

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

ASPECTOS ADAPTATIVOS DOS PROCESSOS DIGESTIVO E METABÓLICO
DE JUVENIS DE PINTADO (*Pseudoplatystoma corruscans*) ARRAÇOADOS
COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA E ENERGIA

LÍCIA MARIA LUNDSTEDT

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de Concentração em Genética e Evolução.

SÃO CARLOS

2003

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

L945aa

Lundstedt, Lícia Maria.

Aspectos adaptativos dos processos digestivo e metabólico de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia. / Lícia Maria Lundstedt . -- São Carlos : UFSCar, 2003.

140 p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Bioquímica. 2. Bioquímica adaptativa. 3. *Pseudoplatystoma corruscans*. 4. Enzimas digestivas. 5. Metabolismo. 6. Aqüicultura. 7. Nutrição de peixes. 8. Morfologia I. Título.

CDD: 574.192 (20^a)

PROF. DR. GILBERTO MORAES
ORIENTADOR

À minha família,
Pequena e tão grande ao mesmo tempo...
À Minha Mãe, Mariza, pelo exemplo de doação
À Minha Avó, Maria Thereza, pela sua sabedoria
À Minha Tia, Marli, pela vitalidade e carinho
Aos meus irmãos, Lourenço e Larissa,
tão especiais e admirados
Ao meu pai, Lourenço (*in memoriam*),
que continua presente em cada minuto
e a quem escolhi pra estar sempre ao meu lado,
Maurício,
DEDICO

Ao meu Orientador, Prof. Gilberto,
Por todas as oportunidades, mas
sobretudo, pelo exemplo de retidão,
caráter, generosidade e sabedoria.
Minha admiração, eterna gratidão
e todo meu respeito,
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Mais uma vez ao Prof. Gilberto que me possibilitou tanto crescimento durante estes anos!
- Aos Membros da Banca Examinadora, os Professores Doutores Wilson M. Furuya, Julio Hermann Leonhardt, Nelsy F. Verani e Tadeu F. Rantin, pelas críticas construtivas e valiosas sugestões que em muito colaboraram com o trabalho, assim como pelo incentivo;
- Ao Wilson, meu muito obrigada pela sua amizade sinceridade, força e encorajamento constantes que me ajudaram a dar mais este passo;
- Ao Rui A. B. Freire Filho, pela certeza de sua grande amizade;
- Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro do CAUNESP, à Pesquisadora Maria Angélica Rosa e ao técnico Sr. Dalton do CEPTA, por possibilitarem a peletização das rações experimentais;
- Ao Prof.Dr. Carlos A. Vicentine e aos seus estagiários, pelo auxílio nas análises morfológicas;
- Especialmente aos Amigos e Colegas de Laboratório: Cristina, Lúcia, Verinha, Paulinho, que me receberam e tanto me ajudaram no início deste trabalho. À Ive, Alexandre, Luís, Araceli, Thiago, Vânia, e aos estagiários, Rodrigo, Cássia e Graziela, por tantos momentos agradáveis compartilhados, e pelo auxílio, sem o qual este trabalho teria sido bem mais complicado;
- Ao Fernando (gaúcho) pelo trabalho em conjunto, amizade e incentivo;
- Ao Prof. Cristiano dos Santos Neto pelo incentivo e apoio; e é claro, como não poderia deixar de mencionar, pela mala emprestada, que quase se perdeu em algum canto do mundo;
- Às “meninas” da secretaria do PPG-Gev, Rose, Regiane e Tatiane, pela simpatia, paciência, tolerância e sempre disposição na resolução dos problemas nestes anos todos de convivência;
- À Leila e à Juliana da secretaria do DGE pelo auxílio constante e ao Rodrigo pela disposição em socorrer os problemas nos arquivos, computadores...
- A todos os membros do Departamento de Genética e Evolução, funcionários, professores e alunos, por estes anos de convívio bastante agradáveis;
- Ao Toninho pelo suporte técnico em todos os momentos do trabalho e pelas brincadeiras do dia a dia. Também ao Piau pela constante disposição em ajudar;
- A todos do Departamento de Ciências Fisiológicas, professores, funcionários e alunos pela colaboração neste trabalho e amizade;
- Especialmente a todos os meus familiares e amigos, que moram no meu coração, pelo apoio durante esta jornada, especialmente à D. Iraci e Sr. Antônio, minha segunda família;
- À tia Clara pela revisão ortográfica e gramatical da Tese, e pelo incentivo;
- Às empresas: Supremais pelo fornecimento do premix vitamínico-mineral, farinha de peixe e farinha de carne e à Ripasa e à VCP pela celulose, utilizados nas rações experimentais.
- À FAPESP pelo apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A espécie <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	3
2.2 Mecanismos e enzimas digestivas	4
2.3 Metabolismo intermediário	11
2.3.1 O papel dos tecidos no metabolismo intermediário	15
2.3.2 Principais metabólitos	17
2.4 Aspectos morfológicos	20
2.4.1 Morfologia do Sistema Digestório de Peixes	21
2.4.2 O intestino	23
2.5 Aspectos da nutrição de peixes	25
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Experimentos de variação de proteína bruta na dieta	34
4.1.1 Delineamento experimental para as análises bioquímicas	34
4.1.2 Delineamento experimental para as análises histológicas	35
4.1.2.1 Análise Histológica do Intestino dos Peixes	35
4.2 Experimento de variação de energia bruta na dieta	37
4.3 Determinações hematimétricas	39
4.3.1 Hematócrito	39
4.3.2 Hemoglobina Total	39
4.3.3 Contagem de eritrócitos (RBC)	39
4.4 Preparação dos tecidos	39
4.4.1 Homogeneizados Celulares	39
4.4.2 Extratos celulares ácidos	40
4.4.3 Extratos celulares neutros	40
4.5 Determinação dos intermediários metabólicos	40
4.5.1 Glicogênio	40
4.5.2 Açúcares redutores totais	41
4.5.3 Lactato	41
4.5.4 Piruvato	41
4.5.5 Aminoácidos livres	41
4.5.6 Proteína total	42
4.5.7 Amônia	42
4.5.8 Uréia	42
4.5.9 Triglicerídeos	42
4.5.10 Ácidos graxos livres	43
4.6 Determinações enzimáticas	43
4.6.1 Enzimas do metabolismo intermediário	43
4.6.1.1 Arginino uréia hidrolase (Arginase)	43
4.6.1.2 Glutamato desidrogenase (GDH)	44
4.6.2 Enzimas Digestivas	44
4.6.2.1 Protease Inespecífica	44

4.6.2.2	Tripsina	45
4.6.2.3	Quimiotripsina	45
4.6.2.4	Lipase	45
4.6.2.5	Amilase	46
4.7	Parâmetros Zootécnicos	46
4.7.1	Porcentagem de ganho de peso (GP)	46
4.7.2	Índice de gordura víscero-somático (IGVS)	46
4.8	Análise Estatística	46
5.	RESULTADOS	47
5.1	Parâmetros hematológicos	47
5.1.1	Varição de proteína na dieta	47
5.1.2	Varição de energia bruta na dieta	48
5.2	Metabolismo Intermediário	49
5.2.1	Varição de proteína bruta na dieta	49
5.2.2	Varição de energia bruta na dieta	54
5.3	Enzimas Digestivas	61
5.3.1	Varição de proteína bruta na dieta	61
5.3.2	Varição de energia bruta na dieta	65
5.4	Análise Morfológica	70
5.4.1	Análise microscópica do intestino	70
5.4.2	Parâmetros Morfométricos	71
5.4.2.1	Diâmetro do tubo	71
5.4.2.2	Altura do epitélio	71
5.4.2.3	Camada mucosa.....	72
5.4.2.4	Número de células caliciformes	72
5.4.2.5	Túnica muscular	72
5.4.2.6	Diâmetro da luz intestinal	72
5.5	Desempenho Produtivo	80
5.5.1	Varição de proteína bruta na dieta	80
5.5.2	Varição de energia bruta na dieta	81
6.	DISCUSSÃO	83
6.1.	Parâmetros Hematológicos	83
6.2.	Metabolismo Intermediário	84
6.2.1	Varição de proteína bruta na dieta	84
6.2.2	Varição de energia bruta na dieta	90
6.3	Enzimas Digestivas	94
6.3.1	Varição de Proteína bruta	94
6.3.2	Varição de energia bruta	104
6.4	Morfologia do trato digestório	106
6.4.1	Análise microscópica do intestino	107
6.4.2	Parâmetros Morfométricos	108
6.4.2.1	Diâmetro do tubo	108
6.4.2.2	Altura do epitélio	109
6.4.2.3	Mucosa intestinal	109
6.4.2.4	Número de células caliciformes	110
6.4.2.5	Túnica muscular	113
6.4.2.6	Diâmetro da luz intestinal	113
6.5	Desempenho Produtivo	114
6.5.1	Varição de proteína bruta na dieta	114
6.5.2	Varição de energia bruta na dieta	116
7.	CONCLUSÕES	120
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

LISTA DE FIGURAS

1. Perfil glicídico no plasma de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável	51
2. Perfil lipídico do plasma de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável	51
3. Perfil glicídico do fígado de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável	52
4. Perfil glicídico do rim de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável	52
5. Perfil de proteínas e de aminoácidos livres no músculo branco de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável	53
6. Perfil metabólico protéico do fígado de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável	53
7. Perfil lipídico do plasma de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável	56
8. Perfil glicídico do plasma de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável	56
9. Perfil metabólico protéico do plasma de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável	57
10. Perfil glicídico hepático de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável	57
11. Perfil metabólico protéico do fígado de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável	58
12. Perfil lipídico do fígado de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável	58
13. Perfil glicídico no rim de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável	59
14. Perfil lipídico do rim de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável	59
15. Perfil glicídico do músculo branco de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável	60
16. Perfil lipídico do músculo branco de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável	60
17. Atividade proteolítica inespecífica nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável ..	63
18. Atividade da tripsina nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável	63
19. Atividade da quimi tripsina nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável	64
20. Atividade da amilase nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável	64
21. Atividade da lipase nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável.....	65
22. Atividade proteolítica inespecífica nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas energia-variável	68
23. Atividade da tripsina nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas-energia variável	68

24. Atividade da quimi tripsina nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas energia-variável	69
25. Atividade da amilase nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas energia-variável	69
26. Atividade da lipase nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas energia-variável	70
27. Características histoquímica de intestino de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável. Destaque para células caliciformes (setas). a) Intestino anterior, 20%PB, PAS - 20x; b) Intestino anterior, 40%PB, PAS - 20x	73
28. Fotomicrografias do intestino de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>). a) fotomicrografia panorâmica evidenciando o diâmetro total do tubo (traço) (Intestino posterior, 50%PB), HE - 4x; b) fotomicrografia destacando o epitélio (EP) da mucosa intestinal (Intestino anterior, 30%PB), H/S - 20x; c) fotomicrografia evidenciando a camada muscular longitudinal externa (ML), a camada muscular circular interna (MC) e serosa (setas) (Intestino anterior, 30%PB), H/S - 20x; d) Fotomicrografia destacando a altura da camada mucosa (seta) e a túnica muscular (TM) composta pelas camadas musculares longitudinal e circular (Intestino anterior, 30%PB), H/S - 4x.	75
29. Diâmetro externo do canal intestinal (mm) em relação ao peso (g) do corpo de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável ..	76
30. Altura do epitélio do intestino de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável	76
31. Altura da camada mucosa nas diferentes porções do intestino de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável	77
32. Fotomicrografias do intestino de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos à dieta contendo 20% PB. Destaque para altura da camada mucosa (setas V) e espessura da túnica muscular (setas TM). a) Intestino anterior, PAS - 10x; b) Intestino posterior, PAS - 10x	78
33. Número de células caliciformes nas diferentes porções do intestino de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável	79
34. Espessura da camada muscular nas diferentes porções do intestino de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína variável	79
35. Diâmetro da luz nas diferentes porções do intestino de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável	80
36. Perfil metabólico e o provável destino dos metabólitos dos juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável	89
37. Perfil metabólico e o provável destino dos metabólitos dos juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia variável	93

LISTA DE TABELAS

1. Composição percentual e química das dietas utilizadas nos experimentos com variação de proteína bruta (com base na matéria seca)	36
2. Composição percentual e química das dietas experimentais com variação de energia bruta (com base na matéria seca)	38
3. Características físico-químicas da água dos tanques durante os experimentos com variação nutricional das dietas para juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>).....	47
4. Parâmetros hematológicos de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável por 28 dias	47
5. Parâmetros hematológicos de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável por 90 dias	48
6. Parâmetros hematológicos de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável por 60 dias	48
7. Padrão metabólico de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável	50
8. Padrão metabólico de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas energia-variável	55
9. Atividade enzimática nas diferentes secções do trato gastrintestinal de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável	62
10. Atividade enzimática nas diferentes secções do trato gastrintestinal de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas energia-variável	67
11. Resultado dos testes histoquímicos realizados nos cortes transversais das diferentes porções do intestino de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) submetidos a dietas proteína-variável por 90 dias	71
12. Parâmetros de desempenho produtivo de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável por 28 dias	81
13. Parâmetros de desempenho produtivo de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas proteína-variável por 90 dias	81
14. Parâmetros de desempenho produtivo de juvenis de pintado (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>), submetidos a dietas energia-variável por 60 dias	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
μl	Micro litro
μmoles	Micro mol
ηmoles	Nano moles
AAL	Aminoácidos livres
AGL	Ácidos graxos livres
ATP	Adenosina Trifosfato
EB	Energia bruta
g	Gramas
g	Aceleração da Gravidade
GDH	Glutamato desidrogenase
GP	Ganho de Peso
Hb	Hemoglobina
IGVS	Índice de gordura víscero-somático
kcal	Quilo caloria
kg	Quilograma
K_m	Constante Michaeliana
L	Litro
ml	Mililitros
OD	Oxigênio dissolvido
PB	Proteína bruta
pH	Potencial hidrogeniônico
RBC	Número de eritrócitos (Red blood cells)
rpm	Rotações por minuto
s.e.m.	Erro padrão da média (standard error of media)
TCA	Ácido tricloro acético
TG	Triglicerídeos
UI	Unidades Internacionais
V_{max}	Velocidade máxima

RESUMO

O crescimento é reflexo das interações metabólicas dependentes dos ajustes conseqüentes ao estado nutricional. O pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, é um Siluriforme carnívoro que, pela qualidade da sua carne e esportividade na pesca, apresenta amplo potencial para a aquicultura, mas sua tecnologia de produção ainda é incipiente. O presente trabalho teve como objetivo o estudo dos aspectos adaptativos dos processos digestivos, metabólicos e da morfologia do intestino de juvenis de pintado, submetidos a variações nos teores de proteína e energia da dieta. Para a investigação das enzimas digestivas e metabolismo intermediário, os animais foram submetidos a dietas isoenergéticas (4.000 kcal EB/kg) com diferentes teores de proteína bruta (20, 30, 40 e 50%); mesmos tratamentos utilizados para as análises histológicas no intestino. Na segunda etapa, os peixes foram submetidos a dietas isoprotéicas (31,5% PB) com variação no teor de energia bruta (3.500, 3.850, 4.200 e 4.550 kcal EB/kg). Os extratos enzimáticos do estômago, intestino anterior, médio e posterior foram utilizados na determinação das atividades de protease inespecífica, tripsina, quimiotripsina, amilase e lipase. O sangue foi utilizado nas determinações hematimétricas. O plasma e as amostras de fígado, músculo branco e rim foram usados na quantificação de glicose, lactato, piruvato, amônia, uréia (extratos ácidos), aminoácidos livres, triglicérides, ácidos graxos livres (extratos neutros), glicogênio, proteína total (extratos alcalinos), e da atividade das enzimas GDH e arginase. A melhor porcentagem de ganho de peso foi apresentada pelos animais arraçados com 40% PB, seguidos pelos grupos que receberam 30, 50 e 20% PB na dieta, respectivamente. Os peixes arraçados com o menor teor energético, 3.500 kcal EB/kg apresentaram ganho de peso muito superior aos demais. Em função da quantificação dos metabólitos e seu reflexo no desempenho produtivo, verificou-se que tanto a carência como o excesso de proteína na dieta é extremamente prejudicial ao metabolismo de pintado. A menor quantidade (20% PB) provavelmente não atendeu às exigências em aminoácidos essenciais, e a maior (50% PB) conduziu a rearranjos metabólicos de um quadro gliconeogênico, para manutenção da glicemia e suportar a demanda energética. O excesso de energia na dieta provavelmente levou à diminuição da ingestão alimentar conduzindo ao consumo de suas reservas gliconeogênicas e depreciando o crescimento. As maiores atividades proteolíticas foram observadas no estômago, onde também foram observadas atividades lipolítica e amilohidrolítica, destacando o papel desta estrutura no processo digestivo da espécie. As proteases praticamente não foram responsivas aos teores de proteína na dieta, e só apresentaram-se aumentadas em função do aporte energético das dietas isoprotéicas na tentativa de suprir suas necessidades em aminoácidos essenciais. Este quadro sugere que estas enzimas sejam de caráter constitutivo, possibilitando à espécie o melhor aproveitamento da proteína, independente da sua quantidade na dieta. A lipase também esboçou um caráter constitutivo, variando apenas em função do consumo alimentar, não respondendo à variação do conteúdo de lipídeos na dieta. A amilase, embora com atividades inferiores àquelas apresentadas pelos peixes onívoros ou herbívoros, apresentou-se como uma enzima indutiva, respondendo à variação do conteúdo de amido na dieta, e não ao de glicogênio, como proposto para peixes carnívoros. Considerando as baixas atividades enzimáticas e a pouca extensão do intestino, supõe-se que seu papel esteja direcionado para a absorção de nutrientes, hipótese reforçada pelas análises histológicas que evidenciaram respostas adaptativas morfológicas em função da quantidade de PB na dieta, aumentando o número de células produtoras de muco, altura das vilosidades intestinais e da espessura da túnica muscular no sentido de intensificar a motilidade das vilosidades intestinais, otimizando os processos absorptivos. Em função da grande variação nutricional ensaiada assume-se que a otimização da alimentação para o pintado ainda está na dependência da melhor razão entre proteína, energia e carboidratos na dieta.

ABSTRACT

The biological growth is reflected on metabolical adjustments, which are sustained by the nutritional status and is function of feeding. Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) is a carnivorous fish appreciated by the fillet, in sportive fishing and presents good aquaculture potential, in spite of the rearing technology is not well established. This work aimed to study adaptive aspects of digestion, metabolic processes and intestinal morphology of juvenile pintado fed on different protein and energy levels. In the first set of experiments, fish were submitted to isoenergetic diets (4,000 kcal GE/kg) with different protein levels (20, 30 40 and 50% CP), and digestive enzymes, metabolites and intestine morphology were analyzed. In the second step, fish were submitted to isoproteic diets (31,5% CP) and different amounts of crude energy (3,500; 3,850 and 4,200 kcal GE/kg), and digestive enzymes and metabolites were analyzed. Crude extract from stomach, anterior, medium and posterior intestine were used to assay unspecific protease, trypsin, chymotrypsin, lipase and amylase. Blood was used to hematimetric analysis. Plasma, liver, white muscle and kidney samples were used to glucose, lactate, pyruvate, ammonia, urea (acid extracts), free amino acids, triglycerides, free fatty acids (neutral extracts), glycogen and total protein (alkaline extracts) determination; and assays of glutamate dehydrogenase plus arginase. The best weight gain percent was achieved by the fish fed on 40% CP followed by 30, 50 and 20% respectively. Fish fed lower amounts of energy (3,500 kcal/kg) reached weight gain higher than the other treatments. Metabolic profile was reflected in the fish yield and it was possible to verify through it that the poor as well as the richer diets in crude protein impaired the metabolism of pintado. Likely, the amount of essential amino acids were not supplied by the lower CP (20%), and the largest (50%) led to metabolical rearrangements as the neoglycogenesis to hold the glucemia and support energetic demands. Surplus of dietary energy probably leads the fish to decreasing of food intake and drives them to consuming the bulk of energetical molecules with consequent growth loss. The higher proteolytic activities were observed in stomach, where lipolytic and amylolytic activities were also detected. This fact highlights the role of that structure in the digestive processes of pintado. Proteolytic activities were not responsive to CP levels but supplying essential amino acids requirements as function of energetic demands. This picture suggests this group of enzymes is constitutive and allow us to assume the species is well fitted to utilize protein in spite of its dietary amount. Lipase also seems to be a constitutive enzyme, changing its activity just as function of food intake instead of diet lipid level. Amylase is less active in pintado than the most omnivorous species. Its activity, however seems to be function of the dietary glycogen content. Considering the lower digestive enzyme activities in the small intestine and its short size, it is reasonable to assume that the main role of such structure is the nutrient uptake. The histological analyzes strength that assumption, as the morphological responses are evidently adaptive to the CP dietary levels. The number of mucus producer cells (goblet cells) increased in consonance with the fold sizes and thickness of the muscularis, furthering the motility of the folds and optimizing the absorptive processes. The great variation of protein, lipid and carbohydrate here assayed allow us to assume that the optimizations of "pintado" diets are very dependent of the best ratios of them.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura constitui atualmente uma atividade vital e em expansão do segmento agrícola mundial. O aumento da demanda por peixes como resultado do acelerado crescimento mundial, aumento da disponibilidade de renda e preferências por pescado sobre outras fontes protéicas de origem animal seja por razões pessoais, culturais ou de saúde aceleram o crescimento do setor (WEBSTER & LIM, 2002).

Estudos em nutrição com ênfase na utilização, digestão e performance de macronutrientes vêm ganhando importância, particularmente na otimização das condições de cultivo das espécies de peixes economicamente viáveis, na tentativa de reduzir o impacto ambiental (HALVER & HARDY, 2002) e aumentar a lucratividade da aquicultura. Estes estudos estão baseados na capacidade do animal em aproveitar o alimento e na sua resposta metabólica frente à variação nutricional da dieta (SUÁREZ et al.,1995), além de avaliar a influência de fatores que possam atuar no aproveitamento destes nutrientes. Entre tais fatores, a inter-relação entre as atividades enzimáticas dos processos digestórios e o perfil metabólico adaptativo tem demonstrado resultados satisfatórios (CORRÊA et al., 1998).

Como em outros vertebrados, a habilidade dos peixes em utilizar os nutrientes ingeridos depende da presença de enzimas apropriadas, presentes em locais adequados no trato gastrintestinal. Geralmente, a distribuição e a intensidade de atividade destas enzimas variam em função do hábito alimentar e morfologia digestória (HOFER & SCHIEMER, 1981; SABAPATHY & TEO, 1993; FAGBENRO et al., 2000; TENGJAROENKUL, 2000).

Neste sentido, estudos sobre nutrição de peixes têm sido desenvolvidos para avaliar a ação proteolítica, lipolítica e amilohidrolítica do processo digestivo, focalizando a conversão alimentar no crescimento e nas respostas metabólicas. Tais estudos destacam a importância do balanceamento da dieta na utilização de ingredientes não protéicos que possam produzir efeito poupador de proteínas, direcionando-as principalmente para o acréscimo de tecidos, ou crescimento.

Partindo do pressuposto que os organismos podem ser capazes de regular a atividade catalítica dos componentes enzimáticos por inúmeros processos metabólicos, respondendo inclusive às alterações ambientais, esta regulação poderia se realizar tanto pelo controle da síntese enzimática como pela sua atividade. Desta forma, os estudos empregando variações qualitativas no arraçamento tornam-se imprescindíveis na caracterização da adaptabilidade dos processos digestivo e metabólico das espécies frente aos diferentes aspectos nutricionais da dieta.

As espécies carnívoras, como o surubim pintado *Pseuplatystoma corruscans*, normalmente alcançam grandes valores de mercado, entretanto, a tecnologia de produção destas espécies apresenta ainda vários aspectos a serem desenvolvidos e aprimorados. Em função disto, os estudos sobre os aspectos da estrutura e fisiologia do aparelho digestório, tais como aspectos bioquímicos da digestão e suas relações com o metabolismo, visando adequar as dietas às suas exigências nutricionais, à sua biologia e ao seu metabolismo adaptativo, são especialmente importantes tanto sob os aspectos acadêmicos, quanto sob os aspectos aplicado e comercial desta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ESPÉCIE *Pseudoplatystoma corruscans*

A espécie *Pseudoplatystoma corruscans*, é conhecida popularmente como surubim, sorubim, piracajara, piracajara, pirá para, jarapoca (FOWLER, 1951; TRAVASSOS, 1960) e mais comumente como pintado que, segundo LAUDER & LIEM (1983), ocupa a seguinte posição sistemática:

Super Classe Pisces

Classe Osteichthyes

Subclasse Actinopterygii

Ordem Siluriformes

Subordem Siluroidei

Família Pimelodidae

Gênero *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862)

Espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829)

A ordem Siluriformes inclui os chamados peixes de couro (SANTOS, 1981), cuja principal característica externa é a ausência de escamas pelo corpo, que é revestido apenas de pele espessa ou coberto, parcial ou totalmente, por placas ósseas. A Família Pimelodidae compreende formas muito diversificadas, de porte variado, aberturas branquiais amplas e, freqüentemente, nadadeiras dorsal e peitorais precedidas por acúleo (BRITSKI et al., 1988). Esta família, a mais numerosa da subordem, é composta por um grande número de gêneros e espécies dulcícolas de hábitos noturnos e dieta variada (DIAS, 1987).

O gênero *Pseudoplatystoma* compreende os maiores peixes desta família e pode ser encontrado nas principais bacias hidrográficas da América do Sul: Amazônica, do Prata e do São Francisco (WELCOMME, 1985; PETRERE, 1995), estando entre os seus principais predadores. De hábito alimentar carnívoro, principalmente piscívoro, é um dos peixes mais apreciados por apresentar em sua carne poucas espinhas, podendo alcançar de 100 a 120kg (SATO et al., 1988). A importância comercial da espécie *P. corruscans* é devido, principalmente, à alta qualidade de sua carne (REID, 1983), ao alto valor de comercialização e à sua marcante participação na pesca comercial. Por isso, a espécie vem sofrendo esforço de pesca acentuado nas diferentes regiões em que ocorre (MARQUES, 1993). Ainda que não seja uma espécie com risco eminente de extinção, sua captura indiscriminada (CURY, 1992) adicionada à poluição

ambiental, ao desbaste de matas ciliares e à construção de barragens (BEHR & HAYASHI, 1997), os estoques naturais vêm diminuindo gradativamente. Portanto, o fato da espécie ocupar um habitat crescentemente alterado pelas ações antrópicas, corre grande risco de desaparecimento, como já verificado em trecho das bacias acima citadas (SATO et al., 1987; MARQUES, 1993).

Além do seu alto valor sócio-econômico, trabalhos realizados pela Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco (CODEVASF) demonstraram o potencial desta espécie para a piscicultura. Esses trabalhos, somados aos resultados obtidos em pesquisas desenvolvidas na Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, por RIBEIRO & MIRANDA (1997), sugerem que o surubim apresenta um crescimento total aparentemente isométrico. Considerando-se todos os seus índices zootécnicos e características de rendimento de carcaça, esta espécie é credenciada como de alto potencial para a produção comercial (MIRANDA, 1993). A porcentagem de filé, com média de 48,26%, apresentou-se inferior à média da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com 57,8%, e à da carpa capim (*Ctenopharingodon idella*) com 55%, mas superior à da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com 33%, e mesmo a do bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) com 37%, sendo esta última, a espécie cultivada mais próxima filogeneticamente dos surubins.

Atualmente, o surubim pode ser considerado juntamente com outras espécies nacionais como o pirarucu (*Arapaima gigas*), o dourado (*Salminus maxillosos*), os tucunarés (*Cichla spp*) e a pirarara (*Phractocephalus hemiliopterus*), espécies de hábito alimentar piscívoro, carnívoro, com potencial para a criação como peixes de mesa (*fast food*), para a pesca esportiva ou mesmo como peixe ornamental de interesse inclusive para exportação (TOLEDO, 1991; CURY, 1992; RABELLO, 1992; KUBITZA, 1995; BEELEN et al., 1998).

Conforme destacado por DEL CARRATORE (2001), no que se refere às espécies carnívoras de clima tropical, notadamente as nativas, informações acerca da nutrição e metabolismo são escassas, sendo que as rações para espécies como o pintado ainda são elaboradas baseadas nas informações adquiridas pela literatura em trabalhos com espécies exóticas, principalmente de clima temperado e muitas vezes marinhas. Desta forma, o estudo dos mecanismos metabólicos adaptativos e morfológicos de *P. corruscans*, seja para fins econômicos, como para fins de aquicultura de repovoamento de rios e reservatórios, é de extrema importância.

2.2 MECANISMOS E ENZIMAS DIGESTIVAS

A digestão é o processo pelo qual o alimento é transformado em compostos mais

simples, capazes de transpor a parede das células intestinais, alcançando a corrente sanguínea para serem transportados aos tecidos. As proteínas são hidrolisadas em aminoácidos livres ou cadeias peptídicas curtas; os carboidratos são hidrolisados em açúcares simples e as gorduras em ácidos graxos e glicerol. Estes processos são facilitados pela ocorrência das enzimas digestivas que atuam ao longo do trato gastrintestinal (JOBING, 1994).

Diferente dos demais vertebrados, os peixes podem consumir uma grande variedade de alimentos e são caracterizados sob vários aspectos. Baseado na forma de obtenção do alimento natural, que geralmente consiste em sobreposição de categorias, eles podem ser classificados como herbívoros, detritívoros, onívoros e carnívoros. Além disso, podem ser agrupados em filtradores, planctófagos, bentófagos e predadores, como, por exemplo, os piscívoros. Estas diferenças estão baseadas no seu comportamento alimentar, morfologia do trato gastrintestinal e fisiologia digestiva (KAPOOR et al., 1975; FÄNGE & GROVE, 1979; DAS et al., 1987; GERKING, 1994; CHAKRABARTI et al. 1995; HIDALGO et al., 1999). Os peixes podem ainda ser subdivididos, de acordo com sua diversidade na alimentação, em eurípagos, que consomem uma dieta mista, estenófagos, que consomem uma seleção limitada de tipos de alimentos, ou monófagos, que consomem apenas um tipo de alimento (KAPOOR et al., 1975).

Entretanto, muitas espécies manifestam consideráveis variações intra-específicas de habitat trófico, com distintos fenótipos associados com padrões particulares de presa ou utilização do habitat. Além disso, certos indivíduos ou grupos de indivíduos podem explorar somente uma pequena proporção da variedade de tipos de presas que são exploradas por outras espécies como um todo. Este polimorfismo trófico está usualmente associado com a variação adaptativa comportamental, morfo e fisiológica (BRYAN & LARKIN, 1972; MITTELBACH et al., 1992, 1999).

Muitas destas adaptações parecem ser reflexos de uma plasticidade fenotípica ao invés de serem de natureza genética, e desenvolvidas como consequência, ao invés de pré-requisito, para uma especialização à dieta. Elas podem envolver mudanças na morfologia das partes da boca e do trato gastrintestinal, bem como nas capacidades digestivas e absorptivas (KAPOOR et al., 1975; HOFER, 1979a,b; BUDDINGTON et al. 1987, 1997; MAGNAN & STEVENS, 1993; MITTELBACH et al., 1999).

A plasticidade fenotípica que possibilita um indivíduo, dentro de uma espécie, modificar seu comportamento alimentar e regular suas funções digestivas em relação à mudança na viabilidade de presas ou composição da dieta tem, obviamente, implicações ecológicas. Aquelas espécies capazes de fazer tais modificações estão aptas a explorar uma extensa variação de recursos alimentares (CARTER et al., 2001). Entretanto, são necessárias

informações mais claras sobre as variações na dieta, hábito alimentar e nicho ecológico para que melhor se compreendam as estratégias digestivas apresentadas pelas diferentes espécies (CHAKRABARTI et al. 1995).

Segundo COLLIE & FERRARIS (1995), as adaptações à dieta podem ser categorizadas em genéticas, como as que são fixas ou e fenotípicas, que são reversíveis. Entretanto, os mecanismos que operam em cada categoria podem ser específicos ou não. Nas adaptações genéticas, os mecanismos não específicos atuantes são aqueles que, se alterados, afetarão a absorção de todos os nutrientes, como por exemplo, a tendência dos herbívoros terem intestinos longos e dos carnívoros possuírem mucosas mais desenvolvidas e, geralmente, apresentarem cecos pilóricos. Os mecanismos genéticos adaptativos específicos podem ser exemplificados pela modulação da expressão dos transportadores de glicose e aminoácidos específica e independentemente. Dentre as adaptações fenotípicas e reversíveis estão as adaptações à dieta, primariamente envolvidas em mecanismos específicos, como, por exemplo, mudanças adaptativas ao conteúdo de açúcar na dieta pela alteração na V_{max} de absorção que podem ser sinalizadas por mediadores hormonais.

Os peixes, na tentativa de se adequarem às mudanças da dieta, também apresentam alguma capacidade de adaptação dos seus processos digestivos, tais como perfil e secreção enzimáticos, absorção e transporte de nutrientes (KAPOOR et al., 1975; HOFER, 1979a,b; BUDDINGTON et al. 1987, 1997), mas estas habilidades parecem variar entre espécies. Os carnívoros, por exemplo, parecem ter uma capacidade limitada em alterar sua função digestiva e de transporte de nutrientes de acordo com a composição da dieta, enquanto os onívoros, exibem uma habilidade muito maior em modular sua fisiologia digestiva e absorptiva (BUDDINGTON et al., 1987,1997).

GLASS et al. (1989) afirmam que o conhecimento da quantidade e especificidade de cada enzima presente num sistema digestório, assim como as condições em que ocorre a hidrólise, é uma ferramenta importante para predizer o processo digestivo em peixes, bem como a digestibilidade de novos alimentos, pois foi verificado que o padrão das enzimas digestórias reflete não só o hábito alimentar (herbivoria, omnivoria ou carnivoria), como a capacidade digestória dos peixes (SMITH, 1980). A partir disso, a determinação da atividade enzimática passa a ser de grande importância na aquicultura (HOFER & KÖCK, 1989), ajudando a elucidar problemas nutricionais relacionados à fisiologia dos nutrientes.

Foi salientado por HEPHER (1989) que a atividade digestório-enzimática está sob influência da idade do peixe (KUZ'MINA, 1996), do tipo de alimento (HOFER & SCHIEMER, 1981; HOFER, 1982; JÓNÁS et al., 1983), do seu estado fisiológico e da estação do ano.

BARRINGTON (1957) e KAPOOR et al. (1975) observaram mudanças significativas na atividade das enzimas digestórias em diferentes períodos do ciclo anual, sendo a temperatura o fator limitante, fato atestado por KUZ'MINA (1991).

Nos vertebrados superiores, a ocorrência de enzimas restringe-se a regiões específicas do trato digestório. Desta forma, pode-se assumir que em alguma fase da evolução do sistema digestório de peixes e ciclóstomos, não houve zonação específica do trato gastrintestinal e muitas das regiões desse sistema tornaram-se capazes de produzir todos os principais tipos de enzimas digestórias. Considerando-se o processo evolutivo e o aparecimento das formas terrestres, os sítios específicos de produção enzimática tornaram-se mais restritos nos organismos mais modernos. Entretanto, têm-se descrito diferenças nos padrões de zonação enzimática em diferentes grupos de peixes (CHAKRABERT et al., 1995). Apesar disto, acredita-se que tanto os processos como as enzimas digestivas, em seu mecanismo de ação e sítio de secreção, sejam muito semelhantes entre os peixes, mamíferos e demais vertebrados superiores (KAPOOR et al., 1975; MUNILLA-MORÁN & SABORIDO-REY, 1996), mesmo aqueles de sangue quente (CHESLEY, 1934; HIDALGO et al. 1999).

Segundo HIDALGO et al. (1999) a dificuldade em se estudar as secreções digestivas em peixes envolve a coleta destas secreções ao invés da metodologia usada nas análises, similares às técnicas utilizadas para outros vertebrados. Além disto, outros fatores podem causar variabilidade nos dados como: 1) a não uniformidade dos tecidos utilizados para determinação das atividades enzimáticas, pois somente em alguns casos a homogeneização inclui as glândulas anexas e/ou todo trato digestório, enquanto em outros casos, a extração é realizada por raspagens da camada mucosa do trato, 2) o estado nutricional dos animais utilizados nos experimentos não é muitas vezes considerado, pois são sacrificados após jejum prolongado ou em diferentes períodos de pós-prandial; e 3) em alguns casos, o trato digestório é lavado antes da homogeneização, enquanto em outros, usa-se o trato e seu conteúdo para extração.

Estes fatores, bem como a ampla variedade de técnicas usadas para determinar diferenças na atividade enzimática (diferentes substratos, temperatura de incubação, pH, etc.), dificultam a obtenção de valores absolutos para atividades enzimáticas em diferentes espécies sob condições fisiológicas específicas, e comparação destes dados aos obtidos por outros laboratórios (HIDALGO et al., 1999).

FÄNGE & GROVE (1979) apontam que as enzimas digestivas produzidas pelas células intestinais ficam localizadas principalmente no epitélio da borda em escova. Entretanto, estas enzimas podem ser parcialmente pancreáticas, as quais têm a tendência de ficarem adsorvidas no glicocálix do epitélio celular. Além disso, os autores salientam que a atividade enzimática

do fluido luminal do intestinal é baixa, mas que células, ou fragmentos delas, são constantemente liberados do epitélio, e juntamente com enzimas providas do estômago ou ainda enzimas do alimento ingerido, podem contribuir para a atividade enzimática no lúmen.

Entretanto, BERMAN & SALENITSE (1966) citados por KAPOOR et al. (1975) compararam a atividade das enzimas digestivas adsorvidas na borda livre das células do epitélio intestinal com as enzimas presentes no lúmen de carpa. Estes autores observaram que a taxa de “digestão de contato” foi nove vezes maior que a taxa de digestão no lúmen intestinal. Dados como estes podem explicar parcialmente a diferença nos resultados obtidos a partir de diferentes métodos.

A digestão das proteínas envolve ação de muitas e diferentes enzimas, cada qual com sua ação específica nas diferentes partes da cadeia polipeptídica (GAUTHIER et al., 1982). HSU & WU (1979) apontam que a pepsina, a tripsina e a quimiotripsina são as três enzimas proteolíticas mais importantes do trato gastrintestinal de peixes e que o produto de reação destas enzimas, os oligopeptídeos, podem ser digeridos a aminoácidos aproveitáveis pelas várias endo- e exo-peptidases.

A pepsina é uma endopeptidase que cliva as ligações peptídicas das proteínas pelo lado aminoterminal dos resíduos de aminoácidos cíclicos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), rompendo as longas cadeias polipeptídicas em peptídeos menores. É capaz de hidrolizar várias proteínas, mas não mucinas, espongininas, conchiolinas, queratinas ou peptídeos de baixo peso molecular (SUMNER & SOMERS, 1947 in FÄNGE & GROVE, 1979).

O poder digestivo do suco gástrico depende tanto da quantidade de pepsina presente, como do pH do meio. Entretanto, o alimento ingerido normalmente apresenta um considerável poder tampão, o que significa que o pH do quimo será maior que o do suco gástrico. Para acidificação do conteúdo, a quantidade de ácido secretada é mais importante que a concentração ácida da secreção. Assim, quanto mais alimento for ingerido, maior deverá ser a taxa secretória (KAPOOR et al., 1975). Entretanto, os autores mencionam a ocorrência de um segundo pico de atividade péptica para algumas espécies de peixes, com pH de até 4, sugerindo que o pH do quimo não é extremamente crítico, e que a digestão proteolítica prossegue em considerável intensidade em uma variação de pH de 1 a 5.

Em mamíferos, aves, répteis e anfíbios as enzimas digestivas pancreáticas são conduzidas ao lúmen intestinal por um ou dois ductos colédocos (SLACK, 1995). Por outro lado, em peixes esta situação não é tão clara. Em Chondrichthyes, o pâncreas forma um órgão compacto como em vertebrados superiores. Em Osteichthyes apenas um pequeno número de espécies (incluindo enguias, “catfish”, “lungfish” e coelacanthos) pode apresentar um pâncreas

compacto. Os demais, em número mais expressivo, apresentam um tecido pancreático difuso e, geralmente localizado ao longo da veia Porta. Além disso, não está evidente se apenas um ducto colédoco ou um sistema de múltiplos ductos, ou ainda se ambos os sistemas estão presentes nos Teleostei (EINARSSON & DAVIES, 1997).

A tripsina apresenta especificidade para hidrolisar peptídeos unidos em que a função carbamil é subscrita por lisina e arginina. Por outro lado, a quimiotripsina não é específica somente para hidrolisar peptídeos nos quais a função carbamil é subscrita por resíduos de aminoácidos aromáticos, como tirosina, triptofano, e fenilalanina, mas também para hidrolisar amidas e ésteres destes aminoácidos aromáticos (RICK, 1965). Em outras palavras, a quimiotripsina apresenta um espectro para atividade proteolítica muito maior quando comparada à tripsina.

Muitos estudos comparam as enzimas digestivas em diferentes espécies de peixes (FISH, 1960, HSU & WU, 1979; HOFER & SCHIEMER, 1981; HOFER et al., 1982; JÓNÁS et al., 1983; HIDALGO et al., 1999) e, embora existam algumas exceções, a maioria dos autores considera que a atividade proteolítica é menos dependente do hábito nutricional (carnívoro, onívoro) do que a atividade da amilase.

BORLONGAN (1990) relatou que estudos histoquímicos recentes mostram que a mucosa intestinal de diversas espécies de teleósteos é capaz de secretar lipase, além daquela secretada pelo pâncreas difuso, o que compensa a falta de um pâncreas compacto e bem desenvolvido. GISBERT et al. (1999) mencionam a ocorrência de lipase no estômago de algumas espécies de peixes, mas destaca que o sítio primário de hidrólise lipídica para a maioria das espécies parece ser a porção anterior do intestino e os cecos pilóricos quando presentes.

Atividade de lipase tem sido detectada no trato digestório de várias espécies de peixes marinhos (CHELSEY, 1934; BROCKERHOFF, 1966; BORLONGAN, 1990). Atualmente, os padrões de distribuição de atividade lipolítica ao longo dos diversos segmentos do trato gastrintestinal de peixes, juvenis e adultos, vêm sendo estudados e parecem divergir entre espécies (KOVEN et al., 1994a,b; CHAKRABARTI et al., 1995). Vários tipos de lipase têm sido reconhecidos no trato digestório de peixes juvenis e adultos (IZQUIERDO et al., 2000). Mesmo que o pâncreas de teleósteos seja geralmente difuso, assume-se que as lípases digestivas de peixes sejam similares, em atividade, às principais lípases de mamíferos. Este fato foi demonstrado em bacalhau do Atlântico (BROCKERHOFF, 1966), em truta arco-íris (LÉGER & BAUCHART, 1972; TOCHER & SARGENT, 1984), em arraias (BROCKERHOFF & HOYLE, 1965) e em tubarão leopardo (PATTON, 1975; PATTON et al., 1977).

A digestão e absorção de lipídios acontecem principalmente no intestino anterior, onde os cecos pilóricos estão situados, quando presentes (FÄNGE & GROVE, 1979; BUDDINGTON & DOROSHOV, 1986; BORLONGAN, 1990). Outros autores relatam que a digestão de lipídios continua nas demais porções do intestino (SMITH & LOVELL, 1973; SMITH, 1989), principalmente naquelas espécies estritamente carnívoras, que apresentam o trato digestório extremamente curto (FERRARIS & AHEARN, 1984).

A habilidade em digerir polissacarídeos, mesmo pouco desenvolvida, está presente em carnívoros (HALVER & HARDY, 2002). Entretanto, peixes tropicais de água doce geralmente podem aproveitar mais carboidratos na dieta quando comparados com os salmonídeos e peixes marinhos.

A digestão de carboidratos é realizada por uma série de enzimas, mas sem dúvida, a mais importante delas é a amilase, que ataca as ligações glicosídicas α 1-4, produzindo a partir do amido uma variedade de oligossacarídeos (LOVELL, 1988). O aumento da produção de amilase pode ocorrer em resposta à presença de carboidratos ou de produtos da sua hidrólise no lúmen do trato gastrintestinal. A glicose, por exemplo, pode influenciar diretamente a produção desta enzima pelo tecido pancreático, ou indiretamente, estimulando a liberação de insulina do pâncreas que atuará de diversas maneiras como, por exemplo, estimulando para a produção de amilase (JOBLING, 1994).

Considerando o grande volume de informações disponíveis na literatura sobre enzimas digestivas de peixes de regiões temperadas, comparativamente muito pouco se sabe para peixes de clima tropical, inclusive os de interesse para a aqüicultura. Neste sentido, MELO et al. (2002) estudaram as proteases do trato gastrintestinal de jundiá (*Rhamdia quelen*), uma espécie onívora entre as onze do mesmo gênero deste siluriforme que apresenta distribuição neotropical, do México à Argentina. Os autores verificaram que a espécie responde aos diferentes níveis de proteína da dieta adaptando seu perfil de enzimas digestivas.

HSU & WU (1979) atestam que as enzimas digestivas são indutivas e, portanto, as maiores atividades de carboidrases devem ser encontradas no trato digestório de herbívoros e as maiores atividades proteolíticas nos de carnívoros. Além disso, verificaram que o hábito alimentar e a adaptação à composição da dieta podem estar refletidos no comprimento do trato gastrintestinal das espécies.

Segundo SEGNER et al. (1989), larvas de *Coregonus lavaretus* L. arraçadas com diferentes dietas são capazes de modificar sua atividade enzimática, embora estas alterações não tenham apresentado qualquer correlação óbvia com o crescimento. No entanto, os autores salientam que é necessário estabelecer até que ponto estas mudanças são adaptativas, para que se possa

melhorar a digestão e a assimilação da dieta, através do conhecimento detalhado da fisiologia, metabolismo energético e intermediário, requerimentos nutricionais e plasticidade adaptativa.

2.3 METABOLISMO INTERMEDIÁRIO

Todos os constituintes metabólicos do corpo são constantemente produzidos e utilizados, isto é, mantidos em estado dinâmico, sob constante “turnover”. Além disso, a concentração de cada metabólito está sob um refinado controle e a modificação de um único substrato pode modular o fluxo de cada combustível, independentemente (WEBER & ZWINGELSTEIN, 1995). Portanto, a habilidade de um tecido em utilizar um determinado nutriente depende tanto da permeabilidade da célula, como do metabolismo intracelular deste nutriente, que visa garantir um adequado gradiente de membrana (MOON & FOSTER, 1995).

As taxas metabólicas dos animais ectotérmicos, como os peixes, são de 5 a 10 vezes menores, quando comparadas a dos animais endotérmicos de tamanho similar, mesmo estando à mesma temperatura. Isto significa que as exigências para a manutenção dos peixes são menores quando comparados aqueles dos vertebrados endotérmicos, apresentando ainda um potencial considerável para a eficiência em conversão alimentar e crescimento somático (CARTER et al., 2001).

Segundo LOVELL (1989), os peixes têm um requerimento energético menor que os animais terrestres por não precisarem manter a temperatura do corpo constante, despendendo menos energia para manter sua posição e se movimentar na água e, além disso, por perderem menos energia no catabolismo protéico. Assim sendo, o requerimento em proteínas, como uma porcentagem da dieta, é, geralmente, maior para os peixes.

FAGBENRO et al. (2000) destacam que o conhecimento do perfil hematológico indica se a dieta está adequada à espécie, assim como sua resposta fisiológica às condições ambientais. Segundo AGUIAR (2002), os parâmetros hematológicos constituem um reflexo de todos os processos corporais e servem como indicadores das condições gerais ou distúrbios metabólicos. Entre eles incluem-se medidas de hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos e contagem ou volume de leucócitos. Os valores de hematócrito revelam a porcentagem de células vermelhas (eritrócitos) contidas no sangue, em relação ao total de elementos. Os eritrócitos contêm hemoglobina, proteína que permite carregar muito mais oxigênio (50 – 100 vezes mais) do que poderia ser transportado na sua ausência.

Além dos parâmetros sangüíneos, determinações de alguns intermediários metabólicos e enzimas podem ser realizadas tanto no sangue como nos diferentes tecidos do corpo. Estas

análises têm o propósito de avaliar o estado fisiológico do animal como um todo, assim como sua resposta adaptativa em função das variações metabólicas impostas, quer seja por estresse ambiental e/ou de confinamento, ou por estresse nutricional imposto pelo arraçamento ou disponibilidade de alimento.

Os nutrientes consumidos pelos organismos superiores são digeridos e absorvidos pelo trato digestório e vão para a corrente sangüínea como moléculas menores. Estas moléculas circulam pelo corpo e, sendo captadas pelos diferentes tecidos, estarão sujeitas às inúmeras reações químicas do metabolismo. O ponto final destas reações é ou a total degradação para liberação da energia contida nas moléculas ou a produção de constituintes dos tecidos, evidenciada pelo crescimento do organismo. A quebra destas moléculas é denominada catabolismo enquanto sua síntese é chamada anabolismo. A natureza e a regulação destas vias estão diretamente relacionadas com a exigência nutricional da espécie e a disponibilidade dos nutrientes na dieta.

Animais carnívoros, como o pintado, requerem altas quantidades de proteína na dieta para que delas possam obter os aminoácidos necessários à síntese protéica e glicose para a demanda energética. O aumento dos níveis de aminoácidos plasmáticos após a ingestão de dietas com grande teor protéico constitui a maior fonte de energia para peixes carnívoros. Desta forma, a utilização de aminoácidos, derivados tanto da dieta quanto da quebra de tecidos protéicos, se dá em dois estágios seqüenciais: primeiro na desaminação e/ou transaminação do aminoácido e conversão em um intermediário que possa entrar no ciclo dos ácidos tricarbóxicos e, segundo, na utilização metabólica ou oxidação deste intermediário (ALEXIS & PAPAPARASKEVA-PAPOUTSOGLU, 1986; SÁNCHEZ-MUROS *et al.*, 1998).

Segundo HEPER (1989) os peixes utilizam facilmente proteína como fonte de energia através do catabolismo de aminoácidos, processo que também está relacionado à síntese protéica. O principal fator de controle do catabolismo dos aminoácidos em peixes é a mudança das atividades enzimáticas pela alteração da concentração de substratos e compostos reguladores, pois a fonte destes aminoácidos é a dieta que, usualmente, é intermitente, diferente do catabolismo de proteínas que é um processo contínuo (LOVELL, 1988).

Em mamíferos, os valores de K_m das enzimas que iniciam a síntese protéica (acil sintetases) nos tecidos são menores, indicando alta afinidade pelo substrato, os aminoácidos, quando comparados aos valores de K_m das enzimas que degradam proteína e aminoácidos. Isto significa que a síntese protéica pode ocorrer mesmo havendo baixíssimas concentrações de aminoácidos, mas que a concentração de aminoácidos deve ser relativamente alta para que possa ocorrer catálise (LOVELL, 1988).

Neste sentido, a eficiência da conversão da proteína dietética em proteína tissular em peixes é paradoxal, visto que estes utilizam extensivamente nos aminoácidos como fonte de energia, “queimando” os precursores de proteínas. Segundo BALLANTYNE (2001) e HALVER & HARDY (2002) muitas hipóteses já foram formuladas na tentativa de se obter uma explicação, mas certamente, a excreção direta de amônia como produto final do metabolismo de nitrogênio é energeticamente favorável, pois não ocorre gasto energético para conversão a um produto menos tóxico. Além disso, a oxidação direta de aminoácidos evita o gasto energético da síntese de moléculas de estoque como glicose ou lipídios para subsequente utilização. A amônia é excretada para a água principalmente pelas brânquias, na forma de NH_4^+ . É extraída diretamente da circulação ou produzida a partir de aminoácidos por desaminação ou desamidação (WALTON & COWEY, 1982; CHRISTIANSEN & KLUNGSØYR, 1987). Contém menos resíduos energéticos que a uréia ou ácido úrico e requer menos energia para a excreção (BRAFIELD & SOLOMON, 1972). Este é um sistema poupador de energia que aumenta a quantidade de energia metabólica que o peixe deriva do metabolismo protéico. Como resultado, os peixes são mais eficientes na utilização de proteínas que os animais homeotérmicos terrestres, que devem eliminar os resíduos nitrogenados anteriormente mencionados (HALVER & HARDY, 2002).

A perda em amônia representa de 70 a 90% da perda total de nitrogênio pelos peixes (MOMMSEN & WALSH, 1992), com 5 a 15% sendo excretado como uréia, dependendo da espécie (DOSDAT et al., 1996). Além disso, cerca de 80 a 90% da excreção de nitrogênio em peixes ocorre diretamente pelas brânquias e o restante pela pele e urina. Devido à sua toxicidade, a amônia deve ser excretada rapidamente, tão logo passe pelas brânquias, prevenindo acúmulo nos tecidos (HALVER & HARDY, 2002).

O valor energético da proteína para peixes, em relação à energia fisiológica utilizável, é de aproximadamente 4,6 kcal/g (SMITH, 1971) e é maior do que para os mamíferos ureotélicos e para as aves uricotélicas, para os quais é de aproximadamente 4,1 kcal/g (BELL et al., 1980). Isto pode ter contribuído para a maior requisição de proteína na dieta de peixes quando comparada com as de aves e mamíferos. Além disso, existem evidências de que parte da proteína consumida pelos peixes é obrigatoriamente canalizada para a produção de energia (HEPER, 1989). Entretanto, dados relacionando respostas adaptativas do metabolismo a mudanças na concentração de proteínas da dieta são raros e geralmente indicam haver pouca capacidade adaptativa em peixes, provavelmente relacionada ao hábito carnívoro (RUMSEY, 1981; WALTON, 1986). Além disso, um número bastante limitado destes estudos considera os animais individualmente.

Por outro lado, espera-se que quanto maiores as quantidades de alimento ingeridas pelo peixe, maiores serão as atividades e as concentrações das enzimas envolvidas no metabolismo celular (HOULIHAN et al., 1993). CARTER et al. (2001) apontam que a ingestão de alimentos de um grupo é direcionada pelas taxas de crescimento e metabolismo que são correlacionadas.

Segundo KAPOOR et al. (1975) os peixes são hábeis em regular a ingestão de alimentos, mas esta é influenciada por vários fatores tanto externos, como temperatura, estação do ano, atividade locomotora, tamanho do corpo, ou o próprio suprimento de alimentos, como internos, exemplificados pela capacidade do trato gastrintestinal, velocidade de digestão, saciedade e taxas metabólicas. Além disso, a quantidade mínima de alimento ingerida pelo peixe deve ser pelo menos aquela suficiente para suprir a “rotina metabólica” ou metabolismo basal.

Quando as condições ambientais são mantidas constantes, eventuais mudanças na alimentação terão reflexos no ciclo fisiológico. Neste sentido, quando o período de alimentação diária é curto, a capacidade do trato gastrintestinal, principalmente do estômago, limita a quantidade de alimento ingerido. Por outro lado, quando os peixes têm acesso livre ao alimento, a capacidade da porção anterior do trato gastrintestinal passa a não ser mais limitante, desde que o peixe consuma uma determinada quantidade de calorias. Entretanto, se o valor calórico ou nutricional é baixo, o peixe toma um grande volume de alimento e a taxa de alimentação passa a ser governada pela fome ou saciedade, que depende do déficit metabólico. Por sua vez, a saciedade não deve ser definida em relação ao conteúdo estomacal e avidez por alimento, pois pode aumentar quando o estômago está vazio, já que a resposta à alimentação pode ser deprimida por outros meios diferentes da ingestão de alimentos. Neste sentido, o grau de saciedade e a avidez por alimentos podem variar independentemente. Quando a resposta à alimentação não é inibida, a ânsia por consumo de alimento passa a ser dependente da concentração sangüínea de glicose e aminoácidos (KAPOOR et al., 1975).

Segundo DE SILVA & ANDERSON (1995), a quantidade de proteína consumida pelos peixes, através da dieta, afeta diretamente seu estado metabólico. Sendo assim, altos níveis de proteína resultam em aumentos nas concentrações de aminoácidos livres circulantes, excreção de amônia, síntese protéica, atividade das enzimas gliconeogênicas e declínio da atividade das enzimas glicolíticas. Entretanto, o autor relata que pouco efeito tem sido observado na atividade das enzimas que catabolizam aminoácidos.

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 (MOON, 1988).

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 em aminoácidos, principalmente pelos peixes carnívoros (MOMMSEM, 1986; SUAREZ & MOMMSEN, 1987; MOON, 1988).

Os aminoácidos não são estocados em grandes quantidades no corpo, como podem ser os lipídios ou os carboidratos. Quando em excesso, são desaminados e os resíduos de carbono são oxidados ou convertidos em lipídios, carboidratos ou ainda outros compostos. O grupamento amino é removido dos aminoácidos principalmente por transaminação ou por desaminação oxidativa. A transaminação parece ser a principal rota inicial para desaminação em peixes, envolvendo a transferência da amônia do grupo amino para um α -ceto ácido, usualmente α -cetoglutarato. Por sua vez, o ceto ácido recipiente é liberado através da desaminação para excreção ou síntese de outro aminoácido e é reciclado por outra transaminação. O ceto ácido formado na transaminação inicial pode ser oxidado, convertido a lipídio ou ainda usado na síntese de outros compostos (LOVELL, 1988). A enzima envolvida neste processo é a glutamato desidrogenase (GDH).

A GDH é muito similar em peixes e mamíferos e apresenta as maiores atividades nas brânquias, rim, músculo vermelho e fígado (CHRISTIANSEN & KLUNGSØYR, 1987). É uma enzima mitocondrial e, sendo assim, a amônia é produzida intramitocondrialmente (BALLANTYNE, 2001)

A argino uréia hidrolase ou arginase é outra enzima de extrema importância no metabolismo de aminoácidos, principalmente para aqueles peixes ureogênicos. Em primeiro lugar, é responsável pela principal via de metabolização da arginina, um aminoácido abundante em dietas carnívoras e, em segundo lugar, esta enzima é peça chave na síntese de creatinina, óxido nítrico e glutamato (JENKINSON et al., 1996).

2.3.1 O papel dos tecidos no metabolismo intermediário

As taxas de síntese protéica são bastante altas no fígado, que é extremamente sensível a qualquer variação na dieta (CARTER & HOULIHAN, 2001). Ele é responsável pela manutenção do “pool” de aminoácidos corpóreo (LOVELL, 1988), desempenhando um papel fundamental no metabolismo e na regulação do transporte destes aminoácidos para os tecidos (CARTER et al., 2001). Somado a isso, o fígado representa o principal sítio de produção de amônia do organismo (ALEXIS & PAPAPARASKEVA-PAPOUTSOGLU, 1986).

Além do metabolismo protéico, o tecido hepático desempenha papel fundamental no metabolismo de carboidratos. Para MOON & FOSTER (1995) o principal papel do fígado no metabolismo glicídico é a conversão de substratos constituídos de 3 carbonos, provenientes da dieta, em compostos energéticos a serem nele estocados, ou a formação de glicose a ser exportada para os demais tecidos. Sendo assim, ao invés de funcionar como um órgão intermediador na manutenção do ciclo de carbono, o fígado também poderia funcionar suprindo os estoques de reserva energética ou glicogênio. Estes autores concordam com CHRISTIANSEN & KLUNGSØYR (1987), que acreditam que o papel do fígado no catabolismo de glicose esteja mais relacionado ao fornecimento de intermediários para os processos biossintéticos do que para o fornecimento de piruvato para combustão.

Outro composto de 3 carbonos é o lactato, um dos substratos mais utilizados pelo metabolismo hepático (SUÁREZ & MOMMSEN, 1987; MOON, 1988), sugerindo a importância do ciclo de Cori para os peixes na reciclagem do lactato muscular (Lactato muscular → glicose hepática → glicogênio muscular) (SUÁREZ & MOMMSEN, 1987).

O rim é um tecido armazenador de glicogênio, mas em quantidades menores daquelas encontradas no fígado (MOON & FOSTER, 1995). Além disso, é o segundo tecido mais importante, após o fígado, em termos da gliconeogênese a partir de aminoácidos (JÜRS & BASTROP, 1995). Estudos comparativos mostram que a atividade da arginase renal é excedida apenas pela hepática (CVANCARA, 1969). Desta forma, CHIU et al. (1986), comparando a atividade de arginase nos diferentes tecidos em truta arco-íris, verificaram que a atividade do tecido renal representa apenas um terço da hepática.

O músculo branco desempenha papel de destaque no metabolismo corpóreo de proteínas, salvo algumas diferenças, apresenta a maior quantidade relativa de aminoácidos essenciais do organismo, representando o maior volume de massa corpórea (CARTER & HOULIHAN, 2001).

No músculo branco as atividades do ciclo de Krebs podem ser mantidas sem a entrada de carbono provindo de outras fontes. Uma rota similar pode ocorrer a partir de aminoácidos sendo trans-deaminados via GDH. Esta é uma estratégia mais eficiente, em que os aminoácidos podem ser catabolizados, resultando em piruvato ou outro produto intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Isto ocorre sem a necessidade de combustão dos estoques de carboidratos ou lipídios, para o fornecimento de intermediários de 2 ou 4 carbonos, mantendo o fluxo do ciclo, evitando o gasto energético para a síntese e estocagem destes combustíveis. Se tal processo “autocatalítico” ocorrer nos demais tecidos, a economia energética pode ser significativa.

A quantidade de massa muscular branca do corpo representa um estoque substancial de glicogênio, aproximadamente vinte vezes maior do que o do fígado (MOYES & WEST, 1995). Entretanto, em proporções relativas, o fígado estoca mais glicogênio que o músculo branco.

Entretanto, em muitas espécies de peixes o glicogênio muscular não é mobilizado, exceto em condições extremas, sendo mantido às custas da glicose sangüínea, que por sua vez, é provida pelos processos hepáticos de gliconeogênese e glicogenólise (NAVARRO & GUTIÉRREZ, 1995).

2.3.2 Principais metabólitos

Os aminoácidos desempenham numerosas funções em peixes e a mais familiar delas é a construção de blocos de proteína (BALLANTYNE, 2001). No entanto, são também necessários para a síntese de outros compostos associados com o metabolismo incluindo hormônios, neurotransmissores, purinas e enzimas metabólicas. Além disso, podem ser catabolizados para suprir a demanda energética metabólica. Os aminoácidos para estes propósitos são provenientes da dieta e o seu “turnover” em tecidos protéicos ocorre constantemente (HALVER & 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, crescimento (CARTER et al., 2001).

Segundo JÜRSS & BASTROP (1995) na análise do metabolismo de aminoácidos alguns fatos devem ser levados em consideração, entre eles: a) a concentração total de aminoácidos livres é dividida pela membrana celular em intracelular e extracelular; b) a intracelular é órgão, e provavelmente, célula-específica. Portanto, as concentrações intracelulares dos diferentes órgãos estão unidas pelo montante extracelular, da circulação sangüínea (que também possui uma porção intracelular nos eritrócitos, e extracelular no plasma), que pode interagir com a mudança da condição nutricional do organismo; c) são necessários mecanismos de transporte para movimentar os aminoácidos do meio extracelular para o intracelular. O fluxo de aminoácidos do “milieu extérieur”, ao invés de uma única membrana celular, tem que cruzar tanto a membrana apical, como a basolateral do epitélio intestinal; d) a composição em aminoácidos intracelular é fortemente influenciada pelas enzimas presentes na célula e pelos transportadores de membrana. Estes mesmos fatores governam ainda a distribuição de aminoácidos entre o compartimento celular citossólico e o mitocondrial.

O fluxo de aminoácidos e as mudanças temporais em sua concentração nos diferentes tecidos dão idéia da dinâmica da relação entre a ingestão de proteínas, metabolismo tecidual e

utilização destes aminoácidos para a síntese protéica. Portanto, a habilidade em regular o grande influxo de aminoácidos, presumivelmente para manutenção da homeostase tecidual, bem como para otimizar a utilização da energia e proteína da dieta, é o ponto central para o sucesso desta relação (CARTER et al., 2001).

A concentração do “pool” de aminoácidos livres é influenciada pela importação e exportação de aminoácidos em sua forma livres, como peptídeos ou proteínas, bem como pela sua utilização dentro de um tecido específico (JÜRS & BASTROP, 1995). Entretanto, existe inter-relação entre o “turnover” de proteínas, o fluxo de aminoácidos livres e a excreção de produtos nitrogenados (CARTER et al., 2001).

Vários autores relatam que a concentração total de aminoácidos livres no fígado aumenta poucas horas após a alimentação (WALTON & WILSON, 1986; CARTER et al., 1995). Entretanto, o “pool” de aminoácidos no músculo branco é relativamente pouco afetado pela alimentação (OGATA, 1986, ESPE et al., 1993; CARTER et al., 1995).

Consideráveis esforços têm sido feitos para relacionar o perfil de aminoácidos nos tecidos, particularmente no sangue, à composição de aminoácidos da dieta (NOSE, 1982; WALTON & WILSON, 1986). Entretanto, experimentos evidenciam pouca correlação significativa entre o “pool” de aminoácidos ingeridos e o “pool” de aminoácidos no fígado e no músculo branco (WALTON & WILSON, 1986; LYNDON et al., 1993; CARTER et al., 1995), fato que não surpreende, em função do grande número de fatores envolvidos na regulação da concentração e composição dos tecidos (FULLER & GARLICK, 1994; ARZEL et al., 1995). Atualmente, tem-se destacado a importância do trato gastrointestinal no metabolismo de aminoácidos derivados da reciclagem (ao invés do alimento) em mamíferos (REEDS et al., 1999), fato que deve desempenhar o mesmo grau de importância para peixes (CARTER et al., 2001).

A concentração de aminoácidos livres é relativamente baixa, pois a maior parte deles está compondo os tecidos protéicos do corpo (HALVER & HARDY, 2002). Os teores mais altos são encontrados no fígado e no rim, podendo sua concentração variar entre 20-60 $\mu\text{moles/g}$ de tecido (exceto taurina) embora níveis abaixo de 10 $\mu\text{moles/g}$ de tecido sejam observados (MOMMSEN et al., 1980). Sendo assim, a importância relativa dos aminoácidos para gliconeogênese pode variar dependendo também da concentração tecidual de outros metabólitos como o lactato (BALLANTYNE, 2001). Além disso, a incorporação de resíduos carbônico de aminoácidos em glicose é rápida, mas, na verdade, nem todos podem ser convertidos à glicose pelos peixes. Segundo BEVER et al. (1981), uma significativa proporção

dos resíduos carbônicos da gliconeogênese é utilizada para a produção de mucopolissacarídeos, constituintes do muco, principalmente por aquelas espécies que consomem quantidades mínimas de carboidrato na dieta.

Sabe-se muito pouco sobre a concentração dos outros intermediários metabólicos nos diferentes tecidos e os múltiplos fatores que regulam a capacidade do metabolismo de carboidratos em peixes, dificultam extrapolar dados obtidos de uma espécie para outra, em função da diversidade sistemática da classe. Entretanto, o metabolismo de carboidratos é uma rota central do fluxo energético em peixes (DABROWSKI & GUDERLEY, 2002). Os carboidratos são geralmente estocados na forma de glicogênio, um polímero de unidades glicosyl unidos por ligações lineares $\alpha(1-4)$ e ramificadas $\alpha(1-6)$. Geralmente são encontrados no citosol, na forma de pequenos grânulos denominados partículas β , mas também podem ser estocados em partículas maiores, as α , ou ainda em corpos especializados de glicogênio, observados somente naqueles tecidos que estocam grandes quantidades deste metabólito (VAN DEN THILLART & VAN RAAIJ, 1995).

A glicogenólise é uma fonte de glicose, mas não parece ser a maior fonte de glicose para o fígado ou músculo quando os níveis de precursores na dieta são adequados. Representa uma estratégia emergencial antes que a glicose esteja disponível a partir da dieta ou pela gliconeogênese de aminoácidos provindos da digestão protéica (WALTON & COWEY, 1989).

Dados relatam que a variação hepática diurna do conteúdo de glicogênio, molécula que apresenta a mesma estrutura química em peixes e mamíferos (KJØLBERG et al., 1963), não demonstra uma relação definida com a ingestão de alimento. Além disso, a maior concentração de glicogênio no fígado pode sofrer um efeito retardado do arraçoamento em função da estação do ano e da idade do peixe (DELAHUNTY et al. 1978; LAIDLEY & LEATHERLAND, 1988). Além disso, o conteúdo de glicogênio hepático é extremamente variável entre indivíduos e espécies de peixes, com valores entre 2 a 1800 μ moles de glycosil/g de tecido. Os teores de glicogênio muscular são proporcionalmente inferiores aos do fígado, mas em relação à massa corpórea, os musculares são mais representativos. Entretanto, VAN DEN THILLART & VAN RAAIJ (1995) destacam que os estoques de glicogênio do músculo branco são, normalmente, direcionados para queima repentina devido ao exercício natatório e não rotineiramente, como para manutenção glicêmica.

O tempo de aparecimento da glicose (e outros açúcares simples) no plasma, em relação à alimentação, vai depender de fatores. Entre eles, o conteúdo total de carboidratos e dos outros ingredientes da dieta, sua forma de processamento, hábito alimentar, histórico

nutricional do indivíduo e temperatura da água (BERGOT & BREQUE, 1983; HUNG, 1991). Neste sentido, espécies onívoras e herbívoras são mais hábeis em utilizar dietas contendo altos teores de carboidratos que as carnívoras. Entretanto, WILSON (1994) destaca que somente os carnívoros apresentam respostas adaptativas aos teores de carboidratos presentes na dieta.

Os lipídios são estocados em muitos órgãos de depósito, diferente de mamíferos que os estocam quase exclusivamente no tecido adiposo. Segundo VAN DEN TILLART & VAN RAAIJ (1995), os sítios de estocagem de lipídios mais importantes em peixes são o mesentério adiposo, o fígado e músculo. Além disso, os lipídios corpóreos refletem os lipídios da dieta, em termos de quantidade e composição de ácidos graxos, embora possam ser sintetizados de carboidratos e aminoácidos (CARTER et al., 2001).

2.4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

O primeiro passo no aproveitamento de nutrientes pelos animais envolve, após a ingestão, o processamento e a absorção pelo sistema digestório. Os estudos em nutrição são de grande valia na compreensão deste processo, pois a forma pela qual ocorre nas diversas espécies, varia em alguns aspectos e até mesmo individualmente, mesmo podendo ser, de certa forma, generalizado para os vertebrados. O canal alimentar dos peixes teleósteos tem sido amplamente estudado e morfológicamente descrito na tentativa de se determinar a função de muitas estruturas anatomicamente especializadas em relação a diferentes adaptações ao hábito alimentar (CATALDI et al., 1987).

Neste sentido, a morfologia vem sendo uma ferramenta útil na compreensão das funções fisiológicas dos organismos vivos, e o seu conhecimento se intensifica com as descobertas de detalhes das diferentes estruturas. A histologia é um dos aspectos da morfologia que comporta os estudos de fisiologia, bioquímica e patologia (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995). Através dela, conhecimentos consideráveis das condições e alterações nos vários tecidos têm sido acumulados, possibilitando maiores esclarecimentos sobre as estruturas e suas funções.

Embora os estudos histológicos em peixes tenham fornecido uma gama de informações sobre o trato gastrintestinal, muitos deles têm seu foco de atenção no status celular antes do início da alimentação exógena (CALZADA et al., 1998). Por esta razão, a literatura carece de informações em relação a possíveis adaptações morfológicas em resposta a variação dos nutrientes da dieta, das quais se possa inclusive inferir sobre a alimentação de espécies de interesse à aqüicultura.

SEIXAS FILHO et al. (2001a) relatam que as relações entre o regime alimentar e as características do aparelho digestório vêm sendo intensamente estudadas em outros grupos zoológicos, onde as técnicas já atingiram um estágio de controle absoluto na formulação e manipulação de rações balanceadas, indispensáveis à obtenção de resultados produtivos satisfatórios. Contudo, a nutrição de peixes, principalmente de teleósteos tropicais, encontra-se longe do estabelecimento de padrões de exigência que possam ser utilizados pelos nutricionistas de uma forma padronizada. Portanto, um conhecimento cada vez mais aprofundado sobre fisiologia dos peixes aumenta as possibilidades de melhorar a preservação e ainda aumentar os estoques aquáticos, bem como otimizar os métodos utilizados em aquicultura (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

2.4.1 Morfologia do Aparelho Digestório de Peixes

As características anatômicas do aparelho digestório encontram-se em estreita dependência com a natureza dos alimentos, as características do habitat, o estado nutricional e o desenvolvimento do indivíduo, sendo manifestadas especialmente no trato gastrintestinal, através de adaptações e modificações (SEIXAS FILHO et al., 2001a). BUDDINGTON et al. (1997) relata que as adaptações à dieta ocorrem em três etapas. Primeiro, durante a evolução genética da espécie, determinando a estrutura e função do trato gastrintestinal em função da seleção para combinar a composição e aparente variabilidade da dieta natural. Segundo, durante a história de vida individual, exemplificada pela ocorrência de mudanças na dieta e características do trato gastrintestinal. Terceiro, envolvendo rápidas e reversíveis mudanças que permitem o organismo se adequar às flutuações da dieta (quantidade e composição) e condições ambientais. O conhecimento da interligação destes fatores pode fornecer subsídios para uma melhor compreensão do desempenho de uma espécie contida em ecossistemas naturais ou mesmo em piscigranjas.

Dentre os vertebrados, os peixes possuem o mais simples ou menos diferenciado sistema digestório, em concordância com sua posição na escala evolutiva (DE SILVA E ANDERSON, 1995; KUZ'MINA, 1991), mas apresentam a morfologia do tubo digestório bastante variável, que ilustra a diversidade de regimes alimentares e modos de vida (SEIXAS FILHO et al., 2001a) na cobertura de vários nichos tróficos. KUZ'MINA (1991) destaca que, se a organização morfológica dos diferentes grupos taxonômicos de peixes difere significativamente, podendo ser relativamente especializada (presença ou não de estômago, diferentes métodos e graus de expansão da superfície absorptiva, etc), sua estrutura histológica difere menos.

A estrutura histológica da parede do tubo digestório dos peixes é geralmente semelhante à dos vertebrados superiores, constituída por 4 camadas básicas: a mucosa, a submucosa, a túnica muscular e a serosa. A mucosa é constituída de células epiteliais colunares, apoiadas em tecido conjuntivo frouxo, formando grandes pregas onduladas. A submucosa é uma camada de tecido conjuntivo que dá sustentação à mucosa. A túnica muscular é composta por duas camadas de músculo (longitudinal externa e transversal ou circular interna) que auxiliam a movimentação do conteúdo do lúmen (digesta, bile ou outras secreções). A serosa é formada internamente por tecido conjuntivo frouxo e externamente por uma camada de células epiteliais pavimentosas (mesotélio), revestindo externamente o trato gastrintestinal. Estas camadas podem não ser encontradas em todos os órgãos e dentro de uma delas podem ocorrer estruturas adicionais, ou ainda apresentarem subdivisões, variando consideravelmente nos diferentes segmentos do canal alimentar (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

O epitélio mucoso ao longo do canal gastrintestinal é regionalmente diferenciado e assume múltiplas funções, tais como proteção das camadas internas, secreção de suco digestivo, absorção, metabolismo de nutrientes, entre outras. Assim, as células epiteliais podem estar diferenciadas em células absorptivas, como as do intestino, em células secretoras gástricas e intestinais, ou em células mucosas encontradas ao longo de todo comprimento do canal (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

Assim como a digestão, a absorção de partículas alimentares e moléculas geralmente ocorrem nas células epiteliais colunares ao longo da borda estriada, onde numerosas enzimas relacionadas tanto com os processos digestivos como aos absorptivos estão localizadas (TENGGAROEKUL et al., 2000).

As células calciformes contêm um aparelho de Golgi muito desenvolvido com função relacionada à síntese dos polissacarídeos, e um retículo endoplasmático granular que produz as proteínas que compõem a secreção (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995). Estas células são facilmente visualizadas em cortes histológicos submetidos à reação histoquímica de PAS, que cora de magenta determinados carboidratos, como por exemplo, os mucopolissacarídeos ácidos.

A secreção mucosa das células calciformes auxilia na lubrificação durante a passagem do alimento e pode fornecer co-fatores enzimáticos necessários aos processos catalíticos (ANDERSON, 1986) ou conter enzimas digestivas propriamente ditas (KAPOOR et al., 1975). As mucinas podem ainda reduzir a habilidade de adesão de bactérias aos enterócitos, protegendo-os também contra possíveis danos físicos e químicos (BUDDINGTON et al., 1997).

2.4.2 O intestino

O conhecimento da histologia do intestino de peixes de interesse comercial é de grande importância para a compreensão de alterações, sejam patológicas, relacionadas a doenças infecciosas, sejam proporcionadas pelas dietas artificiais (GARGIULO et al., 1998), pois a mucosa desempenha papel fundamental nos processos digestivos, absorptivos e metabólicos dos diferentes animais (KUPERMAN & KUZ'MINA, 1994). Além de representar uma barreira seletiva que permite a absorção de nutrientes, também consegue excluir muitas substâncias tóxicas e organismos patogênicos, atua na regulação do balanço eletrolítico e apresenta função imune e endócrina (BUDDINGTON et al., 1997).

KAPOOR et al. (1975) relatam que a estrutura anatômica do intestino dos peixes depende do hábito alimentar da espécie e, particularmente, o comprimento relativo do intestino depende da natureza do alimento. Segundo BUDDINGTON et al. (1997) a superfície absorptiva do intestino, incluindo vilos e microvilos, está relacionada ao metabolismo corpóreo, e medidas adicionais se fazem necessárias para definir um modelo que possa prever a área de superfície absorptiva, combinando metabolismo e qualidade da dieta para peixes, classe que apresenta as menores áreas de superfície intestinal quando comparados com répteis e anfíbios, mas principalmente com mamíferos e aves que apresentam as maiores.

Em muitas espécies de peixes, o limite entre as porções adjacentes do intestino é obscuro e em muitos casos recebem denominações coletivas. Entretanto, seus segmentos podem ser diferenciados pela presença de constrições no lúmen e, mais frequentemente, por alterações no padrão das vilosidades (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995). LUNDSTEDT (1999) estudando a influência de fontes protéicas de origem vegetal à base de concentrado protéico de soja, ou de origem animal, a base de farinha de peixe para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidas sexualmente ou não, verificou alterações morfológicas na porção mediana do intestino, relacionadas à tentativa de melhor aproveitamento das frações nutritivas da dieta. TAKASHIMA & HIBIYA (1995) relatam que as porções anterior e posterior do intestino de “goldfish” apresentam vilosidades profundas e rasas respectivamente, contrariamente às vilosidades do intestino de truta arco-íris.

Esfíncteres e válvulas são normalmente formados ao longo do canal por engrossamento da camada muscular circular lisa. Além disso, o reto é claramente distinguível das porções precedentes pela presença da valva íleo-retal, camada muscular mais espessa e abundância de células mucosas, além de atividade absorptiva reduzida (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

Para KAPOOR et al. (1975) e KHANNA & MEHROTA (1971), as pregas da mucosa mais complexamente estruturadas podem ser encontradas em espécies carnívoras. Já para ANGELESCU & GNERI (1949), a estrutura da mucosa intestinal está mais relacionada com os processos fisiológicos de digestão e absorção, e as regiões com pregas mais complexas estariam mais envolvidas nos processos absorptivos, dado o aumento da área efetiva para a absorção dos nutrientes.

O epitélio da mucosa intestinal é composto, em toda a sua extensão, por uma única camada de células epiteliais, com muito pouca diferenciação citológica entre os enterócitos da porção antero-mediana para a posterior no estado de repouso não absorptivo. A diferença mais marcante entre eles é funcional, e torna-se evidente no momento da digestão e da absorção. Os enterócitos do intestino anterior de peixes adultos têm habilidade em absorver lipídios e proteínas do canal do lúmen, enquanto os do intestino posterior conservam a habilidade característica da fase larval em absorver macromoléculas protéicas (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

Na literatura, poucos são os trabalhos documentados que visam os estudos histoquímicos de glicosaminoglicanas. VICENTINI (1984) estudando as características histoquímicas do epidídimo do bovino zebu faz referência aos trabalhos histoquímicos realizados por LILLE (1965), BARKA & ANDERSON (1965) e PEARSE (1972), e destaca a importância da detecção de macromoléculas e interpretações de mecanismos metabólicos, tanto celulares como teciduais.

Para JUNQUEIRA & CARNEIRO (1995) os polissacarídeos mais pesquisados por reações histoquímicas são o glicogênio, o amido e os polissacarídeos que se associam às proteínas. As proteoglicanas são constituídas por glicosaminoglicanas que se ligam a uma molécula protéica. Por outro lado, as glicoproteínas são resultantes da associação de polissacarídeos não lineares e freqüentemente ramificados, que não contém obrigatoriamente glicosamina.

Segundo LEHNINGER et al. (1995), os polissacarídeos diferem entre si na identidade de suas unidades monossacarídicas, nos tipos de ligações que as unem no comprimento de suas cadeias e no grau de ramificação das mesmas. Os homopolissacarídeos apresentam um único tipo de unidade monomérica, enquanto que os heteropolissacarídeos apresentam dois ou mais tipos, fornecendo suporte extracelular na formação de uma matriz que mantém as células individuais, fixas e reunidas. O mesmo autor ainda coloca que as proteoglicanas, como uma reunião de heteropolissacarídeos e proteínas, são responsáveis pelas propriedades lubrificantes e viscosidade de algumas secreções. As glicosaminoglicanas e proteoglicanas são componentes da matriz extracelular e constituem a substância fundamental amorfa, que mantém as células

unidas, fornecendo uma via porosa para difusão dos nutrientes e oxigênio para as células. A matriz extracelular é composta por heteropolissacarídeos formado de glicosaminoglicanas, que por sua vez, são polímeros lineares compostos por unidades repetidas de dissacarídeos. As glicosaminoglicanas com uma ou mais hidroxilas de açúcar aminado, estão esterificadas com sulfato. A combinação dos grupos carboxilados dos resíduos de ácido urônico e grupos sulfato leva a uma alta densidade de cargas elétricas negativas.

Segundo JUNQUEIRA & CARNEIRO (1995), os polissacarídeos são compostos que encontram-se livres ou ligados às proteínas e lipídios. O único polissacarídeo não ligado às proteínas presentes no organismo dos mamíferos é o glicogênio, que pode ser evidenciado pela reação de PAS. Esta técnica baseia-se na capacidade do ácido periódico oxidar as ligações carbono-carbono das seqüências 1-2 glicol, dos hidratos de carbono, produzindo aldeídos. Os aldeídos são, na etapa seguinte, revelados pelo reativo de Schiff, que reage com os grupamentos aldeídicos, produzindo um composto corado e insolúvel de cor vermelha. Como existem nos tecidos outras moléculas que podem ser evidenciadas pelo PAS, é necessária uma lâmina controle tratada com a enzima amilase, para remoção prévia do glicogênio.

As mucossubstâncias neutras são aparentemente formadas predominantemente por complexos de glicoproteínas, ao passo que as substâncias ácidas, AB positivas, possuem resíduos de ácido salicílico em sua estrutura (DERMER, 1973; DE BOLD et al. 1978), não excluindo a presença de complexos de sialoglicoproteínas.

Desta forma, pode-se salientar que os estudos dos aspectos bioquímicos da digestão e suas relações com o metabolismo e morfologia, visando adequar as dietas às suas exigências nutricionais das espécies, à sua biologia e ao seu metabolismo adaptativo, são especialmente importantes tanto sob o aspecto teórico quanto sob o aspecto aplicado.

2.5 ASPECTOS DA NUTRIÇÃO DE PEIXES

Nutrição [Do Lat. *Nutritio*] S. f. 1. Ato ou efeito de nutrir(-se); nutrimento. 2. Sustento; alimento. 3. Biol. Ger. Conjunto de processos que vão desde a ingestão até sua assimilação pelas células (BUARQUE DE HOLANDA, 1986). Sendo assim, nutrição é o estudo dos alimentos em relação às necessidades dos organismos vivos (BENDER, 1982).

Segundo CARTER et al. (2001), nutrição de peixes é um ramo da fisiologia que se destina amplamente ao estabelecimento da relação entre ração e crescimento, à comparação entre possíveis ingredientes alimentares e à determinação dos requerimentos nutricionais. Além disso, tem-se dado bastante ênfase, além da composição do alimento, à avaliação

adequada do significado das respostas obtidas, pois a nutrição fornece matérias primas para a manutenção da vida (metabolismo).

Os alimentos podem ser classificados como energéticos e construtores (carboidratos, lipídios e proteínas) e não-energéticos (minerais, vitaminas, água e oxigênio), os quais desempenham função suporte para os alimentos energéticos. Mesmo os alimentos não energéticos sendo requeridos em quantidades mínimas (vitaminas e minerais-traço), eles são essenciais à vida (PHILLIPS, 1969). Os minerais desempenham papel fundamental na ativação de muitas reações metabólicas, tanto anabólicas como também catabólicas (HALVER & HARDY, 2002).

Segundo PHILLIPS (1969), o valor nutricional de uma dieta é avaliado, em primeira instância, pela presença dos elementos necessários e catalíticos (minerais e vitaminas), um abundante suprimento em alimentos auxiliares (água e oxigênio) e um balanço adequado entre alimentos energéticos e construtores (carboidratos, lipídios e proteínas). Além disso, o valor nutricional de uma dieta é determinado pela sua digestibilidade e absorção pelo animal, pois não é considerada proveitosa até ser absorvida e estar disponível para o metabolismo.

KAPOOR et al. (1975) salientam que a distribuição da energia da dieta entre metabolismo e crescimento depende de um grande número de fatores intrínsecos e extrínsecos como temperatura, disponibilidade de oxigênio, frequência na alimentação, atividade locomotora, metabolismo basal, dinâmica de ação específica e níveis hormonais. Além disso, a interdependência destes fatores tende a obscurecer o papel de cada um deles no controle da direção do fluxo energético.

Uma dieta completa atende às necessidades em nutrientes e energia para manutenção, crescimento e reprodução de um animal. Entretanto, JOBLING et al. (2001) ressaltam a importância de se considerar que uma ração normalmente é formulada para animais mantidos em cativeiro. Conseqüentemente, aspectos importantes da formulação de dietas dizem respeito à bioviabilidade dos nutrientes essenciais, energia e à aceitabilidade, que depende não somente da sua composição química, mas também da sensibilidade do animal em relação aos componentes da fórmula.

HEPER (1989) destaca que a quantidade de proteína de uma dieta é determinada, em grande proporção, pela composição da proteína em relação aos aminoácidos essenciais e da presença de outros nutrientes essenciais como vitaminas e minerais. Além disso, a composição em aminoácidos da proteína, sua configuração estrutural e digestibilidade, assim como a digestibilidade dos demais ingredientes presentes em uma dieta e a eventual presença de

inibidores de crescimento ou antinutricionais, vão determinar a eficiência de utilização da proteína para o crescimento e seu valor comparativo para o peixe.

A proteína consumida pelo peixe é utilizada por duas rotas metabólicas, (1) catabolismo, produzindo energia para manutenção e (2) anabolismo, principalmente pela síntese de proteínas do corpo, função na qual a sua composição em aminoácidos desempenha um papel crucial (HEPER, 1989). Segundo CARTER et al. (2001), a quantidade de proteína sintetizada vai depender não somente da quantidade de proteína absorvida, mas também do seu balanço em aminoácidos e energia digestível. Ressaltam ainda que somente uma proporção relativamente pequena das proteínas ingeridas em uma refeição é retida como constituintes que refletem no crescimento.

A utilização da proteína da dieta depende essencialmente da espécie de peixe, do tamanho do organismo, de fatores ambientais, da qualidade da proteína e composição em aminoácidos, do nível de sua inclusão na dieta e da energia dietética utilizável, bem como seu tipo, fonte e quantidade oferecidos no arraçamento (WILSON, 1989). Sendo assim, altas taxas de sobrevivência e crescimento sustentável usualmente indicam que a dieta satisfaz aos requerimentos nutricionais mínimos da espécie alimentada. Entretanto, crescimento e sobrevivência sozinhos não são bons indicadores da condição fisiológica do peixe (DHERT et al. 1992).

O balanço entre proteína e energia é, obviamente, o ponto central para o crescimento (CARTER et al., 2001). Entretanto, a utilização de proteína como energia pode ser vantajoso para o peixe, do ponto de vista nutricional, por produzir mais energia livre quando comparada ao catabolismo de carboidratos, com mesmo equivalente em peso. Entretanto, a fração protéica, principalmente aquela de maior valor biológico como o alimento natural, é mais cara do que os carboidratos em geral, e a proteína seria mais eficiente, sob o ponto de vista econômico, se destinada para o crescimento, para o qual é essencial, enquanto as fontes não protéicas mais baratas, como carboidratos e lipídios, seriam utilizadas como energia (HEPER, 1989), poupando o requerimento em proteína da dieta (CHOU et al. 2001).

Os carboidratos são necessários aos organismos por desempenharem importantes funções biológicas como fornecer energia para o cérebro e tecido nervoso, na forma de glicose, e ainda, como precursor metabólico de ácidos nucléicos e mucopolissacarídeos. Além disto, representam uma fonte barata de obtenção de energia que, se usada adequadamente, possibilita o efeito poupador de proteína direcionando-a para o crescimento (TACON, 1988).

WILSON (1994) afirma que a capacidade de utilização de carboidratos pelos peixes de águas tropicais seria muito superior àquela de peixes de água subtropicais e marinhos; e que os

primeiros utilizariam mais eficientemente carboidratos complexos como o amido e a dextrina e os outros mais adaptados a utilizar mono e dissacarídeos.

DEL CARRATORE (2001) testou dietas semipurificadas equivalentes em proteína bruta (36% PB), níveis constantes de fibra de 8,5%, aproximadamente 9% de lipídios e quatro níveis crescentes de inclusão de amido (10, 16, 22 e 28%) para juvenis de pintado ($16,5 \pm 1,7\text{g}$ e $15,7 \pm 2,1\text{ cm}$). O autor observou ganho de peso inversamente proporcional ao nível de inclusão de amido na dieta e justificou que tal resultado pudesse ser reflexo das dificuldades digestivas ou metabólicas dos peixes arraçados com teores superiores a 16% de amido na dieta, principalmente por se tratar de uma espécie carnívora.

A energia metabólica é resultado de uma mistura de substratos e pode ser provinda por duas formas; a) a partir da ingestão de alimentos e absorção pelo intestino ou b) endogenamente, a partir dos combustíveis estocados (VAN DEN TILLART & VAN RAAIJ, 1995).

Entretanto, energia não é um nutriente, mas sim uma propriedade dos nutrientes que é liberada durante a oxidação metabólica de proteínas, lipídios e carboidratos. Neste sentido, a energia não passa de uma abstração, embora possa ser quantificada, quando convertida de uma forma para outra. Sendo definida como a capacidade de realizar trabalho, em um sentido biológico, a energia é necessária para que ocorram as reações químicas, para a movimentação de moléculas contra um gradiente de concentração, e para outros processos corpóreos, ela se reflete na atividade muscular. Portanto, para ser utilizada pelo organismo, é necessário que a energia obtida da dieta seja partida em várias frações (WEBSTER & LIM, 2002).

Tanto o excesso quanto a deficiência em energia na dieta podem reduzir as taxas de crescimento. A necessidade energética para manutenção e atividades voluntárias deve ser satisfeita “a priori”, antes de estar disponível para crescimento. Por outro lado, uma dieta contendo excesso de energia pode restringir o consumo alimentar e, conseqüentemente, prejudicar a obtenção das quantidades adequadas de proteína e outros nutrientes essenciais ao máximo crescimento. Relações inadequadas entre alta-energia e outros nutrientes na dieta também podem levar à deposição de grandes quantidades de gorduras na carcaça (LOVELL, 1988).

Como fonte primária e mais energética (9,4 kcal/g de energia bruta) para os animais, estão os lipídios cujo papel principal é gerar energia metabólica na forma de ATP via β -oxidação, um processo mitocondrial (SHERIDAN, 1988; HALVER & HARDY, 2002). Os lipídios são ésteres de ácido graxo e glicerol, classificados como gorduras, óleos e ceras. Os animais aquáticos são hábeis em metabolizar lipídios, particularmente quando provindos de alimento.

Os lipídios da dieta exercem grandes funções, pois são fontes de energia e ácidos graxos, proporcionam maior palatabilidade ao alimento, servem como veículo para a absorção de vitaminas lipossolúveis e esteróis e, além disso, desempenham um importante papel na estrutura das membranas biológicas na forma de fosfolipídios e ésteres de esteróis (HEPER, 1989; HERTRAMPF & PIEDAD-PASCUAL, 2000; WEIRICH & REIGH, 2001; JOHNSON et al., 2002).

Para peixes, os lipídios não são apenas as maiores fontes de energia metabólica para o crescimento, do ovo até o animal adulto, mas também a maior fonte de energia metabólica para a reprodução (HALVER & HARDY, 2002). Além disto, provém o organismo de ácidos graxos essenciais, necessários ao desenvolvimento adequado (CHOU et al. 2001). A maior parte dos ácidos graxos dos depósitos de gordura do corpo pode ser sintetizada pelos peixes a partir de precursores como carboidratos e proteínas quando em excesso (HEPER, 1989).

Segundo SUÁREZ et al. (1995), os lipídios da dieta, como nutrientes produtores de energia, teriam capacidade de reduzir os níveis dietéticos de proteínas melhorando a retenção de nitrogênio. Os autores destacam ainda que a substituição de proteínas por fontes energéticas não protéicas resulta em um menor catabolismo de aminoácidos, sugerindo a influência da disponibilidade do substrato sobre a adaptação enzimática digestória. A utilização de carboidratos como substitutos parciais de proteínas ainda é controversa, principalmente em peixes carnívoros, visto que estudos metabólicos indicam que a glicose é pouco utilizada por estes animais e, além disso, uma alimentação prolongada baseada nesta classe de nutrientes não proporciona qualquer regulação adaptativa na glicemia.

KRAJNOVIĆ-OZRETIĆ et al. (1994) salientam que as dietas para peixes de água doce, na sua essência, foram empiricamente adaptadas daquelas desenhadas em função dos requerimentos nutricionais dos peixes marinhos. Os autores destacam ainda que estas dietas muitas vezes satisfazem as necessidades para o crescimento, mas podem induzir sérias modificações e alterações metabólicas que geralmente resultam em notáveis acúmulos de lipídios no fígado e na cavidade abdominal.

A fração protéica é geralmente a mais cara dos componentes basais de uma dieta (JOBILING, 2001). Portanto, o maior problema em relação à formulação de dietas para peixes tem sido fornecimento de quantidades mínimas de proteína que proporcionem uma taxa de crescimento ótima ou máxima. Este objetivo pode ser alcançado através de um balanceamento adequado dos outros nutrientes, suprindo a demanda endógena de energia. Balanço este que pode ser expresso na relação proteína : energia da dieta (HALVER & HARDY, 2002).

A utilização de proteínas, por meio de processos catalíticos ou gliconeogênico, pode ser minimizada com a inclusão de quantidades satisfatórias de energia não protéica, como carboidratos ou lipídios, em quantidades adequadas na dieta (HALVER & HARDY, 2002). Os lipídios, como nutriente fornecedor de energia, têm o maior efeito poupador de proteína para muitas espécies de peixes (WILSON, 1989). WATANABE (1982) aponta que lipídios são a maior fonte de energia para peixes carnívoros, muitos dos quais tem uma habilidade limitada na utilização de carboidratos de alto peso molecular. Entretanto, a definição exata do requerimento de ácidos graxos essenciais em animais requer considerações não somente relativas, mas também em quantidade absoluta de concentração na dieta. Além disso, deve-se considerar também a habilidade inata da espécie em metabolizar estes compostos tanto anabólica como catabolicamente (SARGENT et al. 2002).

Devido à interação metabólica entre proteína, lipídio e carboidrato, a definição do exato requerimento em lipídios na dieta não é considerada particularmente importante (HALVER & HARDY, 2002). Entretanto, é amplamente conhecido que quantidades de lipídios variando entre 10 e 20% do peso seco da dieta sejam suficientes para permitir o direcionamento da fração protéica da dieta eficientemente para o crescimento, sem que haja excessiva deposição de gordura na carcaça (COWEY & SARGENT, 1979; WATANABE, 1982). Apesar disto, a quantidade precisa de lipídio depende do nível de proteína da dieta e, em alguns casos, também do nível de carboidrato (WATANABE, 1982).

Os salmonídeos e a maioria das espécies de peixes marinhos de clima temperado utilizam proteínas e lipídios como principais intermediários energéticos e anabólicos para o crescimento. Neste sentido, dietas contendo altas quantidades em energia (lipídios) são formuladas para aumentar a performance de crescimento destas espécies, maximizando o efeito poupador de proteína e permitindo sua máxima conversão em proteína muscular (HALVER & HARDY, 2002), minimizando perdas econômicas.

Alguns estudos sugerem que a degradação de proteína é estimulada pelo consumo (HOULIHAN et al., 1989; MILLWARD, 1989). Outros estudos têm encontrado que as taxas de degradação são independentes do arraçoamento, sugerindo que sejam geneticamente determinadas, enquanto as taxas de síntese sejam mais responsivas ao estado nutricional e influências ambientais (CARTER et al., 1993).

A acresção de tecido (crescimento) está relacionada à ingestão de alimentos e, quando crescimento é definido como deposição protéica, esta razão será determinada pelo balanço entre as taxas de síntese e de degradação de proteína. Medidas do metabolismo protéico podem ser feitas individualmente naqueles animais em que o consumo tenha sido

determinado, e podem revelar as possíveis razões para as grandes diferenças entre indivíduos na eficiência da conversão do alimento em crescimento (HOULIHAN et al., 1995a,b). Neste sentido, a diferença entre o crescimento em proteína, frente a uma mesma ingestão de alimentos, pode ser devido à alta síntese, baixa degradação ou à combinação de ambas (CARTER et al., 2001).

Animais com altas taxas de crescimento foram comparados a indivíduos com a mesma ingestão de alimentos, mas com crescimento mais lento. Verificou-se que a eficiência melhorada da conversão de alimento em crescimento parece estar relacionada com as baixas taxas de degradação (“turnover”), ao invés de estarem relacionadas com as taxas maiores de síntese protéica naqueles indivíduos altamente eficientes (CARTER et al., 1993). Além disso, a síntese protéica tem um grande impacto devido ao alto custo energético. Em peixes juvenis, em fase de crescimento, a síntese protéica pode ser responsável pelo consumo de 42% do total energético consumido, chegando a ser o processo fisiológico de maior demanda em energia (HOULIHAN et al., 1988). Além disso, as taxas de síntese protéica variam entre tecidos, geralmente obedecendo a seguinte ordem de magnitude: fígado > brânquias = trato gastrintestinal (intestino > estômago) = rim (rim cefálico > rim) >> músculo branco (CARTER & HOULIHAN, 2001).

Não somente a síntese protéica, mas também a degradação de proteína (“turnover” aumentado), podem estar correlacionadas com a composição da dieta. MEYER-BURGDORFF & ROSENOW (1995) reportaram que ao alimentarem carpa comum com uma dieta com concentração sub-ótima em proteína, observaram um aumento no “turnover” protéico, presumivelmente relacionado ao aumento de reciclagem de aminoácidos, liberados da degradação protéica. Resultado semelhante também foi observado por PERERA (1995) citado por CARTER et al. (2001) para trutas arco-íris arraçadas com dietas pobres no balanço de aminoácidos. Dados como estes, suportam a hipótese de que a síntese protéica tem papel fundamental na regulação da concentração de aminoácidos livres.

Segundo LANGHANS & SCHARRER (1992), a regulação da ingestão de alimentos é altamente complexa, envolvendo mecanismos de respostas (“feedback”) que atuam em escalas de tempo hierárquicas para determinar, a curto prazo, desde o tamanho de cada uma das refeições, como o balanço de nutrientes essenciais e, em longo prazo, a composição corpórea. O “feedback” positivo determina o início e a continuidade da alimentação, resultado das propriedades sensoriais do alimento, experiência em relação à viabilidade do nutriente e status fisiológico do animal. Por outro lado o feedback negativo pode ser dividido em fases gastrintestinal e metabólica ou pré e pós absorptivas.

Na fase gastrintestinal, muitos dos fatores envolvidos na regulação de curto prazo estão relacionados com a capacidade de enchimento do estômago ou do bulbo intestinal em relação ao seu esvaziamento e transferência da ingesta para o intestino. Em médio prazo, a composição do alimento pode influenciar a produção de enzimas digestivas e a densidade da membrana das células transportadoras de nutrientes, resultando em mudanças nas capacidades digestivas e absorptivas (KAPOOR et al., 1975; BUDDINGTON et al. 1987, 1997).

A absorção de lipídios oriundos da dieta é um processo que em peixes, assemelha-se ao observado em mamíferos. Após a hidrólise intraluminal, os lipídios dietéticos são tomados pelas células epiteliais do intestino por difusão da forma micelar de monoglicerídeos e ácidos graxos (IZQUIERDO et al., 2000). Entretanto, alguns aspectos do metabolismo de lipídios em peixes, incluindo transporte e deposição, aparentam ser um pouco diferente dos observados para vertebrados homeotérmicos. Conforme proposto por SHERIDAN (1988), os peixes apresentariam um modelo diferenciado de distribuição de ácidos graxos do plasma para os tecidos, que é composto em um componente de liberação rápida e em outro de liberação lenta. O de liberação rápida é representado por ácidos graxos livres (AGL) de cadeia curta, solúveis no plasma e AGL de cadeia longa que estariam ligados a proteínas carreadoras. O componente de liberação mais lenta, similar aos de mamíferos, representa um sistema de liberação de triglicerídeos (TG), que consiste na agregação, extrusão e transporte de partículas ricas em TG.

Normalmente são notadas grandes variações nas respostas individuais que atuam além da influência genotípica super-imposta ao indivíduo. METCALF et al. (1989) citados por HOULIHAN et al. (1995a) destacam que as diferenças que são notadas principalmente no “turnover” protéico e nas taxas de crescimento ou modificação de uma resposta individual podem ser resultados da interação social. A formação de hierarquias de dominância normalmente ocasiona aquisição desproporcional de alimentos entre indivíduos de um mesmo grupo, em que os dominantes ganham acesso preferencial, consumindo a maior parte do alimento, crescendo mais rápido, fato normalmente relatado em pequenos grupos.

Estudos em nutrição conduzidos em laboratórios podem, em alguma proporção, diminuir a velocidade de crescimento dos peixes quando comparados com as taxas de crescimento observadas em viveiros, mas, por outro lado, condições laboratoriais permitem o controle de praticamente todas as variáveis ambientais, tornando os dados obtidos mais significativos e seguramente interpretáveis (SHIAU & HUANG, 1990).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como proposta central o estudo das respostas bioquímicas e metabólicas de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, em adaptação às variações das condições nutricionais, assim como seus aspectos evolutivos, especificamente atingidos por meio:

- a) do conhecimento das respostas adaptativas enzimáticas do trato digestório e metabólicas de juvenis de pintado submetidos a dietas proteína-variável;
- b) do conhecimento dos aspectos adaptativos morfológicos do intestino de juvenis de pintado submetidos a dietas proteína-variável;
- c) do conhecimento das respostas adaptativas enzimáticas do trato digestório e metabólicas de juvenis de pintado submetidos a dietas energia-variável;
- d) da comparação dos dados para obtenção de uma dieta que melhor atenda às necessidades nutricionais de *Pseudoplatystoma corruscans*, maximizando o aproveitamento dos nutrientes e prevenindo perdas econômicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução, na Universidade Federal de São Carlos. As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Morfologia de Organismos Aquáticos do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da UNESP – Campus de Bauru.

4.1. EXPERIMENTOS DE VARIAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA NA DIETA

4.1.1. Delineamento experimental para as análises bioquímicas

Trinta e seis pintados provindos do Projeto Pacu, passaram por período de aclimatação de 30 dias, recebendo ração comercial para peixes carnívoros. Ao atingirem o peso e comprimento (\pm s.e.m.) de $68,8 \pm 7,4$ g e $21,8 \pm 0,7$ cm, respectivamente, os peixes foram igualmente distribuídos em quatro caixas de 2.000L, em sistema fechado, com água termostaticada sob fluxo contínuo e aeração constante. Estes animais receberam dietas pelletizadas, isocalóricas (4.000 kcal/kg), com níveis de proteína bruta (PB) de 20%, 30%, 40% e 50% e fibra em torno de 6% (tabela 1). Os animais foram arraçoados duas vezes ao dia, às 8:00h e às 18:00h, com 8% da biomassa total estocada, ao longo dos 28 dias. Os parâmetros físico-químicos da água, oxigênio dissolvido (OD), pH e condutividade, foram semanalmente determinados por processo eletrométrico utilizando-se um aparelho HORIBA modelo U10. Na mesma frequência, a concentração de amônia, alcalinidade e a dureza foram, determinadas pelos métodos de KOROLEFF (1976), GOLTERMAN & CLIMO (1969) e APHA (1980) respectivamente, e a temperatura foi aferida diariamente.

Após o período experimental, 6 peixes de cada tratamento foram amostrados e anestesiados em solução de benzocaína (100mg/L de água). Imediatamente após, os animais foram puncionados na veia caudal, com seringas heparinizadas, para a coleta de sangue, e posteriormente sacrificados por secção medular. Uma alíquota do sangue total foi utilizada nas determinações hematimétricas (sangue total) e o restante, centrifugado a $14.400 \times g$ para obtenção de plasma. O fígado, o rim e uma amostra de músculo branco foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -20°C para as determinações de intermediários metabólicos. O trato digestório foi extraído, dividido em estômago, intestino anterior, médio e posterior, e mantidos congelados a -20°C para as análises enzimáticas digestivas.

4.1.2 Delineamento experimental para as análises histológicas

Quarenta pintados provenientes do CEPTA/IBAMA - Pirassununga passaram por período de aclimatação de 30 dias, recebendo ração farelada para peixes carnívoros. Ao atingirem o peso e comprimento (\pm s.e.m.) de $12,12\text{g} \pm 0,4$ e $12,5 \pm 0,12$, respectivamente, foram aleatoriamente distribuídos em quatro caixas de 250L, nas condições descritas, e receberam dietas pelletizadas, isocalóricas (4.000 kcal/kg), com níveis PB de 20%, 30%, 40% e 50%, (tabela 1), na proporção de 8% da biomassa estocada, por 28 dias. Após este período, os peixes foram pesados, medidos e transferidos para caixas de 2.000L, nas mesmas condições ambientais onde permaneceram por mais 62 dias, recebendo os mesmos tratamentos anteriormente descritos, passando por biometria aos 60 dias e no final do experimento. Os parâmetros físico-químicos da água, foram determinados tal como descrito em 4.1.1. Decorrido o período experimental, 6 peixes de cada tratamento foram aleatoriamente amostrados e anestesiados com solução de benzocaína (100mg/L de água). Imediatamente após, foram puncionados na veia caudal, para a coleta de sangue, e posteriormente sacrificados por secção medular, sendo retirado o trato digestório, para às análises morfológicas. Uma alíquota do sangue coletado foi utilizada nas determinações hematimétricas.

4.1.2.1 Análise Histológica do Intestino dos Peixes

Na preparação do material para as análises microscópicas, foram recolhidas porções do intestino anterior, médio e posterior, imediatamente fixadas em solução de Bouim, e posteriormente incluídas em Paraplast (Oxford-Labware, USA). Após a microtomia, as secções histológicas de $5\mu\text{m}$ foram destinadas à rotina histológica para coloração com hematoxilina-eosina (HE), H/S e reação histoquímica de PAS, PAS + amilase, AB (Alcian Blue) pH 0,5, AB pH 2,5, PAS + AB pH 2,5 e respectivos bloqueios, para detecção de glicosaminoglicana, glicogênio e mucossubstâncias sulfatadas e/ou carboxiladas (esterificação e saponificação) conforme especificado por RIBEIRO et al. (1999).

Para verificar possíveis alterações na morfologia intestinal dieta-dependentes, as lâminas foram também empregadas para mensuração dos parâmetros: a) diâmetro total do tubo (correlacionado com o peso do animal), b) diâmetro da luz (mm), c) espessura da camada muscular (mm), d) altura da camada mucosa (mm), e) altura do epitélio (mm) e f) número de células calciformes, contadas em 5 vilosidades de cada lâmina analisada. Para as análises microscópicas, utilizou-se lupa Zeiss – Stemi SV6 e microscópio Olympus CBA-K, e na documentação do material, fotomicroscópio Olympus BX50.

Tabela 1: Composição percentual e química das dietas utilizadas nos experimentos com variação de proteína bruta (com base na matéria seca).

Ingredientes	DIETAS EXPERIMENTAIS			
	20% PB	30% PB	40% PB	50% PB
Farinha de peixe	15,58	34,75	55,00	74,50
Farinha de Carne	11,00	10,00	8,00	6,50
Milho	59,4	41,00	22,03	3,18
L-Lisina	0,45	0,28	-	-
Óleo Vegetal ¹	7,35	7,40	7,5	7,85
α - Celulose	4,75	5,10	6,00	6,50
Flavorizante ²	0,40	0,40	0,40	0,40
Suplemento mineral-vitamínico ³	0,50	0,50	0,50	0,50
Vitamina C	0,05	0,05	0,05	0,05
Aglutinante ⁴	0,50	0,50	0,50	0,50
Antioxidante ⁵	0,02	0,05	0,02	0,02
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Matéria Seca (%)	90,98	91,57	92,15	92,78
Energia Bruta (kcal/kg)	4.086,75	4.086,99	4.079,35	4.087,37
Proteína Bruta (%)	20,07	30,01	40,03	50,07
Fibra Bruta (%)	6,29	6,01	6,19	6,02
Extrato Etéreo (%)	13,36	13,25	13,1	13,21
Cálcio (%)	2,76	3,86	4,87	5,91
Fósforo total (%)	1,54	2,09	2,6	3,12
Lisina (%)	1,36	1,99	2,58	3,36
Metionina + cistina (%)	0,72	1,06	1,41	1,75
Vitamina C (%)	0,04	0,04	0,04	0,04
Amido ⁶	36,23	25,01	13,44	1,94

¹ Óleo de canola

² Betaína

³ Suprevit Peixes (Supremais), níveis de garantia por 1000g: Vit. A 1.200.000 UI; Vit. D3 200.000 UI; Vit. E 12.000 mg; Vit. K3 2.400 mg; Vit. B1 4.800 mg; Vit. B2 4.800 mg; Vit. B6 4.000 mg; Vit. B12 4.800 mg; Ácido fólico 1.200 mg; Pantotenato de Cálcio 12.000 mg; Vit. C 48.000 mg; Biotina 48 mg; Colina 65.000 mg; Niacina 2.4000 mg; Ferro 10.000 mg; Cobre 600 mg; Manganês 4.000 mg; Zinco 6.000 mg; Iodo 20 mg; Cobalto 2 mg; Selênio 20 mg.

⁴ Carboximetilcelulose

⁵ Antioxidante BHT (Butil hidroxi tolueno)

⁶ Valor estabelecido, considerando o milho contendo 61% de amido

4.2 EXPERIMENTO DE VARIAÇÃO DE ENERGIA BRUTA NA DIETA

Sessenta e oito juvenis de pintado provenientes do Projeto Pacu, passaram por período de aclimação recebendo dieta comercial para peixes carnívoros. Ao atingirem o peso e comprimento (\pm s.e.m.) de $41,6 \pm 0,8$ g e $20,3 \pm 0,2$ cm, respectivamente, foram aleatoriamente distribuídos em quatro caixas de 2.000L, nas mesmas condições descritas em 4.1.1. Estes animais receberam dietas pelletizadas e isoprotéicas, 31,5% PB, variando em 3.500, 3.850, 4.200 e 4.450 kcal/kg de ração (tabela 2). Os animais foram arraçoados duas vezes ao dia, as 8:00h às 18:00h, com quantidade relativa a 8% da biomassa total estocada, ao longo dos 60 dias. Os parâmetros físico-químicos da água, oxigênio dissolvido (OD), pH, condutividade, amônia, alcalinidade, dureza e temperatura, foram determinados na mesma frequência e assim como descrito em 4.1.1.

Decorrido o período experimental, 10 peixes de cada tratamento foram amostrados e anestesiados com solução de benzocaína (100mg/L de água). Imediatamente após, os animais foram puncionados na veia caudal para a coleta de sangue, e posteriormente sacrificados por secção medular. Uma alíquota do sangue foi utilizada nas determinações hematimétricas (sangue total) e o restante, centrifugado a $14.400 \times g$ para obtenção de plasma. Foram coletados o fígado, rim e uma amostra de músculo branco que, como o plasma, foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -20°C para as determinações dos intermediários metabólicos. O trato digestório foi extraído, dividido em estômago, intestino anterior, médio e posterior, mantidos congelados a -20°C para as subseqüentes análises digestivas enzimáticas.

Tabela 2: Composição percentual e química das dietas experimentais com variação de energia bruta (com base na matéria seca).

Ingredientes	DIETAS EXPERIMENTAIS			
	3.500 EB	3.850 EB	4.200 EB	4.550 EB
Farinha de peixe	36,36	38,16	39,60	41,76
Farinha de Carne	14,40	12,60	10,98	7,74
Milho	28,35	23,85	21,74	21,60
Óleo Vegetal ¹	0,90	6,30	10,80	14,81
α - Celulose	8,667	7,767	5,557	2,767
Flavorizante ²	0,36	0,36	0,36	0,36
Suplemento mineral-vitamínico ³	0,45	0,45	0,45	0,45
Vitamina C	0,045	0,045	0,045	0,045
Aglutinante ⁴	10,45	10,45	10,45	10,45
Antioxidante ⁵	0,018	0,018	0,018	0,018
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Matéria Seca (%)	91,16	91,71	92,11	92,38
Energia Bruta (kcal/kg)	3.506,91	3.864,01	4.220,85	4.584,24
Proteína Bruta (%)	31,58	31,56	31,57	31,52
Fibra Bruta (%)	8,83	7,87	5,79	3,24
Extrato Etéreo (%)	6,66	11,65	15,87	19,55
Cálcio (%)	4,65	4,49	4,33	3,96
Fósforo total (%)	2,45	2,36	2,28	2,11
Lisina (%)	1,89	1,93	1,96	1,99
Metionina + cistina (%)	1,07	1,08	1,09	1,11
Vitamina C (%)	0,04	0,04	0,04	0,04
Amido ⁶	27,3	24,5	23,3	23,2

¹ Óleo de canola

² Betaína

³ Suprevit Peixes (Supremais), níveis de garantia por 1000g: Vit. A 1.200.000 UI; Vit. D3 200.000 UI; Vit. E 12.000 mg; Vit. K3 2.400 mg; Vit. B1 4.800 mg; Vit. B2 4.800 mg; Vit. B6 4.000 mg; Vit. B12 4.800 mg; Ácido fólico 1.200 mg; Pantotenato de Cálcio 12.000 mg; Vit. C 48.000 mg; Biotina 48 mg; Colina 65.000 mg; Niacina 24000 mg; Ferro 10.000 mg; Cobre 600 mg; Manganês 4.000 mg; Zinco 6.000 mg; Iodo 20 mg; Cobalto 2 mg; Selênio 20 mg.

⁴ Carboximetilcelulose e Amido de milho na proporção 1:22,2

⁵ Antioxidante BHT (Butil hidroxi tolueno)

⁶ Valor estabelecido, considerando o milho contendo 61% de amido, somado ao amido usado como aglutinante.

4.3 DETERMINAÇÕES HEMATIMÉTRICAS

4.3.1 Hematócrito

Uma alíquota do sangue total foi utilizada na determinação do valor de hematócrito. As amostras de sangue, em duplicata, foram transferidas para capilares de microhematócrito heparinizados, fechados com massa apropriada, centrifugados por 3 minutos a $14.400 \times g$ e a porcentagem de sedimentação dos eritrócitos foi lida em cartão padronizado.

4.3.2 Hemoglobina Total

Na determinação de hemoglobina total, utilizou-se $10\mu\text{l}$ de sangue dissolvido em $2,0\text{ml}$ de solução de Drabkin (KCN , KH_2PO_4 , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$). A leitura do produto resultante foi realizada em 540nm (DRABKIN, 1948) e o cálculo da concentração, realizado a partir da equação abaixo:

$$[\text{Hb}] = \text{ABS amostra} \times 0,014649 \times \text{diluição}$$

onde, $\text{g}\% \text{Hb} = \text{gHb}/100\text{ml}$

4.3.3 Contagem de eritrócitos (RBC)

A contagem de eritrócitos foi realizada em Câmara de Neubauer a partir de uma diluição de 1:200 de sangue total em solução isotônica de citrato/formol (3,8g de citrato de sódio; $2,0\text{ml}$ de formol 40%, completando-se para 100ml de água destilada), sendo o resultado expresso em milhões de eritrócitos/ mm^3 de sangue (LIMA et al., 1969).

4.4 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

4.4.1 Homogeneizados Celulares

Os tecidos foram amostrados sobre superfície gelada e pesados em quantidades apropriadas para as determinações enzimáticas. Para as enzimas digestivas foram mantidas as proporções de 50mg de tecido/ ml de tampão de homogeneização ($0,02\text{M}$ Tris/fosfato de sódio $0,01\text{M}$, pH 7,0 em glicerol v/v) para estômago, e 100mg de tecidos/ ml de tampão para intestino anterior, médio e posterior. Alíquotas adequadas de fígado, rim e músculo branco em tampão de homogeneização foram destinadas para as análises das enzimas do metabolismo intermediário. Os tecidos foram homogeneizados com pistilo de Teflon em homogeneizador mecânico tipo Potter-Elvehjem a $1.000 \text{rpm}/\text{minutos}$, em dois “strokes” de 30 segundos, sob

banho de gelo. Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 11.000xg em centrífuga clínica refrigerada por 3 minutos e os sobrenadantes, mantidos em gelo fundente, foram utilizados como fonte enzimática.

4.4.2 Extratos celulares ácidos

Os tecidos coletados, amostrados sobre superfície gelada e pesados em quantidades apropriadas, foram homogeneizados em homogeneizador mecânico tipo Potter-Elvehjem a 1.000rpm, com dois “strokes” de 30 segundos, sob banho de gelo. Na homogeneização foi mantida a proporção de 100mg de tecido/ml de TCA 20%. Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 14.400 x g em centrífuga clínica e os sobrenadantes foram utilizados como extratos celulares livres de proteína nas determinações dos intermediários metabólicos.

4.4.3 Extratos celulares neutros

A determinação das concentrações de aminoácidos livres foi realizada a partir de extratos neutros. Os tecidos coletados sob os cuidados previamente descritos foram pesados, mantendo-se a proporção de 50mg de tecido hepático, 50mg de tecido renal ou 200mg de tecido muscular branco/ml de água destilada. As amostras foram homogeneizadas como descrito anteriormente e os extratos dos centrifugados de 14.400 x g foram utilizados nos ensaios.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS

4.5.1 Glicogênio

As determinações de glicogênio foram realizadas como descrito por BIDINOTTO et al. (1997). Amostras de fígado, músculo branco e rim de cada exemplar foram transferidos para um tubo de ensaio na proporção de 50 a 100mg de tecido/ml de KOH 6,0N e incubados por 3 minutos a 100°C em Banho-Maria. Após a dissolução alcalina dos tecidos, 250µl desses extratos eram transferidos para tubos rigorosamente limpos e adicionado 3ml de etanol e 100µl de K₂SO₄ 10%, seguido de agitação. As amostras eram centrifugadas a 2.000 x g por 1 minuto. Cada tubo de reação teve seu sobrenadante descartado por inversão e o precipitado, ressuspenso em 2,5ml de água destilada. Um volume adequado desta dissolução foi analisado quanto ao seu teor de açúcares totais pelo método hidrolítico ácido de DUBOIS et al., (1956) e o conteúdo de glicogênio, expresso em µmoles de glicosil-glicose/g de tecido.

4.5.2 Açúcares redutores totais

As determinações de açúcares redutores totais foram realizadas segundo DUBOIS et al. (1956), em ácido sulfúrico concentrado. Esta técnica foi utilizada sempre que o objetivo era determinar os teores de açúcar total. O procedimento consistia no emprego de um volume adequado de extrato, adicionado a 500µl de fenol 4,1% e 2,0ml de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos de reação eram imediatamente resfriados em banho de água e a leitura óptica realizada em 480nm. A concentração de glicose era estimada contra um padrão de glicose contendo 100nmoles e expressa como µmoles de açúcares redutores totais/g de tecido ou ml de plasma.

4.5.3 Lactato

O lactato foi estimado nos extratos ácidos, segundo o método de HARROWER & BROWN (1972). Um volume adequado de extrato era adicionado a 20µl de CuSO₄ 4%. À mistura, 2,5ml de ácido sulfúrico concentrado era lentamente adicionado. Após agitação, as amostras eram fervidas por 5 minutos e resfriadas em banho de gelo. Adicionava-se então, 50µl de solução de p-fenilfenol (1,5g de p-fenilfenol em solução aquosa de NaOH 2%) e as amostras eram agitadas em Vortex e mantidas em repouso por 1 hora. Em seguida, os tubos eram fervidos por 90 segundos, imediatamente resfriados em banho de gelo e a leitura óptica realizada em 570nm. A concentração de lactato fora estimada contra um padrão de lactato contendo 20nmols e expressa em µmoles de lactato/g tecido ou ml de plasma.

4.5.4 Piruvato

A concentração de piruvato foi estimada nos extratos ácidos segundo o método de LU (1939). Um volume adequado de extrato foi adicionado a 250µl de dinitrofenilhidrazina 0,1% em HCl 2,0N. Após 30 minutos de repouso a 37°C, era adicionado à mistura de reação 3,0ml de NaOH 1,3N e a leitura óptica, realizada em 440nm. A concentração de piruvato fora estimada contra um padrão de piruvato contendo 100ηmoles e expressa em µmoles de piruvato/g de tecido ou ml de plasma.

4.5.5 Aminoácidos livres

O teor de aminoácidos livres foi estimado nos extratos neutros segundo o método de COPLEY (1941). Um volume adequado de extrato era adicionado a 1,0ml de solução de ninhidrina 0,1% em propanol. Os tubos de reação eram mantidos em Banho-Maria a 40°C

por 40 minutos e posteriormente resfriados em banho de gelo. A leitura óptica era realizada em 570nm e a concentração de aminoácidos livres, estimada contra um padrão de ácido α -amino-acético contendo 100 nmoles, expressa em μ moles /g de tecido ou ml de plasma.

4.5.6 Proteína total

O teor de proteína total dos tecidos foi determinado, a partir de uma alíquota adequada, provinda da digestão alcalina dos tecidos em NaOH 6N por 1 ou 2 minutos. Adotou-se o método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão, e as concentrações foram expressas em mg de proteína/g tecido ou ml de plasma.

4.5.7 Amônia

A concentração de amônia plasmática era determinada por nesslerização (GENTZKOW & MASEN, 1942), pela transferência de um volume adequado de extrato plasmático ácido a um tubo de ensaio contendo água destilada, em um volume final de 2,0ml ao qual se adicionava 0,5ml de reativo de Nessler. A leitura óptica era realizada em 420nm e a concentração, estimada contra um padrão contendo 100nmols, expressa em μ moles/ml de plasma.

4.5.8 Uréia

As concentrações de uréia plasmática foram determinadas conforme RAHMATULLAH & BOYDE (1980). foram utilizados 200 μ l de extrato ácido, 900 μ l de água destilada, 500 μ l de uma mistura constituída de duas partes de reagente A (60ml de água destilada, 30ml ácido sulfúrico concentrado, 10ml de ácido fosfórico) e uma parte de reagente B (100ml de água destilada, 0,1g de thiosemicarbazida e 0,5g de butanedionemonoxime). A mistura era mantida em Banho-Maria a 100°C por 10 minutos na ausência de luz. A concentração nas amostras foi estimada contra um padrão contendo 10nmols de uréia a 525nm e expressa em μ moles de uréia/ml de plasma.

4.5.9 Triglicerídeos

A concentração dos triglicerídeos das amostras era determinada em extratos orgânicos (35% heptana, 58% isopropanol, 7% ácido sulfúrico 63mM). A uma alíquota adequada da camada superior adicionava-se solução transesterificadora (butilato de potássio 0,75mMol/L) para a liberação do glicerol. Esta fase era conduzida sob Banho-Maria a 37°C por 2 minutos.

Na seqüência adicionava-se às amostras, solução oxidante (metaperiodato de sódio 4,01mmol em ácido sulfúrico 0,37mol) para dar origem às moléculas de formol, novamente repousando-se as amostras em Banho-Maria a 37°C por 2 minutos. A concentração de formol, proporcional à quantidade de triglicerídeos, era determinada colorimetricamente a 410nm, contra um padrão de glicerol em solução aquosa, equivalente a 200mg de triglicerídeos/dL (CHERNECKY et al., 1993).

4.5.10 Ácidos graxos livres

As determinações das concentrações de ácidos graxos livres (AGL) eram realizadas de acordo com a metodologia descrita por NORVÁK (1965). Adicionava-se 1,0ml de solução Dole (hepatana, álcool isopropílico e ácido sulfúrico na proporção de 1:4:0,1) na amostra constituída de alíquotas adequadas de plasma, fígado, músculo branco e rim, seguida de agitação por 2 minutos. Posteriormente, adicionava-se 1,0ml de heptano e 2,0ml de água, agitando-se novamente por inversão. Uma amostra equivalente a 600µl da fase superior era retirada e adicionada a uma mistura de clorofórmio e hepatana (5:1 v/v), e 1,0ml de reagente de cobalto. O reagente de cobalto era constituído por 1,32 vol. de trietanolamina + 10 vol. de solução A + 7 vol. de solução B. A solução A era formada por uma solução saturada de K₂SO₄, 6 gramas Co(NO₃)₂·6H₂O mais 0,8ml de ácido acético glacial em água fervente. A solução B era uma solução de Na₂SO₄ saturada em água fervente. Na seqüência, as amostras eram fortemente agitadas por 30 segundos e centrifugadas por 2 minutos 3.000 rpm. Desta mistura, retirava-se uma alíquota de 600µl à qual adicionava-se 600µl de solução indicadora, constituída de 0,4% de α-nitroso β-naftal em etanol, diluída 12,5 vezes. A leitura óptica era realizada em 500nm e a concentração, estimada contra um padrão de ácido palmítico 4mM e expressa em µmols/g de tecido ou ml de plasma..

4.6 DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS

A determinação das atividades das enzimas foram realizadas nos homogeneizados celulares descritos em 4.4.1.

4.6.1 Enzimas do metabolismo intermediário

4.6.1.1 Arginino hidrolase (Arginase)

A atividade de arginase era determinada pelo método de ARCHIBALD (1946). Utilizava-se 50mg de fígado homogeneizados em 1,0ml de tampão de homogeneização. O meio de

incubação continha 1,2ml de volume final dos seguintes componentes: arginina 250mM em tampão Tris 50mM pH 8,0, cloreto de manganês ($MnCl_2$) 1mM e 30 μ l de homogeneizado celular. A mistura era incubada a 25°C por 30 minutos e a reação, interrompida pela adição de 100 μ l de PCA 70%. Paralelamente era ensaiado um branco de reação. Após a incubação, as amostras eram centrifugadas a 14.400 x g por 3 minutos. No sobrenadante, a concentração de uréia era estimada de acordo com RAHMATULLAH & BOYDE (1980) e a atividade expressa em U(nmoles uréia/min)/mg de proteína.

4.6.1.2 Glutamato desidrogenase (GDH)

A atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) foi determinada segundo HOCHACHKA et al. (1978). O ensaio era registrado por 1 minutos com intervalos de 15 segundos. O meio de reação continha 2,0ml de tampão imidazol pH 7,0 (0,05M), NADH 0,1mM, ADP 1mM, α -cetoglutarato 5mM, acetato de amônio 250mM e uma alíquota adequada de homogeneizado. O coeficiente de extinção molar do NADH previamente determinado ($\epsilon_{340}=0,0855108/mMol/L$) foi utilizado no cálculo da atividade específica. A atividade específica da enzima está expressa em μ mol por min (mU) por mg de proteína (mU/mg proteína).

4.6.2 Enzimas Digestivas

4.6.2.1 Protease Inespecífica

Nos ensaios da atividade proteolítica inespecífica utilizou-se o método de hidrólise da caseína, adaptado de WALTER (1984). Os valores adequados de pH para as determinações em cada segmento do trato digestório foram previamente determinados, tal que: tampão 0,2M glicina/HCl (pH 2,0) foi usado para estômago, tampão 0,1M Tris/HCl pH 7,5 para intestino anterior e tampão 0,1M Tris/HCl (pH 9,0) para intestino médio e posterior. A mistura de reação era composta por tampão adequado (500 μ l), caseína 1% (500 μ l) como substrato e alíquota previamente ajustada do homogeneizado como fonte de enzima. Após 60 minutos de incubação à 25°C, a reação era paralisada com 500 μ l de TCA 15% (ácido tricloroacético), mantida em gelo fundente por aproximadamente 30 minutos e o precipitado removido por centrifugação a 14.400 x g por 3 minutos para leitura do sobrenadante em 280nm. Todas as amostras foram realizadas em duplicata e, paralelamente, dois brancos, um de enzima (onde a quantidade de enzima foi substituída por água destilada) e outro de substrato (onde o

substrato foi substituído por água destilada), passaram pelos mesmos procedimentos dos tubos de reação.

Tirosina foi utilizada como padrão e uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μg de tirosina, por minuto (U), expressa por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

4.6.2.2 Tripsina

A tripsina foi ensaiada segundo HUMMEL (1959) modificado. Utilizou-se como substrato 1,04 mM de TAME (α -*p*-Toluenesulphonyl-L-arginine methyl ester hydrochloride) em solução tampão 0,01M $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /0,2 M Tris/HCl, pH 8,1. Uma alíquota ajustada de homogeneizado celular foi utilizada como fonte enzimática. A temperatura de reação foi de 25°C e a densidade óptica era registrada em 247nm após 20 segundos de reação. A atividade específica da enzima necessária foi expressa em μmol de arginina por min (U) por mg de proteína (U/mg proteína).

4.6.2.3 Quimiotripsina

A atividade proteolítica da quimiotripsina foi determinada segundo o método modificado de HUMMEL (1959). Utilizou-se com substrato 1mM BTEE (N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester) em methanol 2:3 (v:v). O ensaio era realizado em tampão 0,1M $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /0,1 M Tris/HCl, pH 7,8 a 25°C, por 40 segundos a 256nm. A atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para formação de 1 nmol de tirosina por minuto (mU), expressa por mg de proteína (mU/mg proteína).

4.6.2.4 Lipase

A atividade da lipase não-específica foi determinada segundo metodologia adaptada de ALBRO et al. (1985). A reação era encubada em meio contendo 0,4 mM *p*-nitrofenil miristato em solução tampão 24 mM de bicarbonato de amônio pH 7,8 e 0,5% Triton X-100. Após 30 minutos, as reações eram interrompidas pela adição de NaOH 25mM. A densidade óptica era registrada a 405nm e uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de substrato hidrolisado por minuto (U), expressa por mg de proteína (U/mg proteína).

4.6.2.5 Amilase

A atividade amilohidrolítica foi estimada segundo o método proposto por BERNFELD (1955) modificado. Na mistura de reação contendo 1,0ml de solução de amido 5% em tampão Citrato/Fosfato 0,2M (pH 7,0) e 0,5ml de solução de NaCl 0,5% como cofator enzimático, foi adicionado um volume adequado de homogeneizado celular. A reação foi incubada a 25°C por 30 minutos e interrompida com 1,0ml de solução 5% $ZnSO_4 : Ba(OH)_2$ 0,3N. Posteriormente, a mistura de reação foi centrifugada a 11.000xg por 3 minutos e no sobrenadante determinou-se a concentração de glicose livre pelo método colorimétrico de PARK & JOHNSON (1949) a 690nm. A Atividade específica foi expressa como μ moles de açúcares redutores totais por minuto (U) por mg de proteína (UI).

4.7 PARÂMTEROS ZOOTÉCNICOS

Foram adotados como índices simples de desempenho produtivo:

4.7.1 Porcentagem de ganho de peso (GP)

Obtido através da diferença de biomassa estocada no início (BI) e ao final (BF) de cada período experimental,segundo a expressão:

$$GP (\%) = [(BF - BI) / BI] \times 100$$

4.7.2 Índice de gordura víscero-somático (IGVS)

O índice de gordura víscero-somático foi obtido em função da relação entre o peso da gordura visceral (GV), denominada por MARQUES (1993), para a espécie, como corpo adiposo, e o peso total do corpo dos animais (PT), segundo a expressão:

$$IGVS = (GV / PT)$$

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram analisados de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Comparações Múltiplas de Dunn's adotando-se um nível de significância de $P < 0,05$. Todos os valores estão reportados como média \pm s.e.m. (erro padrão da média).

5. RESULTADOS

Os parâmetros físico-químicos da água dos tanques, nos diferentes períodos experimentais, mantiveram-se dentro da faixa de conforto para o cultivo de peixes tropicais (VINATEA ARANA, 1997), podendo-se considerar os resultados como reflexos das alterações nutricionais impostas pelo arraçoamento (Tabela 3).

Tabela 3: Características físico-químicas da água dos tanques durante os experimentos com variação nutricional das dietas para juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*).

Experimentos	Parâmetros físico-químicos da água						
	Temperat. (°C)	pH	OD (mg/L)	Alcal. (mg/L)	Amônia ($\mu\text{gNH}_4^+/\text{L}$)	Condutividade ($\mu\text{siemens}/\text{cm}^2$)	Dureza (mg/L)
PB (28 dias)	23,5 ± 1,2	6,6 ± 0,1	6,8 ± 0,49	31,5 ± 2,3	14,4 ± 1,4	95,1 ± 2,96	38,2 ± 1,41
PB (90 dias)	24,5 ± 1,43	6,8 ± 0,3	6,9 ± 0,42	38,2 ± 1,6	7,66 ± 1,39	95,6 ± 3,05	39,5 ± 2,1
EB (60 dias)	26,1 ± 1,06	6,5 ± 0,2	5,5 ± 0,16	39,4 ± 2,1	15,5 ± 2,4	213,2 ± 47,2	26,02 ± 3,2

Dados estão reportados como média ± desvio padrão. OD: oxigênio dissolvido; Alcal.: alcalinidade; PB: proteína bruta; EB: energia bruta

5.1 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

5.1.1 Variação de proteína na dieta

Os juvenis de pintado arraçados por 28 dias com diferentes níveis de proteína não apresentaram alterações nos parâmetros sanguíneos analisados, hematócrito, concentração de hemoglobina total e/ou número de eritrócitos (Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros hematológicos de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável por 28 dias.

	Tratamentos – Variação de PB na dieta			
	20% PB	30% PB	40% PB	50% PB
Hematócrito (%)	17,50 ± 1,75	15,92 ± 1,51	16,50 ± 1,60	19,34 ± 1,23
Hemoglobina (gHb/100ml)	3,03 ± 0,44	2,60 ± 0,54	3,10 ± 0,15	3,60 ± 0,15
RBC (milhões/ mm^3)	0,308 ± 0,025	0,295 ± 0,013	0,276 ± 0,038	0,296 ± 0,036

Dados reportados como média ± s.e.m. (n=6); PB: proteína bruta

O mesmo perfil hematológico foi apresentado pelos animais arraçoados por 90 dias, com os diferentes níveis de proteína bruta (Tabela 5).

Tabela 5: Parâmetros hematológicos de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável por 90 dias.

	Tratamentos - Variação de PB na dieta			
	20% PB	30% PB	40% PB	50% PB
Hematócrito (%)	18,89 ± 0,62	19,40 ± 1,23	20,78 ± 1,90	21,28 ± 1,44
Hemoglobina (gHb/100ml)	4,41 ± 0,21	4,72 ± 0,36	4,55 ± 0,38	4,56 ± 0,47
RBC (milhões/mm ³)	0,353 ± 0,035	0,278 ± 0,021	0,316 ± 0,028	0,266 ± 0,026

Dados reportados como média ± s.e.m. (n=10); PB: proteína bruta

5.1.2 Variação de energia bruta na dieta

A quantidade de energia bruta na dieta reduziu os parâmetros hematológicos, hematócrito e hemoglobina total, nos animais arraçoados com 3.850 e 4.200 kcal EB kg. Não foram observadas diferenças no número de eritrócitos, entre os tratamentos energia variável (Tabela 6).

Tabela 6: Parâmetros hematológicos de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável por 60 dias.

	Tratamentos – Variação de EB na dieta			
	3500 kcal	3850 kcal	4200 kcal	4550 kcal
Hematócrito (%)	25,6 ± 0,7 ^a	20,3 ± 1,5 ^b	21,2 ± 0,7 ^b	24,6 ± 0,8 ^a
Hemoglobina (gHb/100ml)	6,27 ± 0,23 ^a	4,93 ± 0,44 ^b	5,41 ± 0,32 ^b	6,55 ± 0,24 ^a
RBC (milhões/mm ³)	0,378 ± 0,05	0,374 ± 0,06	0,341 ± 0,09	0,421 ± 0,09

Dados reportados como média ± s.e.m. (n=10); EB: energia bruta

5.2. METABOLISMO INTERMEDIÁRIO

5.2.1 Variação de proteína bruta na dieta

Os dados referentes ao perfil metabólico dos arraçoados por 28 dias, com diferentes níveis de proteína bruta, estão relacionados na tabela 7. As concentrações de glicose e lactato plasmáticos diminuíram em função do aumento de proteína bruta na dieta. Esta redução foi acompanhada da manutenção dos níveis de piruvato (Figura 1). As concentrações plasmáticas de proteína, aminoácidos, amônia e uréia mantiveram-se constantes, independente da quantidade de proteína oferecida. Mesmo que não tenham apresentado variação significativa, as maiores concentrações de triglicerídeos ocorreram nos tratamentos com 30 e 40% PB. Este perfil mostrou-se complementar ao observado para ácidos graxos livres cujos valores diminuíram significativamente para os tratamentos citados (Figura 2). As reservas de glicogênio hepático e renal sofreram reduções significativas, seguidas de um padrão de glicose intracelular diferente em ambos os tecidos. A concentração de glicose no fígado apresentou uma queda significativa enquanto no rim observou-se um aumento. As concentrações de lactato e piruvato reduziram-se no fígado, enquanto no rim a concentração de piruvato diminuiu e a de lactato manteve-se constante (Figuras 3 e 4).

O tecido muscular branco não apresentou variação nas concentrações de glicogênio, glicose e lactato. O teor de piruvato apresentou aumento proporcional à quantidade de proteína bruta na dieta. Observou-se um aumento nas concentrações de proteína, 30 e 40% PB na dieta, e redução nas concentrações de aminoácidos livres nos peixes arraçoados com 50% PB (Figura 5).

A concentração de proteínas no tecido hepático permaneceu constante, enquanto o teor de aminoácidos livres aumentou nos animais arraçoados com teores crescentes de proteína. Este perfil foi acompanhado por um aumento significativo das atividades de GDH e arginase, a partir de 30 e 40% PB, respectivamente. (Figura 6).

O perfil metabólico renal relacionado às proteínas, não mostrou alterações em função do nível de proteína das rações.

Tabela 7: Padrão metabólico de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

Órgão	Metabólito	Tratamentos – Proteína Bruta na ração			
		20% PB	30% PB	40% PB	50% PB
<i>Plasma</i>					
	Glicose	9,56 ± 0,93 ^a	7,10 ± 0,83 ^b	8,14 ± 0,83 ^b	5,21 ± 0,53 ^c
	Lactato	0,75 ± 0,06 ^a	0,39 ± 0,02 ^b	0,33 ± 0,05 ^b	0,13 ± 0,02 ^c
	Piruvato	0,31 ± 0,02	0,35 ± 0,016	0,26 ± 0,016	0,26 ± 0,017
	Amônia	4,53 ± 0,25	2,4 ± 0,16	4,51 ± 1,19	2,1 ± 0,6
	Uréia	0,59 ± 0,1	0,51 ± 0,08	0,65 ± 0,11	0,82 ± 0,14
	Proteína ¹	61,52 ± 3,1	54,42 ± 5,2	45,5 ± 4,7	45,7 ± 5,9
	Aminoácidos livres	1,34 ± 0,14	1,17 ± 0,02	1,54 ± 0,08	1,32 ± 0,07
	Ácidos graxos livres	24,96 ± 6,1 ^a	7,71 ± 1,14 ^b	17,3 ± 3,3 ^b	30,8 ± 6,6 ^a
	Triglicerídeos ¹	0,29 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,31 ± 0,02
<i>Fígado</i>					
	Glicose	259,76 ± 17,33 ^b	306,87 ± 34,1 ^a	211,2 ± 7,36 ^b	240,34 ± 31,96 ^b
	Lactato	5,81 ± 0,5 ^a	6,31 ± 0,68 ^a	5,2 ± 0,43 ^a	3,3 ± 0,52 ^b
	Piruvato	1,80 ± 0,20 ^a	1,14 ± 0,11 ^b	1,11 ± 0,02 ^b	1,02 ± 0,01 ^c
	Glicogênio	392,6 ± 27,12 ^b	454,9 ± 10,34 ^a	308,7 ± 6,26 ^c	184,63 ± 12,5 ^d
	Proteína ¹	220,12 ± 23,3	154,91 ± 18,2	210,50 ± 37,5	205,23 ± 36,2
	Aminoácidos livres	6,65 ± 0,61 ^c	9,01 ± 1,14 ^c	11,4 ± 1,24 ^b	18,6 ± 5,11 ^a
	GDH ²	542,4 ± 65,23 ^c	409,4 ± 29,3 ^c	787,2 ± 74,1 ^b	976,54 ± 49,8 ^a
	Arginase ³	16,02 ± 2,3 ^b	15,3 ± 1,7 ^b	13,7 ± 1,4 ^b	27,6 ± 3,3 ^a
<i>Rim</i>					
	Glicose	9,33 ± 0,7 ^b	10,5 ± 0,7 ^b	13,7 ± 0,8 ^a	14,5 ± 1,9 ^a
	Lactato	1,18 ± 0,12	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,05	1,04 ± 0,04
	Piruvato	0,8 ± 0,02 ^a	0,64 ± 0,04 ^b	0,61 ± 0,06 ^b	0,65 ± 0,06 ^b
	Glicogênio	23,34 ± 1,5 ^a	21,2 ± 1,4 ^a	20,5 ± 1,5 ^a	12,1 ± 0,5 ^b
	Proteína ¹	189,7 ± 23,8	163,6 ± 20,35	233,5 ± 17,3	131,9 ± 12,24
	Aminoácidos livres	11,92 ± 0,6	7,1 ± 2,25	11,9 ± 3,3	17,3 ± 7,1
	GDH ²	304,1 ± 27,91	334,96 ± 27,4	323,16 ± 51,5	285,8 ± 10,8
	Arginase ³	12,6 ± 4,7	19,8 ± 6,1	20,9 ± 3,08	15,52 ± 4,21
<i>Músculo Branco</i>					
	Glicose	56,14 ± 5,86	60,55 ± 6,4	61,31 ± 4,2	63,4 ± 3,7
	Lactato	10,2 ± 1,9	11,2 ± 1,5	12,02 ± 0,9	9,6 ± 0,9
	Piruvato	0,57 ± 0,05 ^b	0,52 ± 0,016 ^b	0,58 ± 0,017 ^b	0,77 ± 0,084 ^a
	Glicogênio	15,9 ± 0,6	15,7 ± 1,3	17,0 ± 0,6	15,8 ± 1,1
	Proteína ¹	249,6 ± 31,8 ^b	362,9 ± 15,6 ^a	297,2 ± 19,4 ^a	199,4 ± 21,8 ^b
	Aminoácidos livres	5,7 ± 2,4 ^a	7,7 ± 3,5 ^a	4,5 ± 1,99 ^a	2,01 ± 0,2 ^b

Dados reportados como média ± s.e.m. (n=6); PB: proteína bruta

Concentrações: (μmol/g tecido ou ml plasma); ¹(mg/g tecido ou ml plasma); ²(μmol/min/mg proteína);

³(nmol/min/mg proteína)

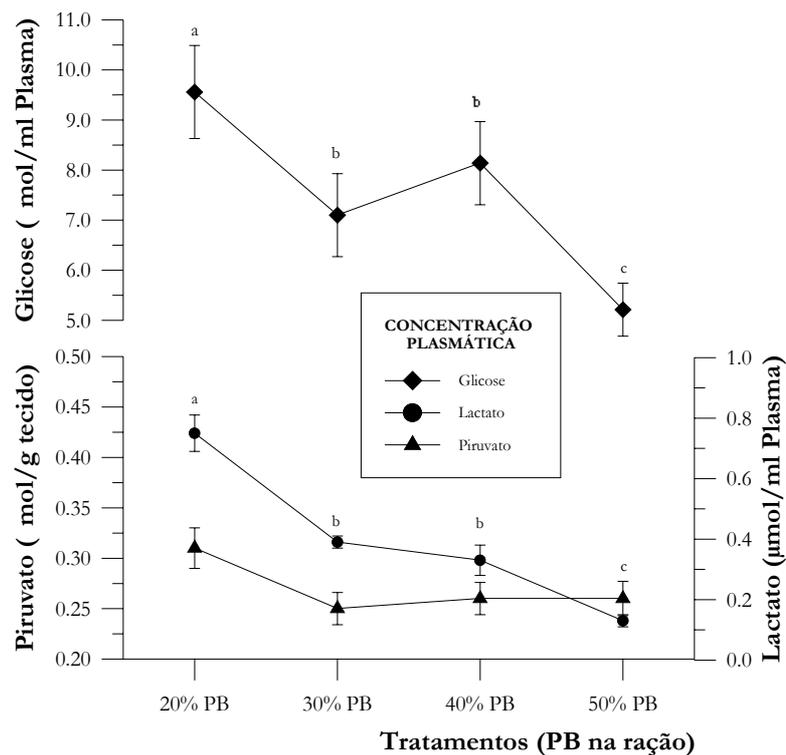


Figura 1: Perfil glicídico no plasma de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável.

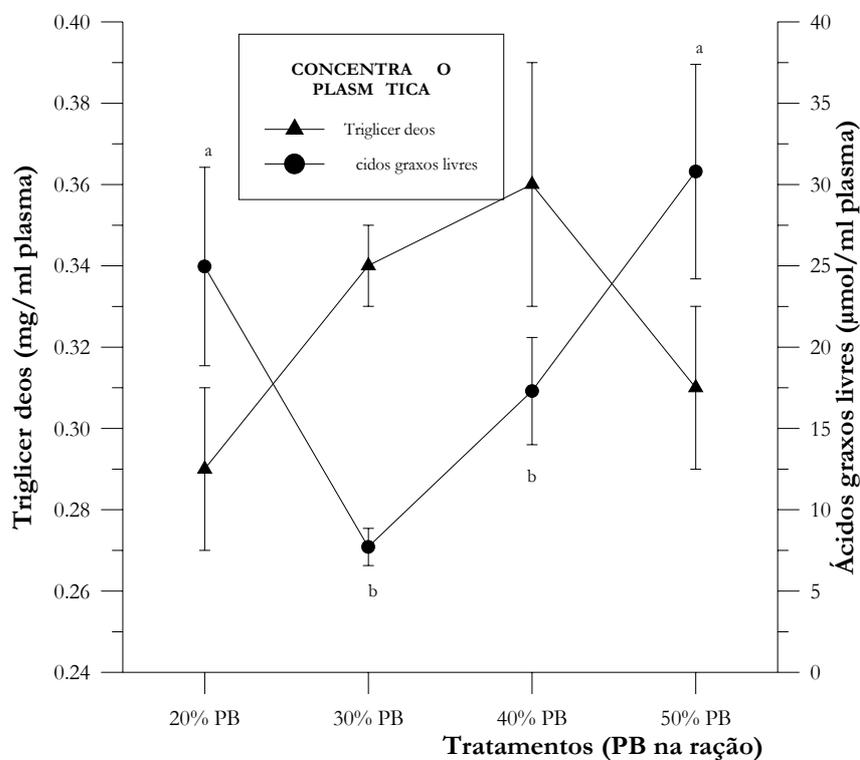


Figura 2: Perfil lipídico do plasma de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável.

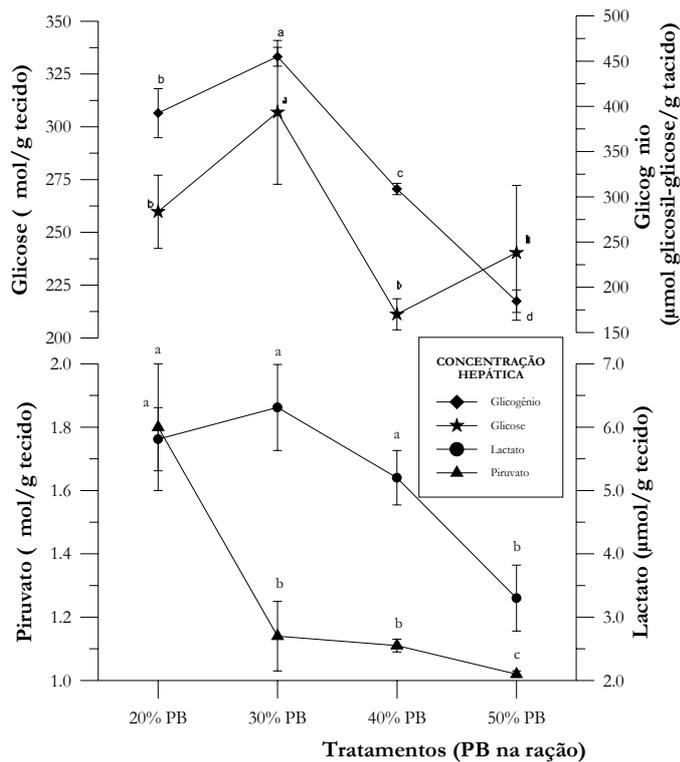


Figura 3: Perfil glicídico do fígado de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável

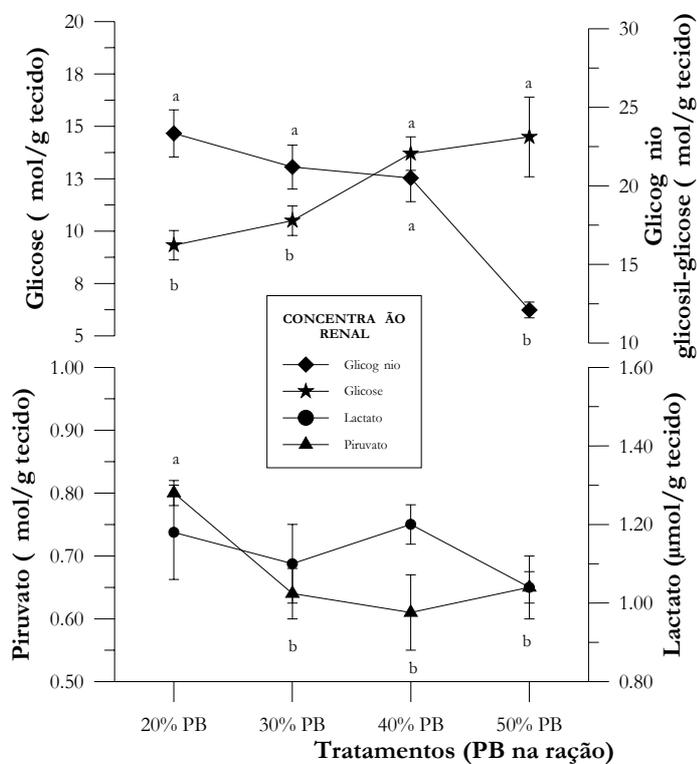


Figura 4: Perfil glicídico do rim de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável.

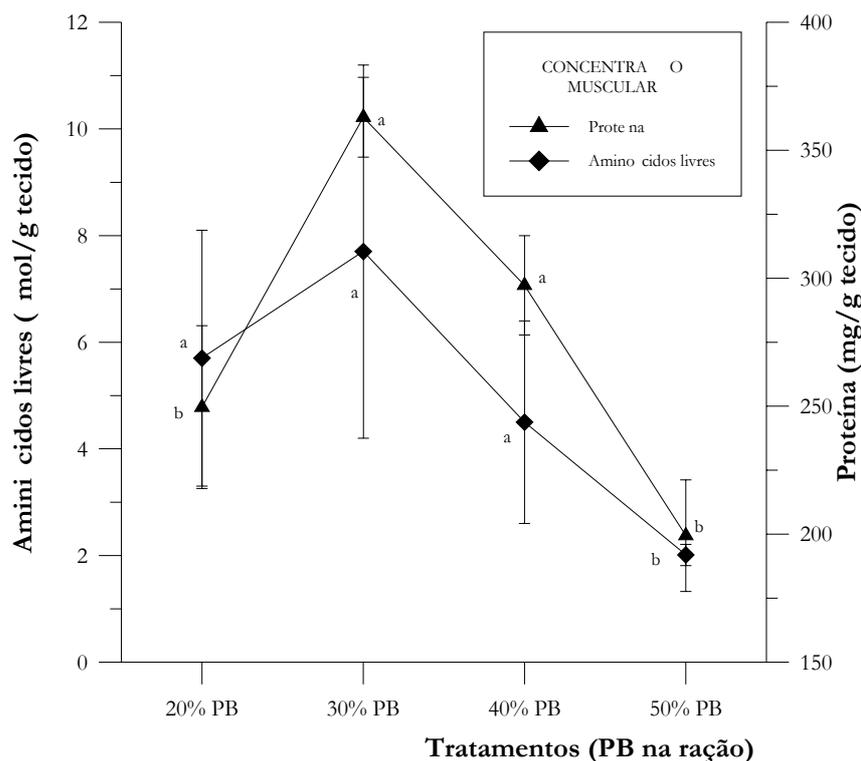


Figura 5: Perfil de proteínas e de aminoácidos livres no músculo branco de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável.

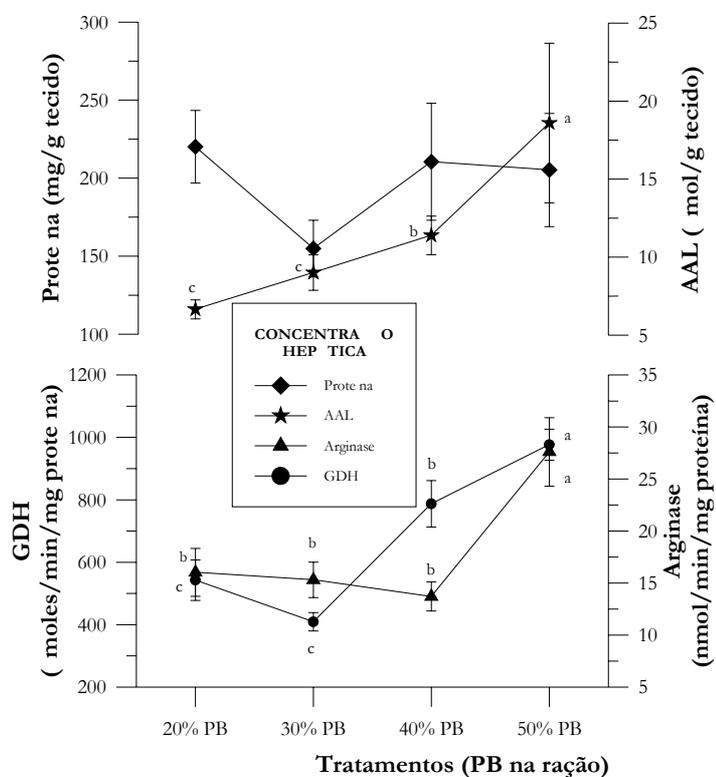


Figura 6: Perfil metabólico protéico do fígado de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável.

5.2.2 Variação de energia bruta na dieta

Os dados referentes ao perfil metabólico nos peixes arraçoados com diferentes teores de energia bruta estão relacionados na tabela 8. A concentração de triglicerídeos plasmáticos decresceu nos animais arraçoados com quantidades superiores a 3.500 kcal EB/kg de ração. Resposta inversa foi observada para os ácidos graxos livres (AGL), superior no tratamento com maior quantidade de energia (Figura 7). Não foram observadas variações nas concentrações de glicose e piruvato plasmáticos. Observou-se uma redução nos valores de lactato, a partir de 3.500 kcal EB/kg (Figura 8). A concentração de aminoácidos livres reduziu e a de uréia aumentou em função do aumento de energia bruta na dieta (Figura 9). As concentrações de proteína e amônia foram menores para os tratamentos contendo 3.850 e 4.200kcal/kg.

O aumento no teor de energia bruta da dieta promoveu alterações significativas nas concentrações dos intermediários metabólicos no fígado. Observou-se uma queda nas concentrações de glicose e piruvato, e constância nas de glicogênio e lactato (Figura 10). A concentração de proteína na dieta e a atividade da enzima GDH não variaram, porém, observou-se um aumento nos aminoácidos livres e redução na atividade de arginase (Figura 11). No mesmo sentido observou-se aumento nas concentrações de ácidos graxos livres e triglicerídeos hepáticos, promovidos pelo aumento da energia bruta das dietas (Figura 12).

As reservas de glicogênio e glicose no rim mantiveram-se constantes. Entretanto, os teores de lactato decresceram e os de piruvato aumentaram com a energia bruta na ração (Figura 13). A atividade da GDH foi estimulada e a da arginase manteve-se constante, assim como as concentrações de proteína e aminoácidos. As concentrações renais de triglicerídeos subiram significativamente e, mesmo não apresentando diferença significativa, as de ácidos graxos livres acompanharam o aumento de energia bruta da dieta (Figura 14).

Os estoques de glicogênio e glicose do tecido muscular branco mantiveram-se constantes. Entretanto, os teores de lactato e piruvato aumentaram com o aumento de energia bruta na dieta (Figura 15). As concentrações de proteína e aminoácidos livres não sofreram influência da quantidade de energia bruta das dietas. A atividade da enzima GDH mostrou-se induzida para os tratamentos contendo 3.850 e 4.200 kcal, embora tenha apresentado valores muito inferiores aos apresentados pelo rim e principalmente pelo fígado. Foram observados apenas traços de atividade da enzima arginase no músculo branco. Seguindo o mesmo perfil apresentado pelos demais compartimentos tissulares analisados, as concentrações de triglicerídeos e ácidos graxos livres aumentaram no tecido muscular branco em função do aumento da energia bruta da dieta (Figura 16).

Tabela 8: Padrão metabólico de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

Órgão	Metabólito	Tratamentos - Energia Bruta na ração			
		3500 kcal	3850 kcal	4200 kcal	4550 kcal
Plasma					
	Glicose	13,4 ± 0,9	11,5 ± 1,1	14,2 ± 1,1	13,5 ± 1,1
	Lactato	2,32 ± 0,3 ^a	1,23 ± 0,1 ^b	1,24 ± 0,1 ^b	1,44 ± 0,2 ^b
	Piruvato	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,02
	Amônia	4,78 ± 0,4	4,1 ± 0,3	3,6 ± 0,2	4,7 ± 0,2
	Uréia	1,18 ± 0,11 ^b	1,78 ± 0,14 ^a	1,67 ± 0,98 ^a	2,0 ± 0,16 ^a
	Proteína ¹	35,72 ± 1,78	26,06 ± 1,97	29,29 ± 2,74	34,57 ± 2,53
	Aminoácidos livres	4,3 ± 0,23 ^a	3,36 ± 0,27 ^b	2,91 ± 0,24 ^b	3,3 ± 0,11 ^b
	Ácidos graxos livres	22,06 ± 1,06 ^b	15,6 ± 3,6 ^b	19,3 ± 4,4 ^b	44,7 ± 5,98 ^a
	Triglicérides ¹	0,84 ± 0,12 ^a	0,28 ± 0,03 ^b	0,21 ± 0,01 ^b	0,24 ± 0,01 ^b
Fígado					
	Glicose	476,96 ± 37,68 ^a	456,56 ± 54,2 ^a	333,38 ± 57,4 ^b	377,01 ± 47,6 ^b
	Lactato	7,5 ± 0,59	7,78 ± 0,98	6,12 ± 0,89	6,48 ± 0,88
	Piruvato	0,703 ± 0,02 ^a	0,78 ± 0,15 ^a	0,44 ± 0,04 ^b	0,65 ± 0,1 ^a
	Glicogênio	334,02 ± 27,41	396,95 ± 37,81	315,49 ± 49,62	329,33 ± 38,97
	Proteína ¹	157,46 ± 7,18	180,86 ± 17,3	170,13 ± 13,9	174,23 ± 7,6
	Aminoácidos livres	23,89 ± 4,08 ^b	45,8 ± 10,38 ^a	48,37 ± 4,68 ^a	52,21 ± 5,45 ^a
	Ácidos graxos livres	158,82 ± 24,8 ^b	185,81 ± 19,5 ^b	229,23 ± 37,9 ^b	382,2 ± 33,1 ^a
	Triglicérides ¹	4,3 ± 0,45 ^b	6,81 ± 0,8 ^a	8,2 ± 1,6 ^a	5,3 ± 0,5 ^b
	GDH ²	653,74 ± 81,9	595,38 ± 110,5	408,08 ± 79,8	633,05 ± 162,5
	Arginase ³	69,2 ± 9,9 ^a	33,42 ± 5,3 ^b	28,31 ± 3,4 ^b	38,5 ± 7,6 ^b
Rim					
	Glicose	15,12 ± 0,48	16,07 ± 0,78	15,87 ± 0,52	15,81 ± 0,51
	Lactato	3,25 ± 0,49 ^a	2,13 ± 0,13 ^b	2,1 ± 0,1 ^b	1,94 ± 0,1 ^b
	Piruvato	0,43 ± 0,02 ^b	0,48 ± 0,02 ^b	0,54 ± 0,03 ^b	0,69 ± 0,09 ^a
	Glicogênio	28,62 ± 2,63	33,4 ± 2,42	32,4 ± 0,9	32,18 ± 1,45
	Proteína ¹	189,96 ± 13,1	174,72 ± 10,3	174,8 ± 10,3	160,1 ± 10,9
	Aminoácidos livres	9,18 ± 0,58	8,14 ± 0,72	8,19 ± 0,66	7,4 ± 1,84
	Ácidos graxos livres	175,1 ± 21,6	160,4 ± 11,5	188,4 ± 19,4	213,5 ± 15,9
	Triglicérides ¹	13,95 ± 1,8 ^b	12,8 ± 1,9 ^b	54,9 ± 12,1 ^a	80,5 ± 30,8 ^a
	GDH ²	268,83 ± 18,3 ^b	377,17 ± 17,9 ^a	329,0 ± 28,36 ^a	321,15 ± 27,9 ^a
	Arginase ³	5,38 ± 0,64 ^c	6,84 ± 1,53 ^b	8,58 ± 0,72 ^a	8,44 ± 1,19 ^a
Músculo Branco					
	Glicose	23,32 ± 1,45	25,6 ± 1,84	27,85 ± 1,16	26,2 ± 1,2
	Lactato	10,6 ± 0,78 ^b	9,5 ± 1,32 ^b	11,5 ± 1,23 ^b	16,6 ± 1,82 ^a
	Piruvato	0,18 ± 0,01 ^b	0,4 ± 0,05 ^a	0,49 ± 0,05 ^a	0,48 ± 0,04 ^a
	Glicogênio	16,41 ± 0,24	15,15 ± 0,94	16,37 ± 0,42	16,82 ± 0,57
	Proteína ¹	147,75 ± 5,7 ^a	131,8 ± 4,5 ^b	145,2 ± 3,9 ^a	150,9 ± 6,9 ^a
	Aminoácidos livres	5,87 ± 0,28	6,67 ± 0,61	6,13 ± 0,56	6,61 ± 0,87
	Ácidos graxos livres	7,5 ± 1,45 ^b	21,5 ± 2,7 ^a	27,9 ± 5,9 ^a	18,8 ± 4,6 ^a
	Triglicérides ¹	0,26 ± 0,25 ^b	0,42 ± 0,19 ^b	3,2 ± 1,5 ^a	4,3 ± 2,3 ^a
	GDH ²	40,73 ± 9,5	77,71 ± 13,1	55,46 ± 5,4	43,28 ± 10,3
	Arginase ³	atividade traço	atividade traço	atividade traço	atividade traço

Dados reportados como média ± s.e.m. (n=10). Concentrações: (μmol/g tecido ou ml plasma);

¹(mg/g tecido ou ml plasma); ²(μmol/min/mg proteína); ³(nmol/min/mg proteína).

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa $P < 0,05$

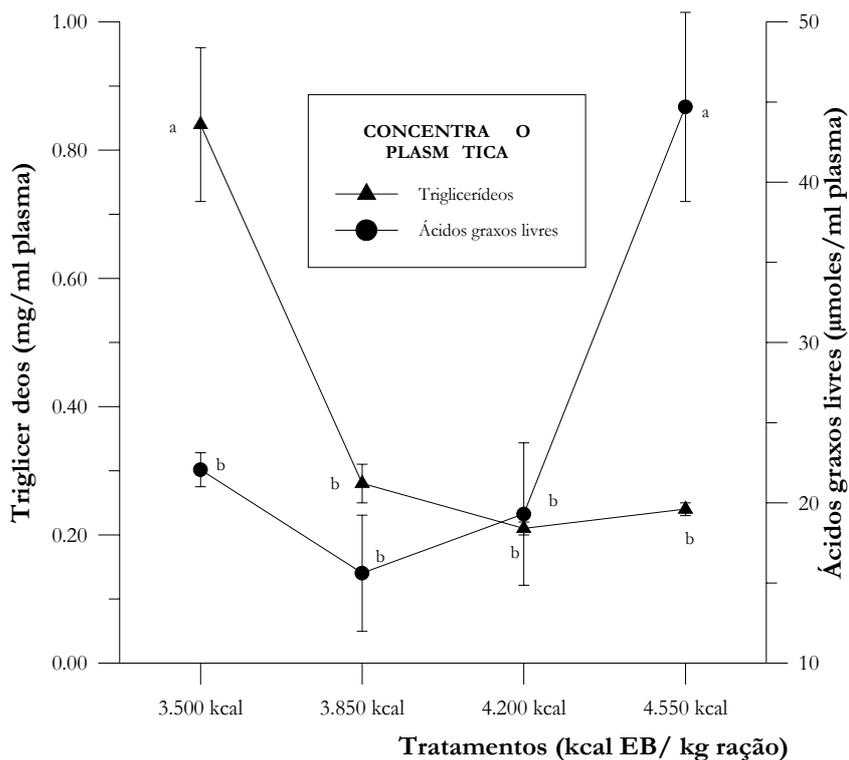


Figura 7: Perfil lipídico do plasma de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

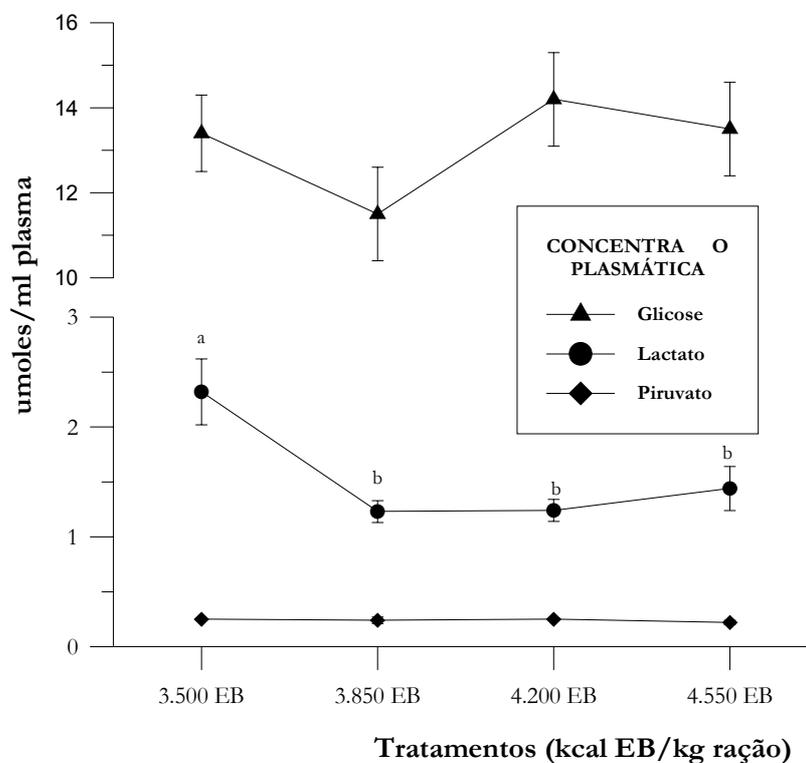


Figura 8: Perfil glicídico do plasma de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

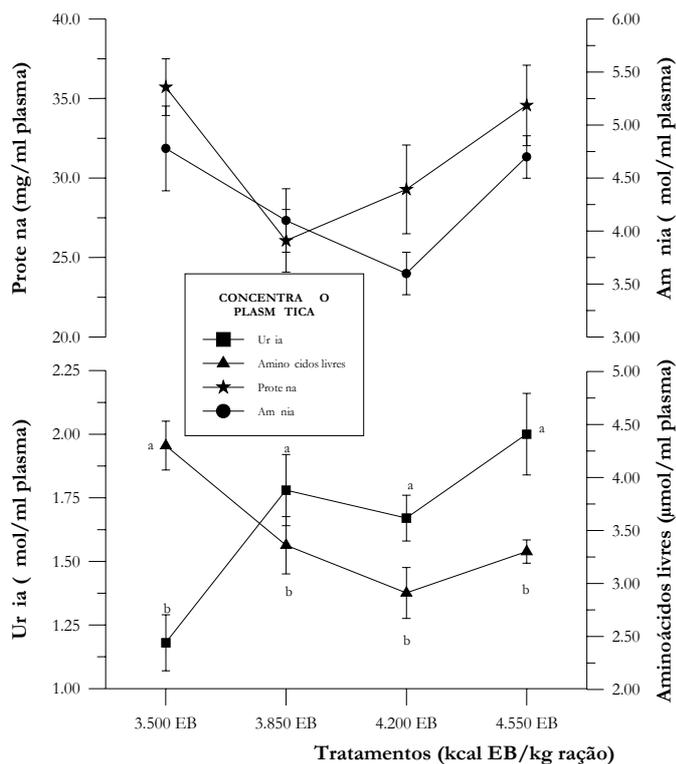


Figura 9: Perfil metabólico protéico do plasma de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

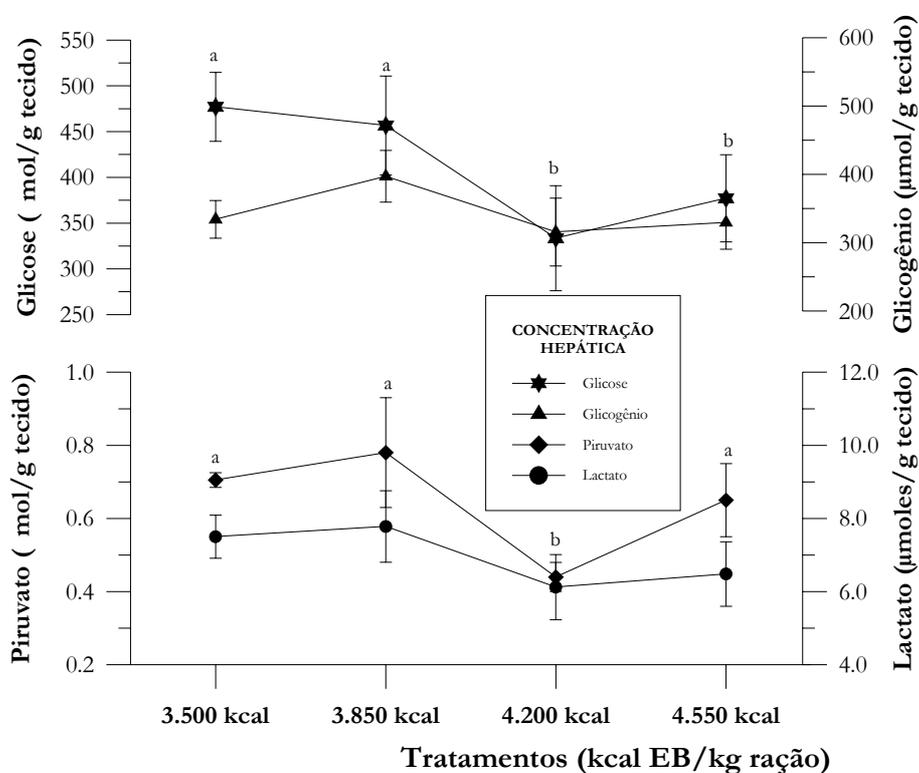


Figura 10: Perfil glicídico hepático de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

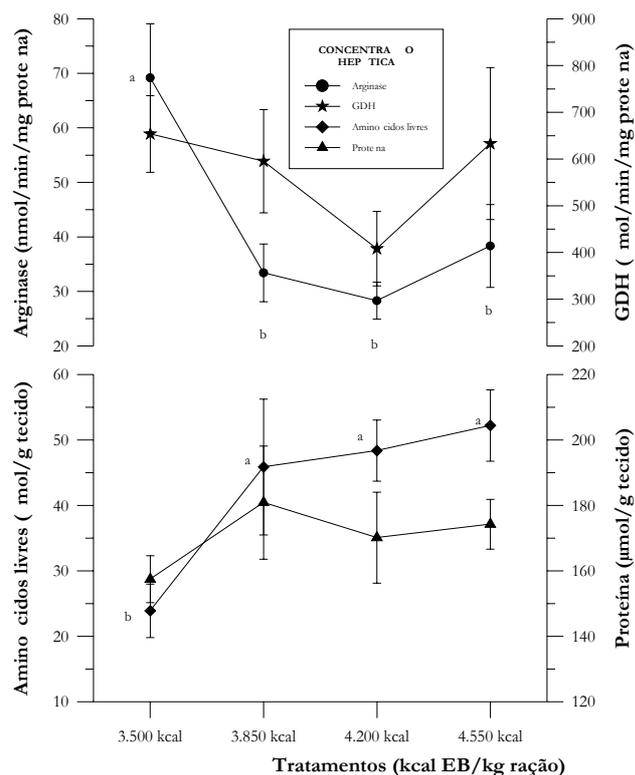


Figura 11: Perfil metabólico protéico do fígado de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

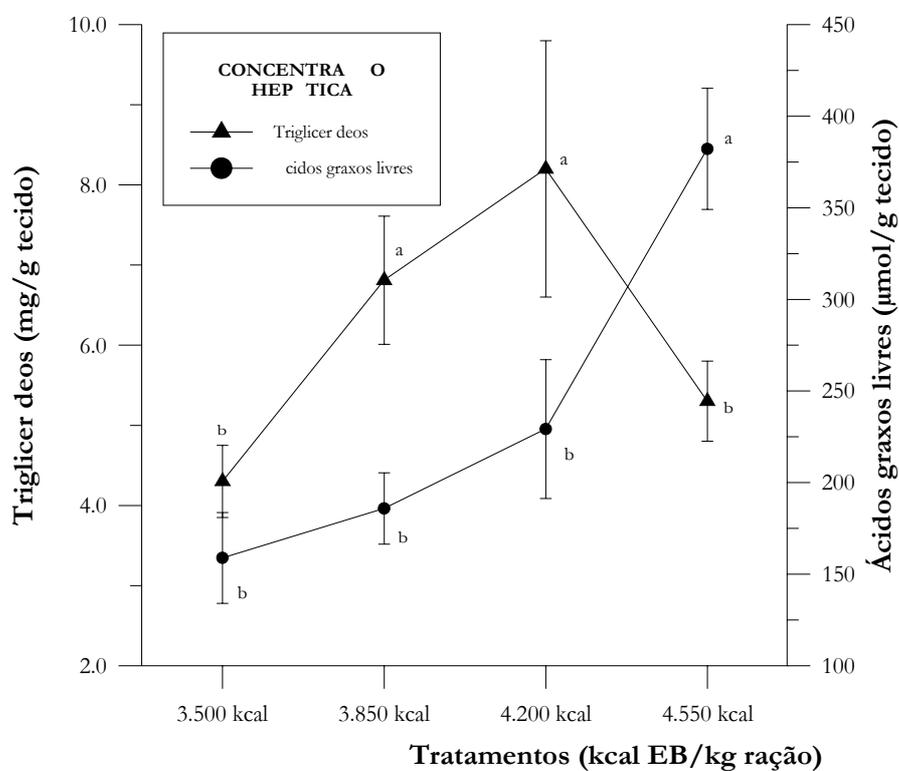


Figura 12: Perfil lipídico do fígado de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

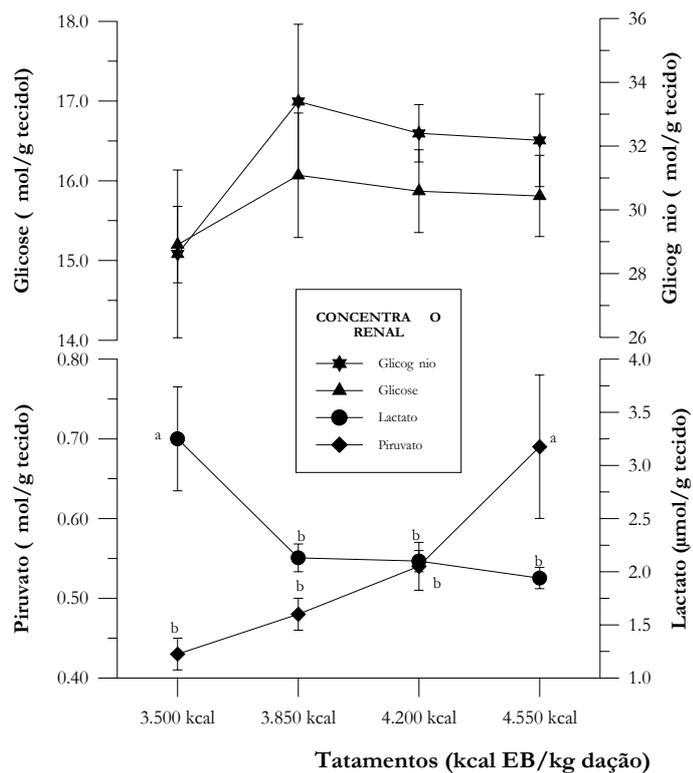


Figura 13: Perfil glicídico no rim de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

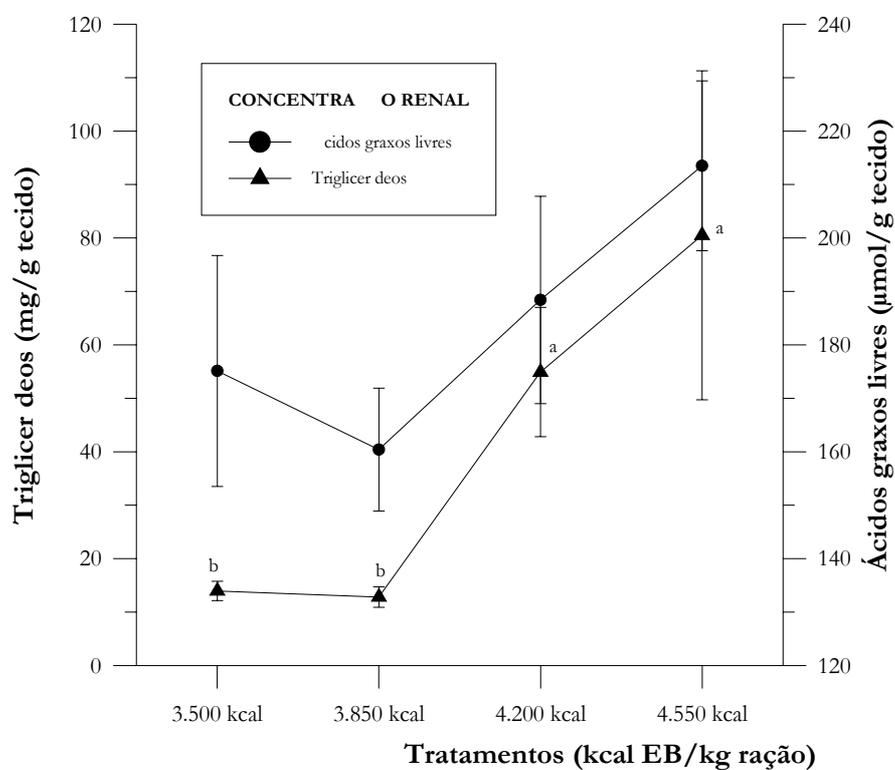


Figura 14: Perfil lipídico do rim de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

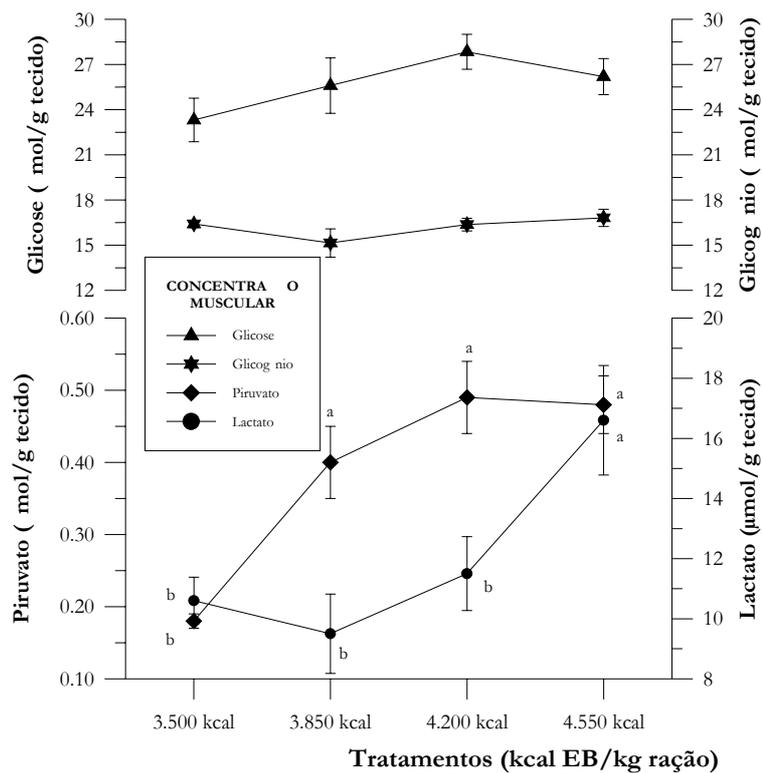


Figura 15: Perfil glicídico do músculo branco de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

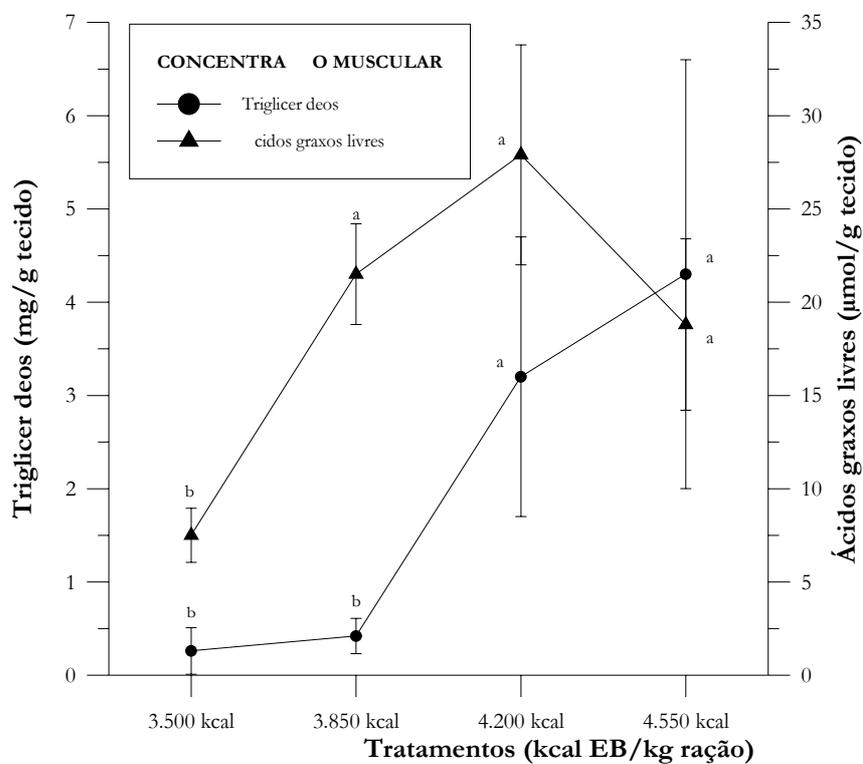


Figura 16: Perfil lipídico do músculo branco de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável

5.3. ENZIMAS DIGESTIVAS

5.3.1 Variação de proteína bruta na dieta

Foi detectada hidrólise de proteína, carboidrato e lipídio ao longo de todo o trato digestório de pintado (Tabela 9). As proteases digestivas foram não responsivas aos diferentes níveis de proteína da dieta na maioria das secções do trato digestório, e as maiores atividades foram verificadas no estômago.

A atividade da protease inespecífica, com atividade preponderante no estômago, mostrou-se muito baixa na porção anterior e nenhuma atividade foi detectada nas porções média e posterior do intestino (Figura 17).

As enzimas proteolíticas específicas, tripsina e quimiotripsina, foram detectadas em todo o trato gastrintestinal. A tripsina apresentou o mesmo padrão de atividade proteolítica, mais alto no estômago (Figura 18) e a quimiotripsina foi igualmente ativa nas porções compreendendo o estômago e as secções anterior e posterior do intestino (Figura 19).

A atividade amilohidrolítica do estômago foi responsiva aos níveis de amido de milho da dieta, e os maiores valores foram observados entre 25 e 13% de amido, correspondendo a 30 e 40% PB, respectivamente (Figura 20). Mesmo não apresentando diferença significativa, o perfil de atividade da amilase manteve-se constante nas demais porções do intestino analisadas.

Atividade lipolítica foi observada em cada secção do trato gastrintestinal e os maiores valores de lipase foram detectados na porção média do intestino (Figura 21).

Tabela 9: Atividade enzimática nas diferentes secções do trato gastrointestinal de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável.

Enzima	Secção	PB na Dieta			
		20% PB	30% PB	40% PB	50% PB
Protease Inespecífica (U/mg proteína)					
	Estômago	53,8 ± 16,4	79,2 ± 15,5	52,6 ± 9,1	60,7 ± 17,2
	I. Anterior	0,60 ± 0,017 ^b	1,03 ± 0,022 ^a	0,43 ± 0,022 ^b	0,46 ± 0,05 ^b
	I. Médio	-	-	-	-
	I. Posterior	-	-	-	-
<i>Tripsina (U/mg proteína)</i>					
	Estômago	3,6 ± 0,68	3,6 ± 0,57	2,7 ± 0,45	4,2 ± 0,60
	I. Anterior	0,24 ± 0,05 ^b	0,18 ± 0,02 ^b	0,33 ± 0,07 ^a	0,41 ± 0,06 ^a
	I. Médio	0,75 ± 0,14 ^a	0,56 ± 0,11 ^a	0,61 ± 0,13 ^a	0,22 ± 0,04 ^b
	I. Posterior	0,34 ± 0,23	0,53 ± 0,22	0,33 ± 0,12	0,19 ± 0,05
Quimiotripsina (mU/mg proteína)					
	Estômago	1,20 ± 0,17	1,40 ± 0,16	1,50 ± 0,16	1,50 ± 0,18
	I. Anterior	0,48 ± 0,14	0,40 ± 0,04	0,58 ± 0,11	0,62 ± 0,05
	I. Médio	0,83 ± 0,09 ^b	1,34 ± 0,17 ^a	1,51 ± 0,09 ^a	0,97 ± 0,08 ^b
	I. Posterior	1,18 ± 0,19	0,97 ± 0,08	1,21 ± 0,10	0,96 ± 0,09
Amilase (U/mg proteína)					
	Estômago	0,012 ± 0,010 ^b	0,180 ± 0,016 ^a	0,140 ± 0,020 ^a	0,030 ± 0,010 ^b
	I. Anterior	0,023 ± 0,008	0,053 ± 0,010	0,032 ± 0,007	0,027 ± 0,008
	I. Médio	0,013 ± 0,005	0,022 ± 0,014	0,020 ± 0,009	0,022 ± 0,016
	I. Posterior	0,012 ± 0,008	0,029 ± 0,019	0,011 ± 0,004	0,003 ± 0,002
Lipase (U/mg proteína)					
	Estômago	3,8 ± 0,95 ^a	1,9 ± 0,32 ^b	3,1 ± 0,25 ^a	3,9 ± 0,5 ^a
	I. Anterior	5,53 ± 0,46 ^b	6,68 ± 0,61 ^b	5,89 ± 0,95 ^b	14,49 ± 2,4 ^a
	I. Médio	12,52 ± 0,82	15,05 ± 2,66	28,14 ± 10,33	26,04 ± 6,64
	I. Posterior	4,96 ± 0,98	6,04 ± 0,56	9,11 ± 3,17	5,78 ± 0,69

Dados reportados como média ± s.e.m. (n=6); PB: proteína bruta;
Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística (P < 0,05) na mesma linha.

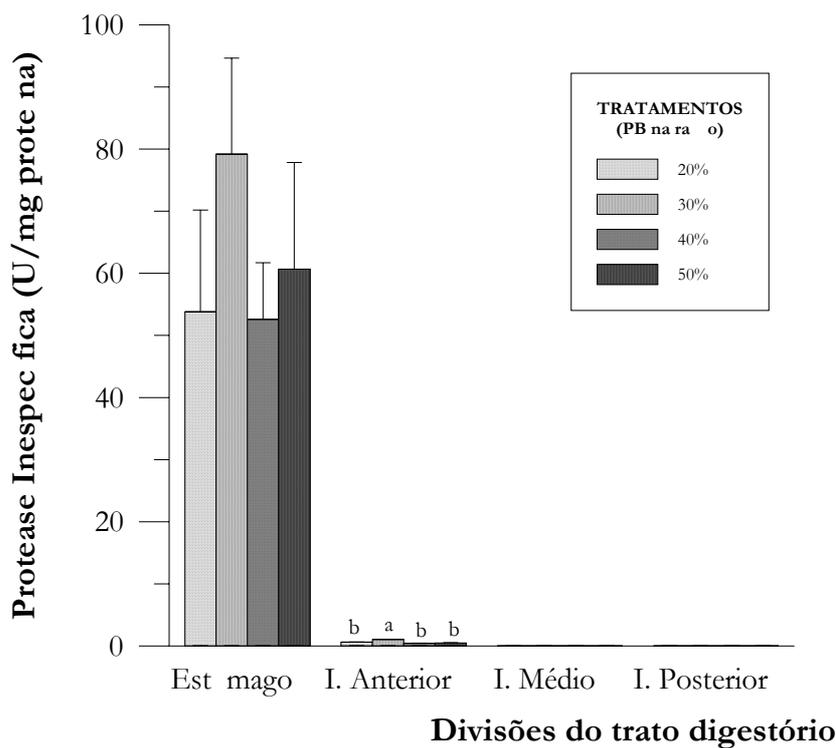


Figura 17: Atividade proteolítica inespecífica nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

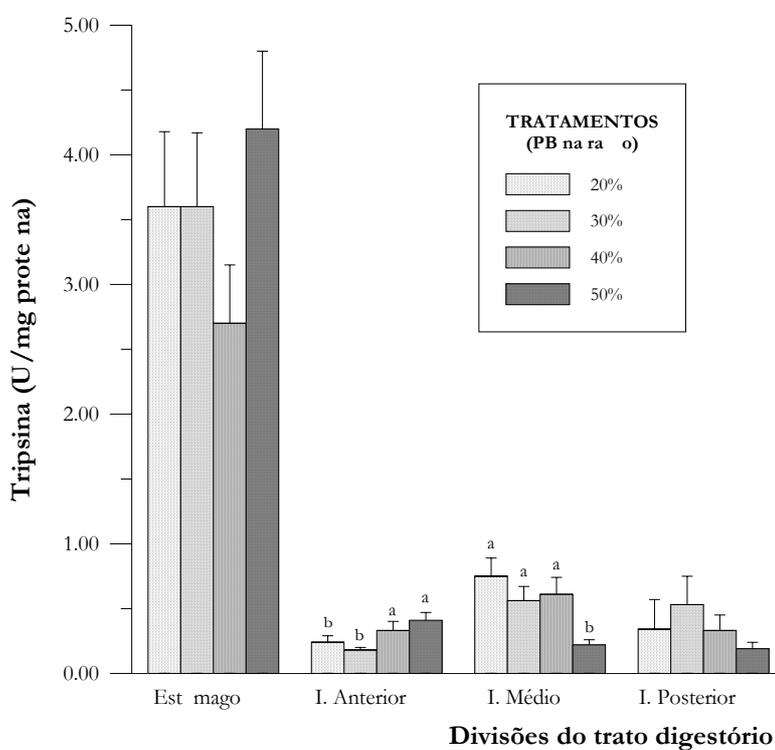


Figura 18: Atividade da tripsina nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

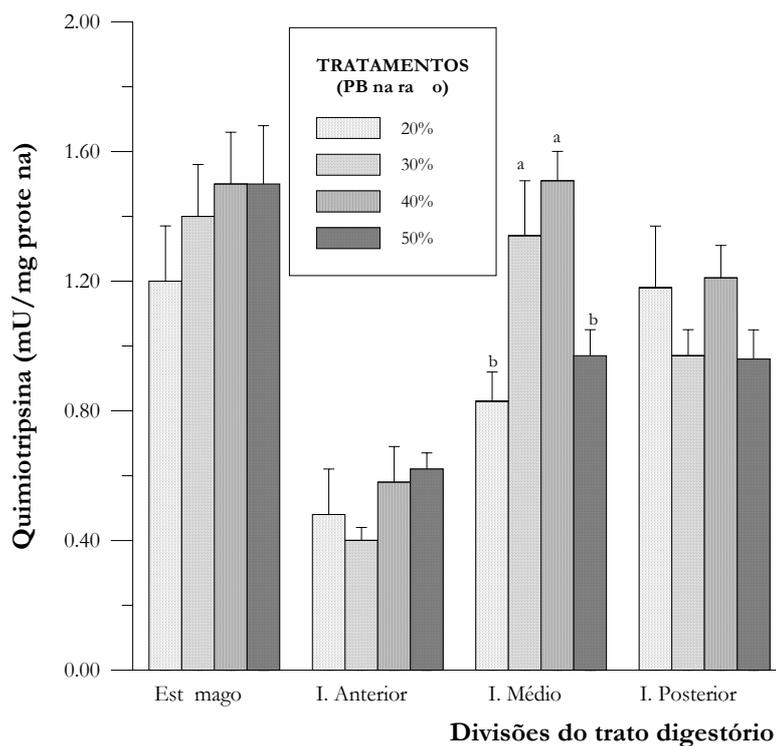


Figura 19: Atividade da quimiotripsina nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

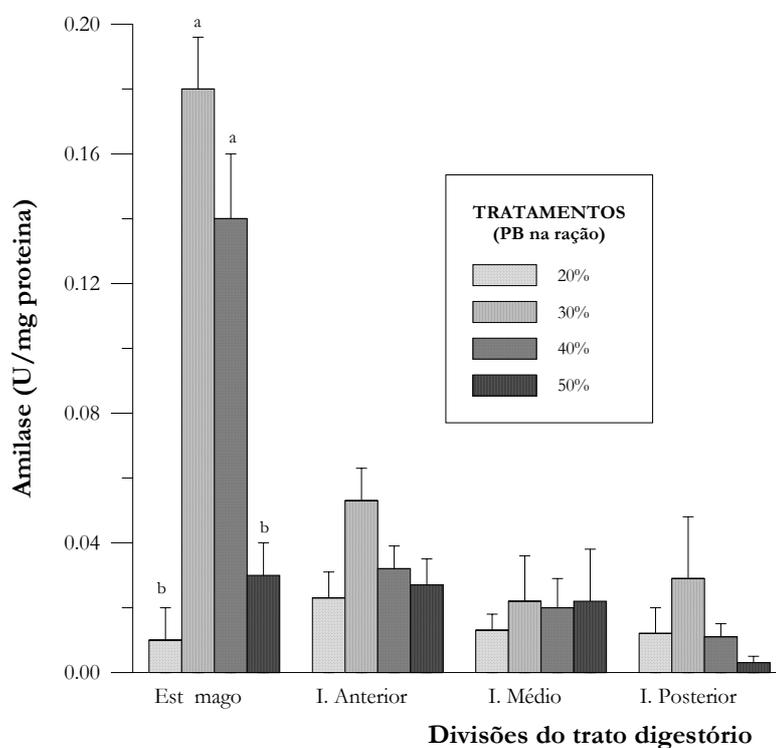


Figura 20: Atividade da amilase nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

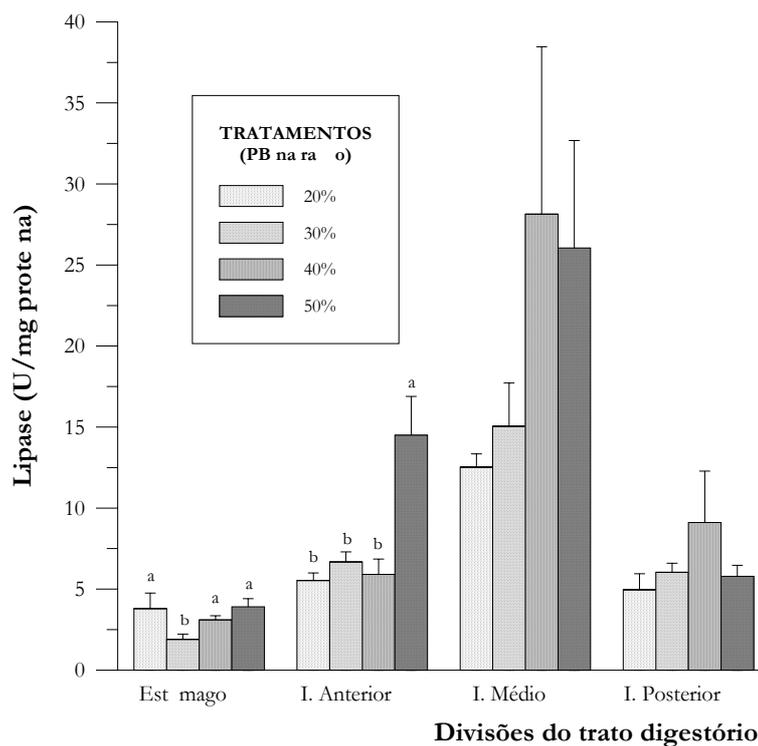


Figura 21: Atividade da lipase nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dieta proteína-variável.

5.3.2 Variação de energia bruta na dieta

O perfil enzimático dos juvenis de *P. corruscans* submetidos a variação nos níveis de energia bruta na dieta também apresentou atividade hidrolítica de proteína, carboidrato e lipídio ao longo de todo o trato digestório (Tabela 10).

A atividade de protease inespecífica apresentou seus maiores valores no estômago e os menores no intestino anterior. Em ambos os segmentos as atividades foram aumentadas em função do teor crescente de energia bruta nas rações. Por outro lado, não foram detectadas atividades nas porções média e posterior do intestino (Figura 22).

A tripsina mostrou-se regularmente distribuída nas diferentes porções do trato digestório analisadas. No estômago, apresentou queda significativa inversamente proporcional ao conteúdo de energia da dieta. Na porção anterior, as menores atividades foram apresentadas pelos tratamentos contendo 3.850 e 4.200 kcal/kg, e o restabelecimento dos valores de atividade foi observado com 4.550 kcal/kg. Não foram detectadas diferenças significativas no segmento médio e posterior (Figura 23).

Assim como a tripsina, a quimiotripsina apresentou-se igualmente distribuída pelas secções gastrintestinais, e as atividades diminuíram significativamente com o aumento dos teores de energia bruta na dieta, em praticamente todas as porções do trato analisadas, com exceção da porção anterior (Figura 24).

As maiores atividades de amilase foram observadas na porção anterior do intestino. Mesmo apresentando aumento significativo de atividade amilohidrolítica somente no estômago, a mesma tendência foi observada nas demais porções do intestino (Figura 25).

As maiores atividades de lipase foram observadas nas porções anterior e média do intestino, caracterizadas por acentuada queda em função do aumento de lipídios nas dietas. O estômago esboçou uma ligeira diminuição seguida de restabelecimento da atividade para o maior teor de energia bruta da dieta. Não foram observadas variações de atividade lipolítica no intestino posterior (Figura 26).

Tabela 10: Atividade enzimática nas diferentes secções do trato gastrintestinal de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas energia-variável.

Enzima	Secção	EB na Dieta			
		3.500 kcal	3.850 kcal	4.200 kcal	4.550 kcal
<i>Protease Inespecífica</i>					
	Estômago	18,2 ± 1,4 ^b	15,4 ± 2,4 ^b	23,64 ± 3,6 ^a	25,94 ± 3,5 ^a
	I. Anterior	2,11 ± 0,9 ^b	5,96 ± 1,5 ^a	4,23 ± 1,3 ^a	7,32 ± 2,3 ^a
	I. Médio	-	-	-	-
	I. Posterior	-	-	-	-
Tripsina					
	Estômago	0,26 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,04 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,02 ^b
	I. Anterior	0,28 ± 0,05 ^a	0,18 ± 0,03 ^b	0,16 ± 0,02 ^b	0,25 ± 0,02 ^a
	I. Médio	0,29 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,33 ± 0,03
	I. Posterior	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,24 ± 0,02
<i>Quimiotripsina</i>					
	Estômago	0,70 ± 0,04 ^a	0,64 ± 0,08 ^a	0,50 ± 0,04 ^b	0,52 ± 0,04 ^b
	I. Anterior	0,57 ± 0,07 ^b	0,89 ± 0,09 ^a	0,50 ± 0,07 ^b	0,91 ± 0,11 ^a
	I. Médio	0,43 ± 0,02 ^b	0,55 ± 0,05 ^a	0,47 ± 0,02 ^b	0,43 ± 0,02 ^b
	I. Posterior	0,33 ± 0,02 ^a	0,32 ± 0,02 ^a	0,28 ± 0,01 ^b	0,28 ± 0,01 ^b
<i>Amilase</i>					
	Estômago	0,034 ± 0,01 ^b	0,026 ± 0,004 ^b	0,015 ± 0,002 ^c	0,052 ± 0,01 ^a
	I. Anterior	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,02
	I. Médio	0,013 ± 0,002	0,016 ± 0,003	0,011 ± 0,002	0,024 ± 0,004
	I. Posterior	0,013 ± 0,001	0,01 ± 0,003	0,011 ± 0,003	0,014 ± 0,002
<i>Lípase</i>					
	Estômago	2,67 ± 0,2 ^a	1,86 ± 0,2 ^b	1,5 ± 0,1 ^b	2,54 ± 0,2 ^a
	I. Anterior	13,9 ± 0,8 ^a	9,95 ± 0,4 ^b	10,1 ± 0,5 ^b	10,2 ± 0,4 ^b
	I. Médio	14,63 ± 1,2 ^a	13,5 ± 0,8 ^a	8,98 ± 0,7 ^b	9,8 ± 0,7 ^b
	I. Posterior	3,6 ± 0,6	3,02 ± 0,3	4,2 ± 0,5	3,35 ± 0,3

Dados reportados como média ± s.e.m. (n=10); EB: energia bruta;
Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) na mesma linha.

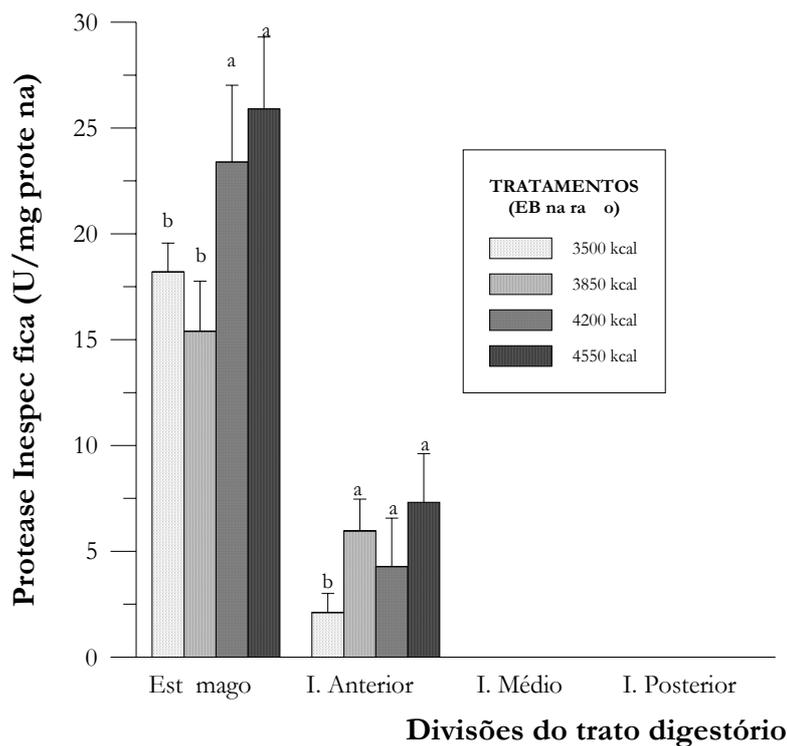


Figura 22: Atividade proteolítica inespecífica nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas energia-variável.

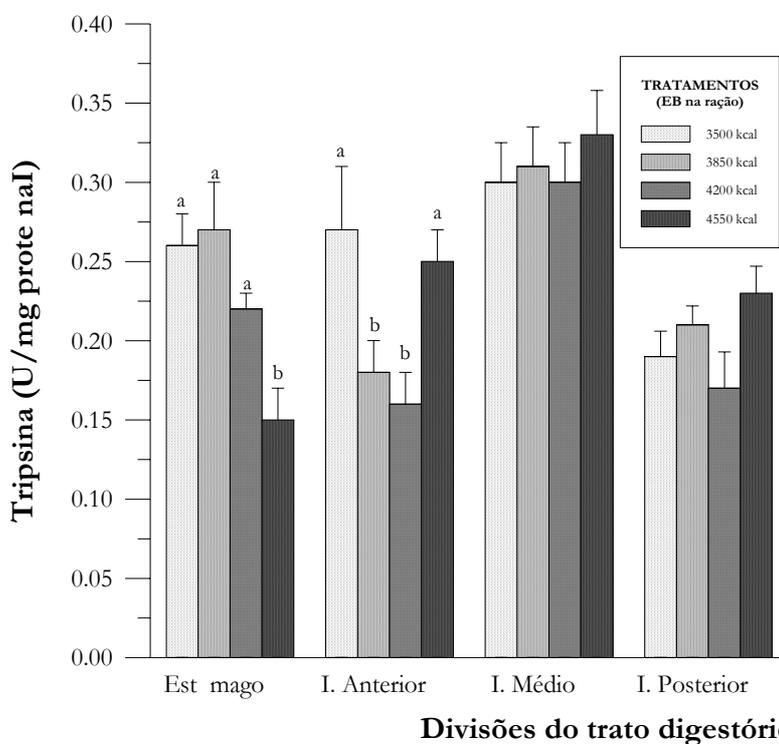


Figura 23: Atividade da tripsina nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas energia-variável.

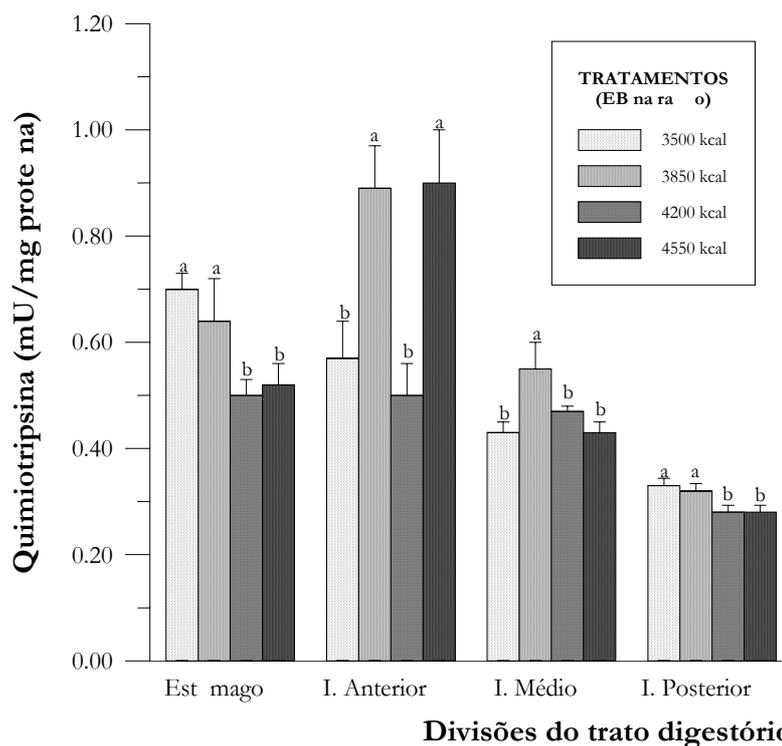


Figura 24: Atividade da quimiotripsina nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas energia-variável.

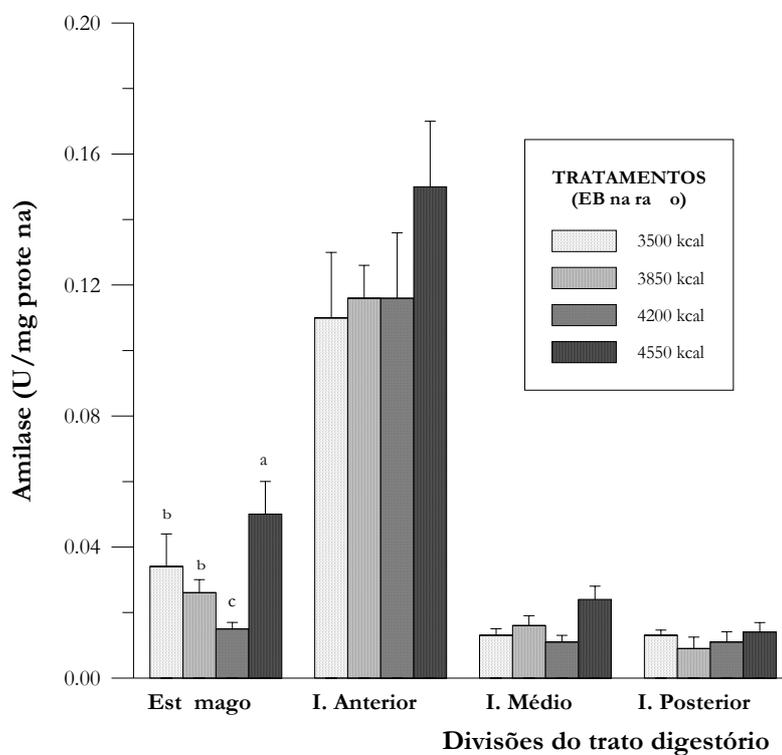


Figura 25: Atividade da amilase nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas energia-variável.

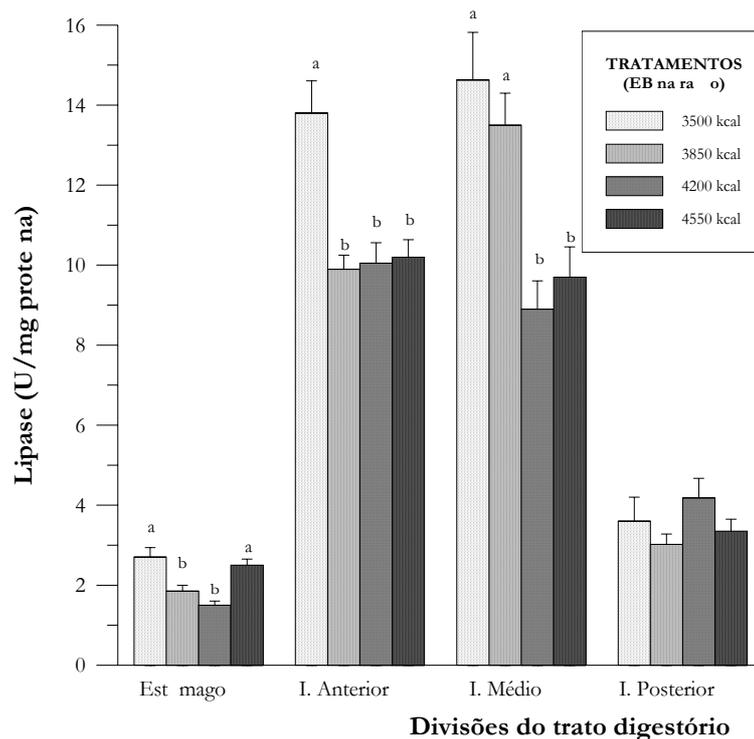


Figura 26: Atividade da lipase nas diferentes porções do trato digestório de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas energia-variável.

5.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA

Em relação à coloração e morfologia do fígado, estômago, intestino, vesícula biliar e rim, constatou-se macroscopicamente que não houve qualquer diferença entre os tratamentos. O intestino foi dividido para as análises em três porções, das quais as duas primeiras são separadas da última, ou posterior, pela presença de um estreitamento correspondente à valva íleo-retal, que pode ser vista a olho nu.

5.4.1 Análise microscópica do intestino

A parede do intestino de pintado mostrou um arranjo estrutural típico do tubo digestório dos vertebrados: a camada mucosa (epitélio colunar simples mais lâmina própria), a submucosa de tecido conjuntivo frouxo e uma túnica muscular dividida em uma camada circular interna e longitudinal externa, recobertas externamente pela camada serosa.

A reação de PAS evidenciou a presença de células caliciformes nas diferentes porções do intestino analisadas. Entretanto, sua intensidade de coloração variou no sentido antero-posterior, intensificando-se na porção final (Tabela 11 e Figura 27).

Não foi observada a presença de polissacarídeos neutros ou ácidos associados, investigados pela coloração de PAS/AB pH 2,5. Da mesma forma, não foi detectada a presença de glicogênio em nenhuma das porções do intestino, conforme observado nas lâminas onde se empregou a reação de PAS + amilase. Também foram observadas reações negativas na investigação de mucossubstâncias através de AB pH 0,5 e AB pH 2,5 (Tabela 11).

Tabela 11: Resultado dos testes histoquímicos realizados nos cortes transversais das diferentes porções do intestino de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável por 90 dias.

Tratamentos	I. Anterior				I. Médio				I. Posterior			
	20%PB	30%PB	40%PB	50%PB	20%PB	30%PB	40%PB	50%PB	20%PB	30%PB	40%PB	50%PB
PAS*	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
PAS/Amilase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAS/ABpH2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB pH 0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB pH 2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Intensidade de coloração das células calciformes: forte (+++), média (++), fraca (+) ou negativa (-);

5.4.2 Parâmetros Morfométricos

Os parâmetros morfométricos analisados, apresentados na Figura 28, mostram alterações morfológicas das diferentes porções do intestino de pintado em função da variação de proteína bruta na dieta.

5.4.2.1 Diâmetro do tubo

A quantidade de proteína bruta na ração não alterou o diâmetro total de cada porção intestinal dos animais. Entretanto, nota-se que a porção mediana apresentou um menor calibre quando comparada com as demais (Figura 29).

5.4.2.2 Altura do epitélio

O único efeito evidenciado pela quantidade de proteína em relação à altura do epitélio da mucosa do intestino de pintado foi observado na porção anterior dos peixes arraçoados com 20% PB (Figura 30). Nos demais tratamentos, assim como para as diferentes porções intestinais analisadas, não foram observadas alterações.

5.4.2.3 Camada mucosa

O padrão de altura da camada mucosa não se alterou para os segmentos anterior e médio do intestino em resposta à quantidade de proteína na dieta. Entretanto, quando comparadas entre si, a porção anterior apresentou o maior padrão de altura da mucosa intestinal com praticamente o dobro da altura das porções média e posterior (Figuras 31 e 32).

O menor padrão de altura foi observado para pregas mucosas da porção posterior do intestino. Nesta secção, os peixes arraçoados com a dieta contendo 30% PB apresentaram as menores pregas. Entretanto, para teores de proteína das dietas superiores a 30%, a altura das pregas da camada mucosa voltou a aumentar.

5.4.2.4 Número de células caliciformes

O aumento dos teores de proteína da dieta resultou em um aumento de células caliciformes em regiões do intestino onde previamente ocorriam em quantidades menores, como no intestino anterior e médio. A resposta mais evidente foi observada na porção proximal, e a distal pouco respondeu ao aumento da proteína da dieta (Figura 33). O número de células caliciformes aumentou significativamente no intestino anterior, principalmente nos animais arraçoados com 30% PB na dieta, chegando até a superar o número de células da porção distal. No intestino médio a responsividade foi também observada para os maiores teores de proteína na dieta.

5.4.2.5 Túnica muscular

A túnica muscular do intestino de pintado consiste de uma camada longitudinal externa e uma camada circular interna, ambas de músculo liso. A camada muscular externa é recoberta pela serosa. O padrão das camadas musculares das porções anterior e média acompanhou de forma semelhante, e coerente, o padrão da mucosa. Na porção posterior do intestino a espessura total das camadas musculares foi superior às demais (Figura 32). A única exceção ocorreu com o tratamento 30% PB, que proporcionou a menor espessura (Figura 34).

5.4.2.6 Diâmetro da luz intestinal

Não houve diferenciação significativa do diâmetro da luz, ou lúmen, entre os tratamentos, considerando-se a mesma porção intestinal. Embora também não tenha havido diferenças significativas deste parâmetro nas diferentes porções, nota-se que o diâmetro é ligeiramente menor na porção intestinal mediana, em relação ao diâmetro nas demais secções do órgão (Figura 35).

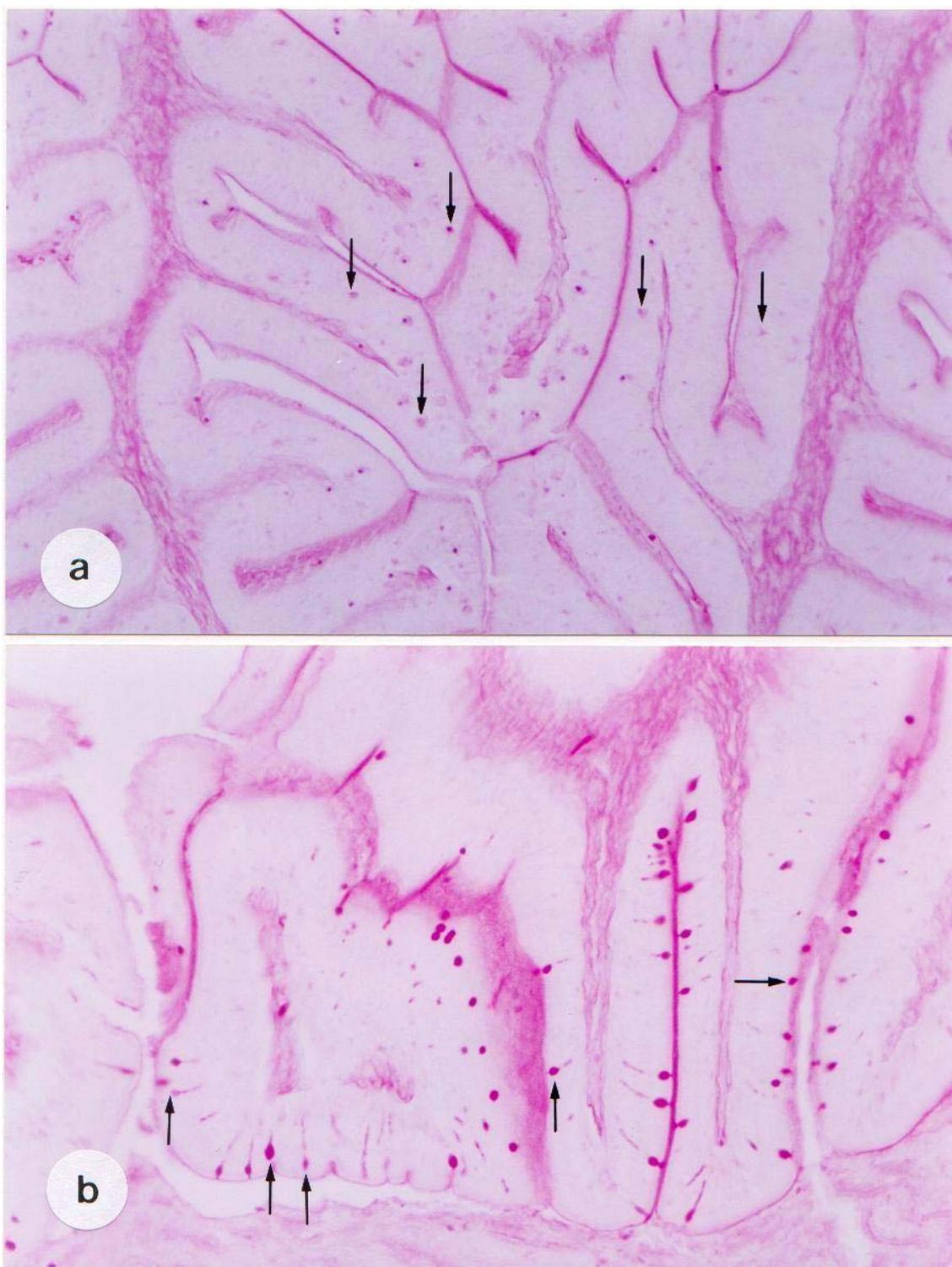
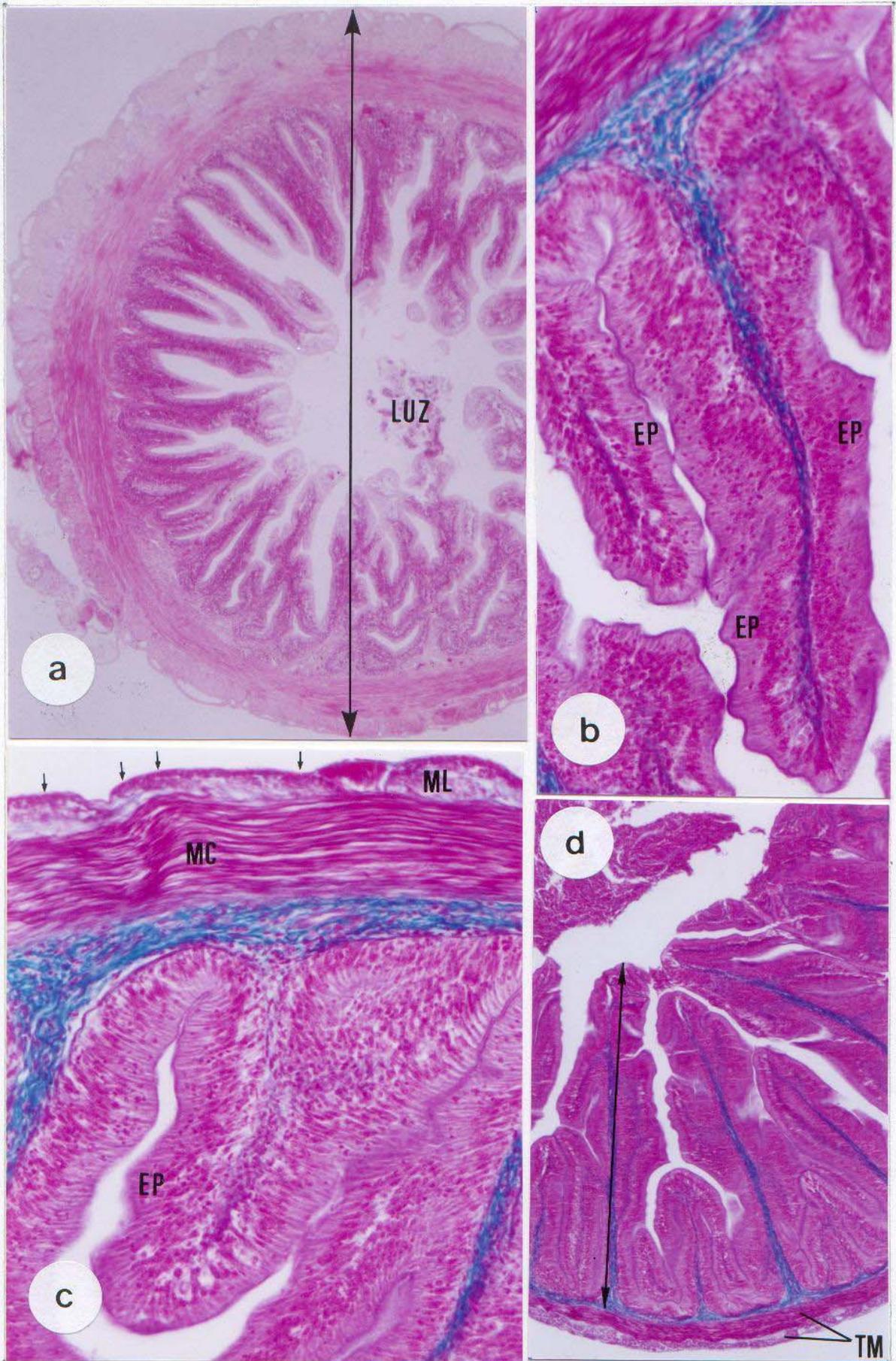


Figura 27: Características histoquímicas de intestino de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável. Destaque para células caliciformes (setas). a) Intestino anterior, 20%PB, PAS - 20x; b) Intestino anterior, 40%PB, PAS - 20x.

Figura 28: Fotomicrografias do intestino de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). a) fotomicrografia panorâmica evidenciando o diâmetro total do tubo (traço) (Intestino posterior, 50%PB), HE – 4x; b) fotomicrografia destacando o epitélio (EP) da mucosa intestinal (Intestino anterior, 30%PB), H/S – 20x; c) fotomicrografia evidenciando a camada muscular longitudinal externa (ML), a camada muscular circular interna (MC) e serosa (setas) (Intestino anterior, 30%PB), H/S – 20x; d) Fotomicrografia destacando a altura da camada mucosa (seta) e a túnica muscular (TM) composta pelas camadas musculares longitudinal e circular (Intestino anterior, 30%PB), H/S – 4x.



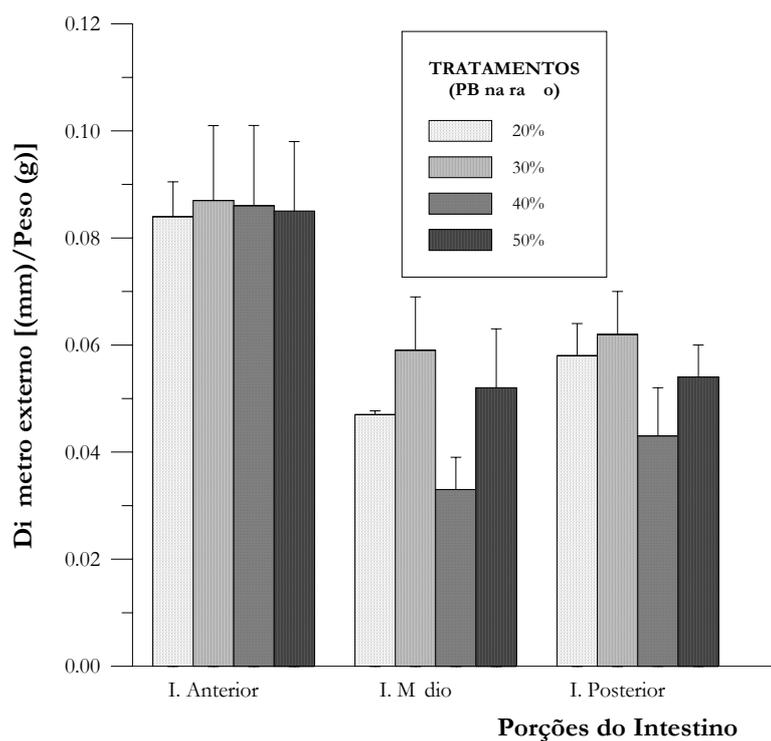


Figura 29: Diâmetro externo do canal intestinal (mm) em relação ao peso (g) do corpo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

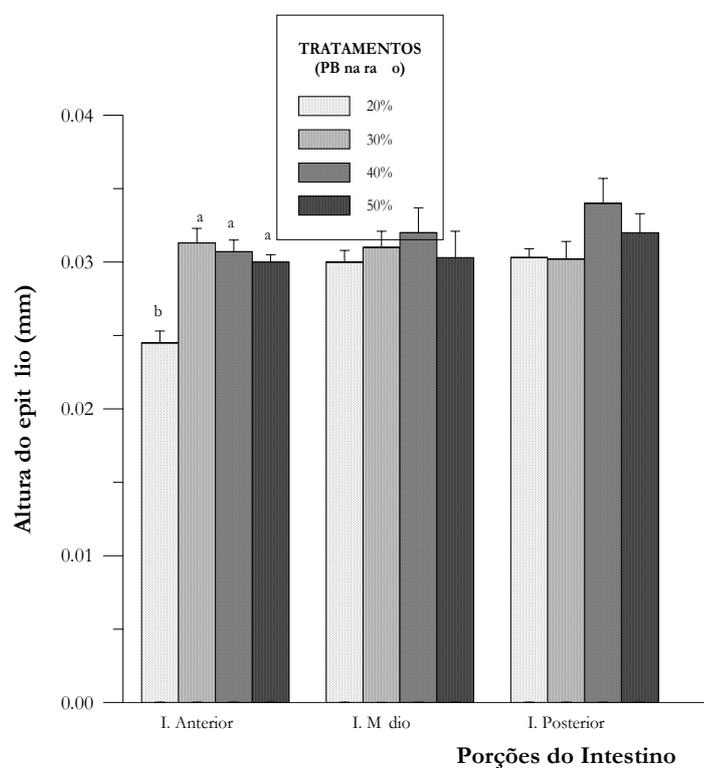


Figura 30: Altura do epitélio do intestino de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

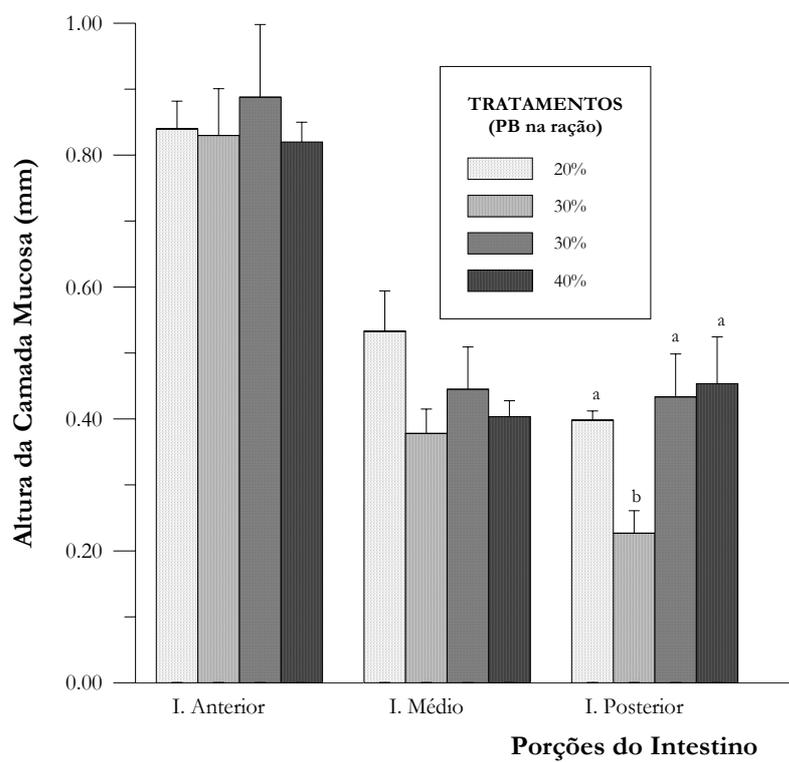


Figura 31: Altura da camada mucosa nas diferentes porções do intestino de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

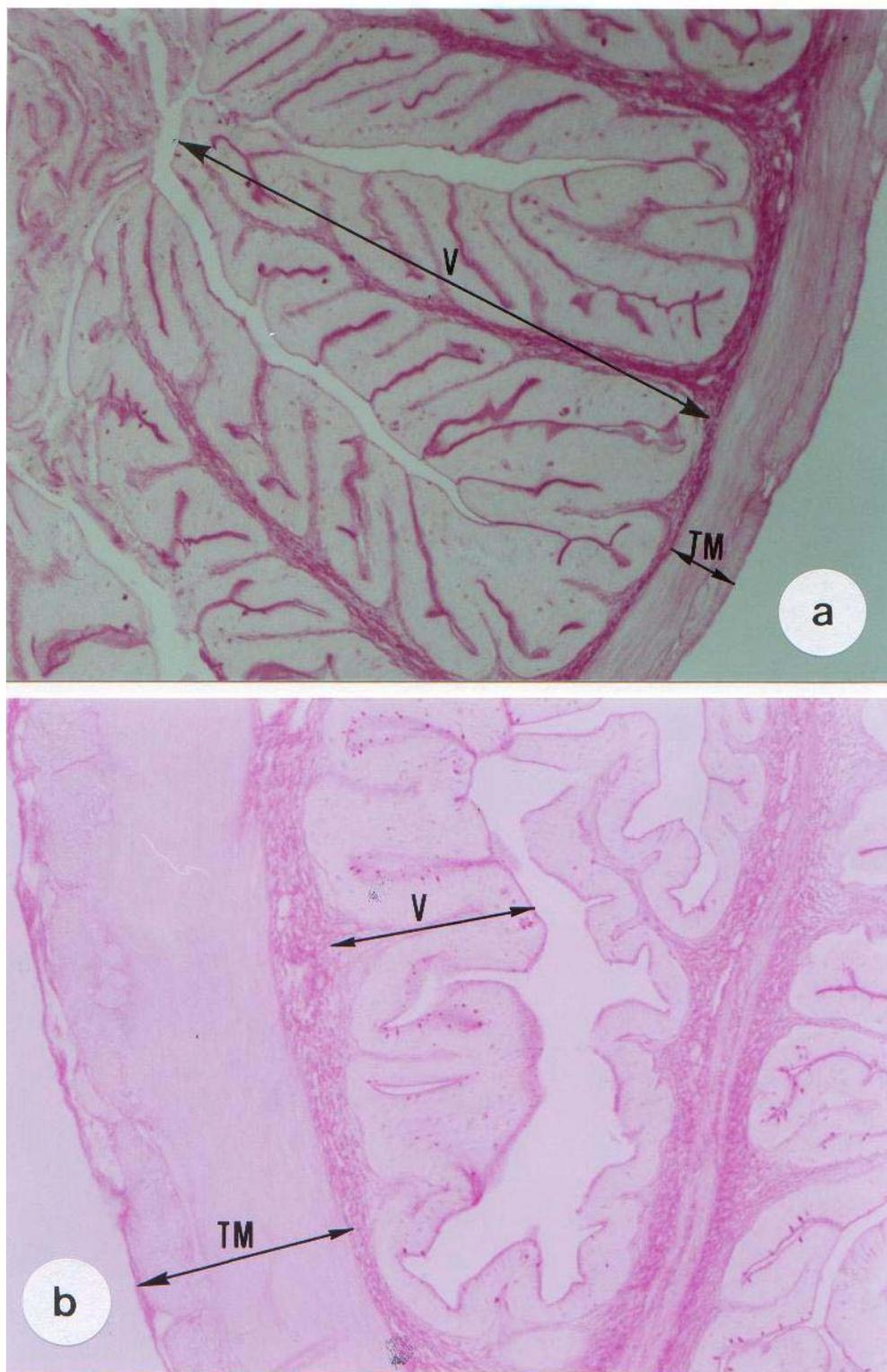


Figura 32: Fotomicrografias do intestino de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos à dieta contendo 20% PB. Destaque para altura da camada mucosa (setas V) e espessura da túnica muscular (setas TM). a) Intestino anterior, PAS – 10x; b) Intestino posterior, PAS – 10x.

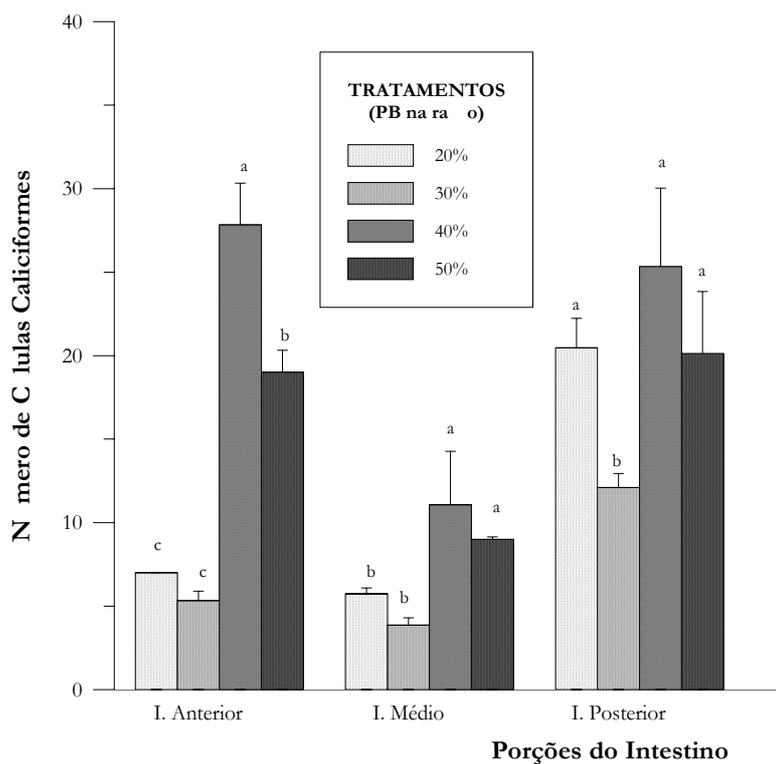


Figura 33: Número de células caliciformes nas diferentes porções do intestino de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

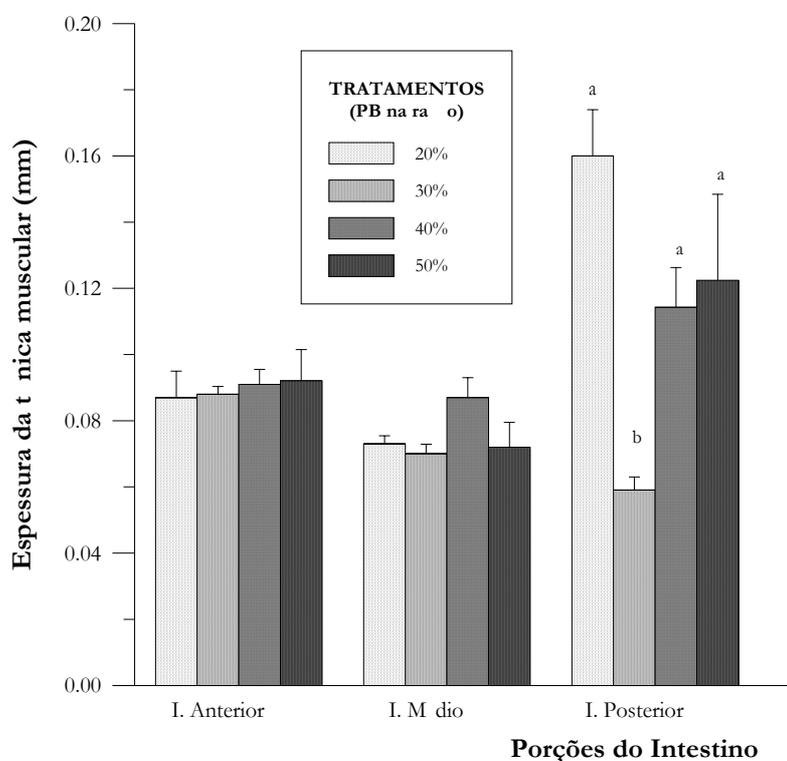


Figura 34: Espessura da camada muscular nas diferentes porções do intestino de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

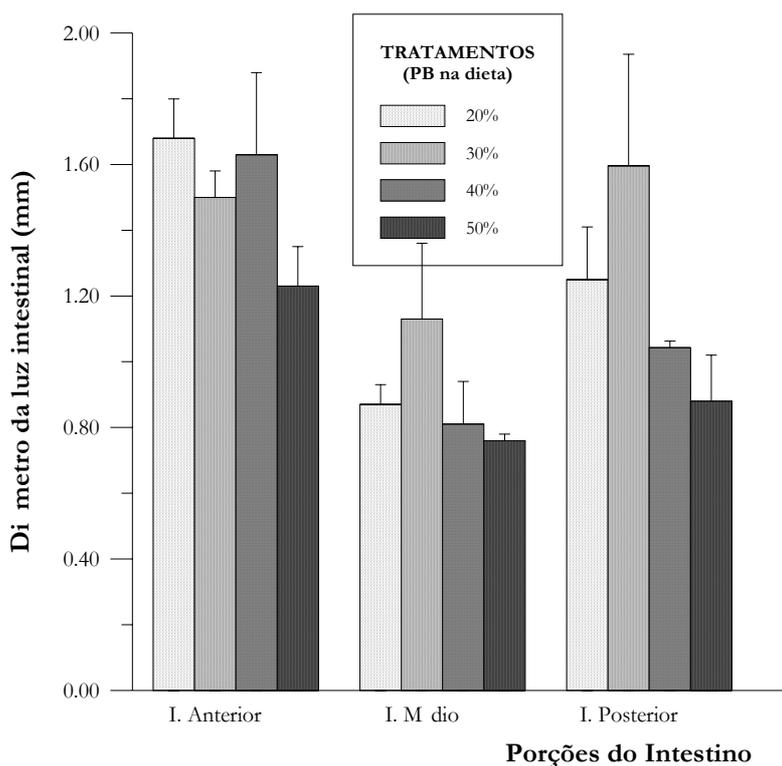


Figura 35: Diâmetro da luz nas diferentes porções do intestino de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável.

5.5 DESEMPENHO PRODUTIVO

5.5.1 Variação de proteína bruta na dieta

O aumento do conteúdo de proteína bruta na dieta promoveu alterações significativas no ganho de peso dos animais durante o período experimental de 28 dias. A melhor porcentagem de ganho de peso foi apresentada pelos animais submetidos ao tratamento contendo 40% PB na dieta, seguido por 30, 50% PB. O menor ganho de peso foi observado para o tratamento contendo 20% PB na dieta (Tabela 12).

Tabela 12: Parâmetros de desempenho produtivo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável por 28 dias.

	Tratamentos - PB variável			
	20% PB	30% PB	40% PB	50% PB
Peso Inicial (g)*	82 ± 15,4	72 ± 17,8	62,3 ± 14,2	59 ± 13,5
Peso Final (g)*	87,3 ± 15,5	91,5 ± 19,6	86,2 ± 11,9	72,5 ± 10,7
Biomassa Inicial (g)	492	432	374	354
Biomassa Final (g)	524	549	517	435
GP (%)	6,5 ^d	27,08 ^b	38,24 ^a	22,9 ^c

*Dados reportados como média ± s.e.m. (n=6)

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa (P < 0,05)

PB: proteína bruta; GP: ganho de peso.

Os animais submetidos às diferentes quantidades de proteína bruta na ração por 90 dias apresentaram a mesma variação no desempenho produtivo daqueles arraçados apenas por 28 dias, corroborando os resultados anteriores. O melhor desempenho foi, mais uma vez, apresentado pelo grupo arraçado com dieta contendo 40% PB, seguido pelos tratamentos 30, 50 e 20%, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13: Parâmetros de desempenho produtivo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas proteína-variável por 90 dias.

	Tratamentos - PB variável			
	20% PB	30% PB	40% PB	50% PB
Peso Inicial (g)*	12,1 ± 0,74	12,0 ± 0,82	11,8 ± 0,80	12,6 ± 1,11
Peso Final (g)*	25,0 ± 2,27	35,8 ± 4,02	44,1 ± 10,81	33,4 ± 3,86
Biomassa Inicial (g)	121	120	118	126
Biomassa Final (g)	250	358	441	334
% GP	106,62 ^d	198,34 ^b	273,73 ^a	165,08 ^c
IGVS	0,016 ± 0,0035 ^a	0,0069 ± 0,0013 ^b	0,0035 ± 0,0012 ^b	0,0053 ± 0,0008 ^b

*Dados reportados como média ± s.e.m. (n=10)

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa (P < 0,05)

PB: proteína bruta; GP: ganho de peso; IGVS: índice gordura visceral somático.

5.5.2 Variação de energia bruta na dieta

As alterações resultantes dos tratamentos foram significativas quanto ao ganho de peso dos animais em função do aumento de energia bruta. O grupo arraçado com 3.500 kcal

EB/kg de ração apresentou o melhor índice de ganho de peso, quatro vezes maior quando comparado com os demais tratamentos, que apresentaram índices semelhantes entre si (Tabela 11). No mesmo sentido, foram significativas as diferenças encontradas na deposição de gordura nos animais dos diferentes tratamentos, verificadas em função da relação entre a deposição de gordura no corpo adiposo (gordura visceral) e o peso dos animais (IGVS). Os peixes dos dois tratamentos com maiores quantidades de energia na dieta diminuíram suas reservas lipídicas, quando comparados com aos demais tratamentos (Tabela 14).

Tabela 14: Parâmetros de desempenho produtivo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), submetidos a dietas energia-variável por 60 dias.

	Variação de EB na dieta			
	3500 kcal	3850 kcal	4200 kcal	4550 kcal
Peso Inicial (g)*	42,1 ± 2,1	41,1 ± 1,7	41,2 ± 1,5	42,6 ± 1,6
Peso Final (g)*	127,4 ± 10,3 ^a	64,7 ± 7,7 ^b	62,0 ± 3,5 ^b	67,4 ± 5,0 ^b
Biomassa Inicial (g)	715	692	700	725
Biomassa Final (g)	2.165	1.100	1.054	1.145
%GP	202,8 ^a	58,9 ^b	50,6 ^b	57,9 ^b
IGVS	0,0037 ± 0,00007 ^a	0,0042 ± 0,0007 ^a	0,012 ± 0,0002 ^b	0,0009 ± 0,002 ^b

*Dados reportados como média ± s.e.m. (n=10)

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística significativa (P < 0,05)

EB: energia bruta (kcal/kg de ração); GP: ganho de peso; IGVS: índice gordura visceral somático.

6. DISCUSSÃO

A vida multicelular só pode ser sustentada se selecionar combustíveis metabólicos, produtos finais e precursores anabólicos, transportados entre células em fluxo e tempo apropriados. Os peixes não são exceção e devem constantemente ajustar as razões de “turnover” de metabólitos sanguíneos para coordenar os processos bioquímicos envolvidos na manutenção, crescimento, reprodução, locomoção e vários tipos de resposta ao estresse ambiental. Como um grupo de vertebrados, eles devem utilizar estratégias metabólicas distintas principalmente impostas pelo meio aquático e alimentação (WEBER & ZWINGELSTEIN, 1995). Neste sentido, os padrões metabólicos das espécies estão sujeitos a variações, muitas vezes significativas, sempre que o organismo é exposto a uma alteração das condições externas e os ajustes se façam necessários. Este tipo de resposta caracteriza a tentativa de manter a homeostase, e inúmeros compostos químicos do perfil celular podem apresentar variações de concentração sempre que esta não é atingida.

6.1. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

DANIELS & GALLAGHER (2000), estudando uma espécie de linguado de verão (*Paralichthys dentatus*), verificou que alguns parâmetros hematológicos pareciam estar relacionados com os níveis de proteína da dieta. O autor constatou que os valores de hematócrito correlacionaram-se positivamente com o aumento de proteína bruta na dieta, assim como as maiores quantidades de proteína por ele testadas (52 e 56%), resultaram em maiores quantidades de células vermelhas (RBC).

A constância observada nos parâmetros hematológicos indica que as variações no teor protéico da dieta não provocaram hemodiluição, hemoconcentração ou qualquer tipo de alteração metabólica imposta que comprometesse o quadro hematológico. Portanto, pode-se admitir que os tratamentos aos quais os animais foram submetidos não resultaram em anemia ou redução das células vermelhas circulantes, geralmente indicativos de doenças infecciosas, ou de subnutrição.

A variação de energia bruta das dietas não comprometeu o RBC. Entretanto, observou-se uma alteração do hematócrito e da concentração de hemoglobina nos animais arraçoados com 3.850 e 4.200 kcal EB, comparados à diminuição da concentração de proteína plasmática. Pode-se admitir que as dietas contendo teores acima de 3.500 kcal EB levam a

adaptações metabólicas para minimizar o desbalanço nutricional em função do excesso energético para a espécie, ao invés de proporcionarem o esperado efeito poupador em proteínas. Segundo PHILLIPS (1969), um balanço correto entre os alimentos energéticos e construtores asseguram um suprimento adequado de energia e matéria prima para otimizar a atividade anabólica que, além de crescimento, inclui reparações dos tecidos, reprodução e formação de produtos essenciais como hemoglobina, hormônios, enzimas, etc.

Os valores de hematócrito observados foram semelhantes aos previamente reportados por BEELEN et al. (1998). Estes autores constataram uma variação de 16,58 a 23,46% para juvenis de *P. corruscans*, com peso médio de $12,4 \pm 1,5$ g, mantidos em laboratório e alimentados *ad libitum* com náuplios de artêmia, larvas de mosquitos e ração comercial para peixes carnívoros.

6.2. METABOLISMO INTERMEDIÁRIO

O perfil metabólico responde à concentração dos nutrientes na dieta. Entretanto, poucos dados sobre o perfil metabólico de peixes, relacionados à alimentação estão disponíveis na literatura (MORAES & BIDINOTTO, 2000). Apesar da importância das proteínas e lipídios, os principais substratos energéticos em peixes, são escassas as informações relacionadas às respostas metabólicas versus a variação destas classes de nutrientes. A maioria das informações a respeito do fluxo metabólico neste grande grupo de vertebrados dá maior atenção aos efeitos da inclusão de carboidratos na dieta. A semelhança de tal abordagem em pesquisas com mamíferos, nos quais os carboidratos têm papel central no metabolismo energético, é a explicação mais provável para este fato. Outra possível razão seria a relativa simplicidade das técnicas de determinações bioquímicas desta classe de biomoléculas, quando comparadas às investigações com proteínas e lipídios (DE SILVA & ANDERSON, 1995; WEBER & ZWINGELSTEIN, 1995; CORRÊA, 2002).

Os diferentes perfis metabólicos apresentados pelos juvenis de pintado submetidos aos diferentes teores de proteína e lipídio na dieta mostraram diferenças significativas sugerindo alterações dinâmicas e trocas de intermediários metabólicos entre os tecidos. Estas trocas envolveram o sangue como veículo dos intermediários, e as alterações plasmáticas nas concentrações dos metabólitos corroboraram as variações observadas no perfil bioquímico apresentado pelos tecidos.

6.2.1 Variação de proteína bruta na dieta

A manutenção da concentração de triglicérides plasmáticos, para os tratamentos contendo 30 e 40 % PB, seguida da queda dos valores de ácidos graxos livres, e a queda do estoque de gordura visceral (corpo adiposo), sugerem que o aumento de proteína alimentar nesta espécie resultou em mobilização (catabolismo) de reserva graxa, principalmente pelos animais arraçoados com 50% PB.

DEL CARRATORE (2001) não observou variação na concentração de triglicérides plasmáticos para juvenis de pintado arraçoados com quantidades crescentes de amido (10 a 28%) e constantes de proteína (36%) e lipídios (\approx 9%). Entretanto, este autor observou uma grande variação individual na concentração deste metabólito, fato que impossibilitou a obtenção de uma conclusão assertiva. Por outro lado, os valores por ele obtidos são condizentes com os que observamos para o pintado nos diferentes tratamentos experimentais.

O aumento na relação proteína/carboidrato na dieta de pintado reduziu tanto a glicemia quanto a lactemia. Estes dados indicam que a espécie responde com o aumento dos níveis de glicose e lactato plasmáticos à inclusão de amido na dieta. Entretanto, DEL CARRATORE (2001) verificou um queda significativa na concentrações de glicose plasmática, inversamente proporcional aos teores de amido na dieta para juvenis de pintado. O autor sugeriu que a espécie apresentaria uma capacidade reduzida de digestão e absorção de carboidratos complexos, como o amido cru, e atesta que estes dados foram reforçados pelos coeficientes de digestibilidade do amido, diminuídos de forma inversamente proporcional ao seu conteúdo de inclusão na dieta.

Segundo BRAUGE et al. (1994; 1995), a ingestão de dieta contendo altos níveis de carboidratos e lipídios digestíveis levaram a um aumento na glicose e triglicérides plasmáticos em truta arco-íris (*O. mykiss*). Os autores ainda destacaram que a magnitude desse aumento, após o arraçoamento, é influenciada pela quantidade de carboidratos digestíveis presentes na dieta.

Mesmo tendo observado variação em alguns parâmetros hematológicos como mencionado anteriormente, DANIELS & GALLAGHER (2000) não encontrou qualquer variação significativa para as concentrações plasmáticas de proteína total, triglicérides, glicose e fosfatase, que pudessem estar relacionados com porcentagem de proteína da dieta para linguado de verão (*P. dentatus*).

O aumento do conteúdo de amido de trigo na dieta foi positivamente correlacionado com o aumento da glicose plasmática, mas negativamente correlacionado com a concentração de triglicerídeos plasmáticos para salmão de Atlântico (*S.salar*) (HEMRE et al., 1995).

CORRÊA (2002), testando diferentes níveis de proteína e carboidrato na dieta para tambaqui, obteve níveis médios de triglicerídeos que variaram de 2,18 (para o menor nível de proteína e carboidrato) a 3,32mg/ml (para os maiores níveis de inclusão de ambos os nutrientes), isto é, a concentração de triglicerídeos plasmáticos era diretamente proporcional à porcentagem de inclusão destes nutrientes na dieta. Comparativamente, a concentração média de triglicerídeos para o tambaqui foi bastante superior às observadas para o pintado neste estudo.

Para os juvenis de pintado alimentados com diferentes concentrações de proteína, a queda nos níveis de glicose hepática e o aumento dos níveis renais mostram respostas bem distintas nesses tecidos. A redução das concentrações de lactato, piruvato e glicose hepáticos sugerem um aumento da atividade glicemiante do fígado inversamente proporcional ao teor de proteína da ração. Outra hipótese é que um aumento do metabolismo oxidativo resultante do aumento na ingestão protéica seja preferencial. Esta preferência oxidativa poderia ser feita pelo catabolismo de carboidratos ou de aminoácidos. O perfil do metabolismo de carboidratos no rim mostrou-se diferente do fígado.

Os valores constantes de lactato e piruvato sugerem uma preferência oxidativa do tecido renal. O aumento na concentração de glicose acompanhado da redução de glicogênio sugere um papel glicemiante deste tecido, à semelhança do proposto para o tecido hepático.

A constância do padrão glicídico no músculo branco, somada ao aumento das concentrações de piruvato e à redução de aminoácidos livres, com o aumento de proteína bruta da dieta, sugerem uma preferência pelo catabolismo protéico, através de um processo oxidativo.

CORRÊA (2002) observou perfis metabólicos distintos e inter-relacionados em tambaquis, em resposta à variação de proteína bruta na dieta. Verificou que as elevações de proteína não induziram alterações bioquímicas no metabolismo glicídico dos compartimentos estudados, com exceção da glicose hepática, relacionando-as com a manutenção da glicemia plasmática. Entretanto, foi constatado um aumento na concentração de aminoácidos livres, tanto no plasma como no tecido muscular branco, para o maior teor de proteína empregado na dieta (38%). Esta autora relatou que este fato poderia estar relacionado com a demanda metabólica do tecido muscular face aos processos anabólicos, ou com um possível excesso de

ingestão protéica, mencionando a importância da investigação de aspectos bioquímicos da excreção nitrogenada frente à variação de proteínas na dieta.

HEMRE et al. (1989) avaliaram a inclusão de 0, 10, 20 e 30% de amido cozido de batata nas dietas de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e concluíram que o glicogênio hepático e muscular não foram alterados em função da ingestão de carboidratos. Os autores sugeriram a gliconeogênese a partir de aminoácidos e triglicerídeos para manutenção dos teores de glicogênio do grupo que não recebeu amido na dieta. Por outro lado, a glicemia apresentou-se diretamente proporcional ao nível de ingestão de carboidratos, embora grandes variações individuais tenham dificultado a compreensão dos resultados.

CARTER et al. (1995) destacam que a concentração de aminoácidos livres no fígado, trato gastrintestinal e músculo branco de truta são relativamente similares, em torno de 35-50 $\mu\text{moles/g}$ de tecido. Embora nossos resultados tenham apresentado concentrações razoavelmente menores, provavelmente por se tratar de uma espécie diferente e de clima tropical, concordaram com as observações do autor de permanecerem similares para os diferentes tecidos, como fígado e músculo branco. Estes dados condizem com o perfil apresentado pelo fígado e são indicativos de um aporte externo de aminoácidos e de uma preponderância do metabolismo protéico, evidenciada pelo aumento na atividade das enzimas GDH e arginase.

ALTRAN (2002) constatou a atividade de arginase em embriões de *P. corruscans*, relacionado-a primordialmente à síntese de uréia como um mecanismo de desintoxicação de amônia e do catabolismo de arginina provenientes da dieta. A atividade da GDH está correlacionada, além do catabolismo protéico, com a excreção de amônia. Seus valores de K_m , mesmo divergentes entre espécies (WALTON & COWEY, 1989), são geralmente similares ou estão acima da média de concentração de aminoácidos dos tecidos. Assim, as diferenças nestas concentrações é que determinarão o primeiro arranjo cinético, aumentando o catabolismo com o aumento das concentrações de substrato (BEAMISH & THOMAS, 1984), conseqüente à ingestão de alimento com altas quantidades de proteína (OGATA et al., 1985).

A enzima GDH está envolvida no processo de desaminação oxidativa do glutamato ocorrida pelas reações de transaminação de grupos alfa-amino de vários aminoácidos. O aumento da atividade desta enzima, verificado no grupo de animais submetido aos maiores níveis de proteína, indica a ocorrência de catabolismo de aminoácidos para serem utilizados como fonte de energia. Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por SUÁREZ et al. (1995), quando testaram várias proporções de proteína/lipídios/carboidrato em dieta de enguia européia (*Anguilla anguilla*). Estes autores verificaram um aumento na atividade da

GDH nos peixes alimentados com as dietas que apresentavam maior relação proteína : energia. A desaminação pela glutamato desidrogenase representa um meio de remover o nitrogênio de aminoácidos, e de as cadeias carbonadas serem utilizadas como energia no ciclo de Krebs. SUÁREZ et al. (1995) verificaram ainda que a atividade da GDH, diminuiu ou não aumentou em função do aumento de carboidratos ou diminuição do conteúdo de lipídios.

SÁNCHEZ-MUROS et al. (1998) verificaram aumento da atividade das enzimas GDH e da alanina-aminotransferase (ALAT) no fígado de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dietas contendo altos teores de proteína, ou sob jejum prolongado. Estes autores relatam que a alta atividade destas enzimas está diretamente relacionada com o aumento da gliconeogênese. Além disso, sugerem que o aumento da atividade da GDH no fígado e rim parece estar relacionado com o importante papel desta enzima na manutenção do equilíbrio ácido-base durante a acidose metabólica, provavelmente associada a uma alta ingestão protéica. ALEXIS & PAPARASKEVA-PAPATSOGLO (1986) e MOYANO et al. (1991) descreveram que a relação entre transaminação e desaminação pode ser um indicador metabólico da utilização de aminoácidos em excesso nos peixes.

O aumento do catabolismo de proteínas normalmente tem como consequência um aumento nos teores de amônia plasmática (VAN WAARDE, 1983). Em algumas espécies, estando em situações ambientais que dificultem a excreção de amônia, pode ser que ocorra um aumento da produção de uréia via ciclo da uréia (WOOD et al., 1995; SAHA & RATHA, 1998). Entretanto, em condições normais, o excesso de amônia produzido pelo catabolismo de proteínas é prontamente excretado pelas brânquias. Desse modo, o aumento da atividade da arginase pelos animais arraçados com 50% de proteína e da tendência de aumento dos teores de uréia plasmática, são provavelmente, resultado do aumento da concentração de arginina da dieta, e não da síntese de novo de arginina via ciclo da uréia. Somado a isso, ALEXIS & PAPAPARASKEVA-PAPOUTSOGLU (1986) destacam ainda que o metabolismo de peixes carnívoros é ajustado no sentido da utilização de proteínas como substrato energético, e que a proporção de proteína ingerida desaminada é independente do seu nível de inclusão na dieta.

A figura 36 representa o perfil metabólico e o provável destino dos metabólitos dos juvenis de pintado submetidos às variações de proteína bruta na dieta.

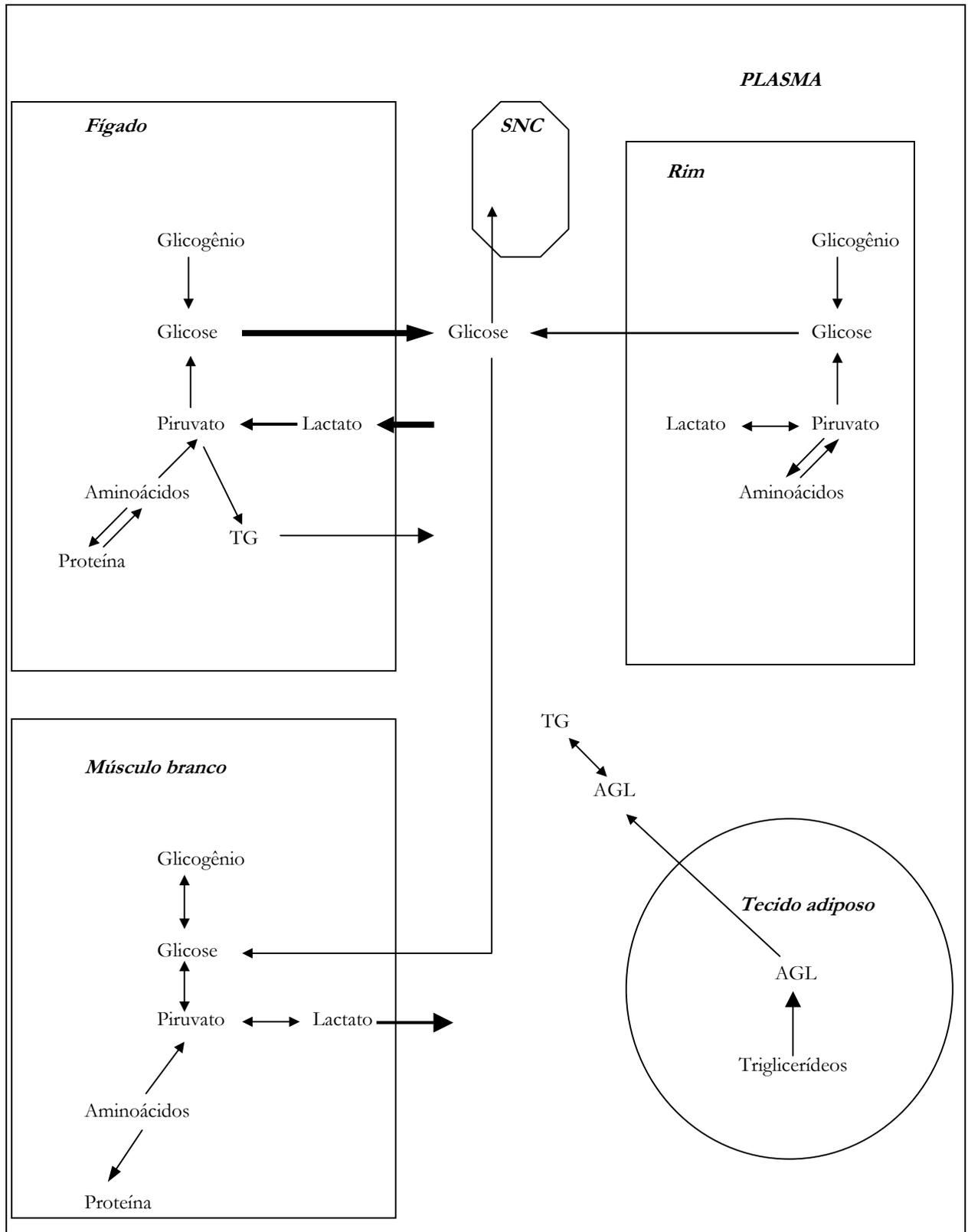


Figura 36: Perfil metabólico e o provável destino dos metabólitos dos juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas proteína-variável.

6.2.2 Variação de energia bruta na dieta

A porção lipídica do sangue é composta majoritariamente por moléculas recém absorvidas, lipídios recentemente processados como quilomicrons, e lipídios mobilizados dos sítios de estocagem. Além disso, a proporção de lipídios em cada uma destas frações é dependente de uma série de fatores, incluindo o estado nutricional, desenvolvimento e, particularmente, estágio de maturidade sexual (SHERIDAN, 1988).

Nos juvenis de pintado submetidos a dietas com diferentes teores de lipídio, ou energia bruta na dieta, a concentração de triglicerídeos plasmáticos decresceu significativamente nos animais arraçoados com quantidades de energia superior a 3.500 kcal. Resposta oposta foi observada para a variação da concentração de ácidos graxos livres (AGL), superior no tratamento com o maior nível de lipídios ou energia. Estes dados sugerem a ocorrência de um quadro metabólico lipolítico, pois, quando os estoques de lipídios são mobilizados, resultam na hidrólise de TG e subsequente liberação de AGL para o plasma (SHERIDAN, 1988). Embora não tenham sido verificadas alterações nas concentrações de glicose e piruvato plasmáticos, a redução dos valores de lactato plasmático sugere um quadro gliconeogênico, a partir deste metabólito. Este perfil ocorreria para a manutenção da glicemia plasmática, considerando-se a provável diminuição do consumo de ração em função do aporte energético da dieta. Resultados divergentes foram observados por HEMRE & SANDNES (1999) que testaram uma ampla faixa de inclusão de lipídios na dieta, de 31 a 47%, para salmão do Atlântico (*S. salar*). A variação lipídica na dieta não resultou em qualquer alteração na concentração de triacilgliceróis plasmáticos. Entretanto, quando os maiores níveis de lipídios da dieta foram combinados com baixos níveis de carboidratos, o resultado foi o aumento dos níveis de glicose plasmáticos. Estes autores associaram esta alteração a um desconhecido estresse associado com os altos níveis de lipídio nas dietas.

Segundo DABROWSKI & GUDERLEY (2002), a maior diferença entre peixes e mamíferos, que pode ser estendida a todos os vertebrados ectotérmicos, é a tolerância consideravelmente maior que os peixes mostram em relação às grandes flutuações dos níveis de glicose sangüíneos. Muitos peixes podem sobreviver por longos períodos, naturalmente ou sob condições experimentais, durante os quais os níveis de glicose plasmática são indetectáveis. Entretanto, sob a maioria das condições fisiológicas, os teores de glicose sangüíneos são freqüentemente estáveis e respondem a variações hormonais. Neste sentido, a concentração de glicose plasmática não parece ser um bom índice de sua própria utilização em peixes (WILSON, 1994). Segundo METÓN et al. (1999), peixes, especialmente carnívoros, são mais hábeis na utilização de carboidratos quando as taxas de absorção e conseqüente

aparecimento no sangue são baixas. Sendo assim, a redução nas concentrações plasmáticas de aminoácidos livres em relação ao aumento da quantidade de lipídio ou energia na dieta reforça a hipótese da provável diminuição do consumo alimentar, indicando também utilização destes aminoácidos como fonte de energia metabólica gliconeogênica.

O aumento nas concentrações de uréia plasmática, somado à queda nas concentrações dos aminoácidos livres, em função da energia bruta da dieta mais uma vez reforçam a hipótese do quadro metabólico gliconeogênico a partir de proteína e aminoácidos; situação contrária ao esperado efeito poupador de proteína pela adição de energia não protéica, no caso, lipídios. A menor concentração de uréia plasmática, somada aos dados de ganho de peso, indicam um melhor aproveitamento da fração protéica pelos animais arraçoados com a dieta contendo a menor quantidade de energia bruta.

A concentração de glicogênio nos diferentes tecidos não foi alterada em função do aporte energético da dieta e parece ter sido mantida às custas de glicose.

No tecido renal a redução na concentração de lactato indica um direcionamento do fluxo carbônico para a produção de piruvato e manutenção da glicose e conseqüentemente glicogênio. A quantidade crescente de lipídios da dieta levou a aumento das reservas lipídicas, tanto como AGL e quanto TG, fato que pode ter proporcionado a manutenção da concentração de aminoácidos livres.

Vale ressaltar que, nos indivíduos analisados, a deposição de gordura no rim, expressa em relação ao peso do tecido, superou inclusive a capacidade de deposição de gordura no fígado. Estes dados ressaltam a importância do tecido renal no metabolismo energético de pintado. Estes dados divergem de JOHNSON et al. (2002) que mostraram que um excesso de lipídios na dieta pode levar à sua deposição principalmente no fígado e na carcaça, o que traz como conseqüências à diminuição da palatabilidade.

No fígado, o aumento constatado da concentração de aminoácidos livres provavelmente serviu de substrato para a manutenção dos níveis de glicogênio através do piruvato, lactato e glicose. Também foram observadas altas concentrações de TG e AGL no tecido hepático, órgão que desempenha um papel central no intercâmbio destes metabólitos entre os diferentes tecidos do corpo (SHERIDAN, 1988).

Mesmo que se tenha observado um aumento nas concentrações de aminoácidos livres, a enzima GDH não apresentou variação significativa na sua atividade. Além disso, a atividade da arginase hepática diminuiu em relação ao aumento de lipídios ou energia bruta da dieta. Entretanto, as atividades de GDH e arginase, mesmo apresentando atividades muito menores

quando comparadas com as do fígado, foram responsivas à variação nutricional da dieta, aumentando suas atividades em função do aumento do aporte energético da dieta.

Mais uma vez, os dados apresentados pelo pintado, uma espécie carnívora, mas de água doce e clima tropical, discordam parcialmente daqueles obtidos para peixes de águas frias. JÜRSS et al. (1985) relatam que, para trutas arco-íris, a atividade de GDH renal raramente responde a diferentes relações de proteína/lipídio na dieta, enquanto a atividade desta enzima aumenta significativamente com o aumento de proteína na dieta.

Como observado nos experimentos com variação de PB, o músculo branco desempenha um papel quase que à parte do metabolismo de pintado. A manutenção dos teores de aminoácidos e glicose provavelmente assegurou as concentrações de piruvato e lactato. Por sua vez, o lactato, uma vez aumentado, foi exportado para a corrente sanguínea, para ser reciclado e servir ao metabolismo energético nos demais tecidos, quando necessário, ou ainda voltar para o tecido muscular para compor os estoques de glicogênio, ressaltando a importância do ciclo de Cori no metabolismo oxidativo dessa espécie.

MOYES et al. (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 sozinhos. Entretanto, quando presentes em conjunto, a oxidação dos ácidos graxos inibe a utilização de piruvato. Estes dados podem ser comparados com as respostas observadas no músculo branco dos animais que apresentaram acúmulo de lactato e piruvato, assim como de AGL e TG, em relação ao aumento de energia bruta ou lipídios na dieta. KRAJNOVIĆ-OZRETIĆ et al. (1994) verificaram que os padrões de assimilação dos ácidos graxos no fígado e músculo branco de “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*) refletem não só o conteúdo, mas a fonte de lipídios da dieta.

O aumento dos teores de TG e AGL musculares sugere que em pintado existe a possibilidade de armazenamento lipídico também no músculo branco. Isto parece razoável ao relacionarmos com o fato de ser uma espécie reofílica que, em ambientes e condições naturais, deve utilizar este estoque como combustível na fase de migração para desova. O aumento dos teores de lipídio na dieta levou à diminuição do estoque de lipídios localizados no corpo adiposo dos peixes. Este fato deve estar relacionado à possível diminuição da ingestão de alimentos em função do aporte energético da dieta e, em função disto, estes estoques devem ter sido consumidos para suportar a demanda energética dos demais tecidos.

A figura 37 representa o perfil metabólico e o provável destino dos metabólitos dos juvenis de pintado submetidos às variações de energia bruta na dieta.

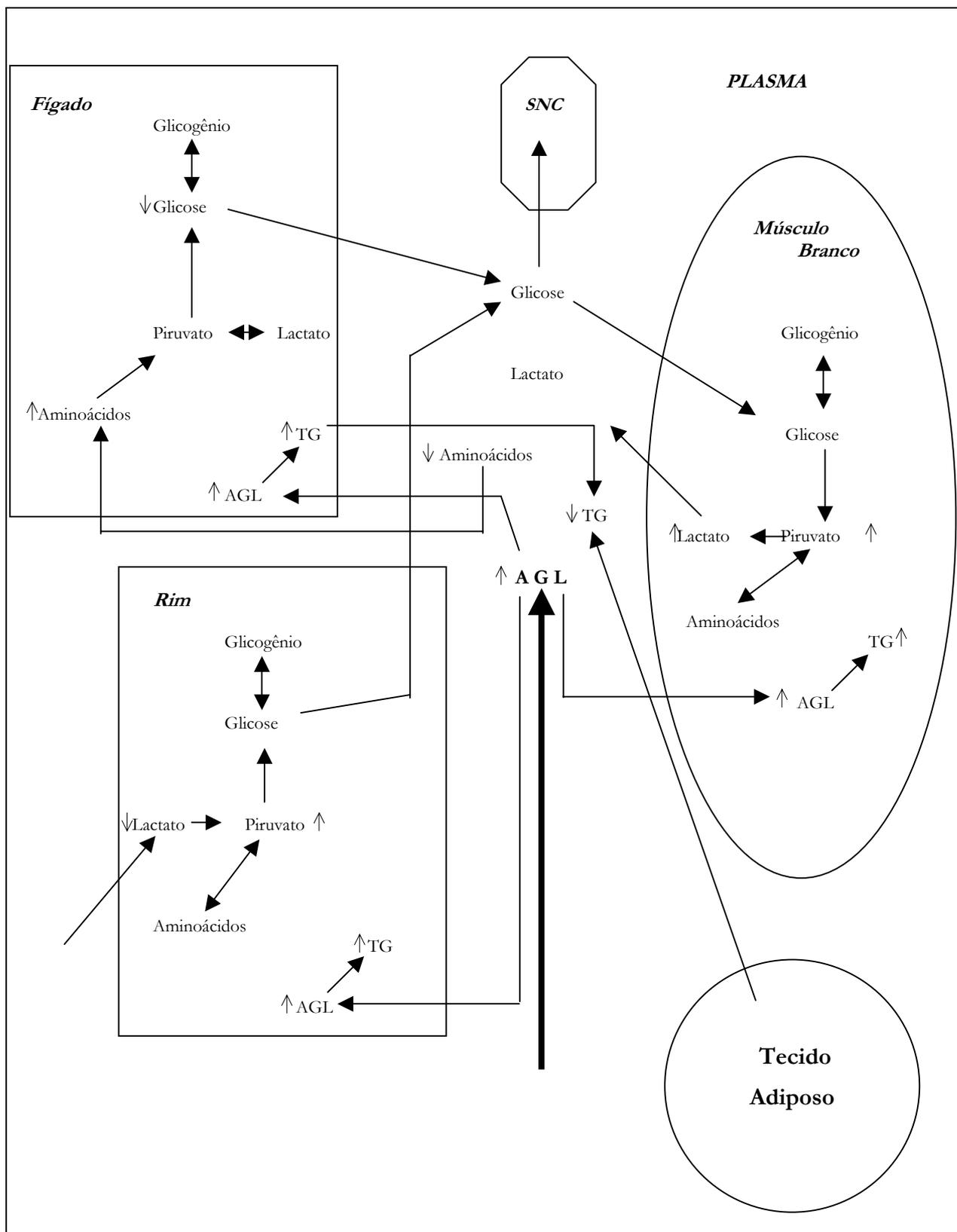


Figura 37: Perfil metabólico e o provável destino dos metabólitos dos juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) submetidos a dietas energia-variável.

6.3 ENZIMAS DIGESTIVAS

6.3.1 Variação de Proteína bruta

O processo digestivo é menos conhecido em peixes do que nos mamíferos em geral. Entretanto, os estudos realizados até o momento indicam que as enzimas digestivas são qualitativamente similares às aquelas observadas nos demais grupos de vertebrados (HIDALGO et al., 1999).

A função das enzimas digestivas é hidrolisar os macronutrientes contidos nos alimentos em compostos que possam ser absorvidos pela membrana da borda estriada dos enterócitos. Estas enzimas podem ser secretadas no lúmen, adsorvidas na membrana ou estarem contidas em vacúolos supranucleares dentro dos enterócitos. Entretanto, a digestão pode ocorrer com os peixes utilizando uma ou mais estratégias: digestão extracelular ou luminal, digestão de contato com a membrana ou digestão intracelular (RUST, 2002).

Vários estudos sobre o processo digestivo em peixes estão disponíveis na literatura comparando principalmente a atividade das enzimas digestivas com: o hábito alimentar das espécies (HOFER & SHIEMER, 1981; JÓNÁS et al., 1983; CHAKRABARTI et al., 1995; MUNILLA-MORÁN & SABORIDO-REI, 1996; HIDALGO et al., 1999); com o desenvolvimento larval (MUNILLA-MORÁN & STARK, 1989; CAHU & ZAMBONINO-INFANTE, 1994; ZAMBONINO-INFANTE & CAHU, 1994; GAWLICKA et al., 2000); a utilização de fontes protéicas (DABROWSKI et al., 1989; ESCAFRE et al., 1997; MOYANO-LÓPEZ et al., 1999); a idade ou o estágio de desenvolvimento (KUZ'MINA, 1996). Apesar disso, e concordando com MORAES & BIDINOTTO (2000) e CORRÊA (2002), não estão disponíveis na literatura informações relacionadas aos mecanismos adaptativos das espécies, principalmente em relação às condições nutricionais, isto é, como as enzimas digestivas e/ou o metabolismo intermediário dos peixes operam frente a variações na concentração dos diferentes nutrientes. Este quadro agrava-se quando se trata de espécies tropicais, sobre os quais esta literatura é ainda mais escassa.

Expressando os dados como atividade total do segmento, elimina-se a possibilidade de artefato (YAMADA et al., 1983). Além disso, a atividade do segmento deve ser considerada como sistema de referência apropriado e diretamente relacionado com a capacidade digestiva do segmento (RAUL et al., 1982).

O padrão digestivo enzimático de pintado é bastante particular quando comparado com outras espécies. Quando submetemos os peixes à variação de proteína bruta na dieta, as maiores atividades proteolíticas foram observadas no estômago. Certamente, esta característica está associada com o hábito alimentar da espécie, destacando o papel desta estrutura em seu

processo digestivo. Considerando que os peixes normalmente engolem a presa, que permanece no estômago por um tempo considerável, a constituição enzimática passa a ser fundamental na digestão dos componentes da dieta.

Uma das maiores funções do estômago é o início da digestão protéica pela ação da pepsina e HCl. Além disso, a evolução do estômago em vertebrados está estreitamente associada com a digestão protéica (STEVENS, 1988). VONK (1941) citado por KOHLA et al. (1992) aponta que a produção do fluido gástrico é estimulada pela fricção mecânica do alimento, fato que pode relacionar a atividade enzimática com o grau de enchimento do estômago. Neste sentido, KAPOOR et al. (1975) salientam que a digestão e o esvaziamento gástrico dependem da quantidade e da qualidade do alimento, da taxa de secreção de suco gástrico, da motilidade gástrica, e da capacidade do intestino em aceitar o quimo do estômago e que, além disso, a quantidade de alimento consumido pode influenciar a secreção gástrica via estímulo proporcionado pela distensão da parede do estômago.

As maiores atividades de protease inespecífica foram observadas no estômago de juvenis de pintado em pH 2,0. Entretanto, não foram detectadas variações significativas no padrão enzimático deste órgão que pudessem estar relacionadas com o aumento da porcentagem de proteínas bruta das rações nos diferentes tratamentos. A não responsividade da pepsina, em função da variação de proteína da dieta, havia sido previamente reportada para outras espécies como o tambaqui, *Colossoma macropomum* (KOHLA et al., 1992), *Tilapia mossambica* (L.) (NAGASE, 1964) e *Brycon melanopterus* (REIMER, 1982). Por outro lado, CORRÊA (2002) observou indução da atividade proteolítica ácida no estômago de tambaqui (*C. macropomum*) apenas entre 18 e 28% PB na ração, permanecendo constante daí até 38%. Estes dados corroboram aqueles previamente descritos por KOHLA et al. (1992) que não observaram alteração na atividade de pepsina quando testaram níveis de 30 e 50% PB. CORRÊA (2002) salientou ainda que o teor de 18% PB na ração para tambaqui seria muito baixo e que o estímulo indutivo deveria ocorrer em resposta à entrada de proteína no estômago até uma determinada concentração, a partir da qual não seria mais responsivo aos aumentos nos teores deste nutriente, permanecendo, portanto, constante.

MELO et al. (2002) verificaram uma relação direta entre o nível de proteína da dieta e a atividade proteolítica ácida no estômago de jundiá (*R. quelen*). Além disto, relatam que as secções do intestino foram bioquimicamente diferenciadas em relação à atividade proteolítica alcalina. Nas porções anterior e média do intestino, a atividade proteolítica foi induzida até 27% PB na dieta, sugerindo que o decréscimo de atividade a partir destes valores poderia estar relacionado à regulação da síntese enzimática em função do conteúdo de proteínas e outros

derivados presentes na dieta, ou ainda à uma capacidade limitada da tomada de nutrientes pela mucosa intestinal.

HIDALGO et al. (1999), estudando o perfil enzimático digestivo em peixes com diferentes hábitos nutricionais, reportaram para enguia européia (*Anguila anguila*) que a maior atividade proteolítica ocorre no estômago em pH 1,5 e que, praticamente, nenhuma atividade ocorria em pHs neutro ou alcalino. Deste modo, considerando a atividade proteolítica inespecífica como padrão para aquela espécie, pode-se dizer que é bastante similar ao apresentado pelo pintado, que apresentou apenas traços de atividade proteolítica no intestino anterior (pH 7,5), e nenhuma atividade detectada nas porções média e posterior do intestino.

O fluido gástrico de peixes pode conter muitos tipos de protease, com atividade proteolítica ótima atuando em diferentes pHs (2,0, 3,0, 5,0 e 8,5). Segundo FÄNGE & GROVE (1979), LOVELL (1988) e KUZ'MINA (1991), indubitavelmente, a mais significativa entre estas proteases é a pepsina, que atua na faixa entre pH 2,0 e 3,0.

Inesperadamente, foram detectadas atividades de tripsina e quimiotripsina no estômago de pintado. Entretanto, observou-se que as proteases analisadas praticamente não responderam ao conteúdo de proteína da dieta. Este perfil relembra a importância da digestão química em função do tempo e permanência da presa ou do alimento no estômago.

A atividade proteolítica alcalina foi relatada em suco gástrico de outras espécies de peixes (KUZ'MINA, 1991). Além disso, a não responsividade da tripsina em relação à dieta artificial ou alimentação natural foi também descrita por CAHU & ZAMBONINO INFANTE (1994) em larvas de "sea bass" (*D. labrax*). Apesar das atividades de tripsina e quimiotripsina estarem presente em todo o intestino, estas atividades proteolíticas foram muito baixas quando comparadas com às apresentadas no estômago. Considerando o tamanho pequeno do intestino e o padrão enzimático em pintado, com atividades relativamente baixas, supõe-se que o principal papel do intestino seja a absorção de nutrientes da dieta. Além disso, a não responsividade das proteases à variação do nível de proteína da dieta leva-nos a assumir que essa espécie é adaptada ao melhor uso da proteína, independente do seu conteúdo na dieta.

SABAPATHY & TEO (1993) apontaram dificuldades em se determinar a fonte de tripsina e quimiotripsina em rabbitfish (*Siganus canaliculatus*), pois estas atividades foram detectadas em todas as porções do trato gastrintestinal, desde o esôfago até a porção final do intestino. HSU & WU (1979) também encontraram atividade de tripsina e quimiotripsina em todos os segmentos do trato gastrintestinal nas 8 espécies de peixes com diferentes hábitos alimentares por eles estudadas, mas salientaram que as maiores atividades foram localizadas especialmente no intestino, hepatopâncreas e cecos pilóricos, quando presentes. Por outro

lado, destacaram que a atividade de tripsina no intestino dessas espécies insignificante quando comparada com a quimiotripsina, fato comparável ao observado para o pintado, onde a atividade de quimiotripsina é da ordem de mil vezes superior à de tripsina.

MELO et al. (2002) também observaram atividade de tripsina e quimiotripsina no estômago de jundiá, com atividades induzidas até o conteúdo de 27% PB na dieta, fato que, para eles, destaca a importante plasticidade da estrutura nesta espécie. Estas proteases também foram quantificadas ao longo do intestino. Na secção anterior, onde foram observadas as maiores atividades, e, na porção média, estas enzimas foram induzidas até 27% PB e permaneceram constantes até o nível máximo testado de 41% PB. Os autores sugerem que esta espécie responde através de uma adaptação do perfil de enzimas digestivas aos teores de proteína da dieta e que, além do papel especial desempenhado pelo estômago, as proteases alcalinas do intestino anterior parecem concluir a hidrólise protéica, direcionando o papel absorptivo para as porções média e posterior do intestino.

HSU & WU (1979) acrescentam que as espécies carnívoras, dentre aquelas por eles estudadas, apresentaram as maiores taxas de eficiência de digestão da proteína dietética mesmo possuindo um trato gastrintestinal bastante curto. No sentido de adaptação ao seu hábito alimentar, o estômago desta categoria de peixes pode secretar pepsina muito ativa. Por outro lado, estes autores destacaram que a onívora *Tilapia mossambica* desenvolveu um trato gastrintestinal bastante longo e apresenta forte atividade secretória de tripsina e quimiotripsina, o que compensariam a baixa atividade péptica de seu estômago.

CORRÊA (2002) obteve responsividade das enzimas digestórias proteolíticas, protease inespecífica, tripsina e quimiotripsina, em função da variação de proteína na dieta para tambaqui. As maiores atividades proteolíticas ácidas do estômago foram observadas para os animais alimentados com 28 e 38% PB na dieta. Além disso, as atividades proteolíticas alcalinas correlacionaram-se positivamente com o conteúdo de proteína da dieta. Reforçando seus resultados, KOHLA et al. (1992) verificaram também uma correlação positiva entre a atividade da tripsina e o grau de enchimento do trato digestório de tambaqui, somada a uma tendência generalizada de aumento da atividade tríptica em função do aumento de proteína na dieta.

Este conjunto de observações leva-nos a admitir que o perfil enzimático de pintado, em resposta à variação de proteína bruta na dieta, não se altera, sendo as proteases digestivas desta espécie do tipo constitutivo. Além disso, estariam adequadas à digestão de altos conteúdos de proteína.

HOFER & SCHIEMER (1981) estudando duas espécies de ciclídeos e seis de ciprinídeos verificaram que a atividade proteolítica no trato gastrointestinal foi mais baixa nos herbívoros do que nos onívoros e carnívoros os quais não apresentaram diferenças muito claras entre eles. Entretanto, se expresso em termos de porcentagem, os onívoros apresentaram uma média de atividades entre eles de aproximadamente 50% e os herbívoros em torno de 25% da atividade média apresentada pelos carnívoros. Verificaram também que a atividade enzimática decresceu da porção anterior para a posterior do intestino supondo que as enzimas sejam reabsorvidas na porção final e que a efetividade estaria relacionada positivamente com o comprimento do intestino. Entretanto, o decaimento na atividade não poderia ser relacionado à autólise enzimática, fato que não foi confirmado nos experimentos *in vitro* por eles realizados. Constataram ainda que tais atividades enzimáticas eram inversamente proporcionais ao comprimento do trato gastrointestinal, mas que o tempo de exposição do alimento ingerido às enzimas proteolíticas, aumentou paralelamente ao comprimento relativo do intestino (comprimento do intestino/comprimento do corpo), o que levou os autores a afirmarem ter esse fato resultado em atividade proteolítica mais intensa nos peixes herbívoros.

Entretanto, a baixa atividade proteolítica apresentada pelos herbívoros, somada ao maior tempo de exposição ou menor velocidade de passagem do alimento neste grupo de peixes, ao invés de nos levar a concordar que estes animais apresentem atividade proteolítica mais intensa, leva-nos a admitir que a especificidade das enzimas proteolíticas dos herbívoros seja sim, bem menor quando comparada com a dos onívoros e principalmente a dos carnívoros, por necessitarem de maior tempo de exposição às enzimas, evidenciado pelo trajeto mais longo para que essas possam desempenhar sua função.

HSU & WU (1979), estudando a relação entre o hábito alimentar e a atividade proteolítica de oito espécies de peixes tropicais com hábitos alimentares diferentes, verificaram que os carnívoros, com os menores comprimentos do trato digestório, apresentavam as maiores atividades de pepsina no estômago, mas baixíssima atividade de quimiotripsina no intestino. Um padrão oposto foi verificado para os micrófagos e um padrão intermediário, para os herbívoros. Além disso, os onívoros apresentaram as maiores atividades de tripsina.

GARCÍA-CARREÑO et al. (2002), estudando as proteinases de piracanjuba (*Brycon orbignianus*), uma espécie comprometida pela ação antrópica nos rios brasileiros devido à construção de hidrelétricas, verificaram que o sistema digestório da espécie possui algum mecanismo de adaptação enzimática, respondendo à qualidade e quantidade do alimento por meio da variação na quantidade e composição das proteases digestivas. Este mecanismo

responsivo foi preponderante no intestino, pois o estômago desta espécie não apresentou qualquer habilidade em responder aos diferentes alimentos, exceto ao jejum.

A digestão de carboidratos é normalmente desconsiderada em peixes carnívoros e a amilase não é considerada fundamental no processo digestivo. Entretanto, FÄNGE & GOVE (1979) destacam que poucas enzimas digestivas não-proteolíticas podem ocorrer no fluido gástrico de peixes como, por exemplo, a amilase relatada no estômago de *Clupea harengus* e de *Dorosoma cepedianum*. Da mesma forma, DE SILVA & ANDERSON (1995) apontam a ação pouco específica da α -amilase que pode hidrolisar tanto amido como glicogênio a oligossacarídeos, ou ainda hidrolisar oligossacarídeos a di e monossacarídeos.

Assim como para o padrão proteolítico, as maiores atividades de amilase foram detectadas no estômago dos juvenis de pintado arraçoados com quantidades crescentes de proteína bruta na dieta. Entretanto, observou-se diferenciação quantitativa de amilase nas diversas porções do intestino (anterior, médio e posterior) sendo que, nesta última, apresentou o menor teor amilohidrolítico.

REYMER (1982) relatou que a atividade da amilase depende da composição da dieta. Pro outro lado, HOFER et al. (1982) o contradisseram, opinando que a atividade da α -amilase é independente da dieta, mas que apresenta alguma especificidade em relação à família taxonômica a que pertença a espécie.

Segundo SABAPATHY & TEO (1993) a atividade amilohidrolítica do onívoro *Siganus canaliculatus* é mais expressiva que a do carnívoro *Lates calcarifer*. A atividade da amilase foi também reportada para peixes tropicais de água doce, como os onívoros piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e piauí (*Leporinus friderici*) e para o carnívoro pintado. Curiosamente, a amilase apresentou-se mais ativa em pintado do que na piracanjuba (SEIXAS FILHO, 1999).

A propriedade indutiva de tal hidrolase foi descrita por CAHU & ZAMBONINO INFANTE (1994) para larvas de “sea bass” (*D. labrax*) quando deixaram de receber alimento natural e passaram a receber dieta microparticulada contendo 12% de amido. Estes autores assumiram que o pico de atividade específica de amilase é resultado de síntese extensiva em resposta à mudança na dieta. KAWAI & IKEDA (1973) in DE SILVA & ANDERSON (1995) observaram um aumento da atividade da amilase em trutas arco-íris em resposta às dietas com altos níveis de proteína, teores constantes de carboidratos e teores variados de fibra. Um resultado semelhante foi também descrito para a mesma espécie por PLANTIKOW (1981 in KOHLA et al., 1992). DABROWSKI et al. (1992) constataram uma relação entre a composição da dieta (qualidade da proteína), a performance dos peixes e as atividades proteolítica e

amilohidrolítica. Estes autores observaram atividade de amilase e tripsina até dez vezes maior quando a espécie de charr (*Salvelinus alpinus*) foi alimentada com dietas contendo altas concentrações de proteína (65-70% PB) ao invés de alimento vivo. Entretanto, uma resposta contrária, maior atividade amilásica para as menores concentrações de proteína e carboidratos da dieta, foi observada no intestino de carpa capim (*C. idella*) por DAS & TRIPATHI (1991).

KOHLA et al. (1992) relataram que a atividade amilohidrolítica correlaciona-se positivamente com o grau de enchimento do trato digestório de tambaqui. Entretanto, nas dietas compostas por ingredientes tanto de origem animal como vegetal verificaram uma correlação negativa entre a atividade de amilase e o conteúdo de carboidratos da dieta. Por outro lado, nas dietas compostas somente por ingredientes de origem animal, o aumento do conteúdo de carboidratos na dieta resultou em aumento significativo de atividade de amilase.

CORRÊA (2002) observou as maiores atividades de amilase em quantidades intermediárias de proteína na dieta para tambaqui que variaram em 18, 28 e 38%, sugerindo uma resposta adaptativa das enzimas digestivas frente à variação deste nutriente na dieta. MORAES et al. (2000) investigaram a ocorrência de eventuais particularidades na atividade de amilase entre o pacu, o tambaqui e o híbrido das duas espécies (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*), popularmente conhecido como tambacu. Estes autores verificaram que o perfil amilohidrolítico da porção dos cecos pilóricos do híbrido apresentou-se mais eficiente quando comparado com a atividade apresentada pelos exemplares de suas espécies parentais, destacando a notável expressão das carboidrases pelo híbrido.

Outros fatores, além da quantidade de amido na dieta e da espécie envolvida, podem influenciar na atividade da amilase; entre eles, o grau de enchimento do trato digestório (BITTERLICH, 1985; KOHLA et al., 1992), o hábito alimentar (FISH, 1960; SABAPATHY & TEO, 1993), a estrutura e a complexidade dos carboidratos (NRC, 1993), a temperatura e a estação do ano (KUZ'MINA et al., 1996) e a idade (KUZ'MINA, 1996).

CHAKRABARTI et al. (1995) opinaram que diferentes partes do intestino de 10 das 11 espécies estudadas, independente do hábito alimentar, exibiram vários graus de atividade de amilase. Os autores acreditam que esta atividade não seja nem alimento dependente nem de origem reflexa e que, além disso, o tipo de dieta, aparentemente, não dá suporte à produção de amilase em peixes.

DAS et al. (1987) estudaram as enzimas digestivas de *Liza parsia* (Ham.), uma das espécies mais importantes de tainha presentes na Índia, que se alimenta principalmente de detritos e microalgas na fase adulta. Verificaram que atividade de amilase está presente por todo o trato gastrointestinal tanto em alevinos como nos adultos, apresentando atividade

considerável no estômago. Atividade proteolítica também foi observada em todo o trato, embora as menores proporções tenham sido verificadas no estômago. Nos alevinos, a atividade proteolítica foi comparativamente maior, enquanto a atividade amilohidrolítica foi maior nos adultos, sugerindo uma possível adaptação ao hábito zooplactófago dos alevinos, alterado para basicamente herbívoros quando adultos. A lipase, por sua vez, não diferiu entre alevinos e adultos, sendo detectada principalmente no fígado e no intestino anterior, sem vestígios no estômago. Esses autores sugeriram que, em função das variações do perfil enzimático, a espécie esteja bastante adaptada às condições do hábito alimentar natural.

MOITRA & RAY (1981) estudando as enzimas digestivas e sua relação com o alimento e hábito alimentar de uma espécie indiana de perca (*Anabas testudineus*), verificaram que a atividade proteolítica é mais pronunciada no hepatopâncreas, no intestino e na porção pilórica do estômago, indicando que a espécie está bem adaptada para digerir proteína na dieta. A atividade lipolítica foi mais pronunciada no intestino e hepatopâncreas e a amilohidrolítica, mesmo moderadamente ativa, distribuída em todas as regiões do sistema digestivo analisadas, fato que os autores associaram ao hábito alimentar carnívoro da espécie.

RAY (1988) estudando as enzimas digestivas de outras 3 espécies de percas indianas, também em relação a hábito alimentar, verificou que as carnívoras *Ambassis nana* e *Ambassis ranga* apresentaram atividade proteolítica acentuada no intestino e no hepatopâncreas, e apenas moderada no estômago. O intestino e o hepatopâncreas da espécie onívora *Colisa fasciata* também apresentaram atividade proteolítica acentuada. A atividade lipolítica do intestino e hepatopâncreas destas espécies foi bastante acentuada, embora *A. nana* tenha apresentado atividade moderada no hepatopâncreas. Atividade de amilase variou de fraca a moderada nas espécies carnívoras, sendo mais pronunciada na onívora *C. fasciata*; características evidentemente relacionadas ao hábito alimentar destas espécies.

KIRCHNER et al. (2003) destacam que, atualmente, na área de nutrição de peixes, o maior desafio é melhorar a utilização de carboidratos. Neste sentido, o pintado apresentou uma resposta particular. Sua amilase foi responsiva ao amido da dieta e não ao conteúdo de glicogênio, como proposto para espécies carnívoras (SABAPATHY & TEO, 1993; DE SILVA & ANDERSON, 1995). Considerando o pintado como uma espécie carnívora, o conteúdo máximo de amido (36%) usado na alimentação foi relevante. Entretanto, a atividade da amilase de pintado é baixa, quando comparada às apresentadas por espécies onívoras (CHAKRABARTI et al., 1995; MORAES & BIDINOTTO, 2000). Além disto, a atividade da amilase foi maior nas dietas de 30 e 40% PB, correspondentes a 25 e 13% de amido, quantidades consideradas altas

para peixes carnívoros, coincidentemente aqueles tratamentos em que foram observadas as melhores taxas de crescimento.

O maior conteúdo de amido (36%) reprimiu a síntese de amilase, fato que pode estar relacionado à intolerância, pela maioria dos peixes carnívoros, a grandes quantidades de polissacarídeos na dieta. Entretanto, WILSON & POE (1985) destacam que espécies tropicais têm maior capacidade de utilização de carboidratos que as marinhas ou de águas frias, apresentando digestibilidade superior a 70% para o amido, como as verificadas em bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), espécie bastante próxima do pintado. Por outro lado, WILSON (1994) acrescentou que mesmo não sendo conhecidas ainda as exigências dietéticas em carboidratos para peixes, algumas espécies demonstram redução no crescimento quando alimentadas com quantidades mínimas desta classe de nutrientes.

De forma geral, as atividades proteolítica e amilohidrolítica estão relacionadas ao hábito alimentar da espécie, e carnívoros têm maiores quantidades de proteases que espécies não-carnívoras. Entretanto, a diferença na atividade proteolítica, entre as espécies, é muito menor que a diferença na atividade de carboidrases, como por exemplo a de amilase (KUZ'MINA, 1991; DE SILVA & ANDERSON, 1995)

O conteúdo de lipídio parece também ser bastante importante na dieta de pintado, pois se assume que peixes, principalmente carnívoros, consumam alimentos ricos em gorduras. Neste sentido, a ocorrência de lipase no trato digestório de peixes é plenamente justificada (CHAKRABARTI et al., 1995).

Mesmo que a variação de proteína experimentada neste trabalho não tenha sido destinada à investigação do caráter indutivo de lipases, foi possível verificar que a atividade lipolítica no intestino médio do pintado foi diferenciada. Esta é, provavelmente, a secção do trato digestório onde a maior parte dos processos digestivos seja concluída, e a maior quantidade de lipídios acessada. Nas demais porções do intestino, anterior e posterior, e no estômago, também foram constatadas atividades lipolíticas menores, ainda que na mesma proporção nestas secções.

CHAKRABARTI et al. (1995) relataram que as diferentes partes do trato gastrintestinal de 11 espécies de peixes têm potencial para a digestão de lipídios, independentemente do hábito alimentar. Além disso, a presença da maioria das classes de enzimas digestivas nestas espécies sugere que sua base genética tenha preservado tais sistemas enzimáticos durante o processo de evolução dos peixes. Postulam ainda a preferência das espécies por algum tipo de alimento. Assim, seria mais apropriado designar o hábito alimentar dos peixes, de acordo com sua preferência, como principalmente carnívoro, predominantemente herbívoro, e assim

sucessivamente. Concluíram estes autores que a habilidade de uma espécie para digerir diferentes alimentos depende principalmente da sua estratégia digestiva, a qual pode refletir seu hábito alimentar com maior propriedade.

A atividade lipolítica foi reportada no estômago de esturjão branco (BUDDINGTON & DOROSHOV, 1986) e esterásica no estômago de turbot (*Scophthalmus maximus*) (MUNILLA-MORÁN & STARK, 1990). KOVEN et al. (1997) avaliando a digestão de várias classes de lipídios por turbot (*S. maximus*) em estudos “in vitro” e “in vivo”, verificaram as maiores atividades lipolíticas e absortivas nas porções terminais do intestino. Afirmaram então que o maior sítio destes processos, na espécie, é a porção mediana do intestino.

Nossos resultados com juvenis de pintado submetidos a variações de PB na dieta são concordantes com os de BORLONGAN (1990) e KOVEN et al. (1994b) que reportam as menores atividades lipolíticas no estômago, ainda que a atividade de lipase neutra esteja distribuída ao longo de todo trato digestório (CHAKRABARTI et al., 1995; IZQUIEDO & HENDERSON, 1998). Contrastando com a maior atividade lipolítica encontrada no intestino anterior de “milkfisk” (*Chanos chanos*) (BORLONGAN, 1990), em bacalhau de Atlântico, “gilthead seabream”, pargo vermelho (*Pagrus pagrus*) e turbot, estão localizadas na região posterior do intestino (KOVEN et al., 1994b; IZQUIERDO et al., 1997; IZQUIEDO & HENDERSON, 1998).

Embora seja relatada a existência de uma relação evidente entre a alimentação e a natureza da atividade enzimática relativa de um animal (YONGE, 1973), eventualmente, nem todas as enzimas detectadas no trato gastrintestinal estarão correlacionadas positivamente com a dieta (OLATUNDE & OGUNBIYI, 1977). CHESLEY (1934) verificou que *Brevoortia sp*, uma espécie de teleósteo marinho, consumidor de grandes quantidades de lipídios na dieta, apresenta uma concentração de lipase semelhante às demais espécies por ele estudadas, que consumiam relativamente menores quantidades de lipídios na dieta.

NAGASE (1964), estudando a tilápia mossambica (*Sarotherodon mossambicus*), não observou correlação da lipase com o conteúdo de gordura da dieta. Por outro lado, REIMER (1982), estudando matrinxã (*Brycon cf. melanopterus*), concluiu que seu padrão enzimático de lipase está ajustado à quantidade de gordura presente no conteúdo intestinal.

SEIXAS FILHO et al. (2000) estudaram atividades de lipases no quimo dos onívoros, piau e piracanjuba, e do carnívoro pintado. Os autores verificaram que o piau apresentou maior atividade que o pintado, o qual apresentou maior atividade que piracanjuba.

DAS & TRIPATHI (1991) reportaram que a atividade de lipase tanto do intestino quanto do hepatopâncreas de carpa capim (*C. idella*) aumenta cerca de dez vezes quando os lipídios da dieta subiram aproximadamente de 2% para 8%.

SETHURAMALINGAM & HANIFFA (2002) verificaram a possibilidade de inclusão de diferentes ingredientes disponíveis na dieta. Estudando o ciprinídeo indiano *Labeo rohita* (Ham.), uma espécie que mostra clara preferência a certos componentes protéicos de origem animal ou vegetal na dieta, observaram a influência dos nutrientes sobre várias classes de enzimas digestivas. Estes autores reportaram um aumento na secreção de protease e lipase nas porções média e posterior do intestino quando 40% de farinha de cabeça de camarões ou farinha de intestino de aves eram adicionados à dieta. Neste sentido, salientam que a alta secreção de lipase no intestino médio deve-se a uma versatilidade da digestão de lipídios.

Considerando-se a grande variação no teor de proteína analisada (20 a 50%), e o perfil enzimático adaptativo apresentado pelos juvenis de pintado, assumimos que a otimização da alimentação é completamente dependente da melhor proporção entre proteínas, energia e carboidratos.

6.3.2 Variação de energia bruta

Alterações na composição da dieta não podem ser consideradas como a primeira e única causa das várias mudanças enzimáticas que ocorrem no trato gastrintestinal de larvas durante a ontogenia. Entretanto, elas determinam o platô de atividade das enzimas digestivas (HENNING, 1987). BUDDINGTON & DIAMOND (1989), afirmam que o início da atividade destas enzimas está subordinado a sinais internos que são geneticamente determinados a ocorrer no tempo correto e de forma gradual.

Os resultados obtidos com variação de proteína bruta na dieta indicam que não há indução da atividade proteolítica e que, provavelmente, estas enzimas sejam de caráter constitutivo. A alteração nas atividades enzimáticas verificada em função da variação de energia ou conteúdo de lipídios da dieta, também não sugere um caráter indutivo às enzimas digestivas de pintado. Embora a atividade proteolítica inespecífica tenha apresentado valores mais altos nos animais arraçados com maior energia bruta, este padrão não foi seguido pela demais enzimas proteolíticas analisadas, tripsina e quimiotripsina.

Se as variações pontuais na atividade proteolítica forem comparadas aos dados obtidos com os intermediários metabólicos, ou com o desempenho produtivo, seremos levados a concluir em favor da redução do aporte energético das rações na forma de lipídio e, conseqüentemente, maior energia bruta. Neste sentido, as maiores atividades proteolíticas

inespecíficas para animais arraçoados com maior quantidade de energia bruta estariam relacionadas à necessidades de suprir em aminoácidos a serem utilizados como fonte de energia.

As atividades enzimáticas observadas sugerem que principalmente a pepsina responde à variação de energia da ração, pois as variações apresentadas pela tripsina são pontuais, não sugerindo qualquer tendência de indução ou supressão em função da alteração nutricional.

A quimiotripsina variou menos quando comparada às atividades do experimento proteína-variável. Mesmo assim, apresentou ligeira diminuição, em função do aumento de energia bruta na dieta, o que deve estar mais relacionado ao grau de saciedade dos animais, influenciado pelo aporte energético das dietas.

Embora as concentrações de amido de milho tenham diminuído com o aumento de energia bruta das dietas, esta variação foi pequena (27,3 a 23,2). A única atividade responsiva observada foi de amilase no estômago nos animais arraçoados com as maiores quantidades de energia; coincidentemente onde ocorriam as menores concentrações de amido. Embora não tenham apresentado variação significativa em relação ao conteúdo de energia da dieta, as maiores atividades amilohidrolíticas foram observadas no intestino anterior. Nas porções mediana e posterior foram observadas as menores atividades desta hidrolase.

As maiores atividades de lipase foram observadas nas porções anterior e mediana do intestino, enquanto as menores foram observadas no estômago e intestino posterior. Embora tenhamos observado diferenças significativamente maiores da atividade lipolítica nos animais arraçoados com as menores quantidades de lipídios, o grau de variação de resposta somado a um possível quadro de diminuição de ingestão de alimento, em função do aporte energético da dieta, indica que a lipase analisada, assim como as proteases, sejam de caráter constitutivo, ainda que um excesso de substrato possa atuar suprimindo essa atividade. Diferentemente do observado para os juvenis de pintado, DAS & TRIPATHI (1991) verificaram que a atividade de lipase, tanto no intestino quanto no hepatopâncreas de carpa capim (*C. idella*), aumentou cerca de dez vezes quando a quantidade de lipídios da dieta subiu de 2 para 8%.

A análise conjunta dos resultados com variação de proteína e lipídios, ou energia no arraçoamento de juvenis de pintado, mostra que existem variações na quantidade de todas as enzimas digestivas analisadas. As enzimas apresentaram atividades sensivelmente menores no experimento com variação de energia na dieta. Este fato pode estar relacionado também aos diferentes lotes de peixes utilizados nos experimentos. Embora estes lotes tenham sido provindos de uma única fazenda, o Projeto Pacu, eles podem ter procedência genética completamente diferente.

6.4 MORFOLOGIA DO TRATO DIGESTÓRIO

A morfologia do trato gastrintestinal de peixes teleósteos tem sido extensamente estudada, principalmente no que se refere à sua relação com o hábito alimentar (ANDERSON, 1986), naquelas espécies que apresentam importância na pesca esportiva, na alimentação ou como peixe ornamental (GARGIULO et al., 1998). Estes estudos normalmente revelam que o intestino de teleósteos, ainda que mais simples que o dos vertebrados superiores, mostram numerosas variações específicas relacionadas à dieta, bem como a filogenia e forma do corpo (KAPOOR et al., 1975; KUZ'MINA, 1991).

Em relação à coloração e morfologia do fígado, estômago, intestino, vesícula biliar e rim, constatou-se macroscopicamente que não houve diferença entre os tratamentos. O trato digestório foi caracterizado pela presença de um estômago bem definido seguido por um intestino curto, característico dos peixes carnívoros, fato que de acordo com SIS et al. (1979) pode ser compensado pelo desenvolvimento da superfície mucosa.

A presença da valva íleo-retal que pode ser vista a olho nu no intestino de pintado, é uma característica morfológica também observada em várias outras espécies de peixes como “sea-bream” (*Sparus aurata*) (CATALDI et al., 1987), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) (SIS et al., 1979) em que o autor relacionou com a prevenção do refluxo do bolo fecal, *Gasterosteus possesses* (HALE, 1965), enguia (*Anguilla anguilla*) (CLARK & WITCOMB, 1980). Entretanto, esta estrutura está ausente em híbridos de tilápia (GARGIULO et al., 1998).

SEIXAS FILHO et al. (2001a) investigando a anatomia funcional e alguns parâmetros morfométricos de pintado, também descreveu a presença da valva íleo-retal para esta espécie, e em função dela, dividiu o intestino em apenas duas porções, a média posicionada anteriormente a valva e a posterior, ou retal, adjacente à valva. Estudando a disposição na cavidade celomática, estes autores também constataram que o arranjo intestinal de pintado é compatível com a maioria dos peixes carnívoros, ou predominantemente carnívoro, por apresentar arranjo quase retilíneo. Ressaltaram que as circunvoluções das alças finais do intestino médio podem ser vistas como adaptações a um possível hábito onívoro, preferencialmente carnívoro. Em relação à idade, verificou que as pregas encontravam-se mais complexas nos animais maiores. Somado a isto, o estudo inter-relacionado o arranjo das pregas intestinais e a velocidade de transporte do alimento no intestino por eles realizado, sugeriu que o padrão longitudinal com inúmeras anastomoses retardam o avanço no sentido aboral, o que possibilita maior período digestivo e conseqüentemente, maior aproveitamento dos nutrientes pela exposição do material alimentar à mucosa intestinal, contribuindo para a

formação do bolo fecal. As pregas da mucosa próxima ao ânus apresentaram direção longitudinal, sugerindo um auxílio na expulsão do bolo fecal, direcionado-os para o exterior.

6.4.1 Análise microscópica do intestino

As análises histológicas revelaram algumas peculiaridades do intestino de pintado arraçoados com diferentes quantidades de proteína na dieta.

Concordando com FLORES QUINTANA et al. (1997) que descreveram previamente a estrutura histológica básica do intestino de pintado, observou-se a presença de uma mucosa bem desenvolvida, submucosa, túnica muscular e serosa e, assim como SEIXAS FILHO et al. (2001a), também dividiram o intestino da espécie em apenas duas porções, separadas pela valva íleo-retal. PEREYRA et al. (2002) através de microscopia eletrônica de varredura constataram a presença de células cilíndricas simples ou colunares, providas de inúmeros microvilos, formando o epitélio que recobre as pregas longitudinais do intestino de pintado, além da presença de inúmeras células mucosas.

Pelas técnicas histológicas e histoquímicas utilizadas, verificou-se que o epitélio do intestino é constituído aparentemente por apenas dois tipos de células, as epiteliais ou enterócitos e as células secretoras de muco ou caliciformes. Recentemente, FERRARIS & AHEARN (1984) revisando os dados de transporte de nutrientes no intestino reportaram que ainda não está claro se os processos de absorção e secreção ocorrem no mesmo ou em diferentes tipos de células.

SEIXAS FILHO et al. (2001b) investigando o sistema endócrino difuso no intestino de teleósteos de água doce verificou a presença de células do tipo fechado, que são aquelas que não estão em contato com o lúmen, nas porções mediana e posterior do intestino de pintado, que poderiam atuar no mecanismo de controle da absorção dos nutrientes do alimento.

A reação de PAS evidenciou a presença de células caliciformes nas diferentes porções do intestino analisadas. A intensidade de coloração variou no sentido antero-posterior, intensificando-se na porção final. A resposta negativa da análise histoquímica de PAS/AB pH 2,5 na investigação de polissacarídeos neutros ou ácidos associados, indica a ausência de cadeias mistas de glicosaminoglicanas. Da mesma forma, não foi detectada a presença de glicogênio em nenhuma das porções do intestino, conforme observado nas lâminas onde se empregou a reação de PAS + amilase.

CLARKE & WITCOMB (1980) também verificaram através de secções com e sem diastase seguida de PAS a ausência de glicogênio nas paredes intestinais de enguias (*A. anguila*). BUCKE (1971) relatou que as lâminas foram PAS positivas, mas não considerou a presença de

glicogênio no trato gastrintestinal de “pike” (*Esox lucius* L.). Também foram observadas reações negativas na investigação de mucossubstâncias ácidas com radicais sulfatados (AB pH 0,5) ou carboxilados (AB pH 2,5). Estes dados sugerem a presença de mucossubstâncias neutras, aparentemente formadas pela predominância de complexos glicoprotéicos (DERMER, 1973; DE BOLD et al., 1978). O papel das mucossubstâncias nos processos digestivos e absorptivos ainda não está bem definido, mas OSTOS GARRIDO et al. (1996) sugerem que podem estar envolvidas na proteção, e que as de caráter neutro estão relacionadas com o controle do pH dos compartimentos do trato gastrintestinal.

6.4.2 Parâmetros Morfométricos

SEGNER et al. (1989) estudando o perfil enzimático do trato digestório de larvas de *Coregonus lavaretus* L. observou que no desenvolvimento ontogenético, a histologia, o comprimento e o volume mucoso intestinal foram governados somente pelo comprimento do peixe e não pela dieta. Observações concordantes com a possibilidade da influência da dieta no desenvolvimento ontogenético da morfologia intestinal foram realizadas por DABROWSKI & KAUSHIK (1985) para larvas de *Coregonus schinzii palea*.

6.4.2.1 Diâmetro do tubo

O fato da porção mediana ter se apresentado mais delgada quando comparada com as demais pode estar relacionado com as baixas atividades enzimáticas observadas para este segmento, evidenciando um provável caráter absorptivo desta região. Corroborando com esta hipótese, nesta região também foram observados os menores números de células caliciformes, que desempenham um papel de proteção, podendo assim diminuir o contato dos enterócitos com a digesta a ser absorvida, caso estivessem presentes em grandes quantidades.

LUNDSTEDT (1999) investigando a influência de fontes protéicas na morfologia digestiva para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) verificou que os animais que haviam passado pelo tratamento de reversão sexual masculinizante com o hormônio 17α -metiltestosterona e alimentados com proteína de origem vegetal à base de concentrado protéico de soja apresentaram um maior diâmetro externo do canal intestinal na porção mediana do intestino. A autora sugere que além dos possíveis efeitos anabólicos do hormônio, a qualidade da proteína também pode resultar em alterações morfológicas no sentido de melhorar o aproveitamento das frações nutritivas da dieta.

6.4.2.2 Altura do epitélio

O aumento nos teores de proteína nas dietas praticamente não resultou em aumento da secreção de suco proteolítico no trato digestório, mostrando que a melhor utilização de proteína pela espécie ocorra independente do seu conteúdo na dieta. Entretanto, o aumento do conteúdo de proteína na dieta, sob influência das enzimas hidrolíticas, deve aumentar a disponibilidade destes nutrientes. A somatória destes fatores pode explicar a menor altura do epitélio intestinal da porção anterior para os peixes alimentados com a dieta contendo 20%PB. A não responsividade observada para o intestino médio, onde também não foram detectadas atividades da enzima proteolítica inespecífica e baixas atividades de tripsina e quimiotripsina, são fortes indicativos de que esta se constitui em uma região potencialmente absorptiva. LUNDSTEDT (1999) não verificou qualquer alteração na altura do epitélio mucoso da porção mediana do intestino em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) em função do tratamento masculinizante ou da fonte protéica da dieta.

6.4.2.3 Mucosa intestinal

A não alteração do padrão de altura da mucosa intestinal entre os tratamentos e para as secções anterior e média do intestino ressalta mais uma vez a habilidade dos animais em aproveitar os nutrientes, principalmente proteínas, independente da sua concentração na dieta. Entretanto, quando comparados entre si, a porção anterior apresentou vilosidades com praticamente o dobro da altura das demais porções.

Na secção posterior do intestino, os peixes alimentados com dieta contendo 30% PB apresentaram o menor padrão de pregas da mucosa. Entretanto, para os teores de proteína superiores a 30%, o tamanho das pregas voltou a aumentar. Desta forma, observamos que o benefício proporcionado pela secreção de enzimas não mais se alterou, mantendo-se o padrão para esta porção intestinal. Assim, se esta adaptação não acompanhou o aumento dos teores de proteína a partir dos 30% para um aumento da disponibilidade de nutrientes, a única estratégia foi aumentar a altura das pregas da mucosa. Nota-se assim que, quando ocorre um aumento da disponibilidade enzimática e efetividade digestiva, a capacidade absorptiva fica diminuída. Esta adaptação morfológica foi responsiva, à semelhança das respostas bioquímicas apresentadas pela espécie. Além disso, a altura da mucosa diminuiu no sentido antero-posterior do intestino, mas só apresentou uma redução significativa na porção terminal, naqueles animais tratados com 30% de proteína. Este fato está provavelmente relacionado às maiores atividades enzimáticas, em valores absolutos ainda que não significativos, apresentadas pelos animais alimentados com dieta contendo 30% PB, o que aumentou a

disponibilização de nutrientes, facilitando a absorção e descartando a necessidade de um ajuste morfológico.

Concordando com o padrão apresentado pelo pintado, SIS et al. (1979) relataram a ocorrência de um gradual encurtamento e engrossamento das pregas mucosas da região pilórica para a região posterior do intestino de *I. punctatus*. CLARKE & WITCOMB (1980), investigando a morfologia do trato gastrintestinal de enguias (*A. anguila*) verificaram que as maiores pregas, que chegavam a obscurecer virtualmente o lúmen, estavam localizadas na porção anterior do intestino, mas que progressivamente, em direção ao reto, elas iam diminuindo de altura. Dados concordantes também foram observados por STROBAND (1977) para carpa capim (*C. idella*) e por BUCKE (1971) para “pike” (*E. lucius*).

GARGIULO et al. (1998) verificaram que a porção posterior do intestino de tilápia híbrida (nilótica x mossambica x zilli) apresentou uma notável redução na altura e complexidade das pregas mucosas, que se tornaram baixas e pouco onduladas. No intestino proximal, os autores relacionaram a complexidade das pregas ao aumento de superfície e auxiliando na mistura do alimento com o suco digestivo pancreático, bem como ao muco secretado pelas células caliciformes. Por outro lado, LUNDSTEDT (1999) verificou que as pregas da porção mediana do intestino de tilápia do Nilo apresentavam uma tendência de elevação naqueles animais que não sofreram tratamento para reversão sexual masculinizante e receberam dietas a base de proteína de origem vegetal, relacionado este fenômeno à necessidade de melhor aproveitamento da proteína concentrada de soja, carente em aminoácidos essenciais.

SEIXAS FILHO et al. (2001a) relatam para alguns dos exemplares de pintado analisados, a presença de uma invaginação valvar, que pode ocorrer no intestino médio e/ou no limite caudal desta porção intestinal, ou ainda na porção retal, auxiliando na contenção das paredes intestinais a distensões excessivas, impedindo o refluxo do material digerido. Esta estrutura também foi observada em alguns dos exemplares submetidos às análises histológicas previamente arraçoados com diferentes teores de proteína bruta na dieta.

6.4.2.4 Número de células caliciformes

Células caliciformes são caracterizadas por apresentar grânulos de secreção glicoprotéica e têm o papel de secretar muco com a finalidade de proteger a superfície nua das células absorptivas. DE SILVA E ANDERSON (1995) relatam um número de células caliciformes da porção posterior ou retal do intestino de peixes variando conforme o hábito alimentar e ao jejum.

O aumento do epitélio a partir da dieta contendo 30% PB sugere a necessidade de maior proteção contra a atuação das enzimas digestivas proteolíticas, tal como observado no experimento onde foram registradas as maiores atividades enzimáticas.

O aumento dos teores de proteína da dieta resultou em um aumento no número de células caliciformes em regiões do intestino onde previamente ocorriam em quantidades menores, como no intestino anterior e médio. A resposta mais evidente observou-se na primeira fração proximal, visto que a distal foi pouco responsiva ao aumento da proteína da dieta. O número de células caliciformes aumentou significativamente no intestino anterior, principalmente nos animais arraçoados com 30% PB na dieta, chegando até a superar o número de células da porção distal, onde normalmente elas ocorrem em maior número (KAPOOR et al., 1975; CATALDI et al., 1987; DE SILVA & ANDERSON, 1995). Na porção anterior, esta exacerbação pode estar relacionada com sua função de proteção do epitélio contra a digesta provinda do estômago, rica em enzimas digestórias e com pH acentuadamente baixo. No intestino médio a responsividade foi observada apenas para os maiores teores de proteína na dieta.

LIEM (1967) sugeriu que a flutuação no número de células caliciformes reportada por vários autores provavelmente esteja relacionada a diferentes condições na alimentação das espécies investigadas. CATALDI et al. (1987) verificaram a presença de células caliciformes por todo o epitélio mucoso do intestino de “sea-bream” (*S. aurata*) e notaram que o número destas células secretoras de muco aumentava em direção à porção posterior.

SIS et al. (1979) salientam que as células secretoras de muco são também encontradas no trato digestório de mamíferos, mas não em número tão abundante como em bagre de canal e outros teleósteos. Os autores verificaram pela reação de PAS – Alcian Blue a presença de mucopolissacarídeos ácidos compondo a secreção das células caliciformes por todo o comprimento do intestino de bagre do canal (*I. punctatus*). Resultados semelhantes foram obtidos por ANDERSON (1986) na investigação da estrutura do trato gastrintestinal de *Girella tricuspidata*. Esse autor constatou que as células caliciformes do intestino coram-se fortemente por AB pH 2,5, o que referiu como uma propriedade comum entre os vertebrados.

CLARKE & WITCOMB (1980) constataram que a mucosa intestinal de enguia (*A. anguila*) também só contém os mesmos dois tipos de células, as colunares do epitélio e as caliciformes. As mais numerosas foram as células colunares que apresentaram substâncias mucopolissacarídicas neutras, relacionadas à função absorptiva. O autor destacou que substâncias desta natureza estão normalmente associadas com sítios de fosfatase alcalina, e assistem à digestão, emulsificação do alimento para formação do quimo, controle do pH

quando no estômago e lubrificação do bolo fecal no intestino. As células caliciformes estavam distribuídas por todo o intestino, aumentando em número no sentido posterior. Apresentaram através de reação com PAS e PAS/AB a presença de mucopolissacarídeos ácidos ou neutros e a reação com fuccina aldeídica indicou a natureza granular da mucina.

BUCKE (1971) verificou que as células caliciformes de “pike” (*E. lucius* L.) aumentavam em número na metade posterior do intestino, estando mais proeminentes no topo destas pregas do que nas criptas. Além disso, constatou que na primeira metade do intestino, as células caliciformes, mesmo em menor número, eram compostas por mucossustâncias sulfatadas ácidas, alteradas para neutras na porção anal do trato. Esse autor relacionou a função das mucinas neutras e ácidas à digestão, absorção, proteção inclusive contra fermentos provocados pelo material ingerido, seja por espinho ou material duro da presa, partícula alimentar como areia e cascalhos, assim como para lubrificação do epitélio.

BUCKE (1971) relata ainda que uma área de distribuição de mucina, com células caliciformes contendo tanto mucopolissacarídeos ácidos como neutros e as células colunares do epitélio contendo predominantemente mucossustâncias neutras deve ser de ocorrência esperada para todos os teleósteos carnívoros, apresentando-se maior que a apresentada por herbívoros.

RIBEIRO et al. (1999) verificaram que o número de células mucosas no trato gastrintestinal de *Solea senegalensis* aumentou em função do desenvolvimento do organismo e que os componentes do muco eram ricos em mucossustâncias neutras. Os autores acrescentaram que a presença de mucinas neutras no trato digestivo está relacionada à absorção de substâncias facilmente digeridas como dissacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta.

GARGIULO et al. (1998) constataram a presença de células caliciformes em vários estágios de desenvolvimento dispersas entre as células colunares do intestino de tilápia híbrida. Estes autores verificaram uma uniformidade de distribuição ou até uma tendência de diminuição destas células na porção posterior do intestino. Ressaltaram ser isso contrário ao descrito para outras espécies e relacionaram sua importância à lubrificação fecal e que um maior ou menor número poderia estar relacionado com a dieta.

KAPOOR et al. (1975) sintetizam a partir de uma grande revisão de literatura que as células produtoras de muco do canal intestinal de teleósteos parecem conter ou mucossustâncias ácidas ou neutras.

6.4.2.5. Túnica muscular

O padrão das camadas musculares acompanhou de forma semelhante, e coerente, o padrão das vilosidades, pois espera-se que uma maior eficiência dos vilos se dê quando a motilidade está aumentada. Na porção posterior do intestino a espessura total das camadas musculares foi superior às demais, fato provavelmente correlacionado com a atividade peristáltica para expulsão do bolo fecal.

SIS et al. (1979) relataram um engrossamento da túnica muscular no segmento terminal do intestino de bagre do canal (*I. punctatus*), uma espécie muito próxima taxonomicamente do pintado, conforme mencionado anteriormente. Além disso, os autores constataram a ausência de cecos pilóricos e da camada muscular da mucosa, características que aumentam o grau de semelhança entre as duas espécies.

CLARKE & WITCOMB (1980) verificaram que a camada circular interna da túnica muscular de enguias apresentou-se três vezes mais grossa do que a longitudinal externa. Além disso, estes autores também relataram o espessamento da túnica muscular na porção retal do intestino da espécie. Embora não tenha sido quantificada tal diferença, a camada circular interna do intestino de pintado também mostrou a mesma característica observada para enguias, em sendo mais espessa.

LUNDSTEDT (1999) verificou o espessamento da camada muscular do intestino médio de tilápia do Nilo que receberam proteína de origem vegetal à base de concentrado protéico de soja na dieta. GARGIULO et al. (1998) analisando histologicamente híbridos de tilápia averiguaram que a espessura da túnica muscular na porção posterior é a mesma da anterior. Estes autores acrescentaram que um aumento na espessura da túnica muscular na camada posterior, nas espécies em que ocorre, está relacionado ao conteúdo de minerais da dieta e que a falta de desenvolvimento desta musculatura em tilápias híbridas seria consequência da dieta pobre nestes micro-nutrientes.

6.4.2.6 Diâmetro da luz intestinal

Não houve diferenciação significativa do diâmetro da luz, ou lúmen, entre os tratamentos, considerando-se a mesma porção intestinal. Embora também não tenha havido diferenças significativas deste parâmetro nas diferentes porções, nota-se que o diâmetro é ligeiramente menor na porção intestinal mediana, em relação ao diâmetro nas demais secções do órgão, coerentemente acompanhando o resultado dos demais parâmetros morfométricos analisados.

6.5. DESEMPENHO PRODUTIVO

6.5.1 Variação de proteína bruta na dieta

Os peixes carnívoros são duas a três vezes mais eficientes que aves e suínos na conversão de energia e proteína e, como a domesticação é um processo contínuo, eles se tornarão mais e mais eficientes e competitivos (GJEDREM, 2000). TACON & COWEY (1985) ressaltam que eles são 20 vezes mais eficientes que aves, suínos ou gado na conversão de proteína dietética em proteína corpórea.

Nos experimentos de variação de proteína bruta na dieta, com duração de 28 e 90 dias, os animais arraçoados com 40% PB tiveram maior crescimento, seguidos pelos tratamentos de 30, 50 e 20% PB, respectivamente. As diferenças observadas no ganho de peso corresponderam às adaptações metabólicas promovidas pela dieta nos peixes em fase de crescimento. Segundo GARLING & WILSON (1976), os níveis de proteína da dieta entre 22 e 40% resultaram em crescimento máximo no bagre de canal (*I. punctatus*). Esses autores atribuíram esta ampla variação na exigência protéica como função das técnicas de produção e da composição das dietas.

DANIELS & GALLAGHER (2000) verificaram que linguados (*P. dentatus*) alimentados com 56% PB apresentaram um ganho de peso significativamente maior que os animais alimentados com menores teores de inclusão protéica. Além disso, não foram verificadas quaisquer alterações na composição de carcaça destes animais em função da PB.

Segundo CHO et al. (1986), a otimização do balanço dos compostos energéticos é de fundamental importância no arraçoamento de peixes, pois um excesso ou uma deficiência de energia não-protéica (lipídios e carboidratos) pode resultar em diminuição do crescimento. Se a dieta é deficiente em energia não-protéica, as proteínas serão utilizadas com propósito energético (metabolismo basal e atividades voluntárias) ao invés de serem direcionadas para a síntese protéica. No mesmo sentido, se a dieta contém um excesso de energia não-protéica, o apetite e/ou a demanda energética poderão ser satisfeitos antes que quantidades suficientes de proteína (e possivelmente outros nutrientes) sejam ingeridas para satisfazer às necessidades de síntese protéica e crescimento.

KOHLA et al. (1992) verificaram uma correlação inversa entre os níveis de proteína na dieta e o ganho de peso, taxa de eficiência protéica e taxa de proteína produzida em juvenis de tambaqui (*C. macropomun*). Estes autores reportaram ainda que LUQUET (1971) verificou o melhor crescimento em trutas arco-íris usando dietas com 30% de PB. As maiores taxas de

crescimento em bagre de canal com peso médio de 14g, em experimentos realizados à temperatura de 27°C, foram obtidas com 35% de proteína bruta e 12% de gordura. Entretanto, em exemplares com peso médio superior a 100g, melhor crescimento ocorreu com dietas contendo teores 25% de PB e 12% de gordura. Portanto, o requerimento energético tem sido expresso como uma função do nível de proteína (CHO et al., 1986).

Para WINFREE & STICKNEY (1981), se uma quantidade insuficiente de energia não protéica está disponível, ou a proteína é baixa em qualidade, haverá uma freqüente desaminação para suprir a demanda energética metabólica. Por outro lado, um excesso de proteína em relação à energia poderá, na verdade, reduzir o crescimento devido à demanda metabólica para excreção de nitrogênio. A síntese e a deposição de proteínas são acompanhadas pelo acúmulo de água nos tecidos o que leva a um ganho de peso até cinco vezes maior do que a proteína obtida. Por outro lado, a deposição de lipídios não leva a qualquer ganho adicional em água, simplesmente substituindo-a nos diferentes compartimentos do corpo (DABROWSKI et al., 1992).

DEL CARRATORE (2001) testou dietas semipurificadas, isoprotéicas, com 36% PB, com níveis constantes de fibra de 8,5%, aproximadamente 9% de lipídios e quatro níveis de inclusão de amido (10, 16, 22 e 28%) para juvenis de pintado ($16,5 \pm 1,7$ g e $15,7 \pm 2,1$ cm). Esse autor observou ganho de peso inversamente proporcional ao nível de inclusão de amido, tanto aos 30 como aos 60 dias de experimentação, e justificou tal resultado como reflexo das dificuldades digestivas e/ou metabólicas nos peixes arraçoados com teores superiores a 16% de amido, por se tratar de uma espécie carnívora. Atribuiu ainda a possível causa dos resultados obtidos à uma provável redução da atividade da amilase e ao tamanho reduzido do trato digestório da espécie, o qual resultaria em rápida passagem do alimento pelo tubo digestório, e dificultaria a digestão de alimentos mais complexos tais como polissacarídeos.

Segundo HUNG et al. (1990), a presença de grandes quantidades de amido no trato digestório pode levar a um acentuado aumento na osmolaridade do bolo alimentar, gerando um acúmulo de água, aumentando a velocidade de passagem e podendo ocasionar diarreia. SPANNHOF & PLANTKOW (1983), testando a digestão de carboidratos para truta arco-íris, observaram uma ineficiente utilização do amido cru, a partir de 20% de inclusão na dieta. Estes autores sugeriram que a baixa atividade da amilase não seria devido à redução na secreção, mas sim devido à adsorção da enzima ao amido cru, inibindo sua ação amilohidrolítica. Além disso, os autores constataram ainda que o tempo de trânsito da dieta rica em amido era duas vezes maior do que a dieta rica em proteína, em função de um

aumento no volume de secreção do suco intestinal, sugerindo que a redução no tempo de exposição impediria maior absorção do amido.

Mesmo não tendo sido verificado o tempo de passagem do alimento pelo trato digestório em juvenis de pintado, arraçoados com teores crescentes de proteína, constatou-se que a partir de 25% de inclusão de amido de milho na dieta a secreção de amilase foi inibida, principalmente no estômago. Nesta secção, a atividade apresentou-se menor nas concentrações de 1,94 e nas superiores a 36,23, o que correspondeu aos tratamentos de 50 e 20% PB, respectivamente. Entretanto, SPANNHOF & PLANTKOW (1983) salientam que se o amido é parcialmente hidrolisado, no momento da pelletização, a taxa de absorção máxima é alcançada com um nível de inclusão de 30 a 35% na dieta de trutas arco-íris.

CHOU et al. (2001) testando níveis de proteína e lipídios na dieta do carnívoro marinho cobia (*Rachycentron canadum*), verificaram que dietas contendo a menor (36%) e a maior (60%) quantidade de proteína bruta apresentaram as menores taxas de crescimento e conversão alimentar, enquanto os melhores resultados foram obtidos pelo grupo arraçoado com 44% PB. Estes dados são comparáveis com os apresentados por pintado em função das variações nutricionais das dietas proteína-variável.

Evidentemente, a quantidade de 20% PB na dieta não supriu os requerimentos nutricionais dos juvenis de pintado. Por outro lado, níveis tão altos quanto 50% PB poderiam significar um excesso de proteína em relação à energia disponível na dieta, fato esse que pode ser o principal responsável pelo crescimento reduzido em função da alta demanda energética para excreção de nitrogênio. Com base nestas informações, afirmamos mais uma vez que o crescimento não é otimizado somente elevando-se os níveis de proteína na dieta, mas levando-se em conta o balanço correto entre os compostos energéticos e os teores de proteína.

6.5.2 Variação de energia bruta na dieta

Os lipídios servem como uma importante fonte de energia dietética para os peixes, principalmente os marinhos que, geralmente, têm uma capacidade limitada de utilização de carboidratos como fonte de energia (CHOU et al., 2001). Os maiores estoques de gordura em peixes, predominantemente como triglicerídeos, são em ordem decrescente o mesentério adiposo (gordura visceral), o músculo e o fígado, (SHERIDAN, 1988).

As alterações no ganho de peso dos animais e deposição de gordura na carcaça (IGVS), em função do aumento de energia bruta, foram conseqüência do aproveitamento da fração lipídica da dieta. O ganho de peso obtido pelos peixes arraçoado com 3.500 kcal EB/kg de ração foi muito superior (200%) ao apresentado pelos demais grupos ($\approx 55\%$). Este dado

indica que os maiores incrementos em energia tenham, provavelmente, levado a uma diminuição de ingestão de alimento e rearranjos metabólicos para tentar minimizar a insuficiência dos demais nutrientes. A diminuição do IGVS indica que os peixes arraçoados com as maiores quantidades de energia foram acometidos por um quadro lipolítico e tiveram suas reservas graxas diminuídas, provavelmente na tentativa de manutenção da glicemia através de gliconeogênese.

Este quadro sugere que teores superiores a 3.500 kcal/kg na dieta para juvenis de pintado não proporcionem efeito poupador de proteínas e vem de encontro com as observações de WINFREE & STICKNEY (1981) e CHOU et al. (2001). Estes autores apontam que um excesso de energia, ou um desbalanço na relação energia/proteína, como responsáveis pela produção de peixe gordo, pela deposição excessiva de gordura na cavidade visceral e outros tecidos, ou pela redução do consumo alimentar, prejudicando a quantidade total de proteína ingerida, e inibindo a utilização adequada das outras frações nutritivas da dieta.

JOHNSON et al. (2002) estudaram os efeitos dos níveis de energia na dieta de juvenis de Nassau Grouper (*Epinephelus striatus*), uma espécie de peixes carnívora, encontrada nos recifes de corais no mar do Caribe e que vem sofrendo acentuado esforço de pesca devido à sua importância econômica como peixe de mesa. Estes autores testaram níveis de 6 a 15% de inclusão de lipídios em dietas isonitrogenadas (45% PB) e verificaram que o melhor crescimento foi do grupo arraçoado com a menor quantidade de lipídio. Somado a isto, observaram uma redução no consumo de alimento e conseqüente diminuição da taxa de eficiência protéica, inversamente proporcionais à quantidade de lipídio na dieta.

Concentrações de até 20% de lipídios na dieta geralmente proporcionam excelentes resultados em peixes marinhos, principalmente naqueles de águas frias em clima temperado (CHOU et al., 2001). TAKEUCHI et al. (1978) relataram que o conteúdo de proteína na dieta de trutas arco-íris pode ser reduzido de 48 para 35% sem redução no ganho de peso se a concentração lipídica for aumentada de 15 para 20%. Entretanto, quando os peixes são alimentados com dietas deficientes, ou com um balanço inadequado de nutrientes, duas respostas opostas podem ser induzidas: um aumento na tomada de alimento para alcançar o nível absoluto de requerimento nutricional quando a deficiência é moderada ou branda, resposta comumente observada em aves e suínos para deficiência em aminoácidos essenciais; ou uma resposta inibitória, quando a deficiência é aguda. A possível explicação para este tipo de resposta é que, em termos de energia metabólica os animais preferem reduzir a tomada de alimento ao invés de forçarem seu metabolismo comendo uma dieta desbalanceada. Esta redução na alimentação preveniria ou protelaria o início de desordens metabólicas. Entre os

primeiros sintomas de uma deficiência em nutrientes essenciais estão a perda do apetite e a conseqüente diminuição do crescimento. Se a forma de energia não protéica não for oferecida de maneira adequada, o animal passará a usar os aminoácidos para o metabolismo energético, diminuindo sua utilização para a síntese protéica e crescimento (HOULIHAN et al. 2001).

Poucos experimentos têm sido conduzidos para que proteína e componentes não protéicos sejam oferecidos separadamente no sentido de se avaliar a ingestão diferenciada. Entretanto, existem dados sugestivos de que os peixes controlam sua tomada de alimento em relação à sua necessidade energética, e que este controle está associado à energia digestível da dieta (BOUJARD & MÉDALE, 1994; MORALES et al., 1994)

A resposta fisiológica ao alimento é dependente de sua quantidade ingerida (CARTER et al. 2001). DE SILVA & ANDERSON (1995) afirmam que a quantidade de alimento consumida por um animal é restrita à quantidade de alimento com que ele pode preencher seu estômago e a porção anterior do intestino. Conseqüentemente, a ingestão será controlada pelo esvaziamento gástrico. Além disso, existem consideráveis evidências para suportar a hipótese de que o esvaziamento gástrico é regulado pelo conteúdo energético do alimento: quanto maior o conteúdo em energia, mais demorado o esvaziamento gástrico. Neste sentido, submetido a uma dieta com altos teores em energia, o animal terá seu consumo diminuído.

Avaliando o desempenho produtivo de juvenis de pintado alimentados com diferentes níveis de proteína e energia MACHADO et al. (1999) concluíram que teores protéicos próximos a 30% foram efetivos para um bom desempenho, desde que houvesse um adequado aporte energético, que para os autores seria próximo a 4.000 kcal ED/kg de ração.

SUÁREZ et al. (1995), estudando o metabolismo intermediário de enguias européias (*A. anguila*), sugeriram que a alta eficiência alimentar proporcionada pelas dietas com os maiores teores de carboidratos, em função das relações com proteína e energia, pareciam indicar uma notável capacidade dos carboidratos substituírem proteínas, principalmente naquelas dietas que continham altos conteúdos energéticos. Esses autores relatam ainda que trabalhos com dietas tendo a mesma composição daquelas ensaiadas demonstraram que a substituição de parte das proteínas por carboidratos resultou em altos índices de eficiência e retenção da proteína da dieta. Além disso, destacaram que, para um dado grupo de dieta, com mesmo conteúdo de energia e relação entre proteína e energia, a eficiência dos carboidratos em substituir proteínas pareceu exceder a de lipídios no efeito promotor de crescimento e taxas de conversão.

As melhores porcentagens de crescimento foram observadas, nos experimentos com variação de PB, para os animais arraçados com 40% PB, e, nos experimentos com variação

de lipídios ou energia bruta, para os animais arraçados com 3500 Kcal EB/kg de ração. Estes tratamentos correspondem a níveis de inclusão de amido entre 13 e 27% respectivamente. Estes dados discordam dos obtidos por DEL CARRATORE (2001), que concluiu que o pintado apresenta uma reduzida capacidade de utilização de carboidratos complexos como o amido de milho, sugerindo a ocorrência de um quadro de subnutrição decorrente da inclusão de níveis elevados deste nutriente na dieta. Analisando-se os dados por ele obtidos, pode-se admitir que o problema não esteja diretamente relacionado à inclusão crescente de amido na dieta e sim ao tipo de alimentação adotada, dietas semi-purificadas, nas quais a principal fonte de proteína foi a albumina, que não atende às necessidades em aminoácidos essenciais para a espécie em questão. Este autor atribuiu o melhor desempenho ao grupo arraçado com apenas 10% de amido na dieta. Coincidentemente, este grupo foi o que recebeu a maior quantidade de farinha de peixe na ração (41,3%), um ingrediente que melhor atende às necessidades para a espécie. Nas demais dietas, o nível deste ingrediente foi bastante reduzido, e a quantidade de proteína pretendida para as dietas (36% PB), foi ajustada com a inclusão de albumina e gelatina que, como mencionado anteriormente, não satisfazem às necessidades da espécie. Além disso, o arraçoamento foi realizado apenas uma vez ao dia, às 18:00h.

Destacamos que, além da adequação dos níveis quantitativos de inclusão das diferentes frações nutritivas da dieta para o pintado, seja necessária a inclusão de ingredientes que atendam às necessidades qualitativas da espécie para que se possa obter resultados satisfatórios em produtividade e viabilidade econômica.

Os dados obtidos no presente experimento somados aos obtidos por SEIXAS FILHO et al. (2001a) sobre o arranjo intestinal de pintado, corroboram a hipótese de que esta não seja uma espécie exclusiva ou estritamente carnívora, mas que demonstra sim uma adaptação ao hábito alimentar onívoro, preferencialmente carnívoro, apresentando ampla possibilidade de utilização de carboidratos na dieta para inteirar sua demanda energética e direcionar as proteínas para as necessidades essenciais e o crescimento.

7. CONCLUSÕES

Nas condições em que foram realizados os experimentos, podemos concluir que:

7.1 EXPERIMENTOS DE VARIAÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA NA DIETA

7.1.1 Enzimas Digestivas

- as maiores atividades proteolíticas foram observadas no estômago;
- a atividade das enzimas digestivas proteolíticas não pode ser usada como modelo para estabelecer o nível ótimo de inclusão de proteína na dieta de pintado;
- o perfil enzimático digestivo contribuiu para assumirmos as proteases digestivas de pintado como constitutivas e estejam adequadas para dietas com alto conteúdo de proteína;
- a amilase mostrou ser indutiva, podendo ser ajustada através do conteúdo de amido na dieta;
- a lipase parece ser uma enzima constitutiva;

7.1.2 Metabolismo Intermediário

- a variação de PB na dieta não teve reflexo nos parâmetros hematológicos;
- o perfil metabólico reflete a concentração dos nutrientes da dieta;
- os tecidos hepático e renal mostraram perfil oxidativo;
- as alterações nutricionais na dieta não alteraram as reservas glicídicas do músculo; tecido que apresentou um perfil ímpar no metabolismo de pintado;
- o teor de proteína da dieta altera as reservas protéicas do tecido muscular, sugerindo uma faixa ótima de aproveitamento;
- tanto um excesso como uma carência em proteína e prejudicial ao metabolismo da espécie, levando a ajustes metabólicos e depreciando o crescimento;

7.1.3 Morfologia Intestinal

- houve uma resposta adaptativa das porções intestinais do trato digestório de *P. corruscans* aos diferentes teores de proteína da dieta;
- as respostas morfológicas deram-se no sentido de:
 - proteção (por aumento das células produtoras de muco);
 - aumento das células absortivas e produtoras de enzimas, limitado à inclusão de 30% PB;
 - aumento provável da capacidade absortiva pelo aumento da altura da mucosa;

- compatibilidade das respostas morfológicas com o padrão bioquímico de resposta;
 - aumento da espessura muscular no sentido de aumentar a motilidade e otimizar os
 - processos de absorção na porção posterior de intestino;
- não se observou qualquer alteração na morfologia externa (macroscópica) de órgãos como rim, fígado, vesícula biliar e do próprio trato digestório em relação ao regime dietético;

7.1.4 Desempenho Produtivo

- a melhor porcentagem de ganho de peso observada no experimento proteína-variável foi com 40% PB;
- o menor valor de inclusão de PB utilizado (20%), provavelmente não atendeu às exigências em aminoácidos essenciais, e o maior (50%) mobilizou estoques energéticos para manutenção da glicemia e suportar a demanda energética;

7.2 EXPERIMENTOS DE VARIAÇÃO DE ENERGIA BRUTA NA DIETA

7.2.1 Enzimas digestivas

- a lipase parece ser constitutiva;

7.2.2 Metabolismo Intermediário

- a variação de energia da dieta alterou as concentrações de hematócrito e hemoglobina;
- quantidades maiores que 3.500 kcal EB/kg de ração acometeram um quadro lipolítico;
- nos experimentos com variação de EB na dieta, as concentrações de glicogênio dos tecido não se alteraram, provavelmente mantidas às custas de glicose;
- mantidas as devidas proporções, o rim mostrou uma capacidade de armazenamento de lipídeos maior que a do fígado, destacando sua importância no metabolismo energético da espécie;
- as concentrações de TG e AGL no músculo branco sugerem a possibilidade de razoável armazenamento lipídico, provavelmente por se tratar de uma espécie reofílica;

7.2.3 Desempenho Produtivo

- o aporte energético das dietas com os maiores teores em EB provavelmente diminuíram a ingestão;
- a melhor porcentagem de ganho de peso observada no experimento energia-variável foi com 3.500 kcal EB/kg de ração;

7.3 CONCLUSÕES GERAIS

- as atividades hidrolíticas sobre proteínas, carboidratos e lipídeos do estômago de pintado destacam o papel desta estrutura no processo digestivo da espécie;
- as proteases e lipases parecem ser indutivas;
- *Pseudoplatystoma. corruscans* é uma espécie carnívora com habilidade para utilizar carboidratos na dieta, em quantidades ainda a serem estabelecidas;
- o fígado desempenhou um papel fundamental no intercâmbio dos metabólitos entre os diferentes tecidos;
- o intestino de pintado desempenha a função principal de absorção de nutrientes

Considerando a ampla variação nutricional testada nas dietas, podemos admitir que, um perfeito ajuste entre a fração proteica e os compostos energéticos ainda se faz necessário para se otimizar o crescimento e a lucratividade no processo produtivo de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L.H. DE (2002). Efeitos do inseticida organofosforado metil paration (Folidol 600®) sobre o teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869): aspectos do metabolismo intermediário. Tese (Doutorado), São Carlos: UFSCar. 120p.
- ALBRO, P.W.; HALL, R.D.; CORBETT, J.T. & SCHROEDER, J. (1985). Activation of nonspecific lipase (EC 3.1.1.-) by bile salts. *Biochemica et Biophysica Acta*, 835: 477-490.
- ALEXIS, M.N. & PAPAPARASKEVA-PAPOUTSOGLIO, E. (1986). Aminotranferase activity in the liver and white muscle of *Mugil capito* fed diets containing different levels of protein and carbohydrate. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 245-249.
- ALTRAN, A.E. (2002). Estudos do metabolismo de excreção nitrogenada de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829), durante as diferentes fases do seu desenvolvimento ontogenético. Dissertação de Mestrado. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos.
- ANDESON, T.A. (1986). Histological and cytological structure of the gastrointestinal tract of the luderick, *Girella tricuspidata* (Pisces, Kyphosidae), in relation to diet. *Journal of Morphology*, 190: 109-119.
- ANGELESCU, V. & GNERI, F.S. (1949). Adaptaciones del aparato digestivo al régimen alimenticio in algunos peces del rio Uruguay e del rio de la Plata. *Rev. Inst. Invest. Mus. Argent. Cienc. Nat.*, 1: 161-272.
- APHA, American standard methods for examination of water and wastes (1980). Washington: Joint Editorial Board, DC, 12th ed.
- ARCHIBALD, R.M. (1946). Determination of citrulline and alantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *J. Biol. Chem.* 156: 121-142.
- ARZEL, J.; METAILLER, R.; KERLEGUER, C.; DELLIOU, H. & GUILLAUME, J. (1995). The protein requirement of brown trout (*Salmo trutta*) fry. *Aquaculture*, 130: 67-78.
- BALLANTYNE, J.S. (2001). Amino acid Metabolism. In: WRIGHT, P. & ANDERSON, P. (eds). *Nitrogen Excretion. Fish Physiology Series*, Vol. XX. Academic Press. pp. 77-107..
- BARKA, T. & ANDERSON, P.J. (1965). *Histochemistry*. Haper & Row, New York, Evanston and London, 660p.
- BARRINGTON, E.J.W. (1957). The alimentary canal and digestion. In: BROWN, M.E. *The physiology of fish*. New York: Academic Press, p.109-161.
- BEAMISH, F.W. & THOMAS, E. (1984). Effect of dietary protein and lipid on nitrogen loss in rainbow trout. *Aquaculture*, 41: 359-371.
- BEELEN, R.; VAN DER HEIJDEN, T.; BOOMS, R.; VERDEGEM, M. & PAVANELLI, G.C. (1998). Blood values of Young Brazilian catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). *Acta Scientiarum*, 20(2): 147-150.

- BEHR, E.R. & HAYASHI, C. (1997). Alimentação de larvas de *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829) em bandejas berçário durante o período crítico. In: Encontro Brasileiro de Ictiologia, 12, 1997, São Paulo. Resumos...São Paulo: SBI. p.51.
- BELL, G.H.; EMSLIE-SMITH, D. & PETERSON, C. (1980). Textbook of Physiology and Biochemistry. 10th ed. Livingston, Edinburgh. 563p.
- BENDER, A.E. (1982). Dictionary of nutrition and food technology. Butterworths, 5 ed. 390p.
- BERGOT, F. & BREQUE, J. (1983). Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and the intake level. *Aquaculture*, 34: 203-212.
- BERNFELD, P. (1955). Amylases α e β : colorimetric assay method. In: COLOWICH, S.P. & KAPLAN, N.O. Methods *in* Enzymology. (eds). Vol. 1. New York: Academic Press Inc. pp. 149-154.
- BEVER, K.; CHENOWETH, M. & DUNN, A. (1981). Amino acid gluconeogenesis and glucose turnover in kelp bass (*Paralabrax* sp.). *Am. J. Physiol.*, 240R: 246-252.
- BIDINOTTO, P.M.; SOUZA, R.H.S.; MORAES, G. (1997). Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinatins of microsamples. *Bol. Tec. CEPTA - Pirassununga*, 10: 53-60.
- BITTERLICH, G. (1985). Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeder, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp, *Aristichthys nobilis* Rich. *J. Fish. Biol.* 27(2): 103-112.
- BORLONGAN, I.G. (1990). Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture*, 89: 315-325.
- BOUJARD, T. & MÉDALE, F. (1994). Regulation of voluntary feed intake in juvenile rainbow trout fed by hand or self-feeders with diets containing two different protein/energy ratios. *Aquatic Living Resources*, 7: 211-215.
- BRAFIELD, A.E. & SOLOMON, D.J. (1972). Oxy-caloric coefficients for animals and respiring nitrogenous substrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 43A:837.
- BRAUGE, C.; CORRAZE, G. & MÉDALE, F. (1995). Effects of dietary levels of carbohydrate and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in freshwater or in sea water. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A: 117-124.
- BRAUGE, C.; MÉDALE, F. & CORRAZE, G. (1994). Effects of dietary levels of carbohydrate levels on growth, body composition and glycemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in sea water. *Aquaculture*, 123: 109-120.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para peixes da bacia do São Francisco). 3ed. Brasília: CODEVASF, 115p.
- BROCKERHOFF, H. & HOYLE, R.J. (1965). Hydrolysis of triglycerides by pancreatic lipase of a skate. *Biochim. Biophys. Acta.*, 98: 435-436.
- BROCKERHOFF, H. (1966). Digestion of fat by cod. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 23: 1835-1839.

- BRYAN, J.E. & LARKIN, P.A. (1972). Food specialization by individual trout. J. Fish. Res. Board. Can., 29: 1615-1624.
- BUARQUE DE HOLANDA, A. (1986). Novo dicionário Aurélio da Língua Portuguesa. Nova Fronteira, 2 ed.
- BUCKE, D. (1971). The anatomy and histology of the tract of the carnivorous fish the pike *Esox lucius* L. J. Fish. Biol., 3: 421-431.
- BUDDINGTON, R.K. & DIAMOND, J.M. (1989). Ontogenic development of intestinal nutrients transporters. A. Ver. Physiol., 51: 601-619.
- BUDDINGTON, R.K. & DOROSHOV, S.I. (1986). Digestive enzymes complement of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Comp. Biochem. Physiol., 83A:561-567.
- BUDDINGTON, R.K.; CHEN, J.W. & DIAMOND, J.M. (1987). Genetic and phenotypic adaptation of the intestinal nutrient transport to diet in fish. J. Physiol., 393: 261-281.
- BUDDINGTON, R.K.; KROGDHAL, Å & BAKKE-MCKELLEP, A.M. (1997). The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. Acta Physiol. Scand., 161 (Supl. 638): 67-80.
- CAHU, C.L. & ZAMBONINO-INFANTE, J.L. (1994). Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comp. Biochem. Physiol., 109A: 213-222.
- CALZADA, A.; MEDINA, A. & GONZÁLEZ DE CANALES, M.L. (1998). Fine structure of the intestine development in cultures sea bream larvae. J. Fish. Biol., 53: 340-365.
- CARTER, C.G. & HOULIHAN, D.F. (2001). Protein Synthesis. In: WRIGHT, P. & ANDERSON, P. (eds). Nitrogen Excretion. Fish Physiology Series, Vol. XX. Academic Press. pp. 31-75.
- CARTER, C.G.; HE, Z.Y.; HOULIHAN, D.F.; MCCARTHY, I.D. & DAVIDSON, I. (1995). Effect of feeding on tissue free amino acid concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Fish. Physiol. Biochem., 14: 153-164.
- CARTER, C.G.; HOULIHAN, D.F.; BRECHIN, J. & MCCARTHY, I.D. (1993). The relationships between protein intake and protein accretion, synthesis and retention efficiency for individual grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). Can. J. Zool., 71: 392-400.
- CARTER, C.G.; HOULIHAN, D.F.; BUCHANAN, B. & MITCHELL, A.L. (1995). Protein-nitrogen flux and protein growth efficiency of individual Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish. Physiol. Biochem., 12: 305-315.
- CARTER, C.G.; HOULIHAN, D.F.; KIESSLING, A.; MÉDALE & JOBLING, M. (2001). Physiological effects of feeding. In: HOULIHAN, D.F.; BOUJARD, T. & JOBLING, M. (eds). Food intake in fish. Blackwell Science. pp. 297-331.
- CATALDI, E.; CATAUDELLA, S. MONACO, G.; ROSSI, A. & TANCIONI, L. (1987). A study of the histology and morphology of the digestive tract of the sea-bream, *Sparus aurata*. J. Fish. Biol., 30: 135-145.

- CHAKRABARTI, I.; GANI, M.D.A.; CHAKI, K.K.; SUR, R.; MISRA, K.K. (1995). Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and nich segregation. *Comp. Biochem. Physiol*, 112: 167-177.
- CHERNECKY, C.C.; KRECH, R.L. & BERGER, B.J. (1993). Laboratory tests and diagnostic procedures. pp. 932-933.
- CHESLEY, L.C. (1934). The concentration of proteases, amylase, and lipase in certain marine fishes. *Biol. Bull.*, 66: 133-144.
- CHIU, Y.N.; AUSTIC, R.E. & RUMSEY, G.L. (1986). Urea cycle activity and arginine formation in rainbow trout (*Salmo gairdineri*). *J. Nutr.*, 116: 1640-1650.
- CHO, C.Y.; COWEY, C.B. & WATANABE, T. (1986). Finfish nutrition in Asia: Methodological approaches to research and development. International Development Research Center (IDRC) - 233e.154p.
- CHOU, R.L.; SU, M.S. & CHEN, H.Y. (2001). Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 193: 81-89.
- CHRISTIANSEN, D.C. & KLUNGSØYR, L. (1987). Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88B(3): 701-7111.
- CLARKE, A.J. & WITCOMB, D.M. (1980). A study of the histology and morphology of the digestive tract of the common eel (*Anguilla anguilla*). *J. Fish. Biol.*, 16: 159-170.
- COLLIE, N.L. & FERRARIS, R.P. (1995). Nutrient fluxes and regulation in fish intestine. In: HOCHACHKA, P.W. & MOMMSEN, P. (eds.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 221-239.
- COPLEY, N.G. (1941). Alloxan and ninhydrin test. *Analyst.*, 66: 492-493.
- CORRÊA, C.F. (2002). Estudo dos padrões de digestão enzimática e perfil metabólico em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) alimentado com diferentes teores de proteína e carboidrato em regime de confinamento. Tese (Doutorado) – São Carlos: UFSCar. 115p.
- CORRÊA, C.F.; BIDINOTTO, P.M.; MORAES, G. (1998). Comparison of the amylohydrolitic activity in the gut of the neotropical teleost species Pacu *Piaractus mesopotamicus* and Tambacu hybrids (*Colossoma macropomum* Tambaqui X *P. mesopotamicus* Pacu), submitted to different contents of soluble carbohydrate. International Congress on the Biology of Fish. Fish Feeding Ecology and Digestion: "GUTSHOP-98". Symposium Proceedings: 87-99.
- COWEY, C. B. & SARGENT, J.R. (1979). Nutrition. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. & BRETT, J. R. (eds). *Fish Physiology*, vol. VIII: Bioenergetics and growth. Academic Press. pp. 1-69.
- CURY, M.X. (1992). Cultivo de pintado e cachara. *Panorama da Aqüicultura*, 8(13): 8-9.
- CVANCARA, V.A. (1969). Studies on tissue arginase and ureogenesis in fresh-water teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 30: 489-496.
- DABROWSKI, K. & GUEDERLEY, H. (2002). Intermediary Metabolism. In: HALVER, J.E. & HARDY, R. W. (eds.). *Fish Nutrition*. 3 ed, Academic Press. pp.309-365..

- DABROWSKI, K. & KAUSHIK, S.J. (1985). Rearing of coregonid (*Coregonus schinzii palea* Cuv. et Val.) larvae using dry and live food. III Growth of fish and developmental characteristics related to nutrition. *Aquaculture*, 48: 123-135.
- DABROWSKI, K.; KRUMSCHNABEL, G.; PAUKKU, M. & LABANOWSKI, J. (1992). Cyclic growth and activity of pancreatic enzymes of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) alevins. *J. Fish. Biol.* 40: 511-521.
- DABROWSKI, K.; POZYCZYNSKI, P.; KOCK, G. & BERGER, B. (1989). Effect of fish meal protein substitution by soybean protein in diet on growth, diet utilization and proteolytic enzymes activity in rainbow trout (*Salmo gairdineri*). In vivo test for exocrine pancreatic secretion. *Aquaculture*, 77: 29-49.
- DANIELS, H.V. & GALLAGHER, M.L. (2000). Effect of dietary protein level on growth and blood parameters in summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *J. Appl. Aquacult.*, 10(1): 45-52.
- DAS, K.M. & TRIPATHI, S.D. (1991). Studies on the digestive enzymes of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquaculture*, 92: 21-32.
- DAS, K.M.; GHOSH, A. & GHOSH, A. (1987). Studies on the comparative activity of some digestive enzymes in fry and adult of a mullet *Liza parsia* (Ham.). *J. Aqua. Trop.*, 2(1): 9-15.
- DE SILVA, S.S. & ANDERSON, T.A. (1995). Fish nutrition in Aquaculture. Chapman & Hall. Aquaculture 1 Series. 319p.
- DEL CARRATORE, C.R. (2001). Desempenho produtivo, digestibilidade e metabolismo energético de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) alimentados com níveis crescentes de amido. Tese (Doutorado). Jaboticabal: Centro de Aquicultura da UNESP. 60p.
- DELAHUNTY, G. OLCESE, J.; PRACK, M.; VODICNIK, M.J. SCHERECK, C.B. & DE VLAMING, V. (1978). Diurnal variations in the physiology of goldfish *Carassius auratus*. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, 9: 73-88.
- DERMER, G.B. (1973). Phosphotungstic acid at low pH as a section for cell surface sialic acid. *J. Cell Biol. (Abstr.)*: 59-77a.
- DHERT, P.; LAVENS, P. & SORGELOOS, P. (1992). A simple test for quality evaluation of cultured fry of marine fish. *Medinal Faculteid Landbouwwetenschappen Universität Gent*, 57: 2135-2142. In LIM C. & WEBSTER, C. (2001). Nutrition and fish health (Ed.). Food Products Press, Aquaculture. 365p.
- DIAS, A.L. (1987). Análises citogenéticas da família Pimelodidae (Pisces, Pimelodidae). São Carlos: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. 106p. (Disserta o, Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais).
- DOSDAT, A.; SERVAIS, F.; METAILLER, R.; HEULVAN, C. & DESBRUYERES, E. (1996). *Aquaculture*, 141: 107-127.
- DRABKIN, D.L. (1948). The standardization of hemoglobin measurement. *Am. J. Med. Sci.*, 215(1): 110-111.

- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-358.
- EINARSSON, S. & DAVIES, P.S. (1997). A multiductal system conveys digestive enzymes from the pancreas into the intestine in the Atlantic salmon. *J. Fish. Biol.*, 50: 1120-1123.
- ESCAFRE, A.M. *et al.* (1997). Nutritional value of soy protein concentrate for larvae of common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzymes activity. *Aquaculture*, 153-63-80.
- ESPE, M.; LIED, E. & TORRISEN, K.R. (1993). Changes in plasma and muscle free amino acids in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during absorption of diets containing different amounts of hydrolysed cod muscle protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105A: 555-562.
- FAGBENRO, O.; ADEDIRE, C.O.; AYOTUNDE, E.O & FAMINE, E.O. (2000). Haematological profile, food composition and digestive enzyme assay in the gut of the African bony-tongue fish, *Heterostis (Clupisudis) niloticus* (Cuvier 1829) (Osteoglossidae). *Tropical Zoology*, 13: 1-9.
- FÄNGE, R. & GROVE, D. (1979). Digestion. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. & BRETT, J. R. (eds). *Fish Physiology*, Vol. VIII: Bioenergetics and growth. Academic Press. pp. 161-260..
- FERRARIS, R.P. & AHEARN, G.A. (1984). Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77A: 397-413.
- FISH, G.R. (1960). The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of tilapia and perch. *Hidrobiol.*, 15: 161-178.
- FLORES QUINTANA, C.I.; PEREYRA, L.A.; DOMITROVIC, H.A.; ROUX, J.P. & SAMPIETRO, J.C. (1997). Estructura histológica del aparato digestivo de surubí (*Pseudoplatystoma coruscans* y *Pseudoplatystoma fasciatum*) (Pisces, Siluriformes). *Acta Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE II(4)*: 17-20.
- FOWLER, H.W. (1951). Os peixes de água doce do Brasil. *Arquivos de Zoologia*, 6(3): 405-625.
- FULLER, M.F. & GARLICK, P.J. (1994). Human amino acid requirements: can the controversy be resolved? *Annual Review of Nutrition*, 14: 217-241.
- GARCÍA-CARREÑO, F.L.; ALBUQUERQUE-CAVALCANTI, C.; NAVARRETE DEL TORO, M.A. & ZANIBONI FILHO, E. (2002). Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132B: 343-352.
- GARGIULO, A.M.; CECCARELLI, P. DALL'AGLIO, C. & PEDINI, V. (1998). Histology and ultrastructure of the gut of the tilapia (*Tilapia* spp.), a hybrid teleost. *Anat. Histol. Embryol.*, 27: 89-94.
- GARLING, D.L. & WILSON, R.P. (1976). Optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.*, 116(9): 1368-1375.
- GAUTHIER, S.F.; VACHON, C.; JONES, J.D. & SAVOI, L. (1982). Assessment of protein digestibility by *in vitro* enzymatic hydrolysis with simultaneous dialysis. *J. Nutr.*, 112: 1718-1725.

- GAWLICKA, A.; PARENT, B.; HORN, M. ROSS, N.; OPSTAD, I. & TORRISSEN, O. (2000). Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indicator of readiness for the first feeding. *Aquaculture*, 184: 303-314.
- GERKING, S.D. (1994). *Feeding Ecology of Fish*. Academic Press, San Diego.
- GISBERT, E.; SARASQUETE, M.C.; WILLIOT, P. & CASTELLO-ORVAY, F. (1999). *J. Fish. Biol.*, 55: 596.
- GJEDREM, T. (2000). Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquacult. Res.*, 31: 25-33.
- GLASS, H.J.; MACDONALD, N.L.; MORAN, R.M. & STARK, J.R. (1989). Digestion of protein in different marine species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94(3): 607-611.
- GOLTERMAN, H.L. & CLIMO, R.S. (1969). *Methods for chemical analysis of freshwater*. IBP Handbook 8. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 171 p.
- HALE, P.A. (1965). The morphology and histology of the digestive system of two freshwater teleosts, *Poecilia reticulata* and *Gasterosteus aculeatus*. *J. Zool.*, 146: 132-149.
- HALVER, J.E. & HARDY, R. W. (2002). Nutrient Flow and Retention. In: HALVER, J.E. & HARDY, R. W. (eds.). *Fish Nutrition*. 3 ed, Academic Press. pp.755-770.
- HARROWER, J.R. & BROWN, C.H. (1972) Blood lactic acid . A micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.*, 32(5); 224-228.
- HEMRE, G.I. & SANDNES, K. (1999). Effect of dietary lipid level on the muscle composition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition*, 5: 9-16.
- HEMRE, G.I. & SANDNES, K.; LIE, Ø. & WAAGBØ, R. (1995). Blood chemistry and organ nutrients composition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. fed graded amounts of wheat starch. *Aquacult. Nutrit.*, 1: 37-42.
- HEMRE, G.I.; LIE, Ø.; LIED, E. & LAMBERTSEN, G. (1989). Starch as an energy source in feed for cod (*Gadus morhua*): Digestibility and retention. *Aquaculture*, 80: 261-270.
- HENNING, S.J. (1987). Functional development of the gastrointestinal tract. In: JOHNSON, L.H. (ed.). *Physiology of the Gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, 2 ed., pp. 285-300.
- HEPER, B. (1989). Principles of Fish Nutrition. In: SHILO, M. & SARIG, M. (eds.). *Fish culture in warm water systems: problems and trends*. Boca Raton: CRC. pp. 121-141.
- HERTRAMPF, J. W. & PIEDAD-PASCUAL, F. (2000). *Handbook on ingredients for aquaculture feeds*. Kluwer Academic Publishers. 573p.
- HIDALGO, M.C.; UREA, E. & SANZ, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170: 267-283.
- HOCHACHKA, P.W.; GUPPY, M.; GUDERLEY, H.E.; STOREY, K.B. & HULBERT, W.C. (1978). Metabolic biochemistry of water vs air-breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructures. *Can. J. Zool.* 56: 736-750.
- HOFER, R. & KÖCK, G. (1989). Method for quantitative determination of digestive enzymes in fish larvae. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 36(4): 439-441.

- HOFER, R. & SCHIEMER, F. (1981). Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habitd. *Oecologia*, 48: 342-345.
- HOFER, R. (1979a). The adaptation of the digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus*, and rudd, *Scardinius erythrophthalmus* L. 1. Amylase. *J. Fish. Biol.*, 14: 565-572.
- HOFER, R. (1979b). The adaptation of the digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus*, and rudd, *Scardinius erythrophthalmus*, Proteases. *J. Fish. Biol.*, 15: 373-379.
- HOFER, R. (1982). Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous cyprinid. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72A: 55-63.
- HOFER, R.; DALLA VIA, G.; TROPPEMAIR, J. & GIUSSANI, G. (1982). Differences in digestive enzymes between cyprinid and noncyprinid fish. *Men. Ist. Idrobiol.*, 40: 201-208.
- HOULIHAN, D.F., CARTER, C.G. & MCCARTHY, I.D. (1995a). Protein system in fish. In: HOCHACHKA, P.W. & MOMMSEN, P. (eds.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 191-220.
- HOULIHAN, D.F., CARTER, C.G. & MCCARTHY, I.D. (1995b). Protein turnover in animals. In: WHRIGHT, P.J. & WALSH, P.A. (eds.). *Nitrogen and Excretion*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-29.
- HOULIHAN, D.F.; BOUJARD, T. & JOBLING, M. (2001). *Food intake in fish*. Blackwell Science. 418p.
- HOULIHAN, D.F.; HALL, S.J.; GRAY, C. & NOBEL, B.S. (1988). Growth rates and protein turnover in Atlantic cod *Gadus morhua*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 951-964.
- HOULIHAN, D.F.; HALL, S.J.; GRAY, C. (1989). Effects of ratio on protein turnover in cod. *Aquaculture*, 79: 103-110.
- HOULIHAN, D.F.; MATHERS, E. & FOSTER, A.R. (1993). Biochemical correlates of growth rate in fish. In: Rankin, J.C. & Jensen, F.B. (eds.). *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London, pp. 45-71.
- HSU, YA-LI & WU, JEN-LEIH (1979). The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica*, 18(1): 45-53.
- HUMMEL, B.C.W. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(12): 1393-1399.
- HUNG, S.S.O. (1991). Carbohydrates utilization by sturgeon as assessed by oral administration tests. *J. Nutrit.*, 121: 1600-1605.
- HUNG, S.S.O.; GROFF, J.M.; LUTES, P.P. & KOFIFYNN-AIKINS, F. (1990). Hepatic and intestinal histology of juvrnile white sturgeon fed different carbohydrates. *Aquaculture*, 87: 349-360.
- IZQUIERDO, M.S. & HENDERSON, R.J. (1998). The determination of the lipase and phospholipase in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assay. *Fish. Physiol. Biochem.*, 19: 153-162.
- IZQUIERDO, M.S.; ARANTZAMENDI, L. & CABALLERO, M.J. (1997). Compared distribution of lipase and phospholipase activities along digestive tract in several marine fish species. In: 3rd Int. Symp. Research for Aquaculture: Fundamental and Applied aspects. Universid de Barcelona, Espanha.

- IZQUIERDO, M.S.; SOCORRO, J.; ARANTZAMEND, L. & HERNÁNDEZ-CRUZ, C.M. (2000). Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish. Physiol. Biochem.*, 22: 97-107.
- JENKINSON, C.P.; GRODY, W.W. & CEDERBAUM, S.D. (1996). Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114B: 107-132.
- JOBLING, M. (1994). *Fish bioenergetics*. London: Chapman & Hall, 309p.
- JOBLING, M. (2001). Feed Composition and analysis. In: HOULIHAN, D.F.; BOUJARD, T. & JOBLING, M. (eds.). *Food intake in fish*. Blackwell Science. pp. 1-24.
- JOBLING, M.; GOMES, E. & DIAS, J. (2001). Feed types, Manufacture and ingredients. In: HOULIHAN, D.F.; BOUJARD, T. & JOBLING, M. (eds.). *Food intake in fish*. Blackwell Science. pp.25-48.
- JOHNSON, E.G.; WATANABE, W.O. & ELLIS, S.C. (2002). 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*, 64: 47-54.
- JÓNÁS, E.; RÁGYANSZKI, M.; OLÁH, J. & BOROSS, L. (1983). Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio*) fishes. *Aquaculture*, 30: 145-154.
- JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. (1995). *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, 8ª ed. 433p.
- JÜRS, K. & BASTROP, R. (1995). Amino acid metabolism in fish. In: HOCHACHKA, P.W. & MOMMSEN, P. (eds). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam. pp. 159-189.
- JÜRS, K.; BITTORF, T. & VÖKLER, T. (1985). Influence of salinity and ratio of lipid to protein in diets on certain enzymes activity in rainbow trout (*Salmo gairdineri* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 73-79.
- KAPOOR, B.G.; SMITH, H.; VERIGHINA, I.A. (1975). The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Mar. Biol.*, 13: 109-139.
- KHANNA, S.S. (1961). Alimentary canal in some Teleostean fish. *J. Zool. Soc. India.*, 13: 206-219.
- KHANNA, S.S. & MEHROTRA, B.K. (1971). Morphology and biology of the teleostean intestine. *Anatomischer Anzeiger*, 129: 1-18.
- KIRCHNER, S.; KAUSHIK, S. & PANSERAT, S. (2003). Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 134A: 337-347.
- KJØLBERG, O.; MANNERS, D.J. & WRIGHT, A. (1963). The molecular structure of some glycogens. *Comp. Biochem. Physiol.*, 8: 353-365.
- KOHLA, U.; SAINT-PAUL, U.; FRIEBE, J.; WERNICKE, D. HILGE, V. BRAUM, E. & GROPP, J. (1992). Growth, digestive enzyme activities and hepatic glycogen levels in juvenile *Colossoma macropomum* Cuvier from South America during feeding, starvation and refeeding. *Aquaculture and Fisheries Management*, 23: 189-208.

- KOROLEFF, F. (1976). Determination of nutrients. In: GRANSHOFFK (ed.). Methods of seawater analysis. *Verlag. Chemie. Weinheim*. pp. 117-187.
- KOVEN, W.M.; HENDERSON, R.J. & SARGENT, J.R. (1994a). Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*) I: Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. *Fish. Physiol. Biochem.*, 13: 69-79.
- KOVEN, W.M.; HENDERSON, R.J. & SARGENT, J.R. (1994b). Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*) II: Lipolysis *in vitro* of ¹⁴C-labelled triacylglycerol, cholesterol ester and phosphatidylcholine by digesta from different segments of the digestive tract. *Fish. Physiol. Biochem.*, 13: 275-283.
- KOVEN, W.M.; HENDERSON, R.J. & SARGENT, J.R. (1997). Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*): *in vitro* and *in vivo* studies of lipolytic activity in various segments of the digestive tract. *Aquaculture*, 151: 155-171.
- KRAJNOVIĆ-OZRETIĆ, M.; NAJDEK, M. & OZRETIĆ, B. (1994). Fatty acids in the liver and muscle of farmed and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A(3): 611-617.
- KUBITZA, F. (1995). Preparo de rações e estratégias de alimentação no cultivo intensivo de peixes carnívoros. In: Simpósio Internacional sobre nutrição de peixes e crustáceos. Campos do Jordão, Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. Anais...p. 91-115.
- KUPERMAN, B.I. & KUZ'MINA, V.V. (1994). The structure of the intestinal epithelium in fish with different types of feeding. *J. Fish. Biol.*, 44: 181-193.
- KUZ'MINA, V.V. (1991). Evolutionary features of the digestive-transport function in fish. Plenum Publishing Corporation. Translated from *Zhurnal Évolýutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*, 27(2): 167-175. Original article submitted February 15, 1989.
- KUZ'MINA, V.V. (1996). Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture*, 148: 25-37
- KUZ'MINA, V.V.; GOLOVANOVA, I.L. AND IZVEKOVA, G.I. (1996). Influence of temperature and season on the some characteristics of intestinal mucosa carbohydrases in six freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B: 255-260.
- LAIDLEY, C.W. & LEATHERLAND, J.F. (1988). Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weights in rainbow trout, *Salmo gairdineri* Richardson. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89A: 495-503.
- LANGHANS, W. & SCHARRER, E (1992). Metabolic control over eating. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 70: 1-67.
- LAUDER, G.V. & LIEM, K.F. (1983). The evolution and interrelationships of the Actinopterygian fishes. *Bulletin of the Museum of comparative Zoology*, 150(3): 95-197.
- LÉGER, C. & BAUCHART, D. (1972). Hydrolise de triglycérides par le système lipasique du pâncreas de truite (*Salmo gairdineri* Rich.) Mise en évidence d'un nouveau type de spécificité d'action. *C. R. Acad. Sci.*, 275: 2419-2422.

- LEHNINGER, A.L. ; NELSON, D.L. & COX, M.M. (1995). Princípios de Bioquímica. 2 ed. São Paulo: Savier.
- LIEM, K.F. (1967). Functional morphology of the integumentary, respiratory, and digestive system of the symbranchoid fish *Monopterus albus*. *Copeia*, 2: 375-388.
- LILLIE, R.D. (1965). Histopatologic technique and practical histochemistry. *Mc Graw-Hill Co.*, New York, Toronto, Sidney, London, 715 p.
- LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B. GALIZZI, J. & CANÇADO, J.R. (1969). Métodos de laboratório aplicados à clínica. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 653p.
- LOVELL, T. (1988). Nutrition and feeding of fish. New York: Chapman & Hall, 259p.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- LU, G.D. (1939) The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. *Biochem. J.*, (33): 249-254.
- LUNDSTEDT, L.M. (1999). Efeito da reversão sexual e de fontes proteicas no desempenho produtivo, digestibilidade aparente e morfologia do trato digestório da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de Mestrado. Jaboticabal: Centro de Aquicultura da UNESP. 57 p.
- LUQUET, P. (1971). Efficacité des protéines en relation avec leur taux d'incorporation dans l'alimentation de la truites arc-em-ciel. *Ann. Hydrobiol.*, 2: 175-186.
- LYNDON, A.R.; DAVIDSON, I. & HOULIHAN, D.F. (1993). Changes in tissue and plasma free amino acid concentrations after feeding in Atlantic co. *Fish. Physiol. Biochem.*, 10: 365-375.
- MACHADO, J.H.; DEL CARRATORE, C.R. & LANDELL FILHO, L.C. (1999). Desempenho produtivo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia. *UNIMAR Ciências*, 8(2): 87-98.
- MAGNAN, P. & STEVENS, E.D. (1993). Pyloric ceecal morphology of brook charr, *Salvelinus fontinalis*, in relation to diet. *Environmental Biology of fishes*, 36: 205-210.
- MARQUES, E.E. (1993). Biologia reprodutiva, alimentação natural e dinâmica da nutrição do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) no alto rio Paraná. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas).
- MELO, J.F.B.; LUNDSTEDT, L.M.; RADÜNZ NETO, J.; SANTOS NETO, C. & MORAES, G. (2002). Respostas enzimáticas do trato digestório de jundiá *Rhamdia quelen* alimentados com diferentes níveis de proteína. Resumo expandido. Recife, Anais da XXXIX Reunião Annual da sociedade Brasileira de Zootecnia.
- METÓN, I.; MEDIAVILLA, D.; CASERAS, A.; CANTÓ, E.; FERNÁNDEZ, F. & BAANATE, I.V. (1999). Effect of diet composition and ratio size on key enzymes activity of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition*, 82: 223-232.

- MEYER-BURGDORF, K.H. & ROSENOW, H. (1995). Protein turnover and energy metabolism in growing carp. 2. Influence of feeding levels and protein energy ratio. *Journal of animal Physiology and animal Nutrition*, 73: 123-133.
- MILLWARD, D.J. (1989). The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover. *Aquaculture*, 79: 1-28.
- MIRANDA, M.O.T. (1993). Características zootécnicas e rendimento de carcaça do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) do rio São Francisco. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 50p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, Área de Produção Animal).
- MITTELBACH, G.C.; OSENBURG, C.W. & WAINWRIGHT, P.C. (1992). Variation in resource and abundance affects diet and feeding morphology in the pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Oecologia*, 90: 8-13.
- MITTELBACH, G.C.; OSENBURG, C.W. & WAINWRIGHT, P.C. (1999). Variation in feeding morphology between pumpkinseed populations: phenotypic plasticity or evolution? *Evolutionary Ecology Research*, 1: 111-128.
- MOITRA, S.K. & RAY, A.K. (1981). Digestive enzymes and their relationships with the food and feeding habits in Indian freshwater fishes *Anabas testudineus* (Bloch). *J.Zool. Soc. India.*, 33(1-2): 25-32.
- MONNSEN, T.P. & WALSH, P.J. (1992). *Experientia*, 48: 583-593.
- MONNSEN, T.P. (1986). Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes. *Can. J. Zool.*, 64: 1110-1115.
- MONNSEN, T.P.; FRENCH, C.J. & HOCHACHKA, P.W. (1980). Sites and pattern of protein and amino acid utilization during spawning migration of salmon. *Can. J. Zool.*, 58: 1785-1799.
- MOON, T.W. & FOSTER, G.D. (1995). Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: HOCHACHKA, P.W. & MOMMSEN, P. (eds). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam. pp. 65-100.
- MOON, T.W. (1988). Adaptation, constraint and function of the gluconeogenic pathway. *Can. J. Zool.*, 66: 1059-1068.
- MORAES, G. & BIDINOTTO, P.M. (2000). Induced changes in the amylolytic profile of the gut of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1885) fed different levels of soluble carbohydrates; its correlation with metabolic aspects. *Revista de Ictiologia*, 8(1-2): 47-51.
- MORAES, G.; CORRÊA, C.F.; BIDINOTTO, P.M. & AGUIAR, L.H DE (2000). Digestive amylolytic profile of *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* and their hybrid: a comparative approach. Disponível em: <http://www.fishbiologycongress/Aberdeen>.
- MORALES, A.E.; CARDENETE, G.; DE LA HIGUERA, M. & SANZ, A. (1994). Effects of dietary protein source on growth, feed conversion and energy utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 124: 117-126.

- MOYANO-LÓPEZ, F.J. *et al.* (1999). Inhibition of digestive protease by vegetable meals in three species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 122B: 327-332.
- MOYANO, F.J.; CARDENTE, G. AND HIGUERA, M. (1991). Nutritive and metabolic utilization of proteins with glutamic acid content by the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A:759-762.
- MOYES, C.D.; MATHIEU-COSTELLO, O., BRILL, R.W. & HOCHACHKA, P.W. (1992). Mitochondrial metabolism of cardiac and skeletal muscle from a fast (*Katsuwonus pelamis*) and a slow (*Cyprinus carpio*) fish. *Can. J. Zool.*, 70: 1246-1253.
- MOYES, C.D. & WEST, T.G. (1995). Exercise metabolism of fish. In: HOCHACHKA, P.W. & MOMMSEN, P. (eds.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 367-392.
- MUNILLA-MORÁN, R. & SABORIDO-REI, F. (1996). Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activity in the gut of sea bream (*Sparus aurata*), turbot, (*Scophthalmus maximus*) and red fish (*Sebastes mentella*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B: 827-834.
- MUNILLA-MORÁN, R. & STARK, J.R. (1989). Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture*, 81: 315-327.
- MUNILLA-MORÁN, R. & STARK, J.R. (1990). Metabolism in marine flatfish. VI Effect of nutritional state on digestion in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 625-634.
- NAGASE, G. (1964). Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mosambica*: digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 49: 270-284.
- NAVARRO, I. & GUTIÉRREZ, J. (1995). Fasting and Starvation. In: HOCHACHKA, P.W. & MOMMSEN, P. (eds.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 393-434.
- NORVÁK, M. (1965). Colorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. *J. of Lipid Research.*, 6: 431-433.
- NOSE, T. (1982). Changes in the pattern of free plasma amino acids in rainbow trout after feeding. *Bulletin of the Freshwater Laboratory Tokyo*, 22: 137-144.
- NRC (1993). *Nutrient requirements of fish*. Washington: National Academy Press. 114p.
- OGATA, H. (1986). Correlations of essential amino acids pattern between dietary protein and the blood, hepatopancreas, or skeletal muscle in carp. *Bull. Of the Japanese Society of the Scientific Fisheries*, 52: 307-312.
- OGATA, H.; ARAI, S. & MAS ALVAREZ, B. (1985). Effect of dietary protein levels on free amino acid content of juvenile European eel. *Bull. Japan. Soc. Sci., fish.*, 51: 537-578.
- OLATUNDE, A.A. & OGUNBIYI, O.A. (1977). Digestive enzymes in the alimentary tracts of three tropical catfish. *Hydrobiol.*, 56: 21-24.

- OSTOS GARRIDO, M.V.; GONZÁLEZ OLLER, C. & ABAURREA EQUISOAIN, M.A. (1996). Effect of diet on gastric mucosa cells in the European eel (*Anguila anguila* L.). Histochemical and ultrastructural study. *Micron.*, 27(1): 25-34.
- PARK, J.T. & JOHNSON, M.J. (1949). A submicro determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 181: 140-151.
- PATTON, J.S. (1975). High levels of pancreatic nonspecific in rattlesnake and leopard shark. *Lipids*, 10: 562-564.
- PATTON, J.S.; WARNER, T.G. & BENSON, A.A. (1977). Partial characterization of the bili salt-dependent triacylglycerol lipase from the leopard shark pancreas. *Biochem. Biophys. Acta.*, 486: 322-330.
- PEARSE, A.G.E. (1972). Histochemistry; theoretical and applied. Little, *Brown and Co.* Boston.
- PEREYRA, L.A.; DOMITROVIC, H.A. & SAMPIETRO, J.C. (2002). Microscopía electrónica do barrido del tubo digestivo del surubí (*Pseudoplatystoma coruscans* y *P. fasciatum*) (Pisces, Siluriformes). Disponível em [http:// unne.edu.ar/cyt/veterinarias/v-010.pdf](http://unne.edu.ar/cyt/veterinarias/v-010.pdf), Acesso em 02/07/2002.
- PETRERE JR., M. (1995). A pesca de água doce no Brasil. *Ciência Hoje*, 19(110): 28-33.
- PHILLIPS, A.M.JR. (1969). Nutrition, digestion and energy utilization. In: HOAR, W.S.& RANDALL, D.J. (eds). *Fish Physiology. Vol. I. Excretion, Ion Regulation, and Metabolism.* pp. 391-432.
- RABELO, T. (1992). Empresa produz pintado em cativeiro. Criação de pintado irá preservar a espécie. *Jornal O Estado de São Paulo*, 08 de julho de 1992, nº 1913, ano XXXVIII, Suplemento Agrícola, Capa. pp. 10-11.
- RAHMATULLAH, M.; & BOYDE, T.R.C. (1980). Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime: methods with and without desproteinization. *Clin. Chim. Acta* 107: 3-9
- RAUL, F.; NORIEGA, R.; DOFFOEL, M.; GRENIER, J.F. & HAFFEN, K. (1982). Modifications of brush border enzyme activities during starvation in the jejunum and ileum of adult rats. *Enzyme*, 28: 328-335.
- RAY, A.K. (1988). On the digestive enzymes in three Indian freshwater perches in relation to food and feeding habits. *J. Inland. Fish. Soc. Índia.*, 20(1): 1-5.
- REEDS, P.J.; BURRIN, D.G.; STOLL, B. & VAN GOUDOEVER, J.B. (1999). Consequences and regulation of gut metabolism. In: LOBLEY, G.E.; WHITE, A. & MACRAE, J.C. (eds). *Protein Metabolism and Nutrition.* Wageningen Pers., Wageningen, the Netherlands. pp. 127-153.
- REID, S.B. (1983). La biología de los bagres rayados *Pseudoplatystoma fasciatum* e *P. tigrinum* en la cuenca del río Apure. Venezuela. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología.* Serie: Producción Agrícola. Barinas, año 1, Diciembre (1): 13-41.
- REIMER, G. (1982). The influence on diet on the digestive enzymes of the Amazon fish Matríncha, *Brycon cf melanopterus*. *J. Fish Biol.* 21: 637-642.
- RIBEIRO, L. SARASQUETE, C. & DINIS, M.T. (1999). Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* (171): 293-308.

- RIBEIRO, L.P. & MIRANDA, M.O.T. (1997). Rendimentos de processamento do surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. In: MIRANDA, M.O.T. (org). Surubim. Belo Horizonte: IBAMA, p. 101-111 (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 19).
- RICK, W. (1965). Trypsin and Chymotrypsin. In: BERGMAYER, H.U. (ed.). Methods of Enzymatic Analysis. 1ª ed., 2 printing, revisada. Academic Press, New York and London, p.800.
- RUMSEY, G.L. (1981). Why does the salmonid require a high protein diet? *Salmonid* (5): 20-24.
- RUST, M.B. (2002). Nutritional Physiology. In: HALVER, J.E. & HARDY, R. W. (eds.). Fish Nutrition. 3 ed, Academic Press. pp.367-452.
- SABAPATHY, U. & TEO, L.H. (1993). A quantitative study of some digestive enzymes in rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. *J. Fish Biol.* 42: 595-602.
- SAHA, N. & RATHA, B.K. (1998). Ureogenesis in Indian air-breathing teleosts: adaptation to environmental constraints. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120A: 195-208
- SÁNCHEZ-MUROS, M.J., GÁRCIA-REJÓN, L., GÁRCIA-SALGUERO, L., LAHIGUERA, M. AND LUPIÁÑES, J.A. (1998). Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *Biochemistry & Cell Biology.* 30. 55-63.
- SANTOS, E. (1981). Peixes de água doce (Vida e costumes dos peixes do Brasil). Belo Horizonte: Ed. Italiana, 267 p. il. (Coleção Zoologia Brasília, v.2).
- SARGENT, J.R.; TOCHER, D. R. & BELL, G. (2002). The lipids. In: HALVER, J.E. & HARDY, R. W. (eds.). Fish Nutrition. 3 ed, Academic Press. pp. 181-257.
- SATO, Y.; CARDOSO, E.L. & AMORIN, J.C.C. (1987). Peixes das lagoas amrginais do rio São Francisco a montante da represa de Três Marias, MG. Brasília, CODEVASF. 42p.
- SATO, Y.; CARDOSO, E.L.; SALLUM, W.B. (1988). Reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) da bacia do São Francisco. In: ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA, 6, 1988, Belo Horizonte. Resumos... Belo Horizonte: Associação Mineira de Aquicultura - AMA. p.20.
- SEGNER, H.; RÖSCH, R.; SCHIMIDT, H. & VON POEPPINGHAUSEN, K.J. (1989). Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish Biol.*, 35: 249-263.
- SEIXAS FILHO, J.T.; DE MOURA BRÁS, J.; GOMIDE, A.T.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L.; & MENIN, E. (2001a). Anatomia funcional e morfometria do intestino no Teleostei (Pisces) de água doce surubim (*Pseudoplatystoma coruscans* – Agassiz, 1829). *Rev. Bras. Zootc.*, 30(6): 1670-1680.
- SEIXAS FILHO, J.T.; FONSECA, C.C.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L.; & MENIN, E. (2001b). Determinação do sistema endócrino difuso nos intestinos de três Teleostei (Pisces) de água doce com hábitos alimentares diferentes. *Rev. Bras. Zootc.*, 30(5): 1403-1408.
- SEIXAS FILHO, J.T.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L.; GOMIDE, A.T.M. & MENIN, E. (1999). Atividade de amilase em quimo de três espécies de peixes Teleostei de água doce. *Rev. Bras. Zootc.*, 28(5): 907-913.

- SEIXAS FILHO, J.T.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L.; GOMIDE, A.T.M. & MENIN, E. (2000). Atividade de lipase em quimo de três espécies de peixes Teleostei de água doce. *Rev. Bras. Zootc.*, 29(1): 6-14.
- SETHURAMALINGAM, T.A. & HANIFFA, M.A. (2002). Effect of formulated diet on digestive enzymes of *Labeo rohita* (Ham.). *Indian Journal of Experimental Biology*, 40: 83-88.
- SHERIDAN, M.A. (1988). Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 679-690.
- SHIAU, SHI-YEN & HUANG, SHU-LING (1990). Influence of varying energy levels with two protein concentrations in diets for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) reared in seawater. *Aquaculture*, 91: 143-152.
- SIS, R.F.; IVES, P.J.; JONES, D.M.; LEWIS, D.H. & HAENSLY, W.E. (1979). The microscopic anatomy of the oesophagus, stomach and intestine of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish. Biol.*, 14: 179-186.
- SLACK, J.M.W. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121: 1569-1580.
- SMITH, B.W. & LOVELL, R.T. (1973). Determination of apparent digestibility in feeds for channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 4: 831-835.
- SMITH, L.S. (1980). Digestion in teleost fishes. In Lectures presented at the FAO/UNDP Training Course in fish feed technology, ACDP/REP/80/11. pp 3-17.
- SMITH, L.S. (1989). Digestive functions in teleost fishes. In HALVER, J.E. (ed). *Fish nutrition*. 2 ed. Academic Press, San Diego, pp. 331-421.
- SMITH, R.R. (1971). A method for measurement digestibility and metabolizable energy of fishfeed. *Prog. Fish. Cult.*, 33(3): 132.
- SPANNHOF, L. & PLANTKOW, H. (1983). Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture*, 30: 95-108.
- STEVENS, C.E. (1988). *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System*. Cambridge University Press, Cambridge.
- STROBAND, H.W.J. (1977). Growth and diet dependant structural adaptations of the digestive tract in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Val.). *J. Fish. Biol.*, 11: 167-174.
- SUÁREZ, M.D.; HIDALGO, M.C.; GARCÍA GALLEGO, M.; SANZ, A. & DE LA HIGUERA, M. (1995). Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. *Comp. Biochem. Physiol.* 111A(3): 421-428.
- SUAREZ, R.K. & MONNSEN, T.P. (1987). Gluconeogenesis in teleosts fishes. *Can. J. Zool.*, 65: 1869-1882.
- TACON, A.G.J. & COWEY, C.B. (1985). Protein and amino acid requirements. In: TYTLER, P. & CALOW, P. (eds). *Fish Energetics. New Perspectives*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD. pp. 155-185.

- TACON, A.G.J. (1988). Standard methods for the nutrition feeding of farmed fish and shrimp. Vol. 1. Argent Laboratories Press. Redmond, Washington, USA. 129p.
- TAKASHIMA, F. & HIBIYA, T. (1995). An Atlas of Fish Histology – Normal and Pathological Features. 2. ed. Tokio: Kondansha Ltd; Stuttgart; New York: Fisher. 195p.
- TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. & OGINO, C. (1978). Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 44:, 485. In: Halver, J.E. & Hardy, R. W. (2002). Fish Nutrition. 3 ed, Academic Press. 824pp.
- TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, T. AND SMITH, S. A. (2000). Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture 182: 317-327.
- TOCHER, D.R. & SARGENT, J.R. (1984). Studies on triacylglycerol, wax and esterol ester hydrolases in intestinal caecae of rainbow trout (*Salmo gairdineri*) fed diets rich in triacylglycerol and wax ester. Comp. Biochem. Physiol., 77B: 561-571.
- TOLEDO, L.R. (1991). Novo hóspede dos açudes. Globo Rural, Editora Globo. Rio de Janeiro, ano 6, 68: 54-61.
- TRAVASSOS, H. (1960). Catálogo dos peixes do vale do rio São Francisco. Bol. Soc. Cear. Agron., 1: 1-66.
- VAN DEN THILLART, G. & VAN RAAIJ, M. (1995). Endogenous fuels; non invasive *versus* invasive approaches. In: HOCHACHKA, P.W. & MOMMSEN, P. (eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol. 4, Metabolic Biochemistry. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 33-63.
- VAN WAARDE, A., VAN DEN THILLART, G. & KESBEKE, F. (1983). Anaerobic energy metabolism of the European eel, *Anguilla anguilla* L. J. Comp. Biochem. Physiol., 149: 469-475.
- VICENTINI, C. A (1984). Estúdio histoquímico del epidídimo em el bovino Cebú (*Bos indicus*). *Archivos de Anatomia y Embriología*, v. XVIII. Ed. Univ. Complutense, Madrid.
- VINATEA ARANA, L. (1997). Princípios químicos da qualidade da água em aqüicultura. Florianópolis; Ed. Da UFSC. 166p.
- WALTER, H.E. (1984). Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In BERGMAYER, H.U. (Ed.). Methods of Enzymatic Analysis, vol. V. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270-277.
- WALTON, M.J. & COWEY, C.B. (1982). Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. Comp. Biochem. Physiol., 73B(1): 59-79
- WALTON, M.J. & COWEY, C.B. (1989). Intermediary Metabolism. In: Halver, J.E. (ed.). Fish Nutrition. 2 ed. Academic Press, San Diego. pp. 259-329.
- WALTON, M.J. & WILSON, R.P. (1986). Postprandial changes in plasma and liver amino acids of rainbow trout fed complet diets containing casein. Aquaculture, 51: 105-115.
- WALTON, M.J. (1986). Metabolic effect of feeding a high protein/low carbohydrate diet, as compared with a low protein/ high carbohydrate diet to rainbow trout *Salmo gairdnerii*. Fish Physiol. Biochem., 1: 7-15.

- WATANABE, T. (1982). Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B: 3-16.
- WEBER, J.M. & ZWINGELSTEIN, G. (1995). Circulatory substrates fluxes and their regulation. In: HOCHACHKA, P.W. & MOMMSEN, P. (eds). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam. pp. 15-32.
- WEBSTER, C.D. & LIM, C.E. (2002). *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. CABI Publishing. 418p.
- WEIRICH, C.R. & REIGH, R. (2001). Dietary lipids and stress tolerance of larval fish. In: LIM, C. & WEBSTER, C.D. (eds). *Nutrition and fish health. Food Products Press, Aquaculture*. pp. 301-312.
- WELCOMME, R.L. (1985). River fisheries. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, Roma, 330p. (FAO Fisheries Technical Papers, 262).
- WILSON, R.P. & POE, W.E. (1985). Apparent digestibility of protein and energy in feed ingredients for channel catfish. *Prog. Fish. Cult.*, 47: 154-158.
- WILSON, R.P. (1989). Amino acids and proteins. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. 2 ed. Academic Press, San Diego. pp.111-153.
- WILSON, R.P. (1994). Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124: 67-80.
- WINFREE, R.A. & STICKNEY, R.R. (1981). Effects of dietary protein energy on growth, feed conversion efficiency and body composition of *Tilapia aurea*. *J. Nutr.*, 111: 1001-1012.
- WOOD, C.M., HOPKINS, T.E., HOGSTRAND, C. & WALSH, P.J. (1995). Pulsatile urea excretion in the toadfish *Opsanus beta*: an analysis of the rates and routes. *J. Exp. Biol.* 198: 1729-1741.
- YAMADA, K.; GODA, S.; BUSTAMANTE, S. & KOLKOVSKY, O. (1983). Different effect of starvation on activity of sucrase and lactase in the rat jejunioileum. *Am. J. Physiol.*, 244 (G): 449-455.
- YONGE, C.M. (1973). Evolution and adaptation in the digestive system of the Metazoa. *Biol. Revs.*, 12: 87-115.
- ZAMBONINO-INFANTE, J.L. & CAHU, C.L. (1994). Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A(2): 209-212