricos e a não adição de amido à dieta provocou uma diminuição da atividade desta enzima para valores menores ou iguais aos do Jejum (Figura 3). A amilase do intestino posterior foi responsiva à adição de aminoácidos

tanto no grupo que recebeu a dieta SO+AAEL quanto no grupo que recebeu a dieta SA+AAEL (Figura 3).

A atividade proteolítica não específica foi observada em todas as secções do trato digestório de matrinxã (Figura 4). A presença de amido ou óleo na dieta não afetou esta atividade enzimática nos cecos pilóricos (Figura 4). No estômago, além de serem observados os valores mais altos da atividade proteolítica (Tabela 3), pode-se observar também que o grupo SO+AAEL teve uma atividade proteolítica significativamente superior a do grupo SO (Figura 4) e que as atividades proteolíticas dos grupos que receberam a dieta sem amido foram significativamente menores que as do grupo Controle (Figura 4). O intestino anterior e o posterior apresentaram o mesmo perfil e as mais baixas atividades proteolíticas (Figura 4). Porém, estas atividades pareceram ser responsivas à adição de aminoácidos.

A atividade da tripsina apresentou o mesmo perfil observado para protease não específica, o que nos leva a assumir esta atividade como a principal protease intestinal observada neste experimento (Figura 5). Então, as afirmações feitas para as proteases inespecíficas de intestino são as mesmas para tripsina.

A atividade lipolítica foi observada em todas as secções intestinais de matrinxã (Figura 6). As atividades mais altas foram observadas em intestino anterior, seguidas pelas dos cecos pilóricos, que não foram responsivos (Tabela 3). Uma resposta pouco expressiva da lipase foi observada no intestino anterior e posterior devida à alimentação com aminoácidos e amido (Figura 6). O intestino posterior foi responsivo ao lipídio da dieta quando o amido era relativamente baixo (Figura 6). Na realidade, considerando os níveis altamente discrepantes de lipídio da dieta e as atividades fixas de lipase, é plausível assumir que esta enzima tenha baixa responsividade.

TABELA 3. Atividades das enzimas digestivas nas diferentes porções do trato gastrintestinal de matrinxã (*B. amazonicus*) em diferentes condições alimentares

Enzima (U/ mg de proteína)	Porção	Condições alimentares					
		Jejum	Controle	SO	SO+AAEL	SA	SA+AAEL
Amilase							
	C.P	2,357±0,86 ^b	14,73±2,61 ^a	14,33±2,93 ^a	12,64±1,42 ^a	2,29±0,92 ^b	2,72±0,54 ^b
	I.A	2,39±0,67 ^b	5,73±1,06 ^a	4,83±0,67 ^a	5,89±0,58 ^a	0,83±0,11 ^c	0,89±0,1 ^c
	I.P	0,48±0,18 ^c	4,95±0,54 ^a	3,97±0,40 ^a	4,85±0,39 ^a	0,47±0,09 ^c	0,96±0,18 ^b
Protease							
	E	2,2±1,93 ^d	265,66±28,09 ^a	209,14±22,88 ^b	312,78±59,50 ^a	159,44±53,94 ^{bc}	139±39,55 ^c
	C.P.	29,9±9,33 ^b	110,76±10,07 ^a	118,75±15,60 ^a	108,83±10,32 ^a	121,71±18,40 ^a	126,58±9,54 ^a
	I.A.	0,59±0,83 ^c	5,30 ±0,80 ^a	5,329±0,86 ^a	4,79±0,77 ^a	3,61±0,30 ^b	5,65±0,67 ^a
	I.P.	2,05±0,3 ^c	35,30±10,03 ^a	29,57±9,10 ^a	34,94±7,73 ^a	12,03±2,56 ^b	27,76±5,3 ^a
Tripsina							
	C.P.	0,72±0,31 ^b	2,29±0,50 ^a	2,83±0,57 ^a	2,32±0,64 ^a	2,68±0,43 ^a	2,45±0,58 ^a
	I.A.	0,04±0,04 ^c	0,15±0,02 ^a	0,16±0,02 ^a	0,15±0,016 ^a	0,113±0,02 ^b	0,15±0,02 ^a
	I.P.	0,07±0,01 ^d	1,24 ±0,35 ^a	1,27±0,17 ^a	1,14±0,24 ^a	0,177±0,02 ^c	0,48±0,07 ^b
Lípase							
	C.P.	0 ^b	1,77±0,46 ^a	1,54±0,69 ^a	2,29±0,50 ^a	2,27±0,84 ^a	3,40±0,54 ^a
	I.A	0,93±0,46 ^c	5,74±0,54 ^b	6,68 ±0,80 ^{ab}	8,09±0,73 ^a	5,32±0,77 ^b	5,40±0,96 ^b
	I.P	0,14±0,03 ^d	0,71 ±0,30 ^b	0,43±0,1 ^c	0,77±0,17 ^b	1,51±0,23 ^a	1,43±0,21 ^a

E, estômago; C.P, cecos pilóricos; I.A, intestino anterior; I.P, intestino posterior. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) (média ± S.E.M.) (n = 9).

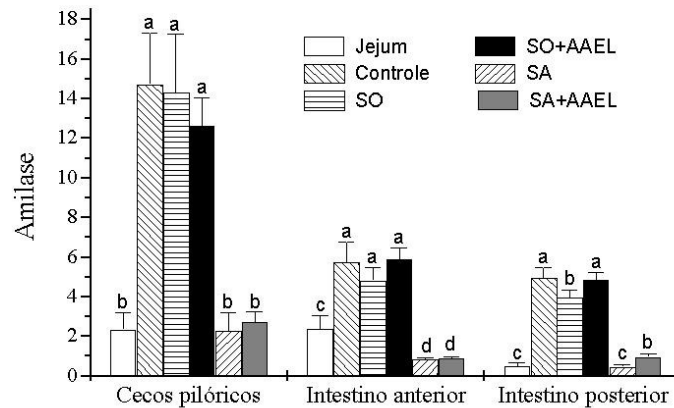


Figura 3. Atividade enzimática amilohidrolítica de cecos pilóricos, de intestino anterior e de intestino posterior de *B. amazonicus* em U/ mg de proteína. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.

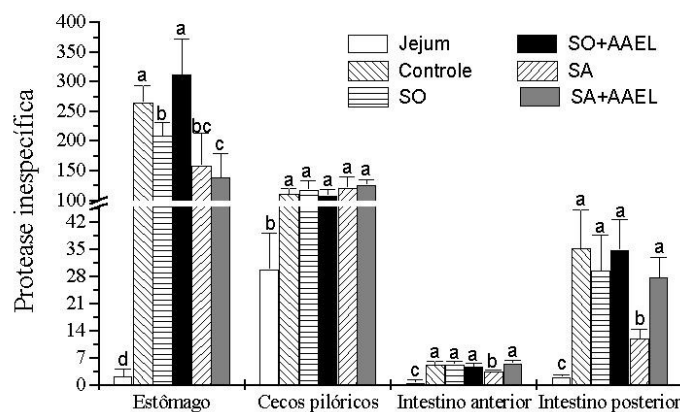


Figura 4. Atividade enzimática proteolítica de estômago de cecos pilóricos, de intestino anterior e de intestino posterior de *B. amazonicus* em U/ mg de proteína. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.

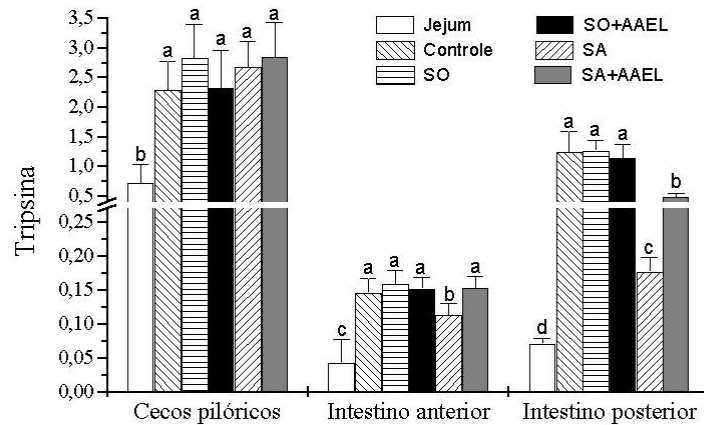


Figura 5. Atividade enzimática tríptica de cecos pilóricos, de intestino anterior e de intestino posterior de *B. amazonicus* em U/ mg de proteína. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam médias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.

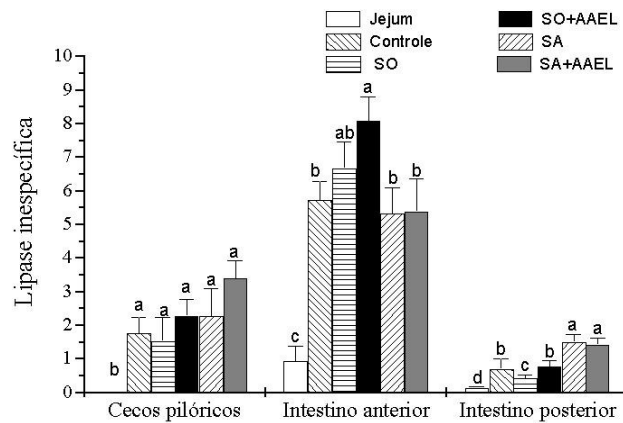


Figura 6. Atividade enzimática lipolítica inespecífica de cecos pilóricos, de intestino anterior e de intestino posterior de *B. amazonicus* em U/ mg de proteína. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam médias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.

4.3 Perfil metabólico.

Perfil lipídico.

As concentrações plasmáticas de triglicerídeos dos grupos Jejum e SA foram significativamente menores do que as dos outros quatro grupos (Figura 7). As maiores concentrações de triglicerídeos plasmáticos foram observadas nos grupos Controle e SO, e estas foram significativamente maiores do que as dos grupos SO+AAEL e SA+AAEL (Tabela 4). No músculo branco as maiores concentrações de triglicérides foram observadas no grupo Jejum e as menores nos grupos SA e SA+AAEL (Figura 7), que são significativamente iguais entre si. No fígado, observou-se um perfil parecido com o do plasma, porém neste órgão a concentração de triglicérides do grupo SA foi significativamente maior do que a do grupo SA+AAEL (Figura 7).

A concentração plasmática e muscular de AGL do grupo que permaneceu em jejum foi significativamente maior do que a dos outros grupos (Figura 8). As concentrações plasmáticas de AGL dos grupos Controle, SO, SO+AAEL e SA+AAEL foram estatisticamente iguais entre si e significativamente menores em relação ao grupo SA (Figura 8). No músculo branco, a maior concentração de AGL foi a do grupo Jejum e as menores foram observadas nos grupos Controle, SO e SO+AAEL (Tabela 4). No fígado, as concentrações de AGL dos grupos Controle, SO, SO+AAEL e SA foram significativamente semelhantes entre si, porém maiores do que as do grupo Jejum e as do SA+AAEL (Figura 8). As maiores concentrações médias de triglicerídeos e de AGL foram observadas no fígado (Tabela 4).

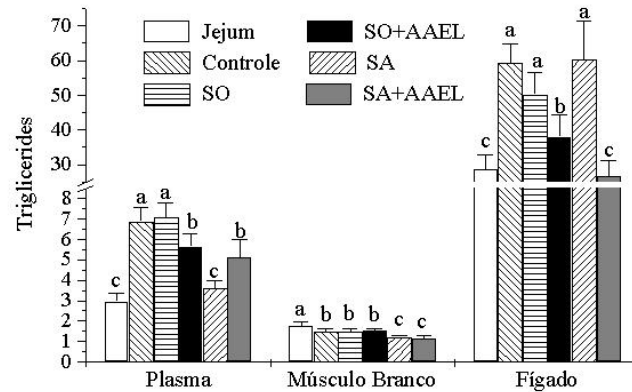


Figura 7. Concentração média de triglicerídeos no plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes condições alimentares. Os valores da concentração de triglicerídeos do plasma são expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.

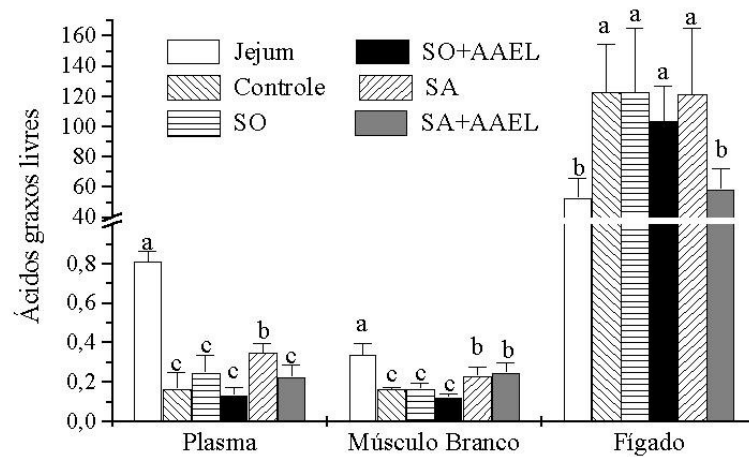


Figura 8. Concentração de ácidos graxos livres plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes condições alimentares. Os valores das concentrações de ácidos graxos livres do plasma estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.

Tabela 4. Médias das moléculas do perfil lipídico de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes condições alimentares.

Material	Condição alimentar					
	Jejum	Controle	SO	SO+AAEL	SA	SA+AAEL
Triglicerídeos						
Plasma ¹	2,97±0,43 ^c	6,87±0,71 ^a	7,06±0,71 ^a	5,65±0,63 ^b	3,61±0,38 ^b	5,10±0,89 ^c
Músculo Branco ²	1,76±0,18 ^a	1,47±0,16 ^c	1,48±0,16 ^c	1,52±0,10 ^c	1,22±0,20 ^b	11,50±0,13 ^b
Fígado ²	28,60±4,36 ^c	59,28±5,57 ^a	50,20±6,39 ^a	37,97±6,25 ^b	60,22±11,14 ^a	26,67±4,56 ^c
Ácidos graxos livres						
Plasma ³	0,81±0,05 ^a	0,17±0,08 ^c	0,25±0,09 ^c	0,14±0,04 ^c	0,35±0,05 ^b	0,23±0,06 ^c
Músculo Branco ⁴	0,34±0,06 ^a	0,16±0,01 ^c	0,17±0,03 ^c	0,12±0,02 ^c	0,23±0,04 ^b	0,25±0,05 ^b
Fígado ⁴	53,24±12,80 ^b	122,96±31,48 ^a	123,12±42,01 ^a	103,75±22,94 ^a	121,46±43,88 ^a	58,67±14,10 ^b

Valores expressos em suas Médias±S.E.M. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas para p<0.05 (n=9).

¹ mg/ml de plasma; ² mg/mg de tecido; ³ μmol/ml de plasma; ⁴ μmol/ mg de tecido

Perfil glicídico

A concentração plasmática de glicose do grupo jejum foi significativamente maior que a dos outros grupos (Figura 9), sendo que a menor concentração plasmática foi observada no grupo Controle (Tabela 5). Os outros grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre si (Figura 9). No músculo branco, as maiores concentrações de glicose foram dos grupos SA e SA+AAEL (Figura 9), porém no grupo SA foi estatisticamente maior que no grupo SA+AAEL (Figura 9), já a menor concentração de glicose foi observada no grupo que permaneceu em jejum. No fígado, além de observamos a maior concentração média de glicose (Tabela 5), as concentrações de glicose do grupo Controle e do SO foram significativamente maiores que as dos demais grupos, e a do grupo Jejum foi significativamente menor que a dos demais grupos (Figura 9).

Em relação às concentrações de lactato pode-se observar que, no plasma, a concentração de lactato do grupo SA+AAEL foi significativamente menor que nos demais grupos (Figura 10). No músculo branco, onde foi observada a maior concentração média de lactato (Tabela 5), as concentrações nos grupos Jejum e SA foram significativamente menores que nos outros grupos (Figura 10). A concentração de lactato no fígado do grupo Jejum foi significativamente menor que nos demais grupos (Figura 10), e as dos grupos Controle, SA e SA+AAEL foram significativamente maiores (Figura 10).

A concentração de piruvato plasmático do grupo Jejum foi significativamente maior que a dos demais grupos (Figura 11). No músculo branco não houve diferenças significativas entre os grupos com diferentes condições alimentares (Figura 11). As concentrações hepáticas de piruvato dos grupos SA e SA+AAEL foram iguais entre si e significativamente menores que nos demais grupos (Figura 11). As maiores concentrações deste metabólito ocorreram nos grupos Controle, SO e SO+AAEL (Tabela 5).

Os teores de glicogênio do fígado foram maiores que os de músculo branco (Tabela 5). No músculo branco do grupo Jejum houve uma queda significativa da concentração de glicogênio em relação aos outros grupos, cujas concentrações foram iguais (Figura 12). A concentração de glicogênio do fígado do grupo Jejum também foi significativamente menor que a dos demais grupos (Figura 12), porém as concentrações dos outros grupos não foram iguais entre si. As maiores concentrações de glicogênio foram observadas no fígado dos grupos SO, SA e SA+AAEL (Figura 12).

Tabela 5. Médias das moléculas do perfil glicídico de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes condições alimentares.

Material	Condição alimentar					
	Jejum	Controle	SO	SO+AAEL	SA	SA+AAEL
Glicose						
Plasma ¹	22,07±0,87 ^a	14,02±0,61 ^c	18,56±1,35 ^b	172,64±1,37 ^b	18,01±0,69 ^b	19,358±1,80 ^b
Músculo Branco ²	5,40±0,22 ^d	6,69±0,29 ^c	6,28±0,48 ^c	6,29±0,67 ^c	12,89±0,628 ^a	10,90±0,39 ^b
Fígado ²	248,04±11,42 ^c	358,20±39,32 ^a	369,28±25,44 ^a	291,36±29,27 ^b	336,46±19,78 ^b	308,96±27,43 ^b
Lactato						
Plasma ¹	3,15±1,12 ^a	2,69±0,65 ^{ab}	4,24±0,89 ^a	3,23±0,43 ^b	2,67±0,41 ^b	1,37±0,33 ^c
Músculo Branco ²	36,56±3,35 ^b	46,95±1,98 ^a	45,51±2,81 ^a	43,01±1,55 ^a	39,40±2,33 ^b	41,02±2,764 ^{ab}
Fígado ²	4,77±0,17 ^c	9,92±1,20 ^a	10,42±1,18 ^a	9,49±0,74 ^a	8,23±0,377 ^b	7,95±0,94 ^b
Piruvato						
Plasma ¹	0,33±0,01 ^a	0,26±0,02 ^b	0,28±0,03 ^b	0,254±0,03 ^b	0,25±0,03 ^b	0,253±0,04 ^b
Músculo Branco ²	0,50±0,10	0,58±0,06	0,52±0,05	0,50±0,07	0,60±0,08	0,565±0,04
Fígado ²	0,86±0,07 ^b	1,19±0,08 ^a	1,17±0,08 ^a	1,11±0,04 ^a	0,721±0,038 ^c	0,72±0,05 ^c
Glicogênio						
Músculo Branco ³	3,04±0,37 ^c	4,27±1,17 ^a	4,64±1,04 ^a	4,99±0,88 ^a	5,29±0,59 ^a	4,26±0,59 ^a
Fígado ³	130,67±32,16 ^c	196,46±31,65 ^b	280,92±13,18 ^a	238,64±10,37 ^b	297,99±29,66 ^a	311,25±66,39 ^a

Valores expressos em suas Médias±S.E.M. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas para p<0.05 (n=9).

¹ μmol/ ml de plasma; ² μmol/ mg de tecido; ³ μmol glicosil glicose/g de tecido

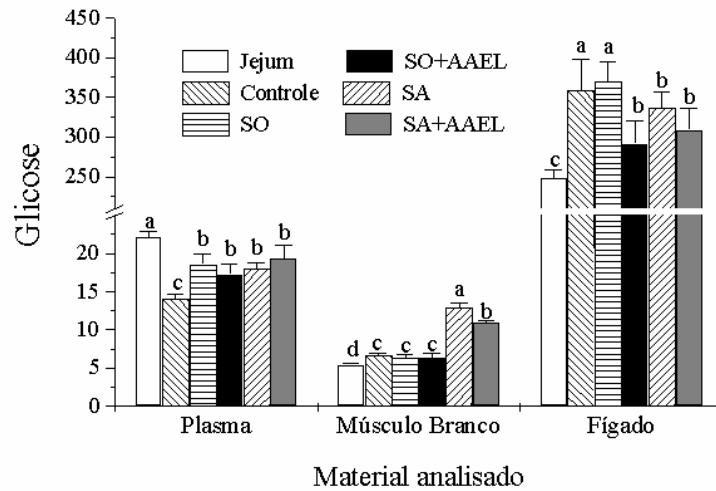


Figura 9. Concentrações de glicose no plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materiais analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de glicose do plasma estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n=9$ peixes.

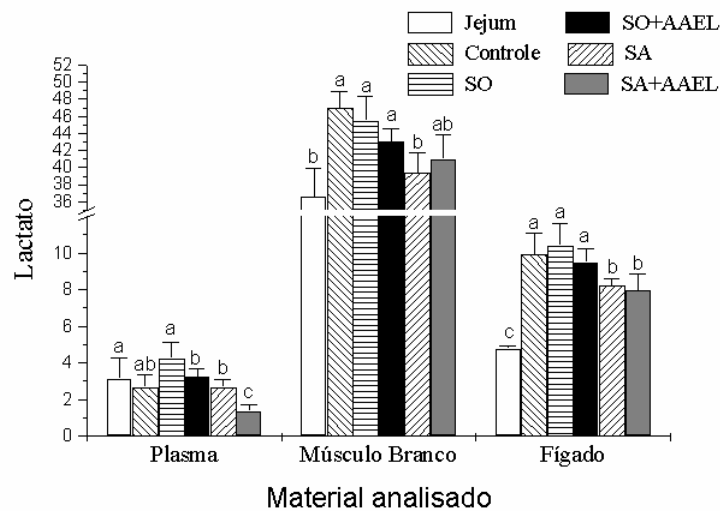


Figura 10. Concentrações de lactato de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materias analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de lactato do plasma estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n=9$ peixes.

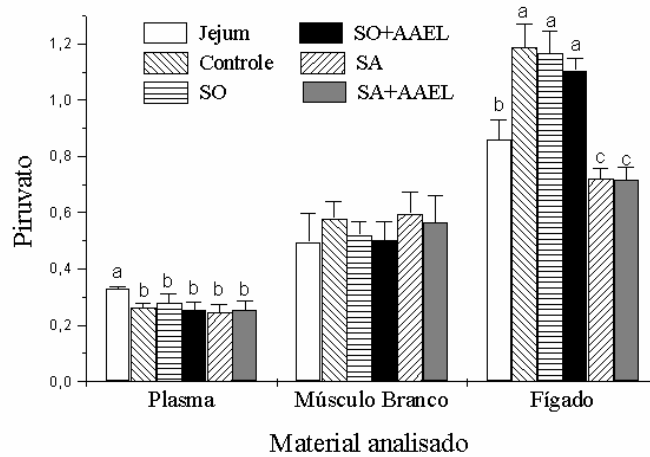


Figura 11. Concentrações de piruvato de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materias analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de piruvato do plasma estão expressos em µmol/ ml de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em µmol/ mg de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média±SEM para n=9 peixes.

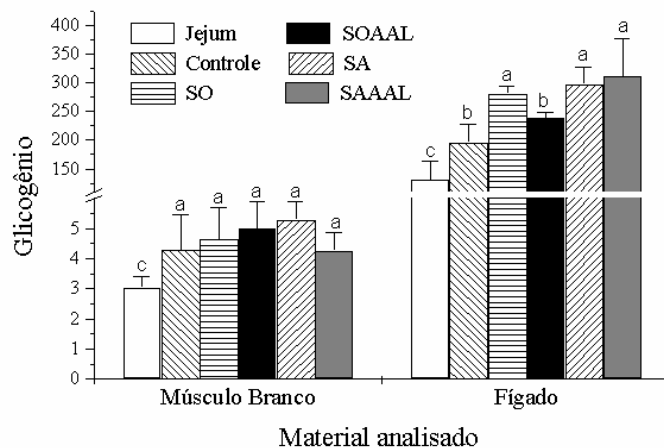


Figura 12. Concentrações de glicogênio de músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materias analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações glicogênio do músculo branco e do fígado estão expressos em µmol glicosil-glicose /g de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam medias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média ± SEM para n = 9 peixes.

Perfil protéico

As concentrações de proteína no plasma dos grupos Jejum, Controle e SO foram significativamente menores que as concentrações protéicas dos demais grupos (Figura 13). A concentração média de proteína no músculo branco do grupo SA+AAEL foi significativamente maior que as dos demais grupos (Tabela 6). A segunda maior concentração de proteína foi observada no grupo SA (Figura 13). Os demais grupos apresentaram concentrações médias iguais de proteína muscular (Figura 13). No fígado, as concentrações médias protéicas dos grupos Jejum, SA e SA+AAEL foram estatisticamente iguais entre si e maiores que nos demais grupos (Figura 13).

O teor de aminoácidos plasmáticos do grupo Jejum foi significativamente maior que nos demais grupos, os quais foram estatisticamente iguais (Figura 14). O músculo branco do grupo SO+AAEL apresentou a maior concentração de aminoácidos (Figura 14). Este grupo foi seguido pelo SA (Figura 14), e o grupo Jejum apresentou a menor concentração muscular de aminoácidos (Figura 14). As concentrações musculares médias de aminoácidos dos demais grupos foram iguais entre si (Figura 14). No fígado, onde foi observada a maior concentração média de aminoácidos, os grupos Jejum e SO+AAEL apresentaram as maiores concentrações médias de aminoácidos livres (Tabela 6). Eles foram seguidos pelos grupos Controle e SA+AAEL, e as menores concentrações médias de aminoácidos livres foram observadas nos grupos SO e SA (Figura 14).

A amônia plasmática variou apenas no grupo Controle onde se observou o menor valor médio (Figura 15). No músculo branco, o menor valor médio da concentração de amônia foi observado no grupo Jejum (Figura 15). As concentrações nos grupos SO e SA foram as maiores (Figura 15). O grupo SA+AAEL apresentou uma concentração média igual à dos grupos Controle, SO, SO+AAEL e SA (Figura 15). No fígado, além de se observar a maior concentração média de amônia (Tabela 6), observou-se também que o maior valor de amônia hepática foi o do grupo SA, enquanto o grupo SO+AAEL apresentou o menor valor (Figura 15).

Tabela 6. Médias das concentrações de proteína, aminoácidos e amônia de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes condições alimentares.

Material	Condições alimentares					
	Jejum	Controle	SO	SO+AAEL	SA	SA+AAEL
Proteína						
Plasma ¹	27,69±1,14 ^b	25,34±1,19 ^b	26,17±1,78 ^b	29,93±1,61 ^a	31,08±2,65 ^a	32,24±2,03 ^a
Músculo Branco ²	69,88±8,26 ^c	83,95±11,66 ^c	71,53±10,54 ^c	73,35±14,79 ^c	127,51±8,43 ^b	147,40±8,13 ^a
Fígado ²	82,49±4,01 ^a	71,14±4,50 ^b	69,83±5,79 ^b	720,16±7,36 ^b	82,70±7,13 ^a	87,98±7,79 ^a
Aminoácidos						
Plasma ³	14,51±0,45 ^a	9,98±0,759 ^b	11,34±0,82 ^b	10,37±1,32 ^b	10,82±1,27 ^b	11,15±1,02 ^b
Músculo Branco ⁴	22,48±1,10 ^d	24,93±0,94 ^c	26,43±0,91 ^c	34,85±2,28 ^a	31,24±1,56 ^b	27,40±2,63 ^c
Fígado ⁴	126,41±10,43 ^a	99,65±8,37 ^b	83,51±7,01 ^c	116,49±9,53 ^a	84,69±6,96 ^c	98,22±7,53 ^b
Amônia						
Plasma ³	5,93±0,62 ^a	3,656±0,54 ^b	63,95±1,13 ^a	6,52±1,13 ^a	5,56±0,7 ^a	6,42±0,862 ^a
Músculo Branco ⁴	25,63±1,81 ^c	31,06±1,64 ^b	37,57±3,50 ^a	31,90±2,68 ^{ab}	37,04±3,94 ^a	34,51±3,84 ^{ab}
Fígado ⁴	74,40±3,54 ^b	73,53±3,74 ^b	75,79±1,65 ^b	68,85±2,14 ^c	83,30±2,53 ^a	74,46±3,43 ^b

Valores expressos em suas Médias±S.E.M. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas para p<0.05 (n=9).

¹ mg/ml de plasma; ² mg/g de tecido; ³ μmol/ ml de plasma; ⁴ μmol/ mg de tecido

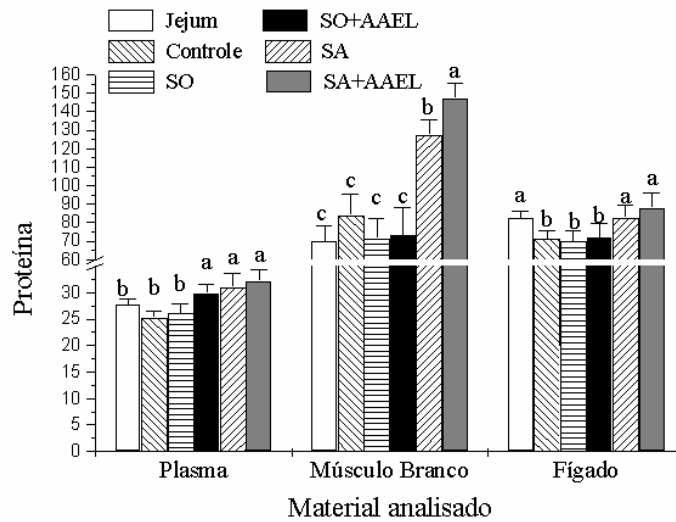


Figura 13. Concentração de proteína de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materiais analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de proteína do plasma estão expressos em mg/ml de plasma e do músculo branco e do fígado estão expressos em mg/mg de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam médias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.

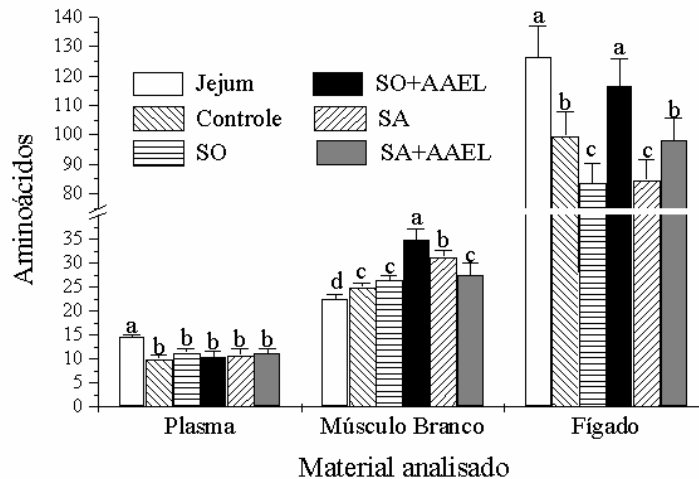


Figura 14. Concentrações de aminoácidos de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materiais analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de aminoácidos do plasma estão expressos em $\mu\text{mol/ml}$ de plasma do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam médias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n = 9$ peixes.

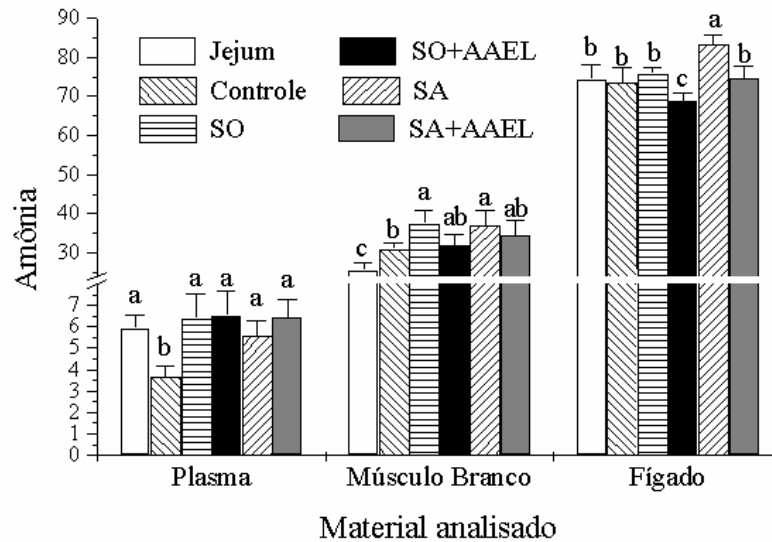


Figura 15. Concentrações de amônia de plasma, músculo branco e fígado de *B. amazonicus* em diferentes materiais analisados. Os peixes foram colocados em diferentes condições alimentares: Jejum, Controle, SO, SO+AAEL, SA e SA+AAEL. Os valores das concentrações de amônia do plasma estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de plasma do músculo branco e do fígado estão expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de tecido. Letras diferentes no mesmo grupo de tecido representam médias estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. Os valores estão representados como Média \pm SEM para $n=9$ peixes.

5 DISCUSSÃO

5.1 Enzimas digestivas

Vários estudos em nutrição de peixe são fundamentados na capacidade que apresentam de usar os nutrientes, associada às respostas metabólicas devidas às mudanças na dieta (Suárez, Hidalgo *et al.*, 1995). Esta abordagem supõe que os fatores nutricionais possam influenciar o processo de digestão e melhorar o uso dos nutrientes. REIMER (1982) observou que o matrinxã apresenta capacidade de adaptar seu metabolismo ao tipo de nutriente presente nas dietas, aumentando a atividade das enzimas digestivas em função do substrato ofertado (proteína, carboidrato ou gordura). Devido a essa característica, o matrinxã poderia aproveitar eficientemente gorduras, carboidratos e proteínas como fonte de energia para realizar suas funções biológicas. Já que as mudanças no tipo, fonte e quantidade de alguns desses macronutrientes podem alterar o perfil enzimático ou a quantidade de enzimas, uma inter-relação entre as atividades de enzima digestivas e o perfil metabólico pode ser esperada. Na realidade,

esta suposição tem sido descrita para algumas espécies, como pacú, *Piaractus mesopotamicus*, e pintado, *Pseudoplastystoma corruscans*, (Moraes e Bidinotto, 2000; Corrêa, 2002; Lundstedt, Melo *et al.*, 2004). No entanto, ensaios de digestibilidade e desempenho de crescimento ainda são os métodos mais utilizados para se avaliar o aproveitamento de nutrientes (Stone, Allan *et al.*, 2003).

Provavelmente, o aumento da atividade das enzimas digestivas pode causar uma melhora da utilização dos nutrientes. Há um consenso sobre a variação proporcional da secreção e da quantidade de amilase, de lipase e de protease devida à variação do conteúdo ou nível dos seus substratos na dieta (Lhoste, Fiszlewicz *et al.*, 1994). Isto pode ser observado particularmente quando o matrinxã está em jejum. Reduções nas atividades enzimáticas no estômago, nos cecos pilóricos e no intestino de peixes em jejum, quando comparadas com as atividades de peixes bem alimentados, mostram que a presença de alimento no intestino é importante para a secreção de enzimas. Isto foi observado, também, em salmão do Atlântico, *Salmo salar*, (Einarsson e Davies, 1996). Neste caso, as atividades da pepsina gástrica, tripsina e quimotripsina pancreática aumentam durante os primeiros dias de jejum, e depois diminuem com o tempo. KROGDAHL e colaboradores (1999) também observaram para esta espécie uma rápida diminuição na atividade específica da maltase, da trealase e da sucrase logo no período inicial de jejum.

Durante o período de jejum, ocorre um declínio na capacidade de síntese protéica, prejudicando a reposição dos constituintes celulares e das atividades enzimática. Por outro lado, este quadro possibilita uma economia energética considerável (Jobling, 1994). Algumas espécies de peixes, como o matrinxã, que suportam periodicamente longos períodos de privação alimentar devido à migração para a reprodução (Souza, Urbinati *et al.*, 2003), devem controlar a síntese e secreção de enzimas digestivas para prevenir desperdício de energia durante a ausência de alimento.

A utilização de carboidratos difere entre as espécies de peixes e depende da complexidade da fonte de carboidrato (Yamamoto, Konishi *et al.*, 2000). A presença de amilase no intestino de matrinxã é um efetivo indicador da habilidade do peixe para utilizar carboidrato. Esta característica está presente em jundiá (Melo, 2004), pintado (Lundstedt, 2003) e tambaqui (De Almeida, Lundstedt *et al.*, 2006) espécies de água doce de regiões tropicais. Baseado nas atividades enzimáticas pode-se constatar que a digestão de amido foi mais efetiva nos cecos pilóricos de matrinxã, seguida pelo intestino anterior e posterior. A composição da dieta modulou a atividade da amilase em matrinxã, já que os peixes alimentados com uma dieta sem adição de amido apresentaram as mais baixas atividades em

todas as secções de intestino (Figura 3). Porém, a presença de aminoácidos livres no intestino anterior e posterior provocou um aumento da atividade da amilase quando havia amido na dieta. Esse aumento da atividade da amilase pode ser o responsável pelo aumento da concentração de glicose plásmática (Figura 9).

Além dos aminoácidos adicionados, o aumento na produção de amilase pode ocorrer em resposta à presença de amido (Cahu, Rønnestad *et al.*, 2004) ou de produtos de sua hidrólise no lúmen do trato gastrintestinal. A adaptação da amilase devida aos diferentes níveis de amido da dieta tem sido descrita em peixes (Cahu e Zambonino-Infante, 1994). MORAES & BIDINOTO (2000) e LUNDSTEDT e colaboradores (2004) também verificaram a variação da atividade enzimática da amilase em pacú e em pintado alimentados com diferentes níveis de carboidratos. A glicose pode estar influenciando diretamente a produção desta enzima pelo tecido pancreático, ou indiretamente, estimulando a liberação de insulina pelo pâncreas que atuará estimulando a produção de amilase (Saito, Williams *et al.*, 1980; Osborn, Rosenberg *et al.*, 1987; Jobling, 1994).

Como os carboidratos não são considerados a fonte preferencial de energia em peixes, em várias espécies estes compostos parecem ser menos relevantes que em mamíferos. A variação na taxa de utilização de diferentes tipos de carboidratos para o crescimento pode ser bem explicada pela diferenças na taxa de digestão/absorção desse substrato (Wilson, 1994; Hutchins, Rawles *et al.*, 1998). Os peixes carnívoros apresentam pouca habilidade para digerir e metabolizar carboidratos quando comparados aos peixes onívoros e herbívoros (Moon e Foster, 1995; Kubitza, 1999; Moon, 2001; Lee e Lee, 2004). Segundo SABAPATHY & TEO (1993), a amilase do peixe onívoro *Siganus canaliculatus* (mácula de pinta branca) é mais ativa do que a do peixe carnívoro *Lates calcarifer* (perca-gigante).

A substituição satisfatória de proteína da dieta por carboidratos demanda atenção, visto que há evidências de que um excesso de energia não protéica (carboidrato ou lipídios) pode prejudicar o crescimento dos peixes (Winfrey e Stickney, 1981; Jonhson, Watanabe *et al.*, 2002). Por outro lado, a razão proteína/ carboidrato pode ser ajustada para prevenir o uso de aminoácidos como fonte de energia. Além disso, o aumento da energia não protéica leva à retenção de nitrogênio (Engin e Carter, 2001). Portanto, deve-se estudar a melhor proporção entre carboidrato da dieta e oferecimento de aminoácidos para a otimização da produção de amilase e aproveitamento dos carboidratos e proteínas, uma vez que o estudo do papel e da contribuição dos carboidratos para a demanda de energia em diferentes espécies de peixe ainda vem se desenvolvendo (Wilson e Poe, 1985).

As proteases de matrinxã foram expressas em todas as regiões do tubo digestório, mostrando a relevância da presença de proteína na alimentação de matrinxã (Figura 4). Algumas das atividades enzimáticas mostraram-se importantes pelos ensaios de protease inespecífica. No estômago de matrinxã, os aminoácidos livres adicionados à dieta parecem ter provocado o aumento da atividade proteolítica no tratamento SO+AAEL (Figura 4). O conteúdo de amido também parece ter sido crucial para atividade proteolítica, visto que se pode observar uma diminuição significativa do grupo SA+AAEL (Figura 4). O tipo de regulação neste caso parece semelhante ao observado para amilase em intestino anterior e posterior. Porém, este é provavelmente um efeito indireto dependente na liberação de gastrina. Este hormônio é o principal responsável pela liberação de HCl no lúmen intestinal para posterior ativação de pepsina. Além disso, a gastrina mostra claramente um efeito trófico, pois é capaz de estimular com habilidade o desenvolvimento e o crescimento da mucosa estomacal em humanos. A liberação de gastrina é dependente de substâncias como cálcio, glicose e aminoácidos, como fenilalanina e triptofano (Buchan, 1999).

Em humanos, os aminoácidos ou os seus derivados descarboxilados podem agir nas células-G para estimular a secreção de gastrina (Delvalle e Yamada, 1990). Extrapolando-se esses fatos poderíamos assumir que a presença contínua de glicose mais aminoácidos seria a responsável por um aumento de mucosa gástrica e, conseqüentemente, pelo aumento dos níveis de protease no estomago de matrinxã.

A atividade proteolítica de cecos pilóricos não foi responsiva a lipídio, aminoácidos ou amido (Figura 4). A atividade proteolítica de cecos é menos dependente da presença de reguladores, ou até mesmo do alimento, ainda que mesmo uma pequena diminuição ao longo do jejum seja observada. Este fato pode estar ligado a falta de células do sistema endócrino nessa porção do trato digestório de matrinxã. SEIXAS FILHO e colaboradores (2001), estudando duas espécies próximas ao matrinxã, piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, e piau, *Leporinus friderici*, verificaram a ausência de células endócrinas nos cecos pilóricos destas duas espécies. Porém, a relação entre a dieta, a estrutura e a função dos cecos pilóricos é muito complexa e ainda pouco entendida (Drewe, Horn *et al.*, 2004).

A tripsina é considerada uma enzima digestiva chave, pois é a responsável pela ativação de muitas outras enzimas proteolíticas, incluindo a quimiotripsina (Sunde, Taranger *et al.*, 2001) e é a protease predominante nos cecos pilóricos ((Hsu e Wu, 1979; Sunde, Taranger *et al.*, 2001; García-Carreño, Albuquerque-Cavalcanti *et al.*, 2002). Sendo assim, considerada a semelhança entre o perfil da atividade da tripsina e da protease inespecífica, a

atividade da tripsina foi, provavelmente, a principal atividade proteolítica dos cecos pilóricos (Figura 4 e Figura 5).

As atividades de tripsina no intestino anterior e posterior foram dez vezes mais baixas que dos cecos durante o jejum (Tabela 3). Porém, a resposta à presença de alimento ou nutrientes no intestino posterior foi notavelmente mais alta. Os estudos de CAHU & ZAMBONINO INFANTE (1995) mostraram que o aumento de proteína hidrolisada na dieta de alevinos de “sea bass” induz as atividades proteolíticas. JEANNINGROS (1982) e NIIJIMA (2000) propuseram a presença de receptores de aminoácidos no duodeno, jejuno e sistema porta-hepático venoso. Estes receptores podem estimular a síntese de enzimas digestivas. Sendo assim, os aminoácidos presentes no alimento podem estar envolvidos diretamente nos processos de estimulação de síntese e secreção de enzimas digestivas.

A presença de aminoácidos no lúmen intestinal pode aumentar a secreção de colecistocinina em peixes adultos e em mamíferos (Mearadji, Masclee *et al.*, 2001). Este hormônio, junto com estímulos neurais, tem um papel importante na secreção de enzimas digestivas do pâncreas (Singer, 1993; Einarson, Davies *et al.*, 1997; Rønnestad, Tonheim *et al.*, 2003).

A existência de múltiplas formas de tripsina em várias espécies animais levantou perguntas sobre a sua origem e os seus papéis (Ohlsson e Tegner, 1973; Louvard e Puigserver, 1974; Guy, Lombardo *et al.*, 1978; Brodrick, Largman *et al.*, 1980). Os diferentes comportamentos da tripsina de cecos pilóricos e do intestino posterior podem ser devido à presença de diferentes formas desta enzima nestes dois segmentos (Figura 5). Em salmão do Atlântico, inúmeros genes da tripsina têm sido reportados e caracterizados (Male, Lorens *et al.*, 1995). A composição aminoacídica diferenciada entre essas isozimas é fato conhecido, mas nem sempre esta característica traz diferenças marcantes em suas propriedades cinéticas. Entretanto, os fatores que promovem a sua secreção são variáveis entre os animais. O papel de nutrientes em tal expressão é relatado para ratos (Carreira, Fueri *et al.*, 1997), mas em peixes não conhecemos relato sobre esses dados. É provável que algumas iso-formas de tripsina, com características cinéticas semelhantes, e daí aparentemente sem diferenciação de papel funcional, apresentem na verdade respostas indutivas diferentes.

Há relatos de que a quantidade de lipídios presente no conteúdo intestinal provoca uma adaptabilidade da atividade lipolítica de matrinxã (Reimer, 1982). Isto foi explorado em nosso experimento, porém, enquanto os cecos não apresentaram respostas significativas a essas variações (Figura 6), o intestino apresentou alguma responsividade (Figura 6). Isso nos faz pensar que distintas lipases estão sendo expressas; uma, em intestino anterior, que é regulada

pelo amido junto com aminoácidos, e outra, no intestino posterior, que é regulada pelos lipídios do lúmen intestinal. IZQUIERDO e colaboradores (2000) mencionam em seu trabalho que diversos tipos de lipase vêm sendo reconhecidos no trato digestório de peixes juvenis e adultos.

O intestino anterior de matrinxã é possivelmente a secção mais importante na digestão de lipídios, pois além de apresentar a mais alta atividade também apresenta um caráter adaptativo (Tabela 4). Semelhantemente ao matrinxã, esta característica também foi demonstrada em tambaqui, *Colossoma macropomum*, (De Almeida, Lundsted *et al.*, 2006). BORLONGAN (1990) destaca que o local primário de ação lipolítica na maioria das espécies parece ser a porção anterior do intestino e os cecos pilóricos, quando presentes. Outros autores relatam que a digestão de lipídios continua nas demais porções do intestino (Smith, 1989). Atualmente, os padrões de distribuição da atividade lipolítica ao longo dos diversos segmentos do trato gastrointestinal de peixes, juvenis e adultos, vêm sendo estudados e parecem divergir entre as espécies (Chakrabarti, Gani *et al.*, 1995). Porém, conclusões mais seguras sobre o papel digestivo das lipases devem ser unidas à digestibilidade dos lipídios. Uma correlação positiva entre atividade de lipase e a digestibilidade de lipídios já foi observada em *Tor khudree* (Bazaz e Keshavanath, 1993), “rohu”, *Labeo rohita* (Gangadhar, Nandeeshha *et al.*, 1997) e robalos, *Dicentrarchus labrax*, (Peres e Olívia-Teles, 1999). Estudos adicionais deverão estabelecer tal correlação em matrinxã.

Dietas suplementadas com aminoácidos ainda são um assunto polêmico e controverso. Estudos prévios *in vivo* com pacú alimentados com níveis de proteína abaixo do indicado para a espécie e com suplementação de lisina ou metionina, não mostraram nenhuma diferença nas taxas de crescimento específicas, concentrações plasmáticas de glicose, triglicérides e proteínas (Muñoz-Ramirez e Carneiro, 2002). Tilápias alimentadas com proteína de soja suplementada com aminoácido também não mostraram nenhuma diferença relativa no desempenho de crescimento (Furuya, Pezzato *et al.*, 2004). Porém, MAMBRINI e colaboradores (1999) estudando truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, obtiveram um resultado significativamente maior com dietas contendo DL-metionina. PIEDRAS (2004) também relata, para *Odontesthes bonariensis*, que uma dieta com metionina e uma dieta com metionina e lisina levam a um crescimento maior do que uma dieta sem aminoácidos livres e uma dieta só com lisina.

O ajuste de macronutrientes é crucial para se aperfeiçoar a nutrição de peixes (De Almeida, Lundsted *et al.*, 2006). Melhorias na formulação e confecção das dietas para peixes devem ser uma preocupação constante, sendo que isto depende de combinações ajustadas dos

nutrientes (Kuz'mina e Golovanova, 2004). Os lipídios e carboidratos complexos na dieta de alguns peixes podem controlar o consumo de proteína (Manjappa, Keshavanath *et al.*, 2002), evitando seu uso na produção de energia e poupando-a para outras funções.

Comumente as atividades das enzimas digestivas do intestino posterior são as mais baixas de todas as porções do trato (Melo, 2004; De Almeida, Lundsted *et al.*, 2006). Segundo DAS e colaboradores (1987) e TENGJAROENKUL e colaboradores (1999), baixas atividades enzimáticas no intestino posterior de peixes são atribuídas à função de reabsorção nesta porção do trato, sugerindo um papel secundário na produção de enzimas. Porém, devemos ressaltar que, possivelmente, o intestino posterior possui um papel importante no processo digestivo, além da absorção dos nutrientes. Isso é corroborado pelos dados obtidos neste experimento, onde se observou um aumento das atividades enzimáticas. Além disso, SEIXAS FILHO e colaboradores (2001) verificaram a presença de células endócrinas nos segmentos referentes ao intestino anterior, que foi chamado por eles de médio, e posterior de piracanjuba e piauí.

5.2 Metabolismo intermediário.

A utilização das reservas energéticas nos peixes depende do tempo de privação alimentar, da espécie estudada (Van Den Thillart e Van Raaij, 1995) e do tipo de alimento ofertado. A redução na concentração de glicose e glicogênio no fígado de matrinxã em jejum sugere o seu fornecimento com o propósito de manter os níveis plasmáticos de glicose (Tabela 5). O aumento da capacidade de glicogenólise do fígado pode ser devido parcialmente às mudanças de hormônios reguladores da glicemia no plasma (insulina e glucagon) (Pereira, Vijayan *et al.*, 1995).

O grau de glicogenólise varia entre as espécies, desde uma rápida ou moderada quebra até a completa degradação do glicogênio durante o jejum (Sheridan e Mommsen, 1991). A respeito da utilização do glicogênio hepático devido à privação alimentar VAN DEN THILLART & VAN RAAIJ (1995) dividem as espécies de peixes em duas categorias. A primeira é aquela em que as espécies utilizam as reservas de glicogênio no primeiro estágio da privação de alimento, como a carpa comum, *Cyprinus carpio*, e a truta arco-íris. E o segundo grupo é aquele que utiliza o glicogênio após as reservas de outros combustíveis terem se esgotado devido a longos períodos sem alimento. A degradação das reservas de glicogênio permite um suprimento constante de glicose para todos os tecidos principalmente o nervoso. Baseado em nossos resultados pode-se incluir o matrinxã na primeira categoria, já que houve

uma redução de 66% das reservas de glicogênio hepático nos animais mantidos em jejum por 15 dias (Tabela 5).

A manutenção dos teores de glicose sanguíneos é importante, pois muitos tecidos, como o cérebro, utilizam preferencialmente glicose como fonte energética (De Silva e Anderson, 1995). O fígado dos peixes pode exportar glicose a partir da quebra de glicogênio em direção aos tecidos extra-hepáticos, já que os estoques de glicogênio do músculo branco não são utilizados rotineiramente para manutenção da glicemia de outros tecidos (Moon e Foster, 1995; Van Den Thillart e Van Raaij, 1995; Hemre, Mommsen *et al.*, 2002). Normalmente este estoque é direcionado para queima rápida devido ao exercício (Van Den Thillart e Van Raaij, 1995). O glicogênio muscular é utilizado somente após o esgotamento do glicogênio hepático em período de jejum induzido (Jobling, 1994). Em matrinxã, o fígado provavelmente exerceu sua função de manutenção da glicemia, pois, como pode ser visto, não houve uma diminuição significativa dos estoques de glicogênio do músculo branco (Figura 12).

A manutenção da glicemia, quando não há disponibilidade de glicose na dieta, pode também acontecer a partir de precursores não glicídios, como lactato e aminoácidos. A diminuição das concentrações de lactato e piruvato nos tecidos analisados e no plasma e a manutenção da concentração de glicose (Figura 9) do grupo Jejum podem ter sido devidas à utilização desta molécula no processo gliconeogênico. O lactato é um dos substratos mais usados pelo metabolismo hepático, sugerindo a importância do ciclo de Cori para os peixes na reciclagem do lactato muscular (lactato muscular → glicose hepática → glicogênio muscular) (Suárez e Monnsen, 1987).

A ausência de amido nas dietas experimentais SA e SA+AAEL e a privação alimentar do grupo Jejum provavelmente estimulou a gliconeogênese hepática e muscular e a liberação de glicose hepática no matrinxã. Isto é sugerido pela redução nas concentrações de lactato hepático e muscular, e de piruvato (substratos para a gliconeogênese) e de glicose hepática (Figura 9). Segundo LOVE (1980), a gliconeogênese a partir de aminoácidos é uma característica central da privação de alimentos nas enguias e nos salmonídeos para a manutenção da glicemia. O grupo que permaneceu em jejum, além de utilizar o lactato, pode ter utilizado aminoácidos para a manutenção da glicemia, já que se pode observar uma diminuição significativa da concentração dessa molécula no músculo branco e um aumento da concentração de amônia no plasma.

O aumento da concentração de glicogênio hepático e a diminuição de glicose hepática nos tratamentos SA e SA+AAEL provavelmente ocorreu porque o fígado realizou

glicogênese e, também, devido a uma possível neoglicogênese a partir de aminoácidos. Esta neoglicogênese foi mais intensa no grupo SA, pois, como se pode verificar, houve uma diminuição dos teores de aminoácidos hepáticos e aumento na concentração de amônia hepática. Isso provavelmente ocorreu devido à insuficiência de carboidratos para suprir demanda energética neste tratamento. MELO e colaboradores (2006), estudando jundiás alimentados com dietas com teores crescentes de proteína e decrescente de carboidratos, observaram um aumento da concentração de amônia hepática com concomitante aumento da glicose. Alguns autores (Hidalgo e Alliot, 1988; Kim, 1997) afirmam que o aumento da concentração de compostos nitrogenados para excreção é uma consequência do uso de aminoácidos para a obtenção de energia.

A glicogenese e a neoglicogenese pode ter ocorrido com o grupo SO, já que podemos observar também o aumento de glicogênio hepático, com a concomitante redução dos teores de aminoácidos. Porém, diferentemente dos outros dois grupos não há uma diminuição da concentração de glicose hepática. Isso pode estar acontecendo devido à maior mobilização de aminoácidos do fígado para a produção de glicose por neoglicogênese. Estes aminoácidos possivelmente são oriundos de proteínas hidrolisadas do alimento, já que não foi observada nenhuma redução nas concentrações de proteínas nos tecidos analisados. MOON & FOSTER (1995) relatam em peixes que na ausência de nutrientes provindos da dieta, o fígado parece ser o fornecedor de glicose para os tecidos extra-hepáticos, através da neoglicogênese através de lactato, piruvato e aminoácidos advindos do catabolismo de proteínas.

Outra forma de se suprir as necessidades energéticas é a utilização das reservas lipídicas. Os lipídios são a fonte de energia mais importante durante os períodos de privação de alimento (Avila, 1987; Collins e Anderson, 1997) e durante a falta de carboidratos. O aumento significativo de AGL no músculo branco e plasma do grupo em jejum, e dos dois grupos que receberam dietas sem amido, está ocorrendo devido à mobilização de triglicerídeos tanto do próprio músculo como do plasma. KROGDAHL e colaboradores (1999) também observaram imediata diminuição da concentração de triglicerídeos plasmáticos devido ao jejum para suprir a demanda energética. Além disso, o fígado, principal órgão de estocagem de lipídios em peixes (Avila, 1987) mobilizou triglicerídeos para o plasma (Figura 7) no grupo SA+AAEL.

Quando a lipase hormônio-sensível é ativada devido à sinalização de que o organismo está necessitando de energia, os triglicerídeos armazenados são mobilizados e transportados como AGL para o plasma, e daí para os tecidos, principalmente para os músculos (Van Den Thillart e Van Raaij, 1995), nos quais podem ser oxidados (Weber e Zwingelstein, 1995).

MOYES e colaboradores (1992) 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 presentes isoladamente. Entretanto, quando presentes em conjunto, a oxidação dos ácidos graxos inibe a utilização de piruvato. A diminuição da concentração de triglicerídeos e um aumento da de AGL no músculo branco dos grupos SA e SA+AAEL são um indicativo de que está ocorrendo lipólise neste tecido, já que não há carboidrato oriundo da dieta para suprir a demanda metabólica. DE ALMEIDA (2006) também verificou uma diminuição na concentração de triglicerídeos e um aumento na de AGL na dieta com o mais alto teor de lipídio e o mais baixo teor de proteína para tambaqui. O aumento do teor de proteína muscular e hepática dos grupos SA e SA+AAEL (Figura 13) pode também estar relacionado com a utilização das reservas lipídicas e não da protéica como fonte de energia. Muitas perguntas importantes e interessantes sobre o papel dos lipídios e das lípases em peixes, principalmente nos herbívoros, precisam ainda ser esclarecidas (Drewe, Horn *et al.*, 2004).

As taxas de síntese protéica são bastante altas no fígado, e este órgão é extremamente sensível a qualquer variação na composição da dieta (Carter e Houlihan, 2001). Acredita-se que as proteínas possam ser a fonte energética para jejuns prolongados nos peixes (Van Den Thillart e Van Raaij, 1995). Entretanto, considerando-se que a estrutura funcional dos organismos é formada basicamente por proteínas, as mudanças em sua composição podem ser bem pequenas e não serem estatisticamente significativas, ou simplesmente serem o resultado de outras mudanças no tecido, tais como o conteúdo de água, lipídios e glicogênio. Por isso, muitos estudos utilizam os aminoácidos e a produção de amônia para inferir sobre o metabolismo protéico (Moyes e West, 1995).

O fígado parece ser o principal sítio de produção de amônia do organismo (Alexis e Pappaskeva-Papatsoglo, 1986). Como as concentrações de aminoácidos hepáticos, plasmáticos e musculares variaram significativamente, e as concentrações de amônia foram significativamente maiores no plasma do grupo que permaneceu em jejum, podemos agora inferir que o grupo em jejum utilizou sua estrutura protéica para a manutenção da suas necessidades energéticas, apesar da concentração de proteína plasmática e muscular ter se mantida constante e a proteína hepática ter aumentado.

Não ficou evidente uma mudança no perfil metabólico devido à adição de aminoácidos essenciais livres a dieta. Isso pode estar relacionado ao pouco tempo de experimentação associado à pequena, mas significativa, variação na atividade das enzimas que responderam à presença de aminoácidos essenciais livres. Um período maior de experimentação pode tornar

evidentes os efeitos da adição de aminoácidos essenciais livres à dieta. A não diferença dos parâmetros biométricos também pode estar ligada a este fato.

6 CONCLUSÕES

- As atividades amilohidrolítica, proteolítica e lipolítica de *B. amazonicus* diminuem devido ao jejum de 15 dias. As reservas lipídicas e os aminoácidos dos tecidos analisados, as reservas glicídicas hepáticas são utilizadas como fonte de energia para a manutenção do metabolismo.
- A ausência de amido na dieta causa uma diminuição da atividade da amilase de todas as porções do trato digestório e a atividade das proteases estomacais;
- Na ausência de amido, há o consumo de triglicérides e a síntese de glicose por neoglicogênese para a obtenção de energia;
- A ausência de lipídios na dieta não causa alterações significativas no perfil enzimático e no metabolismo intermediário de matrizã.
- A adição de aminoácidos essenciais livres provoca aumento:
 - das atividades proteolíticas do estômago e lipolítica do intestino anterior e posterior na ausência de lipídios;
 - das atividades proteolíticas do intestino anterior e do posterior e na ausência de amido;
 - das atividades amilohidrolíticas intestino posterior na ausência de lipídios e de amido.
- Não há alterações no metabolismo intermediário devido a adição de aminoácidos essenciais livres;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRO, P. W., *et al.* Activation of non-specific lipase (EC 3.1.1.) by bile salts. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 835, n., p. 477-490, 1985.
- ALEXIS, M. N.; E. PAPARASKEVA-PAPATSOGLO. Aminotranferase activity in the liver and white muscle of *Mugil capito* fed diets containing different levels of protein and carbohydrate. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 83, n., p. 245-249, 1986.
- AVILA, E. M. The effect of temperature and starvation on the ultrastructure of the hepatocytes of the giant seaperch fingerlings, *Lates calcarifer* (Bloch). **ZoologischerAnzeiger**, v. 1-2, n., p. 103-112, 1987.
- AZZAYDI, M., *et al.* The influence of nocturnal vs. diurnal feeding under winter conditions on growth and feed conversion of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). **Aquacult.**, v. 182, n., p. 329-338, 2000.
- BALLANTYNE, J. S. Amino acid Metabolism. In: P. WRIGHT ; P. ANDERSON (Ed.). **Nitrogen Excretion**. Boca Raton - FL: Academic Press, 2001, v. 20, p. 77-107. (Fish Physiology Series)
- BAZAZ, M. M.; P. KESHAVANATH. Effect of feeding different levels of sardine oil on growth, muscle composition and digestive enzyme activities of mahseer, *Tor Khudree*. **Aquacult.**, v. 115, n., p. 111-119, 1993.
- BEAMISH, F. W.; E. THOMAS. Effect of dietary protein and lipid on nitrogen loss in rainbow trout. **Aquacult.**, v. 41, n. 359-371, p., 1984.
- BÉLANGER, F., *et al.* Digestive capacity and compensatory growth in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 26, n. 2, p. 121-128, 2002.
- BERGOT, F.; J. BREQUE. Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and the intake level. **Aquacult.**, v. 34, n., p. 203-212, 1983.
- BERNFELD, P. Amylases α and β : colorimetric assay method. In: S. P. COLOWICH, KAPLAN, N.O. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1955, v., p.
- BIAGINI P, *et al.* The human gastrin/cholecystokinin receptors: type B and type C expression in colonic tumors and cell lines. **Life Sci.**, v. 61, n. 10, p. 1009-1018, 1997.
- BIDINOTTO, P. M., *et al.* Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Bol. Tec. Cepta**, v. 1, n., p. 53-60, 1997.
- BLASCO, J., *et al.* The effects of starvation and refeeding on plasma amino acid levels, *Cyprinus carpio* L, 1758. **J. Fish Biol.**, v. 38, n., p. 587-598, 1991.
- BOER, S. Y. D., *et al.* Effect of intravenous glucose on intravenous amino acid-induced gallbladder contraction and CCK secretion. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 39, n. 2, p. 268-274, 1994.

BORLOGAN, I. G. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. **Aquacult.**, v. 89, n., p. 315-325, 1990.

BOYCE, S. J. Nitrogenous excretion in the Antarctic plunderfish. **J. Fish Biol.**, v. 54, n. 1, p. 72-81, 1999.

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

BRANDÃO, F. R., *et al.* Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n., p. 299-303, 2005.

BRODRICK, J. W., *et al.* Clearance of circulating anionic and cationic pancreatic trypsinogens in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 289, n. C511-C515, p., 1980.

BUCHAN, A. M. J. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. III. Endocrine cell recognition of luminal nutrients. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 277, n. 6, December 1, 1999, p. G1103-1107, 1999.

BUTLER, D. G. Hormonal control of gluconeogenesis in the North American eel (*Anguilla rostrata*). **Gen. Comp. Endocrinol**, v. 10, n., p. 85-91, 1968.

CAHU, C., *et al.* Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. **Aquacult.**, v. 238, n. 1-4, p. 294-308, 2004.

CAHU, C. L.; J. L. ZAMBONINO-INFANTE. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. **Compendium of Biochemistry and Physiology**, v. 109, n., p. 213-222, 1994.

CAHU, C. L.; J. L. ZAMBONINO INFANTE. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 14, n. 3, p. 209-214, 1995.

CARREIRA, S., *et al.* Stability of the mRNA encoding some pancreatic hydrolases is modulated by dietary protein intake in the rat. **British Journal of Nutrition**, v. 78, n., p. 833-843, 1997.

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

CARTER, C. G.; D. F. HOULIHAN. Protein Synthesis. In: P. WRIGHT, ANDERSON, P (Ed.). **Nitrogen Excretion. Fish Physiology Series**. Boca Raton - NY: Academic Press, 2001, v. 20, p. 31-75

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de Água Doce**. Jaboticabal - SP: FUNEP, 1992, v. 189 p.

- CHAKRABARTI, I., *et al.* Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 112A, n., p. 167-177, 1995.
- CHAMPE, P. C.; R. A. HARVEY. **Lippincott's illustrated reviews: biochemistry.** Philadelphia: Lippincott, 1994, v. 443 p.
- CHEESEMAN, C. I.; R. TSANG. The effect of GIP and glucagon-like peptides on intestinal basolateral membrane hexose transport. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 271, n. 3, September 1, 1996, p. G477-482, 1996.
- CHESLEY, L. C. The concentrations of proteases, amylase, and lipase in certain marine fishes. **Biol Bull**, v. 66, n. 2, April 1, 1934, p. 133-144, 1934.
- CHOU, R.-L., *et al.* Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 193, n. 1-2, p. 81-89, 2001a.
- CHOU, R.-L., *et al.* Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquacult.**, v. 193, n. 1-2, p. 81-89, 2001b.
- COLLINS, A. L.; T. A. ANDERSON. The influence of changes in food availability on the activities of key degradative and metabolic enzymes in the liver and epaxial muscle of the golden perch. **J. Fish Biol.**, v. 50, n. 6, p. 1158-1165, 1997.
- COPLEY, N. G. Alloxan and ninhydrin test. **Analyst**, v. 66, n., p. 492-493, 1941.
- CORRÊA, C. F. **Estudo dos padrões de digestão enzimática e perfil metabólico em tambaqui, *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818) alimentado com diferentes teores de proteína e carboidrato em regime de confinamento.** (Tese). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2002. 115 p.
- COWEY, C. B., *et al.* Studies on the nutrition of marine flatfish. The metabolism of glucose by plaice (*Pleuronectes platessa*) and the effect of dietary energy source on protein utilization in plaice. **Br. J. Nutr.**, v. 33, n., p. 219-231, 1975.
- COWEY, C. B., *et al.* **Nutrition and feeding in fish.** London: Academic Press, 1985, v. 489 p.
- COWEY, C. B.; J. R. SARGENT. Fish nutrition. In: H. J. R. OSLAGE, K. (Ed.). **Fish physiology.** London: Academic Press, 1979, v. 8, p. 1-69
- CRAIG, S.; L. A. HELFRICH. **Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding** Virginia. 2007 2002.
- CYRINO, J. E. P., *et al.* **Digestibilidade da proteína de origem animal e vegetal pelo matrinxã (*Brycon ceplalus* (Günther, 1869)) (Euteleostei, Characiformes, Characidae).** Anais do V Simpósio Brasileiro de Aqüicultura. Cuiabá, 1986. 49-62 p.
- DABROWSKI, K.; H. GUEDERLEY. Intermediary Metabolism. In: J. E. HALVER ; R. W. HARDY (Ed.). **Fish Nutrition.** New York: Academic Press, 2002, v., p. 309-365

DAS, K. M., *et al.* Studies on the comparative activity of some digestive enzymes in fry and adult of Mullet *Liza paesia* (ham). **J. Aqua., Trop.**, v. 2, n., p. 9-15, 1987.

DE ALMEIDA, L. C. **Perfil digestivo e metabólico de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), alimentados com diferentes teores de proteína e lipídio.** (Disertação). Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2006. 77 p.

DE ALMEIDA, L. C., *et al.* Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipids. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n., p. 443-451, 2006.

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

DELVALLE, J.; T. YAMADA. Amino acids and amines stimulate gastrin release from canine antral G-cells via different pathways. **J. Clin. Invest.**, v. 85, n. 1, p. 139-143, 1990.

DESBOIS, C., *et al.* The CCKB/gastrin receptor is coupled to the regulation of enzyme secretion, protein synthesis and p70 S6 kinase activity in acinar cells from ElasCCKB transgenic mice. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, n. 3, p. 1003-1010, 1999.

DIVAKARAN, S., *et al.* Digestive enzymes present in Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis* (Bloch & Schneider 1801) and bluefin trevally *Caranx melampygus* (Cuvier 1833). **Aquacult. Research**, v. 30, n. 10, p. 781-787, 1999.

DREWE, K. E., *et al.* Insectivore to frugivore: ontogenetic changes in gut morphology and digestive enzyme activity in the characid fish *Brycon guatemalensis* from Costa Rican rain forest streams. **J. Fish Biol.**, v. 64, n. 4, p. 890-902, 2004.

DUBOIS, M., *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, n., p. 350-358, 1956.

EINARSON, S., *et al.* Effect of exogenous cholecystokinin on the discharge of the gallbladder and the secretion of trypsin and chymotrypsin from the pancreas of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. . **Comp. Biochem Physiol.**, v. 117C, n., p. 63-67, 1997.

EINARSSON, S.; P. S. DAVIES. On the localisation and ultrastructure of pepsinogen, trypsinogen and chymotrypsinogen secreting cells in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 114, n. 3, p. 295-301, 1996.

ENGIN, K.; C. G. CARTER. Ammonia and urea excretion rates of juvenile Australian short-finned eel (*Anguilla australis australis*) as influenced by dietary protein level. **Aquacult.**, v. 194, n. 1-2, p. 123-136, 2001.

ERFANULLAH; A. K. JAFRI. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratio on growth and body composition of walking catfish (*Clarias batrachus*). **Aquacult.**, v. 161, n. 1-4, p. 159-168, 1998.

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). **Tropical Zoology**, v. 13, n., p. 1-9, 2000.

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

FRASCÁ-SCORVO, C. M. D., *et al.* Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. **B. Inst. Pesca**, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2001.

FURUICHI, M.; Y. YONE. Change of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerance test. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish**, v. 47, n., p. 761-764, 1981.

FURUYA, W. M., *et al.* Use of ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquacult. Research**, v. 35, n. 12, p. 1110-1116, 2004.

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

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

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

GERKING, S. D. **Feeding ecology of fish**. Califórnia: Academic Press, 1994, v. p.

GIELKENS, H. A., *et al.* Gallbladder motility and cholecystokinin secretion in chronic pancreatitis: relationship with exocrine pancreatic function. **Journal of Hepatology**, v. 27, n., p. 306-312, 1997.

GLASS, H., J., *et al.* Digestion of protein in different marine species. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 94, n. 3, p. 607-611, 1989.

GOMIERO, J. S. G., *et al.* Rendimento de carcaça de peixe matrinxã (*Brycon cephalus*) nos diferentes cortes de cabeça. **Ciênc. agrotec.**, v. 27, n. 1, p. 211-216, 2003.

GOULDING, M. **Ecologia da pesca do rio Madeira**. Manaus: CNPq-INPA, 1979, v. 172 p.

GUILLOTEAU, P., *et al.* Gastrin, cholecystokinin and gastrointestinal tract functions in mammals. **Nutrition Research Reviews**, v. 19, n. 2, p. 254-283, 2006.

GUY, O., *et al.* Two human trypsinogens. Purification, molecular properties and N-terminal sequences. **Biochem.**, v. 17, n., p. 1669-1675, 1978.

GUYTON, A. C.; J. E. HALL. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002, v. 973 p.

HACHBARTH, A. **Respostas metabólicas e de crescimento de matrinxã (*Briconecephalus, Güther, 1869*) submetidos ao exercício sustentado.** (Dissertação). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2004. 88 p.

HALVER, J. E. My 50 years in fish nutrition, 1949-99. **Aquacult. Research**, v. 32, n. 8, p. 615-622, 2001.

HALVER, J. E.; R. W. HARDY. Nutrient Flow and Retention. In: J. E. HALVER, HARDY, R.W. (Ed.). **Fish Nutrition**. San Diego: Academic Press, 2002, v., p. 755-770

HARA, H., *et al.* Induction of pancreatic trypsin by dietary amino acids in rats: Four trypsinogen isozymes and cholecystokinin messenger RNA. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 52-59, 2000.

HARROWER, J. R.; C. H. BROWN. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **J. Appl. Physiol.**, v. 32, n., p. 224-228, 1972.

HEMRE, G. I., *et al.* Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquacult. Nutr.**, v. 8, n. 3, p. 175-194, 2002.

HENRY-SILVA, G. G., *et al.* Digestibilidade aparente de macrófitas aquáticas pela tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água em relação às concentrações de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n., p. 641-647, 2006.

HEPHER, B. Principles of fish Nutrition. In: M. SHILO ; S. SARIG (Ed.). **Fish Culture in Warm Water Systems, Problems & Trends**. Boca Raton: CRC, 1989, v., p. 121-142

HERTRAMPF, J. W.; F. PIEDAD-PASCUAL. **Handbook on ingredients for aquaculture feeds**: Kluwer Academics Publishers, 2000,v. 573 p.

HIDALGO, F.; E. ALLIOT. Influence of water temperature on protein requirement and protein utilization in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Aquacult.**, v. 72, n., p. 115-129, 1988.

HIDALGO, M. C., *et al.* Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquacult.**, v. 170, n. 3-4, p. 267-283, 1999.

HIMICK, B. A., *et al.* CCK/Gastrin-like Immunoreactivity in the Goldfish Pituitary: Regulation of Pituitary Hormone Secretion by CCK-like Peptides in Vitro. **Gen. Comp. Endocrinol**, v. 92, n. 1, p. 88-103, 1993.

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

HOFER, R.; G. KÖCK. Method for the quantitative determination of digestive enzyme in fish larvae. **Pol. Arch. Hydrobiol**, v. 36, n., p. 439-441, 1989.

- HSU, Y. L.; J. L. WU. The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. **Bull. Inst. Zool. Academia Sinica**, v. 18, n. 1, p. 45-53, 1979.
- HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and trombin. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, n. 12, p. 1393-1399, 1959.
- HUNG, S. S. O., *et al.* Ability of Juvenile White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to Utilize Different Carbohydrate Sources. **J. Nutr.**, v. 119, n. 5, May 1, 1989, p. 727-733, 1989.
- HUTCHINS, C. G., *et al.* Effects of dietary carbohydrate kind and level on growth, body composition and glycemic response of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* female x *M. saxatilis* male). **Aquacult.**, v. 161, n. 1-4, p. 187-199, 1998.
- INCE, B. W.; S. T. C. SO. Differential secretion of glucagon-like and somatostatin-like immunoreactivity from the perfused eel pancreas in response to D-glucose. **Gen. Comp. Endocrinol**, v. 53, n., p. 389-397, 1984.
- INOUE, L. A. K., *et al.* Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxa *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33C, n., p. 943-947, 2003.
- INUI, Y.; Y. OSHIMA. Effects of starvation on metabolism and chemical composition of eels. **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.**, v. 32, n., p. 494-501, 1966.
- IZEL, A. C. U., *et al.* Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Acta Amaz.**, v. 34, n., p. 179-184, 2004.
- IZQUIERDO, M. S., *et al.* Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. **Recent advances in lipid nutrition in fish larvae**, v. 22, n., p. 97-107, 2000.
- JAUNCEY, K. The effects of varying dietary protein level on the growth, food conversion, protein utilization and body composition of juvenile tilapias (*Sarotherodon mossambicus*). **Aquacult.**, v. 27, n. 1, p. 43-54, 1982.
- JEANNINGROS, R. Vagal unitary responses to intestinal amino acids infusion in the anesthetized cat: a putative signal for protein induced satiety. **Physiol. Behav**, v. 28, n., p. 9-21, 1982.
- JOBLING, M. Some effects of temperature, feeding and body weight on nitrogenous excretion in young plaice (*Pleuronectes platessa* L.). **J. Fish Biol.**, v. 18, n., p. 87-96, 1981.
- JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 1994, v. 309 p.
- JOBLING, M. **Environmental Biology Of Fish**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 455 p.
- JONHSON, E. G., *et al.* 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., p. 47-54, 2002.
- JØRGENSEN, E. H., *et al.* Food acquisition and growth of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in relation to spatial distribution of food. **Aquacult.**, v. 143, n., p. 277-289, 1996.

JÜRS, K.; R. BASTROP. Amino acid metabolism in fish. In: P. W. HOCHACHKA, MOMMSEN, P. (Ed.). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1995, v. 4, p. 159-189

KAMRA, S. K. Effect of starvation and refeeding on some liver and blood constituents of Atlantic cod (*Gadus morshua* L.). **J. Fish. Res. Board. Can.**, v. 23, n. 7, p. 975- 982, 1966.

KAPOOR, B. G., *et al.* The alimentary canal and digestion in teleosts. **Adv. Mar. Biol.**, v. 63, n., p. 301–308, 1975.

KIEFFER, J. D.; B. L. TUFTS. Effects of food deprivation on white muscle energy reserves in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): the relationships with body size and temperature. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 19, n. 3, p. 239-245, 1998.

KIM, K. I. Re-evaluation of protein and amino acid requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquacult.**, v. 151, n. 1-4, p. 3-7, 1997.

KONTUREK, S. J., *et al.* Intravenous amino acids and fat stimulate pancreatic secretion. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 236, n. 6, June 1, 1979, p. G678-684, 1979.

KROGDAHL, A.; A. M. BAKKE-MCKELLEP. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 141, n. 4A, p. 450-460, 2005.

KROGDAHL, A., *et al.* Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. **Aquacult. Nutr.**, v. 11, n. 2, p. 103-122, 2005.

KROGDAHL, A., *et al.* Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. **Aquacult. Nutr.**, v. 5, n. 2, p. 121-133, 1999.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes**. Piracicaba:Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz 1997,v. 74 p.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. Jundiaí: Divisão de Biblioteca e Documentação, USP, 1999,v. 123 p.

KUMAR, S., *et al.* Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. **Fish & Shellfish Immun.**, v. 19, n. 4, p. 331-344, 2005.

KUZ'MINA, V. V.; I. L. GOLOVANOVA. Contribution of prey proteinases and carbohydrases in fish digestion. **Aquacult.**, v. 234, n. 1-4, p. 347-360, 2004.

LALL, S. P. Salmonid nutrition and feed production. In: R. H. COOK ; W. PENNEL (Ed.). **Proceedings of the special session on salmonid aquaculture**. Los Angeles, CA: World Aquaculture Society, 1991, v., p. 107-123

LAM, W. F., *et al.* Effect of hyperglycemia on gastric acid secretion and gastrin release induced by intravenous amino acids. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 61, n. 6, June 1, 1995, p. 1268-1272, 1995.

LARSSON, A.; K. LEWANDER. Metabolic effects of starvation in the eel, *Anguilla anguilla* L. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 4, n., p. 367-374, 1973.

LEE, S.-M.; J. H. LEE. Effect of dietary glucose, dextrin and starch on growth and body composition of juvenile starry flounder *Platichthys stellatus*. **Fish. Sci.**, v. 70, n. 1, p. 53-58, 2004.

LEE, S. M., *et al.* Effects of dietary protein and energy levels on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 31, n. 3, Sep, p. 306-315, 2000.

LEHNINGER, A. L., *et al.* **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995, v. 839 p.

LEITE, R. G. A alimentação de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicum* (Pisces, Characidae), em áreas inundadas da Ilha de Marchantaria, Amazonas, Brasil. **Acta Amaz.**, v. 34, n., p. 661-664, 2004.

LEMIEUX, H., *et al.* Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? **Fish Physiol. Biochem.**, v. 20, n. 4, p. 293-303, 1999.

LHOSTE, E. F., *et al.* Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: Effect of the nature of protein and rat strain on enzyme activities and messenger RNA levels. **J. Nutr. Biochem.**, v. 5, n. 84-94, p., 1994.

LIDDLE, R. A. Cholecystokinin cells. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 59, n. 1, p. 221-242, 1997.

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: R. E. K. REIS, S. O; FERRARIS JR, C. J. (Ed.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDPURCS, 2003, v., p. 174-181

LIU, G., *et al.* Cholecystokinin expression in the developing and regenerating pancreas and intestine. **J Endocrinol**, v. 169, n. 2, May 1, 2001, p. 233-240, 2001.

LOUVARD, M. N.; A. PUIGSERVER. On bovine and porcine anionic trypsinogens. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 371, n. 1, p. 177-185, 1974.

LOVE, R. M. **The Chemical Biology of Fishes**. London: Academic Press, 1980, v. 2 943 p.

LOVELL, T. **Nutrition and Feeding of Fish**. . New York, NY: Van Nostrand Reinhold, 1988, v. 260 p.

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, n., 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.** . (Tese). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2003. 140 p.

LUNDSTEDT, L. M., *et al.* Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 137, n. 3, p. 331-339, 2004.

MALE, R., *et al.* Molecular cloning and characterization of anionic and cationic variants of trypsin from Atlantic Salmon. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, n. 2, p. 677-685, 1995.

MAMBRINI, M., *et al.* Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high-energy, extruded diets on the growth and nutrient utilization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Anim Sci.**, v. 77, n. 11, November 1, 1999, p. 2990-2999, 1999.

MANJAPPA, K., *et al.* 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**, v. 2, n., p. 146-155, 2002.

MEARADJI, B., *et al.* Effect of intraduodenal and intravenous amino acids on proximal gastric motor function in man. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, n. 1, p. 38-45, 2001.

MEDALE, F., *et al.* Utilisation of a carbohydrate-rich diet by common carp reared at 18 and 25 degrees C. **Cybium**, v. 23, n. 1, p. 139-152, 1999.

MELO, J. F. B. **Digestão e metabolismo de jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido a diferentes regimes alimentares.** . (Tese). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2004. 80 p.

MELO, J. F. B., *et al.* Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 145, n. 2, p. 181-187, 2006.

MENDONÇA, J. O. J. O gênero Brycon. **Panorama da Aquicultura**. 6: 14-16 p. 1996.

MENDONÇA, J. O. J., *et al.* Influência da fonte protéica no crescimento do matrinxã, *Brycon cephalus* Gunther, 1869 (Teleostei, Characidae), em viveiros. **Boletim Técnico CEPTA**, v. 6, n. 1, p. 51-57, 1993.

MEURER, F., *et al.* Lipídeos na Alimentação de Alevinos Revertidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Rev. Bras. Zootec.**, v. 31, n., p. 566-573, 2002.

MEYER, J. H., *et al.* Canine gut receptors mediating pancreatic responses to luminal L-amino acids. **Am. J. Physiol.**, v. 231, n. 3, September 1, 1976, p. 669-677, 1976.

MOMMSEN, T. P., *et al.* Metabolic zonation in teleost gastrointestinal tract. **Journal of Comparative Physiology**, v. 173B, n. 5, p. 409-418, 2003.

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

MOON, T. W. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 129, n. 23, p. 243-249, 2001.

MOON, T. W.; G. D. FOSTER. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: P. W. HOCHACHKA ; P. MOMMSEN (Ed.). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1995, v. 4, p. 65-100

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

MOYES, C. D., *et al.* Mitochondrial metabolism of cardiac and skeletal muscle from a fast (*Katsuwonus pelamis*) and a slow (*Cyprinus carpio*) fish. **Can. J. Zool.**, v. 70, n., p. 1246-1253, 1992.

MOYES, C. D.; T. G. WEST. Exercise metabolism of fish. In: P. W. HOCHACHKA, MOMMSEN, P. (Ed.). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1995, v. 4, p. 367-392

MUÑOZ-RAMIREZ, A. P.; D. J. CARNEIRO. Suplementação de lisina e metionina em dietas com baixo nível protéico para crescimento inicial de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg). **Acta Sci.**, v. 24, n., p. 909-916, 2002.

NARASIMHAN, P. V.; B. I. SUNDARARAJ. Effects of stress on carbohydrate metabolism in the teleost *Notopterus notopterus* (Pallas). **J. Fish.Biol**, v. 3, n., p. 441-447, 1971.

NAVARRO, I.; J. GUTIÉRREZ. Fasting and Starvation. In: P. W. HOCHACHKA, MOMMSEN, P. (Ed.). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1995, v. 4, p. 393-434

NEWGARD, C. B., *et al.* Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or an indirect pathway? **J. Biol. Chem.**, v. 258, n. 13, July 10, 1983, p. 8046-8052, 1983.

NIJIMA, A. Reflex effects of oral, gastrointestinal and hepatoportal glutamate sensors on vagal nerve activity. **J Nutr.**, v. 130, n., p. 971S-976S, 2000.

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

NRC. **Nutrient requirements of fish**. National Washington Academy Press. Washington, D.C, p.114. 1993

OHLSSON, K.; H. TEGNER. Anionic and cationic dog trypsin. Isolation and partial characterization. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 317, n. 2, p. 328-337, 1973.

OLSSON, C., *et al.* Cholecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **J Exp Biol**, v. 202, n. 2, January 15, 1999, p. 161-170, 1999.

OSBORN, L., *et al.* Tissue-specific and insulin-dependent expression of a pancreatic amylase gene in transgenic mice. **Mol. Cell. Biol.**, v. 7, n. 1, January 1, 1987, p. 326-334, 1987.

OWYANG, C. Negative Feedback Control of Exocrine Pancreatic Secretion: Role of Cholecystokinin and Cholinergic Pathway. **J. Nutr.**, v. 124, n. 8_Suppl, August 1, 1994, p. 1321S-1326, 1994.

PARK, J. T.; M. J. JOHNSON. A submicro determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 181, n. 140-151, p., 1949.

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

PEREIRA, C., *et al.* 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.

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

PEREZ-CASANOVA, J. C., *et al.* Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquacult.**, v. 251, n. 2-4, p. 377-401, 2006a.

PEREZ-CASANOVA, J. C., *et al.* Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquaculture**, v. 251, n. 2-4, p. 377-401, 2006b.

PHILLIPS, A. M. J. Nutrition, digestion and energy utilization. In: W. S. HOAR ; D. J. RANDALL (Ed.), 1969, v. I, p. 391-432. (Fish Physiology)

PIEDRAS, S. R. N., *et al.* Efeito da suplementação de metionina e/ou lisina no crescimento e na sobrevivência de alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*). **Rev. Bras. Zootec.**, v. 33, n., p. 1366-1371, 2004.

PIZANGO-PAIMA, E. G. **Estudo da alimentação e composição corporal do matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (Characiformes, Characidae) na Amazônia Central.** (Dissertação). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas, 1997. 71 p.

PORTZ, L. **Utilização de diferentes fontes protéicas em dietas formuladas pelo conceito de proteína ideal para o “Black Bass” (*Micropterus salmoides*).** . (Tese). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2001. 111 p.

- PRIETO, M. J., *et al.* Tipo de alimento, sobrevivência e desempenho inicial de pós-larvas de pacú (*Piaractus mesopotamicus*). **Ciênc. agrotec.**, v. 30, n. 5, p. 1002-1007, 2006.
- REHFELD, J. F. The measurement of cholecystokinin. **J. clin. Path.**, v. 33, n. 8, p. 26-30, 1978.
- REHFELD, J. F.; W. W. VAN SOLINGE. The Tumor Biology of Gastrin and Cholecystokinin. In: (Ed.). **Advances in Cancer Research**, 1994, v. 63, p. 295-347. (Advances in Cancer Research)
- REIMER, G. The influence of diet on the digestive enzymes of the Amazon fish Matrincha, *Brycon cf. melanopterus*. **J Fish Biol**, v. 21, n. 6, p. 637-642, 1982.
- RESENDE, E. K. Apresentação. In: EMBRAPA (Ed.). **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestório dos peixes relacionados à piscicultura**. Corumbá: Embrapa, 2003, v., p. 3
- RØNNESTAD, I., *et al.* The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. **Aquacult.**, v. 227, n. 1-4, p. 147-164, 2003.
- ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestório dos peixes relacionados à piscicultura**. EMBRAPA-CPAP. Corumbá, MS, p.48. 2003
- RUEDA-JASSO, R., *et al.* Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. **Aquacult.**, v. 231, n. 1-4, p. 417-433, 2004.
- RYCHLY, J.; B. A. MARINA. The ammonia excretion of trout during 24-hour period. **Aquacult.**, v. 11, n. 1, p. 173-178, 1977.
- SABAPATHY, U.; L. H. TEO. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus*, and the sea bass, *Lates calcarifer*. **J. Fish Biol.**, v. 42, n. 4, p. 595-602, 1993.
- SAITO, A., *et al.* Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by both exogenous and endogenous insulin in isolated and perfused rat pancreata. **J. Clin. Invest.**, v. 65 n., p. 777-782, 1980.
- SALLUM, W. B., *et al.* Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo de ingredinetes de ração para matrinhã (*Brycon cephalus*, GÜNTHER 1869) (TELEOSTEI, CHARACIDAE). **Ciênc. agrotec.**, v. 26, n. 1, p. 174-181, 2002.
- SCORVO FILHO, J. D., *et al.* **Piscicultura em São Paulo: custos e retornos de diferentes sistemas de produção na safra de 1996/1997**. Informações econômicas- IEA. São Paulo, p.41-60. 1998. (28)
- SEIXAS FILHO, J. T., *et al.* Determinação do Sistema Endócrino Difuso nos Intestinos de Três Teleostei (Pisces) de Água Doce com Hábitos Alimentares Diferentes. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 30, n. 5, p. 1403-1408, 2001.

- SHERIDAN, M. A. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 90, n., p. 679-690, 1988.
- SHERIDAN, M. A.; T. P. MOMMSEN. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 81, n., p. 473-483, 1991.
- SINGER, M. Neurohormonal control of pancreatic enzyme secretion in animals. In: V. L. W. GO (Ed.). **The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease**. New York: Raven Press, 1993, v., p. 425-448
- SMITH, L. S. Digestion in teleost fishes. In: FAO/UNDP (Ed.). **Fish feeds technology**. Rome: FAO/UNDP, 1980, v., p. 3-18
- SMITH, R. R. Nutritional Bioenergetics in Fish. In: FAO/UNDP (Ed.). **Fish feed technology**. Rome: FAO/UNDP, 1980, v., p. 21-27
- SMITH, W. L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. **Biochem. J.**, v. 259, n., p. 315-324, 1989.
- SOUZA, V. L., *et al.* Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 32, n., p. 19-28, 2003.
- STEFFENS, W. **Principios Fundamentales de la alimentacion de los peces**. Zaragoza: Editora Acribia S.A, 1987, v. 275 p.
- STICKNEY, R. R.; R. B. MCGEACHIN. Effects of dietary lipid quality on growth and food conversion of tilápia. **Proc. Annu. Conf. Southeast. Aliment**, v. 37, n., p. 352-357, 1983.
- STIMPSON, J. H. Comparative aspects of the control glycogen utilization in vertebrates liver. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 15, n., p. 187-197, 1965.
- STONE, D. A. J., *et al.* Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 2, p. 109-121, 2003.
- SUÁREZ, M. D., *et al.* Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 111, n. 3, p. 421-428, 1995.
- SUÁREZ, R. K.; T. P. MONNSEN. Gluconeogenesis in teleosts fishes. **Can. J. Zool.**, v. 65, n., p. 1869-1882, 1987.
- SUNDE, J., *et al.* 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 Physiol. Biochem.**, v. 25, n. 4, p. 335-345, 2001.

SUZUKI, T., *et al.* Sequence and expression analyses of cholecystokinin (CCK) precursor cDNA in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 21, n. 1, p. 73-80, 1999.

TACON, A. G. J. **Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados – Manual de capacitacion, Doc 4, FAO.** Brasília-DF 1989, v. 136 p.

TENGJAROENKUL, B., *et al.* Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquacult.**, v. 182, n., p. 317-327, 1999.

THIBAULT, M., *et al.* Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 16, n. 2, p. 139-155, 1997.

THIMISTER, P. W., *et al.* Role of intraduodenal proteases in plasma cholecystokinin and pancreaticobiliary responses to protein and amino acids. **Gastroenterology**, v. 110, n. 2, p. 567-575, 1996.

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

VAL, A. L.; A. HONCZARYK. **Criando Peixes na Amazônia.** Manaus: INPA, 1995, v. 150 p.

VAN DEN THILLART, G.; M. VAN RAAIJ. Endogenous fuels, non invasive versus invasive approaches. In: P. W. HOCHACHKA ; P. MOMMSEN (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Metabolic Biochemistry.** Amsterdam: Elsevier Science, 1995, v. 4, p. 33-63

VAN DIJK, P. L. M., *et al.* Energy reserves during food deprivation and compensatory growth in juvenile roach: the importance of season and temperature. **J. Fish Biol.**, v. 66, n. 1, p. 167-181, 2005.

VIEIRA, V. L. P. **Estudo dos processos digestivos em *Brycon cephalus* (matrinxã) e *Brycon orbignyanus* (piracanjuba) alimentados com diferentes teores de proteína: Aspectos adaptativos e resposta metabólica.** (Tese). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2002. 82 p.

VIEIRA, V. P., *et al.* Metabolic responses of matrinxa (*Brycon cephalus*) to dietary protein level. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 140, n. 3, p. 337-342, 2005.

VIGNA, S. R. Evolution of the Cholecystokinin and Gastrin Peptides and Receptors1. **American Zoologist**, v. 40, n. 2, April 01, 2000, p. 287-295, 2000.

WAARDE, A., *et al.* Anaerobic energy metabolism of the European eel, *Anguilla anguilla* L. **Journal of Comparative Physiology**, v. 149B, n. 4, p. 469-475, 1983.

WALTON, M. J.; C. B. COWEY. Intermediary Metabolism. In: J. E. HALVER (Ed.). **Fish Nutrition.** San Diego: Academic Press, 1989, v. 2, p.

WATANABE, T. Lipid nutrition in fish. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 73, n. 1, p. 3-15, 1982.

WEATHERLEY, A. H.; H. S. GILL. **The biology of fish growth**. London: Academic Press, 1987, v. 443 p.

WEBER, J. M.; G. ZWINGELSTEIN. Circulatory substrates fluxes and their regulation. In: P. W. HOCHACHKA, MOMMSEN, P. (Ed.). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1995, v. 4, p. 15-32

WEIRICH, C. R.; R. REIGH. Dietary lipids and stress tolerance of larval fish. In: C. LIM, WEBSTER, C.D. (Ed.). **Nutrition and fish health**. Binghamton, NY: Food Products Press, 2001, v., p. 301-312

WIESER, W., *et al.* The energetics of starvation and growth after refeeding in juveniles of three cyprinid species. **Environmental Biology of Fishes**, v. 33, n. 1, p. 63-71, 1992.

WILSON, R. P. Amino acids and proteins. In: J. E. HALVER (Ed.). **Fish Nutrition**. San Diego: Academic Press, 1989, v., p. 111-153

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

WILSON, R. P.; W. E. POE. Apparent digestibility Protein and energy coefficients of common feed ingredients for Channel Catfish. **Prog. Fish-Cult.**, v. 47, n. 3, p. 155-158, 1985.

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

WOOD, C., *et al.* Pulsatile urea excretion in the ureagenic toadfish *Opsanus beta*: an analysis of rates and routes. **J Exp Biol**, v. 198, n. 8, August 1, 1995, p. 1729-1741, 1995.

YAMAMOTO, T., *et al.* Influence in dietary fat and carbohydrate levels on growth and body composition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under self-feeding conditions. **Fish. Sci.**, v. 67, n., p. 221-227, 2000.

ZANIBONI-FILHO, E., *et al.* Caracterização morfológica do matrinxã, *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869) (TELEOSTEI: CHARACIDAE). **Rev. Bras. Biol.**, v. 48, n. 1, p. 41-50, 1988.