

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
(Convênio UFSCar – UNESP Araraquara)

**DESEMPENHO, ENZIMOLOGIA E METABOLISMO DE JUVENIS DE PACU  
(*Piaractus mesopotamicus*) ALIMENTADOS COM DIETAS PELETIZADAS E EXTRUSADAS  
COM NÍVEIS MÉDIO E ALTO DE LIPÍDEOS E CARBOIDRATOS**

*Claucia Aparecida Honorato da Silva*

São Carlos  
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
(Convênio UFSCar – UNESP Araraquara)

**DESEMPENHO, ENZIMOLOGIA E METABOLISMO DE JUVENIS DE PACU  
(*Piaractus mesopotamicus*) ALIMENTADOS COM DIETAS PELETIZADAS E EXTRUSADAS  
COM NÍVEIS MÉDIO E ALTO DE LIPÍDEOS E CARBOIDRATOS**

*Claucia Aparecida Honorato da Silva*

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

São Carlos  
2008

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

S586de

Silva, Cláucia Aparecida Honorato da.

Desempenho, enzimologia e metabolismo de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas peletizadas e extrusadas com níveis médio e alto de lipídeos e carboidratos / Cláucia Aparecida Honorato da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

100 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

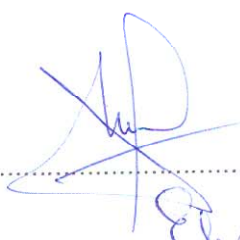
1. Nutrição de peixes. 2. Processo de extrusão. 3. Pacu (Peixe). I. Título.

CDD: 612.396 (20<sup>a</sup>)

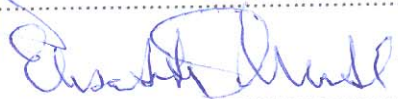
Universidade Federal de São Carlos  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Tese de Cláucia Aparecida Honorato da Silva

Prof. Dr. Gilberto Moraes.....



Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati.....



Profa. Dra. Lícia Maria Lundstedt.....



Profa. Dra. Cristina Ferro Corrêa Toniolo.....



Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes.....



---

***Orientador***  
***Prof. Dr. Gilberto Moraes***

---

***Co-Orientador***  
***Prof. Dr. Dalton José Carneiro***

**Dedico:**

*À minha querida avó Judith de Souza Honorato*  
(in memoriam)

Diante dos inúmeros mistérios existentes entre o CÉU e a TERRA, a única certeza que tenho, é que sempre estive ao meu lado durante essa longa caminhada. Portanto, cito duas palavras relacionadas à sua pessoa: INIGUALÁVEL e INSUBSTITUÍVEL, ou seja...

**ÉS ÚNICA!**

**Ofereço:**

*À minha mãe Cláudia A. Honorato*

Sem a sua ajuda e seus sonhos, chegar até aqui seria impossível. Obrigada pela oportunidade!

*A Julia Pedrolo Honorato...*

Tão pequena e tão importante em minha vida...

**Agradeço:**

*Ao, Cesar!*

Pela pessoa maravilhosa e brilhante que é sempre me incentivando em todos os momentos. Por estar sempre disposto a me ajudar sem limites de tempo, atuando como amigo e companheiro.

## *Agradecimentos*

*Agradeço a Deus pela luz e pela oportunidade;*

*À minha mãe pelo incentivo, compreensão e por me permitirem chegar até aqui! E a toda a minha família.*

*Ao meu orientador Gilberto Moraes que me conduziu durante a execução da tese, por me permitir ousar e por ter acreditado em mim;*

*Ao meu co-orientador Prof. Dr. Dalton José Carneiro por ter me auxiliado mais uma vez em minha formação;*

*À Univesidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade.*

*Ao Centro de aquíicultura da UNESP (Caunesp) por me ceder as intalações para condução dos ensaios biológicos;*

*À Araceli Hachbarth pela amizade e companheirismo ao longo desses anos, por ter me auxiliado nas análises de laboratório, e me ajudado a escrever esta tese;*

*À Cleujosi da Silva Nunes por ter me ajudado a conduzir os ensaios biológicos;*

*Aos meus queridos amigos Ive Marchioni Avilez e Luiz Antônio Kioshi Aoki Inoue sem vocês eu não teria chegado a este laboratório;*

*Ao Rodrigo Camilo, por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis desse doutorado. Valeu a ajuda!*

*Aos colegas de laboratório, pelo convívio e por estarem sempre presentes: Araceli, Amilase, Fernando, Fernanda, Francine, Gustavo, Ive, Josi, Joyce, Juan, Juliana, Livia, Licia, Lucas, Luciana, Luiz, Priscila, Rodrigo, Thiago, Yudy;*

*Ao Toninho pelo suporte técnico e boa vontade;*

*À Carolina Flores-Quintana e sua família que me proporcionaram momentos de aprendizagem profissional e pessoal;*

*Ao Claudinei da Cruz pela parte histológica e pela torcida!*

*Aos meus amigos que me proporcionaram momentos felizes....*

*À FAPESP, pela bolsa (04/07081-7) e pelo auxílio financeiro.*

**Meu siceros agradecimentos**

## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS .....   | viii      |
| LISTA DE TABELAS.....  | x         |
| RESUMO .....   | xi        |
| ABSTRACT .....   | xii       |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Considerações gerais .....   | 1         |
| 1.2 Exigências nutricionais de energia não protéica.....               | 2         |
| 1.3 A estrutura do carboidrato .....                                   | 3         |
| 1.4 Os processamentos das dietas: extrusão ou peletização .....        | 5         |
| 1.5 Aproveitamento de nutrientes.....                                  | 7         |
| 1.6 Enzimas digestivas.....  | 8         |
| 1.7 Metabolismo intermediário em peixes.....                           | 11        |
| 1.8 A espécie <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....                     | 12        |
| <b>2 OBJETIVO.....</b>   | <b>14</b> |
| 2.1 Estratégias.....   | 14        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                       | <b>15</b> |
| 3.1 Dietas experimentais.....  | 15        |
| 3.2 Caracterização das dietas experimentais.....                       | 16        |
| 3.3 Ensaio de digestibilidade aparente .....                           | 16        |
| 3.4 Tempo de trânsito gastrointestinal (TTGI).....                     | 17        |
| 3.5 Enzimas digestivas.....  | 17        |
| 3.5.2.1. Protease Inespecífica .....                                   | 18        |
| 3.5.2.2. Tripsina .....  | 18        |
| 3.5.2.3. Quimiotripsina .....  | 18        |
| 3.5.2.4. Lipase.....   | 19        |
| 3.5.2.5. Amilase .....   | 19        |
| 3.5.2.6. Maltase.....  | 19        |
| 3.6 Ensaio de crescimento .....  | 20        |
| 3.7 Eficiência de retenção de nutrientes .....                         | 20        |
| 3.8 Análise do perfil cromatográfico das dietas e do filé do pacu..... | 21        |
| 3.9 Intermediários metabólicos .....                                   | 22        |
| 3.9.1 Preparação dos extratos .....                                    | 22        |
| 3.9.2 Determinação dos intermediários metabólicos .....                | 22        |
| 3.9.2.1 Açúcares redutores totais.....                                 | 23        |
| 3.9.2.2 Glicogênio .....   | 23        |
| 3.9.2.3 Piruvato.....  | 23        |
| 3.9.2.4 Lactato.....   | 24        |
| 3.9.2.5 Proteínas total .....  | 24        |



|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.9.2.6  | Aminoácidos livres .....   | 24 |
| 3.9.2.7  | Amônia .....   | 24 |
| 3.9.2.8  | Triglicerídeos .....   | 25 |
| 3.9.2.9  | Ácidos graxos .....  | 25 |
| 3.10     | Determinação das enzimas metabólicas .....                                     | 26 |
| 3.10.1   | Preparação dos homogenatos para as enzimas metabólicas .....                   | 26 |
| 3.10.2   | Determinação das enzimas metabólicas .....                                     | 26 |
| 3.10.2.1 | Alanina aminotransferase .....   | 26 |
| 3.10.2.2 | Aspartato aminotransferase .....   | 27 |
| 3.10.2.3 | Glutamato desidrogenase .....  | 27 |
| 3.10.2.4 | Lactato desidrogenase .....  | 27 |
| 3.10.2.5 | Malato desidrogenase .....   | 28 |
| 3.11     | Análises Histológicas .....  | 28 |
| 3.12     | Análises Estatísticas .....  | 29 |
| 4        | RESULTADOS .....   | 30 |
| 4.1      | Caracterização das dietas experimentais .....                                  | 30 |
| 4.2      | Digestibilidade aparente e tempo de trânsito gastrointestinal das dietas ..... | 31 |
| 4.3      | Enzimas digestivas .....   | 36 |
| 4.4      | Crescimento .....  | 40 |
| 4.5      | Eficiência de retenção de nutrientes .....                                     | 44 |
| 4.6      | Perfil de ácidos graxos do filé de pacu .....                                  | 47 |
| 4.7      | Intermediários metabólicos .....   | 51 |
| 4.8      | Enzimas metabólicas .....  | 54 |
| 4.9      | Análises Histológicas .....  | 56 |
| 5        | DISCUSSÃO .....  | 64 |
| 5.1      | Caracterização das dietas experimentais .....                                  | 64 |
| 5.2      | Digestibilidade aparente e tempo de trânsito gastrointestinal das dietas ..... | 65 |
| 5.3      | Enzimas digestivas .....   | 67 |
| 5.4      | Crescimento .....  | 72 |
| 5.5      | Eficiência de retenção de nutrientes .....                                     | 74 |
| 5.6      | Perfil de ácidos graxos do filé de pacu .....                                  | 75 |
| 5.7      | Intermediários metabólicos .....   | 76 |
| 5.8      | Enzimas metabólicas .....  | 81 |
| 5.9      | Análises Histológicas .....  | 84 |
| 6        | CONSIDERAÇÕES FINAIS .....   | 87 |
| 7        | CONCLUSÕES .....   | 87 |
| 8        | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 88 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Regressão das médias do tempo de trânsito gastrointestinal do pacu submetidos a dietas (peletizadas ou extrusadas) com diferentes níveis de carboidratos e lipídeos (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos). ..... 33
- Figura 2- Nível de proteína digestível das dietas com 4% (A) e 8% (A') de lipídeos. (P – peletizado; E – extrusado, 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos). ..... 35
- Figura 3- Nível de energia digestível das dietas com 4% (A) e 8% (B) de lipídeos. (P – peletizado; E – extrusado, 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos). ..... 36
- Figura 4- Atividade específica da amilase no trato digestório estômago, cecos pilóricos, intestino anterior, intestino posterior de pacu. Letras diferentes (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) reportam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média ( $n=9$ )  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E extrusado, 40 e 50 - níveis de carboidratos; 4 e 8 - níveis de lipídeos). 38
- Figura 5- Atividade específica da protease inespecífica no trato digestório estômago, cecos pilóricos, intestino anterior, intestino posterior) de pacu ( $n=9$ ). Letras diferentes (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) reportam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E extrusado, 40 e 50 – níveis de carboidratos; 4 e 8 – níveis de lipídeos). 40
- Figura 6- Crescimento em peso ao longo do período experimental de pacus submetidos ao aumento de carboidratos em dietas peletizadas (A, A') e em dietas extrusadas (B, B'). (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50% níveis de carboidratos; 4 e 8% níveis de lipídeos). ..... 41
- Figura 7- Fator de condição de pacu submetido ao aumento de carboidratos em dietas (peletizadas ou extrusadas) com (A) 4% e (B) 8% de lipídeos. (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos). ..... 44
- Figura 8- Relação entre n-3/ n-6 dos filés de pacu submetido ao aumento de carboidratos em dietas (peletizadas ou extrusadas) com (A) 4% e (B) 8% de lipídeos. Letra diferente (maiúscula comparação entre dietas peletizadas e minúscula comparação entre dietas extrusadas, (\*) comparação entre processamentos) (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos) . ..... 47
- Figura 9- Atividade enzimática da (A) glutamato desidrogenase (GDH), (B) alanina aminotransferase (ALAT) e da (C) aspartato aminotransferase (ASAT) no fígado de pacu. Letra diferente (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) reporta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média ( $n=9$ )  $\pm$  D.P. (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos). ..... 54
- Figura 10- Atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) e da malato desidrogenase (MDH) no fígado de pacu. Letra diferente (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) reporta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média ( $n=9$ )  $\pm$  D.P. (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos). ..... 55
- Figura 11- Foto micrografia do hepatócito de juvenis de pacu submetidos às dietas peletizadas ou extrusadas. (A) hepatócito com núcleos picnóticos (ponta da seta). H/E 100x. P 40/4 (B) hepatopâncreas (p). PAS/H 20 x. E 40/4, (C) inclusão de lipídeo (l). H/E 20 x. P 50/4, (D) acúmulo de glicogênio. PAS/H 20 x. E 50/4, (E) arranjo cordonal dos hepatócitos (linha). H/E 20 x. P 40/8, (F) desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos (linha) PAS/H 20 x. E 40/8, (G) H/E 100x. P 50/8, (H) congestão sanguínea nos sinusóides (s) e desarranjo cordonal (linha). H/E 20 x. E 50/8. .... 57

- Figura 12- Porcentagem de hepatócitos com núcleos picnóticos (HNP) de pacu submetidos ao aumento de carboidratos em dietas (peletizada ou extrusada) com (A) baixo e (B) dietas com alto nível de lipídeos. (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos). ..... 58
- Figura 13- Hepatócitos com núcleo picnótico: A) AHNP - Área do hepatócito que apresentavam núcleo picnótico B) ANP - área do núcleo picnótico de pacu. Letra diferente (minúscula comparação entre dietas peletizadas e maiúscula comparação entre dietas extrusadas, (\*) comparação entre processamentos) reporta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E - extrusado, 40 e 50 – níveis de carboidratos; 4 e 8 – níveis de lipídeos). ... 59
- Figura 14- Hepatócitos com núcleo normal: A, A') AHNN - Área do hepatócito com núcleo normal; B, B') ANN - área do núcleo do hepatócito. Letra diferente (maiúscula comparação entre dietas peletizadas e minúscula comparação entre dietas extrusadas, (\*) comparação entre processamentos) reporta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E - extrusado, 40 e 50 – níveis de carboidratos; 4 e 8 – níveis de lipídeos)..... 60
- Figura 15- Foto micrografia de intestino anterior de juvenis de pacu submetidos às dietas peletizadas ou extrusadas - (A) células caliciformes (seta), PAS/H 100x, P40/4; (B) muscular longitudinal (ml), camada muscular interna (mi), serosa (\*), H/E 20x, E40/4; (C) P50/4; (D) epitélio da mucosa (ep) E50/4; (E) altura da camada longitudinal (linha) PAS/H 20x, E40/4, (F) altura da camada da mucosa (linha) H/E 10x, E40/8, (G) células caliciformes PAS/H 100x, P50/8; (H) células caliciformes PAS/H 100x, E50/8. .... 61
- Figura 16- Quantidade relativa de células caliciformes nas vilosidades do intestino anterior do pacu submetidos ao aumento de carboidratos em dietas (peletizadas ou extrusadas) com (A) baixo e (B) alto nível de lipídeos. Letras diferentes (maiúscula comparação entre dietas peletizadas e minúscula comparação entre dietas extrusadas) reportam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E - extrusado, 40 e 50 – níveis de carboidratos; 4 e 8 – níveis de lipídeos). ..... 62
- Figura 17- Espessura da parede do intestino anterior do pacu submetidos ao aumento de carboidratos em dietas (peletizada ou extrusada) com (A) baixo e (B) alto nível de lipídeos. Letras diferentes (maiúscula comparação entre dietas peletizadas e minúscula comparação entre dietas extrusadas) reportam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E - extrusado, 40 e 50 – níveis de carboidratos; 4 e 8 – níveis de lipídeos). ..... 63
- Figura 18- Resposta metabólica entre músculo e fígado frente ao aumento de carboidrato em dietas peletizadas com 4% de lipídeo na alimentação do pacu. Valores referentes às relações entre as concentrações. .... 77
- Figura 19- Resposta metabólica entre músculo e fígado frente ao aumento de carboidrato em dietas extrusadas com 4% de lipídeo na alimentação do pacu. Valores referentes às relações entre as concentrações. .... 78
- Figura 20- Resposta metabólica entre músculo e fígado frente ao aumento de carboidrato em dietas peletizadas com 8% de lipídeo na alimentação do pacu. Valores referentes às relações entre as concentrações. .... 80
- Figura 21- Resposta metabólica, entre músculo e fígado frente ao aumento de carboidrato em dietas extrusadas com 8% de lipídeo na alimentação do pacu. Valores referentes às relações entre as concentrações. .... 81

**LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição bromatológica das dietas experimentais. ....   | 15 |
| Tabela 2 - Perfil dos ácidos graxos das dietas experimentais. ....   | 22 |
| Tabela 3 - Caracterização das dietas peletizadas e extrusadas .....  | 30 |
| Tabela 4 - Interação dos nutrientes e processamentos. ....   | 31 |
| Tabela 5 - Digestibilidade aparente e tempo de trânsito gastrointestinal de pacu. ....   | 32 |
| Tabela 6 - Interação de processamento de dietas e níveis de nutrientes para os coeficientes de digestibilidade do pacu. ....   | 34 |
| Tabela 7 - Interação níveis de lipídeos e níveis de carboidratos para os coeficientes de digestibilidade do pacu. ....   | 35 |
| Tabela 8 - Desempenho de juvenis de pacu submetidos a 20 dias de alimentação. ....   | 36 |
| Tabela 9 - Atividades específicas das enzimas digestivas nas porções do trato gastrointestinal do pacu submetidos ao aumento de carboidratos em dietas com 4% de lipídeos. ....  | 37 |
| Tabela 10 - Atividades específicas das enzimas digestivas nas porções do trato gastrointestinal do pacu submetidos ao aumento de carboidratos em dietas com 8% de lipídeos. .... | 39 |
| Tabela 11 - Parâmetros de crescimento pacu. ....   | 42 |
| Tabela 12 - Interação níveis de carboidratos e lipídeos no crescimento de pacu. ....   | 43 |
| Tabela 13 - Interação nível de lipídeos e processamento no crescimento de pacu. ....   | 43 |
| Tabela 14 - Eficiência de utilização de nutrientes do pacu. ....   | 45 |
| Tabela 15 - Interação de nível de lipídeos e processamento na eficiência de retenção de nutrientes. ....   | 46 |
| Tabela 16 - Interação de nível de carboidratos e processamento na eficiência de retenção de nutrientes. ....   | 46 |
| Tabela 17 - Perfil de ácidos graxos do filé do pacu. ....  | 48 |
| Tabela 18 - Interação de níveis de carboidratos e lipídeos no perfil de ácidos graxos no filé do pacu. ....  | 49 |
| Tabela 19 - Interação de níveis de carboidratos e processamentos no perfil de ácidos graxos do filé de pacu. ....  | 50 |
| Tabela 20 - Interação de nível de lipídeos e processamentos no perfil de ácidos graxos do pacu. ....   | 51 |
| Tabela 21 - Intermediários metabólicos de pacus submetidos ao aumento de carboidratos em dietas com 4% de lipídeos. ....   | 52 |
| Tabela 22 - Intermediários metabólicos de pacus submetidos ao aumento de carboidratos em dietas com alto (8%) nível de lipídeos. ....  | 53 |
| Tabela 23 - Teste histoquímico realizado no intestino anterior do pacu evidenciando a intensidade de reação do glicocalix. ....  | 62 |

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas bioquímicas e metabólicas em adaptação ao processamento da dieta (peletizadas e extrusadas) contendo baixo e alto nível de carboidratos e lipídeos na alimentação do pacu *Piaractus mesopotamicus*. Foram analisadas as características das dietas, os índices de crescimento, a eficiência de retenção dos nutrientes e da energia, o perfil de ácidos graxos presentes no filé, o tempo de trânsito gastrointestinal, digestibilidade de proteína e da energia, enzimas digestivas (proteases inespecífica, tripsina, quimiotripsina, amilase, maltase e lipase), intermediários metabólicos de músculo branco, plasma e fígado (amônia, lactato, piruvato, proteína, aminoácidos livres, triglicerídeos, ácidos graxos livres e açúcares redutores totais), enzimas metabólicas (ALAT, ASAT, GDH, LDH, MDH) e a histologia do intestino anterior e do fígado. O processamento da dieta foi influenciado pelos níveis de carboidratos e lipídeos, sendo que o processo de extrusão foi altamente dependente do nível de carboidrato das dietas. O crescimento e a eficiência de retenção de nutrientes e a digestibilidade revelaram que o efeito poupador de proteína pelo carboidrato foi observado para as dietas peletizadas já o efeito poupador de proteína pelo lipídeo foi observado nas dietas extrusadas. As enzimas digestivas do pacu apresentaram indução das proteases às dietas com baixo lipídeo e indução das amilases às dietas com alto lipídeo. O perfil metabólico revelou principalmente momentos diferentes de disponibilização da glicose. O aumento de carboidrato e de lipídeo assim como o processamento aplicado as dietas evidenciaram adaptações na morfologia do trato digestório do pacu que resultaram em melhora da absorção dos nutrientes disponíveis. As adaptações da morfologia do fígado revelaram aumento da atividade hepática conforme o aumento de energia disponibilizada através do processamento das dietas. Em conclusão, o efeito poupador de proteína é encontrado pela combinação entre teores de carboidrato e lipídeos em adição ao processamento aplicado à dieta.

### ABSTRACT

The purpose of this thesis was to study the biochemistry and metabolic adaptive aspects of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed with different diets processing (extrusion or pelletization), which had high or low levels of carbohydrates and lipids in their composition. It was analyzed growth and biochemical parameters: diet composition parameters, growth performance, efficiency of nutrient retention, filet fatty acids profile, transit velocity, digestibility of protein and energy, digestive enzymes (unspecific proteases trypsin, chymotrypsin, lipase, amylase and maltase), metabolic responses (glucose, lactate, piruvate, free fatty acids, free amino acids, glycogen, protein and ammonia) metabolic enzymes responses (ALAT, ASAT, GDH, LDH, MDH) and intestinal and liver morphology. We could observe that the different diets processing were affected by the levels of carbohydrates and lipids, where extrusion process showed high dependance of levels of carbohydrates. The zootechnical approaches revealed protein sparing effect of carbohydrates in pelletized diets and, protein sparing effect of lipids in extruded diets. In relation to digestive enzymes responses it was observed that unspecific protease was induced by low lipids diet levels whereas amylase diminished its response in high lipids diet levels. The metabolic profile reflected different ways to get glucose available to the gluconeogenesis through different metabolic substrates, in order to support the energetic stores. The increase of both carbohydrates and lipids on different processing diets (extrusion or pelletization), support the morphological adaptations of liver and intestine of pacu, resulting in better nutrient absorption. In conclusion, the protein sparing effect may be found as much different carbohydrates and lipids combinations as different diet processing.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações gerais

Entre alguns nutrientes de relevância na nutrição, os carboidratos representam uma preocupação para a piscicultura, uma vez que seu aproveitamento é variável em função do hábito alimentar, clima da região, tipo de carboidrato e forma como é processado. Os carboidratos constituem o grupo de nutriente mais contraditório dentro da alimentação dos peixes. O seu aproveitamento pelos peixes parece estar associado à complexidade de sua molécula. Embora os peixes não tenham exigências dietéticas específicas para carboidratos, a inclusão desse nutriente na formulação das dietas constitui uma importante fonte de energia, representando uma considerável economia na produção de rações (GATLIN, 1999).

Wilson (1994) verificou que os dissacarídeos e polissacarídeos digestíveis favorecem mais acentuadamente o crescimento que os monossacarídeos, assim como o amido cozido ou gelatinizado possui uma melhor digestibilidade e influencia mais acentuadamente o crescimento dos peixes que os amidos crus. Dessa forma, torna-se necessário manipulá-lo tecnologicamente, de tal maneira que aumente a área de contato com as enzimas, o que é conseguido com tratamento térmico. Entre os processamentos de ração mais utilizados na aqüicultura estão a extrusão e a peletização, os quais propiciam modificações benéficas ao amido melhorando o aproveitamento nutricional das rações pelos peixes (JAYARAM & SHETTY, 1981).

Segundo alguns autores, o melhor aproveitamento de carboidratos em rações contendo ingredientes extrusados é devido ao aumento da taxa de amido gelatinizado nas rações. Isso foi observado por Takeuchi et al. (1990) quando compararam alevinos de truta (*Orncorhynchus mykiss*) e carpa (*Cyprinus carpio*) alimentados com dietas contendo fontes de carboidratos (amido de batata, amido de milho, farinha de trigo, milho e centeio) extrusadas ou não. Observaram que, em ambas as espécies, o crescimento e as taxas de eficiência alimentar e eficiência protéica foram maiores em peixes alimentados com rações contendo ingredientes extrusados, quando comparadas com rações que continham ingredientes não-extrusados. Porém, rações formuladas com farinha de trigo, quando submetidas aos dois tratamentos, não mostraram diferença no desempenho dos peixes.

## 1.2 Exigências nutricionais de energia não protéica

Entre as principais estratégias para otimizar a nutrição de organismos aquáticos está a inclusão cuidadosa de fontes energéticas como os carboidratos e os lipídeos nas dietas, que podem promover o efeito poupador de proteína (WILSON 1994; SHIAU 1997).

Os lipídeos são considerados a principal fonte de energia não protéica para peixes, particularmente os ácidos graxos livres derivados de gorduras e óleos (TACON, 1989). Porém, altos níveis de inclusão na dieta poderão influenciar diretamente no tempo de passagem do alimento pelo trato digestório, podendo provocar diarreias nos peixes. Outra limitação está na parte técnica da produção de pellets que podem ser menos estáveis na água devido a problemas de agregação da partícula. Contudo, Watanabe (1982) relata que a fonte preferencial de energia não protéica para peixes é o lipídeo, pois a digestão do carboidrato é muito baixo devido à baixa atividade amilohidrolítica da maioria das espécies de peixes.

Os carboidratos constituem o grupo de nutrientes mais contraditórios dentro da alimentação dos peixes. O uso desta fonte pelos peixes parece estar associada à complexidade de sua molécula. Certas espécies utilizam tanto açúcares simples quanto açúcares complexos, enquanto outras não utilizam nem mesmo os açúcares simples como fonte de energia (SULLIVAN & REIGH, 1995). Por outro lado, peixes de água temperada como *O. mykiss* não aproveitam carboidratos complexos (HILTON & ATKINSON, 1982).

Embora os peixes não tenham exigências dietéticas específicas para carboidratos, a inclusão desse nutriente na formulação das dietas constitui uma importante fonte de energia, representando uma considerável economia na produção de rações, uma vez que apresentam menor custo em relação aos alimentos protéicos (GATLIN, 1999). Como a catabolismo oxidativo das proteínas é nutricional e economicamente pouco eficiente, a ação poupadora da proteína de fontes de energia tem sido estudada principalmente em espécies de peixes de águas temperadas (MÉDALE et al., 1991), como *O. mykiss* (BEAMISH & MEDLAND, 1986), *Salvelinus namaycush* (JAYARAM & BEAMISH, 1992) e *Salmo trutta* (ARZEL et al., 1994); assim como em algumas espécies de águas quentes como o *Clarias gariepinus* (HENKEN et al., 1986; MACHIELS & HENKEN, 1987), *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* (SHIAU & CHEN, 1993) e *Colossoma macropomum* (VAN DER MEER et al., 1997). A adição de fontes de energia tem melhorado a eficiência de retenção da proteína, incrementando a energia digestível e também diminuindo as perdas metabólicas de nitrogênio (KAUSHIK & OLIVA-TELES, 1985; MÉDALE et al., 1991).



A utilização de carboidrato está associada a diversos fatores como temperatura de cultivo, regime alimentar associado à estação climática (verão ou inverno), processamento da dieta e nível dos nutrientes (KAUSHIK, 1989; VENOUE et al., 2003). Por isso alguns autores relatam o melhor aproveitamento de carboidratos em rações contendo ingredientes extrusados, devido ao aumento da taxa de amido gelatinizado nas rações. A utilização de dietas contendo ingredientes extrusados na alimentação de *Ornithorhynchus mykiss* e *Cyprinus carpio* revelou as melhores respostas de crescimento, taxas de eficiência alimentar e eficiência protéica em comparação aos peixes alimentados com ingredientes não-extrusados (TAKEUCHI et al., 1990).

Por isso, estão sendo conduzidos estudos para melhorar o aproveitamento da fonte de carboidratos através do processamento da fonte, como extrusão, micronização, cozimento, entre outros, objetivando a “desorganização” da estrutura do grânulo de amido, para facilitar a ação da enzima amilase no processo de digestão (KAUSHIK & OLIVA-TELES, 1985).

### 1.3 A estrutura do carboidrato

A estrutura do carboidrato é um fator importante no estudo de processamento da dieta para alimentação animal, pois a forma em que este se apresenta no alimento pode provocar mudanças nos índices de desenvolvimento e metabolismo animal. Dentre os muitos tipos de amido o que mais se destaca é o amido do grão de milho que é constituído por dois polímeros de glicose, a amilose (22 a 28%) e a amilopectina (72 a 78%), que formam um complexo altamente organizado, o que dificulta a ação das amilases (LAWRENCE, 1985).

O maior componente do amido é o polímero de glicose que é composto pela amilose e amilopectina cujo interior do grânulo é composto de regiões alternadas em cristalinas e amorfas. A região cristalina ou micelar é composta principalmente por amilopectina, que é uma molécula ramificada constituída de aproximadamente 1400 resíduos de  $\alpha$ -glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4, ocorrendo também ligações  $\alpha$ -1,6, sendo resistente à entrada de água e ao ataque enzimático (ROONEY & PFLUGFELDER, 1986). A parte linear das moléculas de amilopectina forma estruturas helicoidais duplas, estabilizadas por pontes de hidrogênio entre grupamentos hidroxila (SOEST et al., 1996; KEETELS et al., 1996). São elas que dão origem às regiões cristalinas dos grânulos, indicada com a responsável pela viscosidade. Já a amilose, é constituída de 250 a 300 resíduos de D-glicopirranose, ligadas por pontes glicosídicas  $\alpha$ -1,4, que conferem a molécula uma estrutura

helicoidal essencialmente linear (CURA et al., 1995; NILSSON et al., 1996) indicada como a responsável pela propriedade geleificante do amido.

Alguns fenômenos afetam as propriedades dos amidos. Um deles é a gelatinização, o processo de transformação do amido granular em pasta visco elástica (JANG & PYUN, 1996). Durante o aquecimento de dispersões de amido em presença de excesso de água, inicialmente ocorre o inchamento de seus grânulos até temperaturas nas quais ocorre o rompimento dos grânulos, com destruição da ordem molecular e mudanças irreversíveis nas suas propriedades. A temperatura na qual ocorre este tipo de transformação é chamada de temperatura de gelatinização T(G) (RAGHEB et al., 1996). Por outro lado, quando o amido é aquecido em presença de pequenas quantidades de água, ocorre o rompimento de seus grânulos (FARHAT & BLANSHARD, 1997).

Essas alterações físicas na molécula do amido podem ser benéficas (WULANSARI et al., 1999) aumentando sua digestibilidade. Grossmann et al. (1998) relatam que a extrusão seria um método empregado para obtenção de amidos modificados solúveis em água e com elevada capacidade de retenção de água, em razão da gelatinização e dextrinização que ocorrem durante o processo. Esse fenômeno se deve ao fato que durante a gelatinização, os grânulos de amido absorvem água, exudam parte da amilose, e tornam-se mais suscetíveis à degradação enzimática, perdendo a birrefringência (ROONEY & PFLUGFELDER, 1986).

O amido é o principal componente energético dos grãos de cereais (55 a 77%) e no processo de extrusão, contribui na expansão e coesão do produto final, além de ser gelatinizado a uma temperatura de 50 a 80°C, quando o amido torna-se solúvel absorvendo grande quantidade de água (BATAGLIA, 1990; GOELEMA, 1999), o que resulta em melhor digestão enzimática devido a maior facilidade para absorção das enzimas (MELLO JR., 1991). A melhoria na utilização do amido é dependente dos métodos de processamento, das fontes de amido utilizadas e também da espécie animal (THEURER, 1986).

As barreiras físicas para a digestão do amido incluem a cutícula da semente, a matriz protéica que envolve os grânulos de amido e a baixa solubilidade do amido. Alguns processos como a trituração rompem a cutícula, mas normalmente têm pouco efeito sobre a matriz protéica que envolve o amido ou sobre sua solubilidade. A utilização mais completa do amido requer um maior grau de rompimento do grânulo de amido, que pode ser obtido através de rompimento do grânulo de amido, que pode ser obtido através do processamento a vapor apropriado. Os tratamentos que envolvem umidade, calor e pressão causam o

rompimento da matriz protéica que recobre e encapsula o grânulo de amido e aumentam a sua eficiência de utilização (OWENS, 1986).

#### **1.4 Os processamentos das dietas: extrusão ou peletização**

Diversos tratamentos químicos e físicos tais como peletização e extrusão são utilizados no processamento da dieta, com o objetivo de incrementar a eficiência de sua utilização, refletindo em melhoras no crescimento animal (FARIA et al., 2007).

A extrusão consiste em uma combinação de umidade, pressão (30 a 60 atm), temperatura entre 130 e 150°C e atrito mecânico, que resulta em alterações físico-químicas como redução da partícula do ingrediente, gelatinização do amido e inativação dos fatores anti-nutricionais (CHENG & HARDY, 2003). Podem também ser formados complexos amilose-lipídeos, desnaturar proteínas e rompem as pontes de hidrogênio (THAKUR & SAXENA, 2000). Durante o processo de extrusão ocorre a gelatinização, cozimento, fricção molecular, esterilização e secagem da matéria prima, reestruturando-a para criar novas texturas e formatos (EXTRUSADOS, 2003).

No início do processo, a matéria prima é pesada e encaminhada para o umificador, onde a água é adicionada para chegar ao teor de umidade desejado. Em seguida a matéria prima é encaminhada até o extrusor por meio de uma rosca dosadora. No extrusor, uma rosca sem fim força o material em direção a matriz. Durante esse processo a temperatura se eleva e a pressão dentro do extrusor aumenta. Ao deixar o extrusor a pressão decresce violentamente e a água vaporiza instantaneamente provocando a expansão do material. A forma do produto final pode ser controlada pela forma da matriz de saída. Depois da extrusão apesar de totalmente cozidos, os produtos devem ser secos (YOSHITOMI, 2004).

O processo de extrusão com relação a outros métodos de cozimento apresenta uma série de vantagens, entre elas a versatilidade, formato do produto, grande capacidade de produção, melhora das características funcionais e da qualidade do alimento final (EXTRUSADOS, 2003).

Pelo fato de ser um processo de alta temperatura e curto tempo de residência, as perdas de nutrientes são menores e o cozimento pode melhorar a digestibilidade do produto devido à desnaturação das proteínas e gelatinização do amido. Os produtos extrusados possuem longa vida de prateleira sem refrigeração, apresentando-se com baixa contagem total de microorganismos e livres de patógenos e salmonelas (EXTRUSADOS, 2003).

Existem vários fatores que afetam o produto extrusado entre eles destacam-se a temperatura da extrusão, a umidade da matéria prima, o diâmetro da matriz, a quantidade de amido e a natureza do amido empregado. Segundo Alves & Grossman (2002) o que caracteriza o produto extrusado é o grau de expansão que por sua vez vai afetar a densidade, a fragilidade e a textura do produto confeccionado.

Durante o processo de extrusão, ocorre desnaturação protéica, um conjunto de alterações na conformação da molécula, provocando modificações relacionadas à tecnologia de alimentos (GOMES & AGUILERA, 1984; ARAÚJO, 1999). A proteína desnaturada é a mais sensível à hidrólise pelas enzimas proteolíticas e em muitos casos aumenta a digestibilidade (ARAÚJO, 1999). No entanto, esse processo só é benéfico para os alimentos quando provoca desnaturação parcial da molécula protéica (LEONEL et al., 2006).

A utilização da pressão na extrusão faz com que este processo apresente algumas vantagens como desativação dos fatores anti-nutricionais, minimiza a reação de Maillard (BATAGLIA, 1990) retarda a rancificação das gorduras e aumenta a digestibilidade do óleo (SAKOMURA, 1996), diminuição nas perdas de vitaminas, principalmente as lipossolúveis (NETO, 1992) porém, podem formar complexos de lipídeos com a amilose (BHATNAGAR & HANNA, 1994).

A peletização consiste em compactar mecanicamente a ração dentro de uma câmara de prensagem, na qual rolos compressores forçam a passagem da mistura dos ingredientes que compõem a mesma através de orifícios existentes em um anel externo chamado de matriz (COELHO, 1997). Toda matéria-prima utilizada no processo passa por um aquecimento, seja pelo uso prévio de vapor com temperaturas em torno de 120°C, elevando a temperatura da mistura para uma faixa entre 50 a 90°C, seja pelo atrito mecânico sofrido durante a prensagem da ração pelos rolos compressores contra a matriz, elevando a temperatura da mistura para 50 a 60°C (MILLÁN et al., 1987). Esta técnica apresenta baixa incidência de desnaturação de proteínas, quelação de minerais e destruição de vitaminas, além de possibilitar a inclusão de altos níveis de lipídeos (KUBITZA, 1998).

A peletização torna o alimento mais denso (apresentando facilidades para o transporte), reduz a seletividade e segregação dos ingredientes, destrói organismos patogênicos e torna o alimento mais palatável, reduzindo partículas de pó presente, facilitando a ingestão (BEHNKE, 1996).

### 1.5 Aproveitamento de nutrientes

Frente a este cenário de processamento de dietas, as modificações e as interações ocorridas entre os ingredientes durante o processamento da dieta vão refletir diretamente na digestibilidade. Diversos autores vêm ressaltando a baixa capacidade dos peixes para aproveitar os amidos crus das dietas, quando comparada com o amido cozido ou gelatinizado, atribuindo a estes melhores coeficientes de digestibilidade (VENOU et al., 2003; CHENG & HARDY, 2003; YOUNG et al., 2006). A utilização de amidos geleificados melhora a disponibilidade da energia das dietas ofertadas para *O. mykiss* (CHENG & HARDY, 2003), *S. salar* (YOUNG et al., 2006) e *Sparus aurata* (VENOU et al., 2003). Essa modificação na estrutura do carboidrato, que pode torná-lo mais acessível à hidrólise das enzimas digestivas, também melhora a disponibilidade da matéria seca em dietas para *O. mykiss* (BERGOT & BREQUE, 1983; KAUSHIK & OLIVA-TELES, 1985).

Além da digestibilidade da dieta, a correlação com a velocidade ou taxa com que o alimento deixa o trato digestório são preponderantes para melhorar a capacidade dos peixes em digerir e absorver os nutrientes. Em peixes, a motilidade do sistema digestório está ligada aos alimentos que compõe as dietas. A retenção do bolo alimentar pelo trato digestório do animal é responsável pelo tempo que o alimento fica exposto ao processo digestivo e absorptivo do organismo, influenciando em sua eficiência (NRC, 1993).

Como a digestibilidade é um reflexo da ação das enzimas digestivas, é essencial o entendimento de seu funcionamento como uma ferramenta para prever os processos digestivos, assim como a digestibilidade de novos alimentos, pois o padrão das enzimas digestivas reflete além do hábito alimentar (herbívoro, onívoro ou carnívoro), a capacidade digestiva. A partir disso, a determinação da atividade enzimática passa ser de grande importância na aquicultura, ajudando o entendimento dos problemas relacionados à fisiologia da nutrição (MORAES et al., 2007).

A digestão é o processo através do qual o alimento é transformado no trato digestório em compostos mais simples, capaz de transpor a membrana das células intestinais, alcançando a corrente sanguínea para serem transportadas aos tecidos. As proteínas são hidrolisadas em aminoácidos livres ou cadeias polipeptídicas curtas; os carboidratos são hidrolisados em açúcares simples; e as gorduras em ácidos graxos e glicerol. Esses processos são possibilitados pela ocorrência das enzimas digestivas, atuando sobre o alimento ingerido, ao longo do trato digestório (JOBLING, 1994; DE SILVA & ANDERSON, 1995).

Neste contexto de aproveitamento de nutrientes, o trato digestório de teleósteos tem sido largamente estudado, devido às características peculiares que as diferentes espécies apresentam sob o aspecto morfofuncional. Os peixes quanto ao hábito alimentar pode ser reunido em três grupos: herbívoros, onívoros e carnívoros (KAPOOR et al, 1975).

O hábito alimentar pode variar de uma espécie para outra e dentro de uma mesma espécie, sendo dependente da natureza do alimento disponível, do local de nutrição e do estágio ontogenético. A adaptação do aparelho digestivo ao regime alimentar se manifestam mais claramente na cavidade bucal, pela sua posição, configuração, capacidade de pressão, arcada dentária. No trato gastrointestinal as adaptações são observadas na disposição, configuração, estrutura, relevo da mucosa, comprimento intestinal e pelas conformações das glândulas anexas (NACHI, 1988).

A morfologia da mucosa intestinal desempenha também um papel fundamental no processo digestivo, absorptivo e metabólico dos diferentes animais (KUPERMAN & KUZ'MINA, 1994), além de representar uma barreira seletiva que permite absorção de nutrientes e exclui muitas substâncias tóxicas e organismos patogênicos e também regula o balanço eletrolítico (BUDDINGTON et al., 1987).

O conhecimento da morfologia microscópica do fígado e do intestino de peixes de interesse comercial é de grande importância para a compreensão de alterações, sejam patológicas relacionadas a doenças infecciosas sejam elas proporcionadas pelas dietas administradas (GARGIULO et al., 1998).

## **1.6 Enzimas digestivas**

O perfil das enzimas digestivas no trato digestório, sua especificidade, a otimização de suas atividades e suas limitações adaptativas, permitem predizer, com maior exatidão, o aproveitamento de alimentos usuais e até mesmo de novas fontes de alimento (GLASS et al., 1989).

Os peixes apresentam uma capacidade específica de adaptação ao processo digestivo, tais como ajustes do perfil e da secreção enzimáticos, da absorção e do transporte de nutrientes. Essa capacidade lhes permite adequarem-se às mudanças da dieta e aperfeiçoar as estratégias alimentar, e esta habilidade varia entre as espécies (KAPOOR et al, 1975; HOFER, 1979).

É muito provável que as diferenças no desempenho dos peixes sejam, até certo grau, atribuídas às diferenças inter-específicas das características de seus tratos digestório e à

eficiência com que o alimento ingerido é capaz de ser digerido e assimilado. A habilidade dos peixes em processar os alimentos é fundamental ao seu desenvolvimento e depende de características específicas como o perfil enzimático de seu canal alimentar (FAGBENRO et al., 2000), bem como de sua capacidade adaptativa (LUNDSTEDT et al., 2004).

Existe uma correlação entre a estrutura do trato digestório e a distribuição das enzimas digestivas. O hábito alimentar está intimamente ligado ao comprimento do trato digestório, tanto que em peixes herbívoros este é maior que em carnívoros. Estas características estão ligadas ao tempo de trânsito e às conseqüentes exposições do alimento à ação das enzimas. Revelando uma correlação entre as atividades enzimáticas digestivas e o tipo de dieta (MORAES et al., 2007).

As enzimas digestivas são usualmente indutivas (HSU & WU, 1979). As maiores atividades de carboidratases deverão ser, portanto, encontradas no trato digestório de peixes herbívoros e as maiores atividades proteolíticas em carnívoros. A capacidade de adaptação dos processos digestivos nos peixes, tais como perfil e secreção enzimáticos, absorção e transporte de nutrientes, varia entre as espécies (KAPOOR et al., 1975; BUDDINGTON et al., 1997). 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., 1997).

O trato digestório dos peixes apresenta uma diferenciação funcional na maioria das espécies. A distribuição das enzimas digestivas ao longo do trato digestório dos peixes vem sendo descrita em várias espécies como, por exemplo, *S. aurata* (DEGUARA et al., 2003), *Pseudoplatystoma corruscans* (LUNDSTEDT et al., 2004), *Colossoma macropomum* (ALMEIDA et al., 2006; CORREA et al., 2007), *Rhamdia quelem* (MELO et al., 2006), *Brycon cephalus* (MORAES et al., 2005), *Piaractus mesopotamicus* (MORAES & BIDINOTTO, 2002). As atividades enzimáticas observadas no trato digestório dos peixes se deve, provavelmente à pequena massa de tecido pancreático difuso ao longo do intestino anterior e, nos adultos, às infiltrações pancreáticas do fígado (CATALDI et al. 1987).

Nos peixes, a maior parte da digestão ocorre no intestino (ROTTA, 2003), porém, tanto o estômago quanto a mucosa intestinal, o pâncreas e os cecos pilóricos são fontes de enzimas proteolíticas (PHILLIPS, 1969). Portanto, essa estrutura é muito importante no processo digestivo dos peixes, já que um grande número de enzimas como tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidases (proteolíticas), amilases, lipases e quitinases são

produzidas nestes tecidos (DE SILVA & ANDERSON, 1995). O tecido pancreático também pode estar associado ao tecido adiposo que reveste os cecos pilóricos ou disperso no mesentério (KAPOOR et al. 1975). A secreção dessas enzimas é mediada por estímulos neurais e hormonais, que geralmente provocam um aumento da secreção enzimática para a luz do trato digestório (FANGE & CHIOU, 1989).

A digestão das proteínas envolve a ação de diferentes enzimas, cada qual com sua ação específica sobre diferentes sítios de ligação peptídica resultando na formação de peptonas, proteoses e polipeptídios menores (GAUTHIER et al., 1982). A hidrólise dos polipeptídeos resultantes se faz por ação das aminopeptidases, carboxipeptidases e dipeptidases com a formação final de aminoácidos livres. Assim, os aminoácidos livres podem ser finalmente absorvidos (HALVER & HARDY, 2002). A digestão de proteínas começa pela ação da pepsina produzida no estômago, sendo completada pela ação de proteases alcalinas, como tripsina e quimiotripsina, produzidas ao longo do intestino (FANGE & CHIOU, 1989).

A digestão dos lipídios nos peixes pode ocorrer no estômago, nos cecos pilóricos e no intestino pela ação de uma variedade de lipases e colipases (SMITH, 1989). As gorduras neutras são hidrolisadas em ácidos graxos e glicerol que são absorvidos e utilizados como fonte de energia ou armazenados para fins de reserva (ALMEIDA, 2006).

A digestão de carboidratos em peixes ocorre no estômago, nos cecos pilóricos e no intestino pela hidrólise de moléculas de polissacarídeos complexas (WILSON & POE, 1985). A digestão de carboidratos é realizada por algumas enzimas, sendo a amilase a mais relevante produzindo uma variedade de oligossacarídeos e monossacarídeos como produtos da reação (LOVELL, 1989). A utilização dos carboidratos difere entre as espécies e depende principalmente da complexidade da fonte de carboidrato ingerida (YAMAMOTO et al., 2000).

Moraes et al. (2007) descrevem que o perfil enzimático digestivo dos peixes pode constituir em uma ferramenta especial no ajuste do nível de nutrientes para peixes criados em cativeiro. Considerando-se o caráter indutivo destas enzimas, a flexibilidade fenotípica da espécie pode permitir não só os ajustes necessários para otimização dos nutrientes, mas também explorar a capacidade adaptativa das espécies para fontes alternativas de energia metabólica.



### 1.7 Metabolismo intermediário em peixes

O valor nutricional de uma dieta é avaliado principalmente através de um balanço adequado entre alimentos energéticos e protéicos (PHILLIPS, 1969). Os carboidratos são essenciais para o metabolismo da grande maioria dos organismos e também a forma de energia metabólica mais imediata e de baixo custo. Porém, sua utilização pelos peixes é muito variável. Em várias espécies parecem não ter a mesma relevância apresentada no metabolismo de mamíferos, não sendo considerados a fonte preferencial de energia.

Por outro lado, a maioria das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos em mamíferos foi encontrada nos peixes, tais como as da via glicolítica, gliconeogênese, ciclo de Krebs, síntese de glicogênio, além de outras (SHIMENO, 1974; COWEY & WALTON, 1989). Dessa forma, o metabolismo de carboidratos é uma rota do fluxo energético em peixes (DABROWSKI & GUDERLEY, 2002). Contudo, o papel e a contribuição de carboidratos quanto à exigência energética das diferentes espécies de peixes, se mantêm ainda sem esclarecimento (YOUNG et al., 2006).

A glicose provinda da dieta pode ser armazenada como glicogênio hepático e muscular ou utilizada na síntese de compostos como triglicerídeos e aminoácidos não essenciais (CHAMPE & HARVEY, 1994). A glicose pode também ser utilizada como substrato para produzir energia, incorporando-a em moléculas como o ATP. A glicólise, como uma das principais vias de utilização de glicose, foi descrita também em peixes por Fideu et al. (1983), que observaram o aumento na atividade das enzimas da via glicolítica em *Onchorhynchus mykiss* alimentadas com dietas contendo altos níveis de carboidratos.

A proteína consumida pelos peixes pode ser utilizada em duas rotas metabólicas; uma via catabólica, produzindo energia para manutenção e uma via anabólica, principalmente para síntese de proteínas, onde a composição de aminoácidos da dieta é crucial (HEPHER, 1989). Como o excesso de proteína não pode ser estocado, normalmente os excedentes são direcionados para vias catabólicas e os aminoácidos, desaminados ou descarboxilados, são utilizados como fonte de energia, no lugar dos carboidratos e lipídios (DE SILVA & ANDERSON, 1995).

No geral os peixes tendem a oxidar aminoácidos mais eficientemente, e preferencialmente transformá-los em glicose. Isso ocorre porque a utilização de proteínas como energia é vantajosa para os peixes do ponto de vista nutricional, por produzirem mais energia livre com o mesmo equivalente em peso quando comparada ao catabolismo de carboidratos (LOVELL, 1989).

Segundo Halver & Hardy (2002) a facilidade dos peixes no catabolismo de proteína para fins energéticos está na possibilidade de excreção direta de amônia como produto final do metabolismo de nitrogênio. Desta forma, não ocorre gasto energético para sua eliminação na forma de um produto menos tóxico, tal como nos mamíferos. Também, a oxidação direta de aminoácidos evita o gasto energético da síntese de moléculas de estoque como glicogênio ou lipídio, para subsequente utilização. Além disso, o ambiente aquático apresenta escassez de carboidratos, e dessa forma, os sistemas digestório e metabólico dos peixes parecem estar mais bem adaptados à utilização de proteínas como recurso energético (LOVELL, 1989).

Os lipídeos são as biomoléculas com maior densidade energética para os animais e sua função principal é gerar energia metabólica na forma de ATP via  $\beta$ -oxidação; um processo mitocondrial (HALVER & HARDY, 2002). Os animais aquáticos são hábeis em metabolizar lipídios e estes são considerados a maior fonte de energia metabólica utilizada para a reprodução (HALVER & HARDY, 2002) e podem ser estocados em vários órgãos, principalmente em vísceras, fígado e músculos, correspondendo de 15 a 45% do conteúdo visceral (VAN DEN THILLART & VAN RAAJI, 1995).

### **1.8 A espécie *Piaractus mesopotamicus***

O *Piaractus mesopotamicus*, conhecido popularmente como pacu-guaçu no Sul e Sudeste do Brasil, ou por pacu no Pantanal Matogrossense (FERRAZ DE LIMA, 1988), encontra-se naturalmente distribuído na América do Sul. É uma espécie de clima tropical, encontrada nas bacias dos Rios Paraná, Paraguai e Uruguai (SAINT-PAUL, 1986). Na natureza, o pacu tem uma dieta muito diversificada, variando em função da sazonalidade e conseqüentemente, da disponibilidade de alimento. O estudo de conteúdo estomacal da espécie foi descrito por Silva (1985) que observou frutos, folhas e algumas vezes, pequenos peixes, crustáceos ou insetos, caracterizando-a como onívora, com tendência à herbivoria. Esses hábitos são convergentes com as características anatômicas da boca, de dentição molariforme especializada em cortar e moer os alimentos, e do tubo digestivo relativamente longo (GODOY, 1975). O pacu possui a habilidade de metabolizar elevados níveis de carboidratos na dieta utilizando-os como fonte de energia e tem grande capacidade para armazenar gordura, substrato utilizado para sua manutenção em longas migrações (ZAPATA, 2001).

A posição sistemática de acordo com MACHADO-ALLISON (1983):

Classe: OSTEICHTHYES;

Sub-classe: ACTINOPTERYGII;

Superordem: OSTARIOPHYSIS;

Ordem: CHARACIFORME;

Família: CHARACIDAE;

Sub-família: SERRALMINAE;

Gênero: *Piaractus*;

Espécie: *Piaractus mesopotamicus*.

No Brasil, o pacu é considerado uma das espécies com o maior potencial para o cultivo intensivo, destacando-se tanto em termos de rusticidade no manejo como pela taxa de crescimento e pela sua carne de excelente qualidade. Devido à facilidade de produção e esportividade na pesca, tornou-se bastante popular nos “pesque-pagues” (FERNANDES et al., 2000, ABIMORADI et al., 2007).

O cultivo do pacu, assim como da maior parte dos organismos aquáticos, depende principalmente de alimentos artificiais, e sua alimentação geralmente constitui a fração mais significativa nos custos operacionais das empresas de cultivo de peixes (TACON, 1989). Isso torna os estudos sobre as exigências nutricionais das espécies aquáticas indispensável ao desenvolvimento da aqüicultura.

Admite-se que espécies com hábito alimentar onívoro possam digerir e metabolizar carboidratos e lipídeos de forma eficiente para poupar proteína para o crescimento. Alguns estudos sobre as exigências nutricionais já foram realizados para o pacu. Carneiro (1983) estudando as exigências de proteína e energia para alevinos desta espécie, encontrou os melhores resultados de desempenho em peixes alimentados com 30% de proteína bruta e 3.600 kcal/kg de dieta. Fernandes et al. (2000) revelaram que a exigência de proteína para alevinos é de 26% e de juvenis de 22%. O efeito poupador de proteína pelo aumento de carboidratos em dietas foi observado para dietas com baixo nível de lipídeo com uma concentração de 22% de proteína digestível em dietas peletizadas (ABIMORADI & CARNEIRO, 2007). O pacu quando submetidos a dietas com baixo conteúdo de proteína apresentam baixo índices de crescimento independente da relação entre as fontes energéticas (carboidratos e lipídeos) indicando assim que esta espécie apresenta restrições para o efeito poupador de proteína (FERNANDES et al., 2000; ABIMORADI et al., 2007).

## 2 OBJETIVO

Avaliar as adaptações bioquímicas e metabólicas do pacu submetidos a dietas com diferentes processamentos (peletização ou extrusão), diferentes níveis de carboidratos e lipídeos.

### 2.1 Estratégias

- Caracterização das dietas experimentais;
- Determinação do tempo de trânsito gastrointestinal e dos coeficientes de digestibilidade aparente de proteína e energia;
- Determinação das respostas adaptativas enzimáticas do trato digestório;
- Avaliação do desempenho de produção e eficiência de retenção de nutrientes;
- Avaliação do perfil metabólico tissular e das enzimas chaves do metabolismo intermediário;
- Estudo dos aspectos adaptativos morfológicos do fígado e do intestino anterior.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Dietas experimentais

Foram formuladas oito dietas isoprotéicas ( $26,7 \pm 0,7\%$  de PB) contendo dois níveis de carboidratos (40 ou 50%) e dois níveis de lipídeos (4% ou 8%), quatro delas submetidas ao processo de peletização e quatro ao processo de extrusão.

O processamento de extrusão foi feito em equipamento Extrutek de rosca simples, com capacidade nominal de 10 Kg/hora. O processamento por peletização ocorreu em peletizadora modelo de laboratório (Califórnia Pellet Mill). Os pellets foram confeccionados com diâmetro entre 1,2 e 1,5 mm e comprimento entre 1,5 e 3,0 mm. Os ingredientes utilizados foram analisados quanto à composição bromatológica (A.O.A.C., 2000).

Tabela 1 - Composição bromatológica das dietas experimentais.

| Carboidratos (%)                   | 40     |        | 50     |        |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
|                                    | 4      | 8      | 4      | 8      |
| Lipídeos (%)                       |        |        |        |        |
| <b>Ingredientes (%)</b>            |        |        |        |        |
| Farinha de peixe <sup>A</sup>      | 10,4   | 10,4   | 10,4   | 10,4   |
| Farelo de soja <sup>B</sup>        | 31     | 13     | 25,5   | 11,5   |
| Soja integral tostada <sup>C</sup> | 4,7    | 22     | 7,5    | 20,8   |
| Milho                              | 26,9   | 29,9   | 25,5   | 25,0   |
| Amido de milho                     | --     | --     | 8,9    | 12,5   |
| Farelo de trigo                    | --     | 2      | 9,0    | 8      |
| Farinha de trigo                   | 6,5    | 8      | 2,6    | 2      |
| Quirera de arroz                   | 8,5    | 7      | 8,0    | 7,9    |
| Óleo de soja                       | 0,5    | 0,4    | --     | 0,9    |
| Celulose microfina <sup>D</sup>    | 10,5   | 6,3    | 1,6    | --     |
| Mistura mineral -vitamínico*       | 1      | 1      | 1      | 1      |
| <b>Composição química</b>          |        |        |        |        |
| Matéria seca                       | 89,5   | 89,5   | 88,7   | 89,7   |
| Proteína digestível**              | 22,1   | 22,1   | 21,9   | 22,2   |
| Lipídeo                            | 4,0    | 8,0    | 4,1    | 8,0    |
| Carboidratos ***                   | 40,1   | 40,0   | 50,0   | 49,2   |
| Matéria mineral                    | 5,2    | 5,4    | 5,3    | 5,0    |
| Energia digestível (kcal/kg) **    | 2828,0 | 3204,6 | 3184,4 | 3543,5 |

<sup>A</sup> – Composição em (%): 94,88 matéria seca, 28,87 cinza, 5,53 lipídeo, 53,93 proteína bruta e energia bruta 3833,0 kcal.kg<sup>-1</sup>.

<sup>B</sup> – 89,36 matéria seca, 5,17 cinza, 0,89 lipídeo, 45,99 proteína bruta e energia bruta 4392,5 kcal.kg<sup>-1</sup>. <sup>C</sup> – 94,45 matéria seca, 4,70 cinza, 22,92 lipídeo, 37,06 proteína bruta e energia bruta 5438,3 kcal.kg<sup>-1</sup>. <sup>D</sup> – celulose microfina RHOSTER Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista, SP, Brazil). Todos os ingredientes foram moídos em peneira com granulometria de 0,5mm.

\*ROVIMIX PEIXE – Roche ® Suplemento mineral e vitamínico, níveis de garantia por Kg do produto: Vitamina A 500.000 UI; Vitamina D<sub>3</sub> 200.000 UI; Vitamina E 5000 UI; Vitamina K<sub>3</sub> 15000 mg; Vitamina B<sub>1</sub> 1500 mg; Vitamina B<sub>2</sub> 4000 mg; Vitamina B<sub>6</sub> 1500 mg; Vitamina C 1500 mg; Ácido Fólico 500 mg; Ácido Pantotênico 4000 mg; Ácido Nicotínico 7000 mg; Biotina 50000 mcg; Inositol 1000 mg; Colina 40000 mg; Cobalto 10 mg; Cobre 500 mg; Ferro 5000 mg; Iodo 50 mg; Manganês 1500 mg; Selênio 10 mg; Zinco 5000 mg e Antioxidante 12500 mg.

\*\* Digestibilidade dos ingredientes para o pacu de acordo com Abimorad & Carneiro (2004).

\*\*\*carboidratos=matéria seca-(proteína bruta - lipídeo - fibra bruta - matéria mineral);

### 3.2 Caracterização das dietas experimentais

As dietas foram caracterizadas quantos aos parâmetros de controle de qualidade.

- A absorção de água foi realizada de acordo com a técnica proposta por Holay e Harper (1982). Em 40 gramas da amostra foi adicionado 200mL de água a 60°C, seguido de agitação por 10 segundos. Em seguida, a mistura foi filtrada por 30 segundos em papel-filtro. Absorção de água (%) =  $[(200 - \text{Volume filtrado}) / 40] * 100$
- A flutuabilidade foi avaliada pela imersão da ração em 1000mL de água destilada por 5 minutos e expressa de acordo com o seguinte cálculo:  $100 - (\text{número de grânulos afundados} / \text{número total de grânulos}) * 100$ .
- A estabilidade foi determinada pelo tempo máximo que a dieta mantém sua forma original imersa em água.
- A densidade da dieta foi avaliada pela razão peso: volume (para um volume de 100ml).
- A lixiviação de proteína foi realizada na água remanescente do teste de absorção de água, através da quantificação de proteína pelo método de BRADFORD et al. (1976).

### 3.3 Ensaio de digestibilidade aparente

O ensaio de digestibilidade das dietas experimentais foi realizado em um período de três semanas. As fezes foram coletadas pelo sistema de Guelph modificado, constituído de incubadoras de fibra de vidro de 80L (ABIMORAD & CARNEIRO, 2004).

Foram utilizados 180 juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) pesando  $69,6 \pm 17,9\text{g}$ , distribuídos em nove caixas de fibro-cimento com capacidade de 1000L com aeração e fluxo contínuo de água. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais acrescidas de 0,5 % de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  por um período de sete dias. Posteriormente, os exemplares foram transferidos para as incubadoras, onde se procedeu à coleta de fezes em intervalos de 30 minutos por um período de 12 horas. O material foi recolhido em tubos plásticos, congelado e as fezes foram secas em estufa com circulação de ar à 55°C, até peso constante, para posterior análise bromatológicas.

Os coeficientes de digestibilidade aparente foram determinados por método indireto usando o óxido de cromo como indicador. As dietas e as fezes foram analisadas quanto aos teores de proteína e energia (AOAC, 2000); o óxido de cromo, pelo método de digestão com ácido nítrico e ácido perclórico (FURUKAWA & TSUKAHARA, 1976), com leitura óptica de absorção atômica (EAA) em  $\lambda = 357,9 \text{ nm}$ .

Os coeficientes de digestibilidade foram calculados de acordo com a fórmula:

$$D_a = 100 - 100 * \left[ \frac{\% \text{ indicador no alimento}}{\% \text{ indicador nas fezes}} * \frac{\% \text{ nutriente nas fezes}}{\% \text{ nutriente no alimento}} \right]$$

### 3.4 Tempo de trânsito gastrointestinal (TTGI)

Este ensaio foi realizado segundo o método descrito por Storebakken (1985) sendo feito sete dias após o término do ensaio de digestibilidade. Foram produzidos dois lotes de dietas. Uma delas contendo 0,5% Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e a outra adicionadas de 0,5% TiO<sub>2</sub> (Tabela 1). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, durante 10 dias, com dietas contendo Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, após este período os peixes receberam a dieta com TiO<sub>2</sub>, durante 4 horas a cada 60 minutos, sendo fornecido um total de 10% do peso vivo.

Após 6 horas do último arraçoamento, os peixes foram transferidos para o sistema de Guelph modificado e as fezes foram coletadas a cada 60 minutos. Para quantificação dos marcadores estabeleceu-se como critério a relação branca e verde, sendo a presença de 100% de fezes com coloração branca considerada como tempo de trânsito gastrointestinal da dieta.

### 3.5 Enzimas digestivas

Para o ensaio de enzimas digestivas foi conduzido um ensaio biológico por um período de 20 dias. Foram utilizados 96 juvenis de pacu com peso de 66,80 ± 1,34g e comprimento de 13,90 ± 0,29cm. Estes foram distribuídos em oito aquários de 250L em sistema fechado, com água termostatizada sob fluxo contínuo e aeração constante. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia até a saciedade (Tabela 1).

Durante o período experimental os parâmetros da qualidade de água foram: temperatura 29 °C; oxigênio dissolvido 5,6 ± 0,42 mg/L; pH 7,4 ± 0,1 e condutividade 190,5 ± 1,5 µS.cm<sup>-1</sup>. Ao final do período experimental, 10 peixes de cada tratamento foram transferidos para um recipiente contendo benzocaína (100mg/L) por 30 segundo (INOUE et al., 2003). Os exemplares foram sacrificados por secção medular sendo aferidos peso e comprimento e coletado o trato digestório que foi subdividido em estômago, cecos pilóricos, intestino anterior e posterior.

#### 3.5.1 Preparação dos homogeneizados teciduais

Uma amostra de 100mg de tecido, das diferentes seções do trato digestório coletado, foi homogeneizada com tampão de fosfato de sódio pH 7,0 (glicerol v/v em tampão fosfato de sódio 20mM e Tris 10mM) em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. Os homogeneizados

eram centrifugados a 4°C; o estômago a 13.400 x g por 3 minutos e os cecos pilóricos, intestino anterior e posterior a 13.400 x g por 10 minutos. O sobrenadante era utilizado como fonte de enzima para determinação das atividades de protease inespecífica, tripsina, quimiotripsina, lipase, amilase e maltase.

### **3.5.2 Determinações das enzimas digestivas**

#### **3.5.2.1. Protease Inespecífica**

A atividade proteolítica total foi ensaiada através da hidrólise de caseína segundo adaptado de Walter (1984). Os valores adequados de pH para os ensaios em cada porção do trato digestório foram previamente determinados. Para o estômago utilizou-se tampão glicina-HCl 0,2 M (pH 2,0), para cecos pilóricos, intestino anterior e posterior, utilizou-se tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 9,0). A mistura de reação era composta de: tampão adequado à fração do trato (500µl), caseína 1% (500µl) como substrato e alíquota previamente ajustada do homogeneizado como fonte de enzima. Após 180 minutos (estômago) e 60 minutos (os demais tecidos) de incubação à 25°C, a reação foi interrompida com 500µl de ácido tricloroacético 20% (TCA), mantida em gelo por 30 minutos e o precipitado removido por centrifugação a 14.400 x g por 3 minutos para leitura do sobrenadante em 280nm. Uma solução de tirosina foi utilizada como padrão e a atividade específica expressa em µmol de tirosina minuto<sup>-1</sup> (U), miligrama de proteína<sup>-1</sup> (UI).

#### **3.5.2.2. Tripsina**

A atividade de tripsina foi determinada conforme Hummel (1959). O meio de reação continha: tampão TRIS 0,2M; CaCl<sub>2</sub> 0,01M pH 8,1 e 1,04mM de p-toluenosulfonil L-arginina etilester (TAME). A reação era incubada a 25°C por um minuto e acompanhada opticamente a 247nm por 1 minuto. Uma unidade de tripsina foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a hidrólise de 1µmole de arginina/minuto (U) sendo expressa por mg de proteína (UI).

#### **3.5.2.3. Quimiotripsina**

A atividade de quimiotripsina foi determinada segundo Hummel (1959). A mistura de reação continha: tampão TRIS 0,2M; CaCl<sub>2</sub> 0,01M pH 7,8 e 0,001mM de benzolil-L-tirosina etilester (BTEE) como substrato de reação. A reação era incubada a 25 °C acompanhada opticamente a 256nm por 1 minuto. Uma unidade de quimiotripsina foi



definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolizar  $1\mu\text{mol}$  tirosina  $\text{minuto}^{-1}$  (U) sendo expressa por mg de proteína (UI).

#### 3.5.2.4. *Lipase*

A atividade de lipase não-específica foi ensaiada segundo metodologia adaptada de Albro et al. (1985). A reação era incubada em meio contendo: volume adequado de homogeneizado;  $0,4\text{mM}$  de p-nitrofenil miristato em solução tampão  $24\text{mM}$  de bicarbonato de amônio pH 7,8 e  $0,5\%$  Triton X-100. Após trinta minutos, as reações eram interrompidas pela adição de NaOH  $25\text{mM}$ . A densidade óptica era então registrada a  $405\text{nm}$ . Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolizar  $1\mu\text{mol}$  de substrato  $\text{minuto}^{-1}$  (U) e expressa por mg de proteína (UI).

#### 3.5.2.5. *Amilase*

A atividade amilohidrolítica foi ensaiada segundo o método proposto por Bernfeld (1955) modificado. A mistura de reação continha:  $1,0\text{ ml}$  de solução de amido  $5\%$ ; tampão citrato/fosfato  $0,2\text{M}$  (pH 7,0);  $0,5\text{ ml}$  de solução de NaCl  $0,5\%$  como cofator enzimático e uma alíquota adequada de homogeneizado celular. A reação era incubada a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e interrompida com  $1,0\text{ ml}$  de solução  $5\%$   $\text{ZnSO}_4 : \text{Ba}(\text{OH})_2$   $0,3\text{N}$ . Posteriormente, a mistura de reação era centrifugada a  $11.000 \times g$  por 3 minutos e no sobrenadante determinada a concentração de glicose livre pelo método colorimétrico de Park & Johnson (1949) em  $\lambda=690\text{ nm}$ . Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir  $1\mu\text{mol}$  de açúcar redutor  $\text{minuto}^{-1}$  (U) e expressa em U por mg de proteína (UI).

#### 3.5.2.6. *Maltase*

A atividade de maltase foi determinada em um meio de reação contendo:  $0,5\text{ ml}$  de tampão  $0,2\text{M}$  citrato fosfato (pH 7,0); volume adequado de homogeneizado celular e  $0,5\text{ml}$  de maltose  $5\%$ . As amostras foram ensaiadas em duplicata com dois brancos; um sem extrato enzimático (BE) e outro sem substrato (BS). Após a incubação por 60 minutos à temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , a reação era interrompida com  $0,1\text{ml}$  de ácido perclórico (PCA)  $0,6\text{N}$  e em seguida  $0,1\text{ml}$  de  $\text{KHCO}_3$   $0,6\text{N}$  para neutralização. No sobrenadante, resultante da centrifugação a  $14.400 \times g$  por 5 min, era determinada a concentração de glicose livre pelo método da glicose oxidase. Dez microlitros de cada sobrenadante eram colocados em duplicata nos poços de uma micro-placa e adicionados de  $200\mu\text{l}$  do reagente utilizado no método enzimático da

glicose oxidase (glicose GOD\_ANA da Labtest). As placas eram lidas em 405nm utilizando um leitor de micro-placas (Termomax<sup>®</sup>, Molecular devices). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de maltose  $\text{minuto}^{-1}$  (U) e expressa por  $\text{mg}$  de proteína (UI).

### 3.6 Ensaio de crescimento

Foram utilizados 240 alevinos de pacu com peso de  $1,17 \pm 0,05\text{g}$ . Os peixes foram distribuídos em 24 aquários de 150L em sistema com abastecimento contínuo de água e aeração constante através de compressor radial, com renovação de 20 vezes por dia. A temperatura ( $29^{\circ}\text{C}$ ) e o oxigênio dissolvido ( $5,6 \pm 0,42 \text{ mg.l}^{-1}$ ) foram monitorados diariamente; o pH ( $7,4 \pm 0,1$ ), a alcalinidade ( $5,6 \pm 0,42 \text{ mg.l}^{-1}$ ) e a condutividade ( $190,5 \pm 1,5 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ) semanalmente.

O ensaio foi conduzido por 90 dias, durante o qual os peixes foram alimentados três vezes ao dia até a saciedade. A cada 30 dias procedeu-se à biometria (peso e comprimento total) e ao final do período experimental foram avaliadas a sobrevivência e coletados os exemplares para as demais análises. Foram coletados nove exemplares de cada tratamento para a composição corporal e eficiência de retenção de nutrientes, nove exemplares para as análises de perfil cromatográfico do filé, nove exemplares para as análises de perfil metabólico e enzimas metabólicas e três exemplares para avaliação histológica.

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

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

### 3.7 Eficiência de retenção de nutrientes

No início do ensaio de crescimento foram abatidos dez alevinos que não pertenciam aos tratamentos. Ao final do ensaio de crescimento, após jejum de 48 horas, foram amostrados nove exemplares de cada tratamento. Todos os peixes foram congelados e

moídos, e o material foi seco a 105°C por 16 horas para análise bromatológica (A.O.A.C., 2000).

A avaliação da eficiência de utilização de nutrientes e de energia das dietas foi realizada para cada parcela, a partir das seguintes fórmulas:

- Eficiência de retenção de proteína bruta ( $ER_{PB}$ ) =  $(PB_{FC} \times P_F) - (PB_{ic} \times P_I) \times 100 / C_{PB}$
- Eficiência de retenção de lipídeo ( $ER_{EE}$ ) =  $(EE_{FC} \times P_F) - (EE_{ic} \times P_I) \times 100 / C_{EE}$
- Eficiência de retenção de energia bruta ( $ER_{EB}$ ) =  $(EB_{FC} \times P_F) - (EB_{IC} \times P_I) \times 100 / C_{EB}$
- Proteína bruta no ganho em peso ( $PB_{GP}$ ) =  $(PB_{FC} \times P_F) - (PB_{IC} \times P_I) \times 100 / (P_F - P_I)$
- Lipídeo no ganho em peso ( $EE_{GP}$ ) =  $(EE_{FC} \times P_F) - (EE_{IC} \times P_I) \times 100 / (P_F - P_I)$
- Energia bruta no ganho em peso ( $EB_{GP}$ ) =  $(EB_{FC} \times P_F) - (EB_{IC} \times P_I) \times 100 / (P_F - P_I)$

Em que:  $PB_{FC}$ ,  $EB_{FC}$ ,  $EE_{FC}$ : nível de proteína bruta, energia bruta e lipídeo final na carcaça;  $PB_{IC}$ ,  $EB_{IC}$ ,  $EE_{IC}$ : nível de proteína bruta, energia bruta e lipídeo inicial na carcaça;  $C_{PB}$ ,  $C_{EE}$ ,  $C_{EB}$ : consumo de proteína bruta, lipídeo e de energia bruta.  $P_I$ ,  $P_F$ : peso vivo inicial e peso vivo final.

### 3.8 Análise do perfil cromatográfico das dietas e do filé do pacu

Ao final do ensaio de crescimento, após jejum de 48 horas, foram amostrados nove exemplares de cada tratamento, seguido de retirada do filé. Os filés de pacu foram moídos e liofilizados (Savant Modulate - Freezer Dryer) para determinação de lipídeos totais (LT) (Bligh & Dyer, 1959). A transesterificação dos lipídios dos filés foi obtida por processo de metilação (5509 da ISO, 1978).

Os ácidos graxos (AG) foram determinados através de cromatografia de gás (Shimadzu, modelo GC – 14B), com detector de ionização de chama e coluna capilar de polietilenoglicol com dimensões de 30m × 0,25mm, 0,25µm (Omegawax 250). O volume de injeção da amostra foi 0,5µL. O aquecimento da coluna seguiu a programação: 100°C por 2 minutos, com rampa de 4°C/min até 240°C. As temperaturas do injetor e detector foram de 250°C e 280°C, respectivamente. As curvas analíticas de calibração foram obtidas com solução-padrão mista de ésteres metílicos dos ácidos graxos investigados (SUPELCO, 37 components FAME mix). A quantificação dos AG foi realizada após a identificação dos picos obtidos através de comparação entre os tempos de retenção das amostras e os padrões.

Tabela 2 - Perfil dos ácidos graxos das dietas experimentais.

| Carboidratos (%)              | 40    |       | 50    |       |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                               | 4     | 8     | 4     | 8     |
| Lipídeo (%)                   |       |       |       |       |
| Somatória de ácidos graxos n3 | 5,10  | 7,10  | 4,36  | 4,12  |
| Somatória de ácidos graxos n6 | 44,06 | 51,33 | 44,05 | 45,48 |
| Ácidos graxos saturados       | 43,97 | 37,33 | 49,18 | 48,47 |
| Ácidos graxos monosaturados   | 6,46  | 4,09  | 2,23  | 1,94  |
| Ácidos graxos poliinsaturados | 49,50 | 58,58 | 48,60 | 49,60 |
| Ácidos graxos insaturados     | 55,95 | 62,68 | 50,83 | 51,53 |
| n3/n6                         | 0,12  | 0,14  | 0,10  | 0,09  |

### 3.9 Intermediários metabólicos

Decorrido o ensaio biológico, três peixes de cada unidade experimental, um total de nove peixes por tratamento, foram coletados para análise dos intermediários metabólicos e das enzimas metabólicas. Os peixes foram puncionados na veia caudal para retirada de amostras de sangue, o qual foi centrifugado a 6000 x g por três minutos para separação de plasma. Em seguida, os peixes foram sacrificados por secção medular para retirada do músculo branco e fígado. As amostras de plasma, músculo branco e fígado foram congelados em nitrogênio líquido e conservados a -20°C.

Nas amostras de plasma foram analisados: açúcares redutores totais, piruvato, lactato, proteína, aminoácidos livres, amônia e triglicerídeos. Em uma fração adequada de fígado e músculo foram analisados os açúcares totais, piruvato, lactato, proteína, aminoácidos livres, amônia, triglicerídeos e ácidos graxos livres. Os tecidos eram devidamente homogeneizados de acordo com o protocolo analítico a ser utilizado.

#### 3.9.1 Preparação dos extratos

- *Extratos ácidos*

Alíquotas de plasma, fígado e músculo branco foram diluídas em TCA 20%, na proporção 1/10. Os tecidos (fígado e músculo branco) foram homogeneizados em homogeneizador mecânico tipo Potter Elvehjem com três "strokes" de 30 segundos a 1.000 rpm, sob banho de gelo. Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 13.400 x g por três minutos. Os sobrenadantes foram utilizados como extratos para quantificação de açúcares redutores totais, piruvato, lactato e amônia.

- *Extratos neutros*

Alíquotas de fígado e músculo branco foram diluídas em água destilada, na proporção 1/10. Os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador mecânico tipo Potter Elvehjem com três "strokes" de 30 segundos a 1.000 rpm, sob banho de gelo. Após a

homogenização, os extratos foram centrifugados a 13.400 x g por três minutos. Os sobrenadantes foram utilizados como extratos para quantificação de aminoácidos livres, proteína, glicose, triglicerídeos e ácidos graxos livres.

### **3.9.2 Determinações dos intermediários metabólicos**

#### **3.9.2.1 Açúcares redutores totais**

A determinação de açúcares totais foi baseada no método hidrolítico ácido de Dubois et al. (1956). O procedimento constituía no emprego de um volume adequado de extrato adicionado a 500µL de fenol 4,1% e 2,5mL de ácido sulfúrico concentrado, rapidamente adicionado ao meio de reação. Os tubos de reação eram imediatamente resfriados em banho de água e a leitura óptica realizada em 480nm. A concentração de glicose foi estimada contra um padrão de glicose contendo 100nmols.

#### **3.9.2.2 Glicogênio**

A extração do glicogênio tecidual foi realizada segundo Bidinotto et al. (1997). Esse método consiste na separação alcoólica do glicogênio seguida pela determinação direta de açúcares redutores totais (DUBOIS, 1956). Foram utilizados para as análises 50 mg de fígado e 100 mg de músculo branco. No método da separação alcoólica, utilizou-se como reagentes; hidróxido de potássio (KOH 6 N), álcool etílico e sulfato de potássio 10 % (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), enquanto que na determinação de açúcares redutores totais (DUBOIS et al., 1956) utilizou-se fenol 4,1 % e ácido sulfúrico concentrado. A leitura óptica foi realizada em espectrofotômetro “Hach DR/2010” em um comprimento de onda de 480 nm, contra um padrão de glicose que continha 100 nmols. O conteúdo de glicogênio foi expresso em µmols de glicosil-glicose/g de tecido.

#### **3.9.2.3 Piruvato**

O piruvato foi determinado segundo Lu (1939), pela reação da dinitrofenilhidrazina. O homogeneizado ácido era diluído em 500 µl de água destilada. À mistura eram adicionados 250 µl de dinitrofenilhidrazina que permanecia em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, 3 ml de NaOH (1,3 N) eram adicionados à reação. A leitura óptica foi realizada em 440 nm. A concentração de piruvato foi estimada utilizando-se um padrão de piruvato contendo 100 nmols.

#### 3.9.2.4 *Lactato*

O lactato foi determinado segundo o método de Harrower & Brown (1972). Um volume adequado de extrato ácido era adicionado a 20µL de CuSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 4% e 3,5mL de ácido sulfúrico concentrado era lentamente adicionado pelas paredes do tubo. A amostra era agitada e posteriormente fervida por cinco minutos. Após a fervura, os tubos eram totalmente resfriados em banho de gelo para então se adicionar 80µL de p-fenilfenol (1,5 g de p-fenilfenol em solução aquosa de NaOH 2%). Após a adição, a amostra era agitada em vortex e mantida em repouso por uma hora. Os tubos eram então fervidos por 90 segundos e imediatamente resfriados em banho de água. A leitura óptica era realizada em 570nm. As concentrações de lactato foram estimadas contra um padrão de lactato contendo 20 nmols.

#### 3.9.2.5 *Proteínas totais*

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

#### 3.9.2.6 *Aminoácidos livres*

O teor de aminoácidos livres foi determinado segundo Copley (1941). Uma alíquota de plasma total, bem como dos extratos neutros, era adicionada a 2,0 ml de solução de ninhidrina 0,1% em propanol. Os tubos de reação eram vedados e então, colocados em banho-maria a 40 °C por 40 minutos. A leitura óptica foi realizada em 570nm. As concentrações de aminoácidos livres foram estimadas contra um padrão de ácido α-aminoacético 1mM.

#### 3.9.2.7 *Amônia*

A amônia foi determinada pelo método de nesslerização (GENTZKOW & MASEN, 1942) um volume adequado de extrato ácido era transferido para um tubo com água destilada em um volume final de 2,0 ml e adicionado 0,5 ml de reativo de Nessler. A leitura

óptica era realizada em 420 nm. As concentrações de amônia foram estimadas contra um padrão de amônia contendo 100 nmols de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

#### 3.9.2.8 Triglicerídeos

A análise de triglicerídeos foi realizada utilizando-se o Kit Labtest para Triglicerídeos Liquiform, que se baseia em método colorimétrico-enzimático (TRINDER, 1969). O procedimento consistia na mistura de 10 $\mu\text{l}$  de plasma ou de extrato hepático ou muscular, diluídos previamente em água (plasma 1:200, fígado 1:20 e músculo branco 1:10), com o reativo do Kit Labtest para triglicerídeos. Após essa mistura ter sido incubada à 37 °C por 10 minutos, a leitura das amostras era realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices) com filtro de 525 nm contra uma curva padrão com alíquotas de concentração conhecida de triglicerídeos (0, 25, 50, 100 e 200 mg/dl).

#### 3.9.2.9 Ácidos graxos livres

As determinações das concentrações de AGL foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Norvák (1965). Adicionava-se 1,0 ml de solução Dole (heptana, álcool isopropílico e ácido sulfúrico na proporção de 1:4:0,1) a uma alíquota adequada de plasma, ou de fígado ou de músculo branco e agitava-se por 2 minutos. Posteriormente, adicionava-se 1,0 ml de heptano e 2,0 ml de água destilada, agitando-se novamente por inversão. Uma amostra equivalente a 600  $\mu\text{l}$  da fase superior era retirada e adicionada a uma mistura de clorofórmio e heptano (5:1 v/v) e 1,0 ml de reagente de cobalto. O reagente de cobalto era constituído por 1,32 volumes de trietanolamina + 10 volumes de solução A + 7 volumes de solução B. A solução A era composta por uma solução saturada de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 6 g  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  mais 0,8 ml de ácido acético glacial em água fervente e a solução B era constituída de uma solução saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Na seqüência, as amostras eram fortemente agitadas por 30 segundos e centrifugadas por 2 minutos a 3.000 x g. Desta mistura, retirava-se uma alíquota de 600  $\mu\text{l}$  à qual se adicionava 600  $\mu\text{l}$  de solução indicadora, constituída de 0,4% de  $\alpha$ -nitroso  $\beta$ -naftol em etanol, diluída 12,5 vezes. A leitura óptica era realizada em 500 nm. As concentrações de AGL foram estimadas contra um padrão de ácido palmítico contendo 50nmols.

### 3.10 Determinação das enzimas metabólicas

A análise da atividade das enzimas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, glutamato desidrogenase, lactato desidrogenase e malato desidrogenase foi realizada no fígado.

#### 3.10.1 Preparação dos homogeneizados para as enzimas metabólicas

Amostras de fígado de 100 mg eram homogeneizadas com tampão fosfato de sódio (glicerol v/v em tampão fosfato de sódio 20mM e Tris 10mM - pH 7,0) em homogenizador tipo Potter-Elvehjem. Posteriormente, esta amostra era centrifugada a 4°C por três minutos a 600 x g e o sobrenadante era submetido a uma nova centrifugação por oito minutos a 6000 x g. O sobrenadante era utilizado para os ensaios enzimáticos da alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, glutamato desidrogenase, lactato desidrogenase e malato desidrogenase.

#### 3.10.2 Determinações das enzimas metabólicas

##### 3.10.2.1 Alanina aminotransferase

A atividade da alanina aminotransferase (ALAT) foi determinada por uma modificação do método de Reitman & Frankel (1957). O princípio de reação da ALAT baseia-se na determinação colorimétrica de piruvato resultante da conversão da alanina por transaminação. A mistura de reação continha: 280 µl de alanina (400mM); 30 µl de α-cetoglutarato (210mM); 50 µl de piridoxal fosfato HCl (2,5mM); 5 µl de arsenato (20mM); 35 µl de tampão fosfato de sódio pH 7,5 (200mM) e 100 µl de homogeneizado celular. Os tubos eram incubados por 30 minutos em banho-maria a 37 °C, após o que, a reação era bloqueada pela adição de 125 µl de dinitrofenilhidrazina 0,1 % (em HCL 2,0 N). O tubo branco de reação passava pelo mesmo procedimento, porém o homogeneizado era adicionado após a dinitrofenilhidrazina. O tubo padrão era incubado apenas excluindo-se o coquetel. Após a adição de dinitrofenilhidrazina, os tubos eram resfriados em gelo e centrifugados a 12.000 x g por 3 minutos. Uma alíquota adequada de sobrenadante era transferida para tubo de ensaio contendo 3,0 ml de NaOH 1,3N. A leitura óptica era realizada em 440nm contra um branco de NaOH 1,3N. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato de sódio 200mM pH 7,5, tendo o pH corrigido após a diluição. Utilizou-se como padrão uma solução de piruvato de sódio contendo 100 nmols. Uma unidade de ALAT (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar 1 nmol de piruvato minuto<sup>-1</sup>, e foi expressa em U·mg proteína<sup>-1</sup> (UI).



### 3.10.2.2 *Aspartato aminotransferase*

A atividade da aspartato aminotransferase (ASAT) foi determinada por uma modificação do método de Reitman & Frankel (1957). O princípio da reação da ASAT baseia-se na determinação colorimétrica de oxaloacetato resultante da conversão do aspartato por transaminação. A mistura de reação continha: 280  $\mu$ l de aspartato (80mM); 50  $\mu$ l de  $\alpha$ -cetoglutarato (210mM); 100  $\mu$ l de piridoxal hidrocloreto (2,5mM); 5  $\mu$ l de arsenato (20mM); 35  $\mu$ l de tampão fosfato de sódio pH 7,5 (200mM) e 100  $\mu$ l de homogeneizado celular. Os tubos eram incubados por 30 minutos em banho-maria a 37 °C, após o que, a reação era bloqueada pela adição de 125  $\mu$ l de dinitrofenilhidrazina 0,1% (em HCL 2,0N). O tubo branco de reação passava pelo mesmo procedimento, porém o homogeneizado era adicionado após a dinitrofenilhidrazina. O tubo padrão era incubado apenas excluindo-se o coquetel. Após a adição de dinitrofenilhidrazina, os tubos eram resfriados em gelo e centrifugados a 21.000 x g por 3 minutos. Uma alíquota adequada de sobrenadante era transferida para tubo de ensaio contendo 3,0 ml de NaOH 1,3N. A leitura óptica era realizada em 440nm contra um branco de NaOH 1,3N. Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato de sódio 200mM pH 7,5, tendo o pH corrigido após a diluição. Utilizou-se como padrão uma solução de oxaloacetato de sódio contendo 100 nmols. Uma unidade de ASAT (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar 1 nmol de oxaloacetato minuto<sup>-1</sup>, e foi expressa em U·mg proteína<sup>-1</sup> (UI).

### 3.10.2.3 *Glutamato desidrogenase*

A atividade da glutamato desidrogenase (GDH) foi determinada segundo Hochachka et al. (1978) adaptado. O princípio de reação baseia-se na redução do  $\alpha$ -cetoglutarato em glutamato acompanhado pela extinção em paralelo do NADH. O consumo de NADH por ação da GDH era monitorado em 340nm durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos em espectrofotômetro Beckman DU<sup>®</sup>520, em um meio de reação contendo em um volume final de 2 ml: tampão imidazol pH 7,0 50mM; NADH 0,1mM; ADP 1mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 5mM, acetato de amônio 250mM e volume adequado de homogeneizado celular. Uma unidade de GDH (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu$ mol de NADH minuto<sup>-1</sup>. A atividade de GDH foi expressa em mU· mg proteína<sup>-1</sup> (mUI).

### 3.10.2.4 *Lactato desidrogenase (LDH)*

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada segundo Hochachka et al. (1978) adaptado. O princípio da reação baseia-se na redução do piruvato em lactato

acompanhado paralelamente pela oxidação do NADH. O consumo de NADH por ação da LDH era monitorado em 340nm durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos, em um meio contendo em um volume final de 2,0ml: de ácido pirúvico 5mM; NADH 0,1mM e 1,7 ml de tampão Tris 25mM pH 7,5 e volume adequado de homogeneizado celular como fonte de enzima. Uma unidade de LDH (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu$ mol de NADH  $\text{minuto}^{-1}$ . A atividade de LDH foi expressa em  $\text{mU} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$  (mUI).

#### 3.10.2.5 Malato desidrogenase (MDH)

A atividade da malato desidrogenase (GDH) foi determinada segundo Hochachka et al. (1978) adaptado. O princípio da reação baseia-se na redução do oxalacetato em malato acompanhado através da oxidação do NADH. A oxidação do NADH pela MDH foi monitorada em 340nm durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos em espectrofotômetro Beckman DU<sup>®</sup>520, em um meio de reação contendo em um volume final de 2,0ml: 50mM de tampão imidazol pH 7,0; 0,2mM de NADH; 0,33mM oxaloacetato e volume adequado de homogeneizado celular como fonte de enzima. Uma unidade de MDH (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu$ mol de NADH  $\text{minuto}^{-1}$ . A atividade de MDH foi expressa em  $\text{mU} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$  (mUI).

### 3.11 Análises Histológicas

Após o ensaio de crescimento, três pacus de cada tratamento foram utilizados para as análises histológicas do fígado e do intestino anterior. Os órgãos foram retirados e imersos em solução de Bouin por 24 horas e posteriormente lavado em álcool 70%. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina com polímero plástico Histosec<sup>®</sup> (Merck). A seguir, realizou-se a microtomia para obtenção de cortes de 2 a 5  $\mu$ m de espessura, que foram corados com Hematoxilina-Eosina e pelo método histoquímico de PAS-H. As análises microscópicas e a documentação do material foram realizadas em fotomicroscópio Olympus BX41.

#### 3.11.1 Histologia do fígado

No fígado foram mensurados: porcentagem de hepatócitos com núcleo picnótico, área do hepatócito e área do núcleo picnótico, área do hepatócito e área do núcleo normal.

#### 3.11.2. Histologia do intestino anterior

Foram mensurados no intestino anterior: quantidade relativa de células caliciformes, espessura da parede.

### 3.12 Análises Estatísticas

Os resultados de crescimento, eficiência de retenção de nutrientes, perfil de ácidos graxos do filé, digestibilidade aparente e tempo de trânsito gastrointestinal foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com oito tratamentos em esquema fatorial 2x2x2, constituído de dois níveis de carboidratos (40 e 50% CHO), dois níveis de lipídeo (4 e 8% EE) e dois processamentos das dietas (peletização ou extrusão) com três repetições.

No estudo de TTGI também foi realizada a análise de regressão, em um esquema de parcela subdividida, tendo como tratamento principal as oito dietas (P40/4, P40/8, P50/4, P50/8, E40/4, E40/8, E50/4, E50/8) e como tratamento secundário as horas em que se procederam às coletas de fezes (6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 horas), com três repetições.

Os resultados de intermediários metabólicos, enzimas metabólicas e enzimas digestivas estão apresentados em média  $\pm$  desvio padrão (n=9 peixes). Foram realizadas as comparações entre aumento de carboidratos em dietas com baixo nível (4%) e alto nível (8%) de lipídeo nas dietas peletizadas e nas dietas extrusadas, tendo, portanto as comparações: P40/4 e P50/4; E40/4 e E50/4, P40/8 e P50/8; E40/8 e E50/8. Os dados foram analisados de acordo com teste paramétrico ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, admitindo-se  $P < 0,05$  como nível de significância.

Nos resultados de histomorfometria do fígado e do intestino anterior foram realizadas as comparações entre aumento de carboidratos em dietas com baixo e as dietas com alto nível de lipídeo, nas dietas peletizadas e nas dietas extrusadas. Também foram contrastados os processamentos (peletização ou extrusão) frente à variação de carboidratos e lipídeos das dietas. Os dados foram analisados de acordo com teste paramétrico ANOVA, seguido de um pós-teste de Tukey, admitindo-se  $P < 0,05$  como nível de significância.

O programa estatístico utilizado para as comparações das médias foi o Statistical Analysis System (SAS Intitule Inc., version 6.12, 1999).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das dietas experimentais

Os parâmetros de caracterização das dietas apresentaram alterações em função das variações de carboidratos, lipídeos e processamentos da dieta. O aumento de lipídeos diminuiu a lixiviação de proteína (LP) e a fluutuabilidade da dieta (FD). O processo de extrusão aumentou os valores de absorção de água (AA) e FD. Houve interação entre os três fatores estudados para a LP e densidade da dieta (DD). A interação entre nível de carboidratos e o processamento afetaram a LP e a DD ( $P < 0,01$ ). A interação entre níveis de lipídeos e o processamento afetou a DD ( $P < 0,01$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização das dietas peletizadas e extrusadas

| Níveis na dieta (%)                      |          |                | Caracterização da dieta   |                            |                      |                          |
|--|----------|----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------|
| Carboidratos                             | Lipídeos | Processamentos | LP<br>(mg/dl)             | AA<br>(g/kg)               | DD<br>(g/ml)         | FD<br>(g/kg)             |
| <i>Efeito das médias</i>                 |          |                |                           |                            |                      |                          |
| 40                                       |          |                | 0,28 ± 0,026              | 282,60 ± 88,9              | 0,107 ± 0,03         | 46,67 ± 5,4              |
| 50                                       |          |                | 0,17 ± 0,010              | 282,57 ± 94,0              | 0,113 ± 0,02         | 48,33 ± 5,3              |
|  | 4        |                | 0,28 ± 0,025 <sup>A</sup> | 291,67 ± 106,7             | 0,106 ± 0,03         | 50,00 ± 0,2 <sup>A</sup> |
|  | 8        |                | 0,02 ± 0,011 <sup>B</sup> | 273,51 ± 71,6              | 0,115 ± 0,01         | 45,00 ± 0,4 <sup>B</sup> |
|  |          | Peletização    | 0,01 ± 0,011              | 206,54 ± 9,2 <sup>B</sup>  | 0,127 ± 0,01         | 0,83 ± 2,9 <sup>B</sup>  |
|  |          | Extrusão       | 0,03 ± 0,024              | 358,63 ± 35,3 <sup>A</sup> | 0,090 ± 0,02         | 94,16 ± 2,7 <sup>A</sup> |
| <i>Valor de F (ANOVA)</i>                |          |                |                           |                            |                      |                          |
| Níveis de carboidratos                   |          |                | 5,01 <sup>**</sup>        | < 0,01                     | 13,79 <sup>**</sup>  | 0,57                     |
| Níveis de lipídeos                       |          |                | 4,72 <sup>*</sup>         | 0,99                       | 35,76 <sup>**</sup>  | 5,14 <sup>*</sup>        |
| Processamento                            |          |                | 7,79 <sup>*</sup>         | 69,71 <sup>**</sup>        | 466,31 <sup>**</sup> | 1792,00 <sup>**</sup>    |
| Carboidratos x Lipídeos                  |          |                | 0,08                      | 0,56                       | 2,59                 | 0,57                     |
| Carboidratos x Processamentos            |          |                | 22,89 <sup>**</sup>       | < 0,01                     | 8,54 <sup>*</sup>    | < 0,01                   |
| Lipídeos x Processamentos                |          |                | 2,11                      | 2,93                       | 79,57 <sup>**</sup>  | 2,29                     |
| Carboidratos x Lipídeos x Processamentos |          |                | 5,15 <sup>*</sup>         | 1,55                       | 14,77 <sup>**</sup>  | 2,29                     |

Valores expressos em média ± DP e n=3 amostras; Letras maiúsculas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; \*\*( $P < 0,01$ ); \*( $P < 0,05$ ); ns (não significativo). Lixiviação de proteína (LP); absorção de água (AA); densidade de dieta (SWD); fluutuabilidade da dieta (FD).

Em comparação com a peletização, o processo de extrusão diminuiu a LP e a DD. O aumento de carboidratos nas dietas extrusadas diminuiu a LP e aumentou a DD. Todavia, o

aumento de lipídeos aumentou a DD. Nas dietas peletizadas, o aumento de carboidratos e o aumento de lipídeos não alteraram as variáveis de caracterização das dietas (Tabela 4).

Tabela 4 - Interação dos nutrientes e processamentos.

| Processamentos                        | Níveis de carboidratos (%)  |                             | Lipídeos (%)               |                            |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                                       | 40                          | 50                          | 4                          | 8                          |
| <i>Densidade da dieta (g/ml)</i>      |                             |                             |                            |                            |
| Peletização                           | 0,126 ± 0,01 <sup>Aa</sup>  | 0,127 ± 0,01 <sup>Aa</sup>  | 0,129 ± 0,01 <sup>Aa</sup> | 0,125 ± 0,01 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão                              | 0,088 ± 0,02 <sup>Bb</sup>  | 0,099 ± 0,01 <sup>Ba</sup>  | 0,082 ± 0,01 <sup>Bb</sup> | 0,105 ± 0,01 <sup>Ba</sup> |
| <i>Lixiviação de proteína (mg/dl)</i> |                             |                             |                            |                            |
| Peletização                           | 0,009 ± 0,007 <sup>Ba</sup> | 0,022 ± 0,006 <sup>Aa</sup> | -                          | -                          |
| Extrusão                              | 0,047 ± 0,020 <sup>Aa</sup> | 0,012 ± 0,010 <sup>Ab</sup> | -                          | -                          |

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula comparação na coluna, minúsculas comparação na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.2 Digestibilidade aparente e tempo de trânsito gastrointestinal das dietas

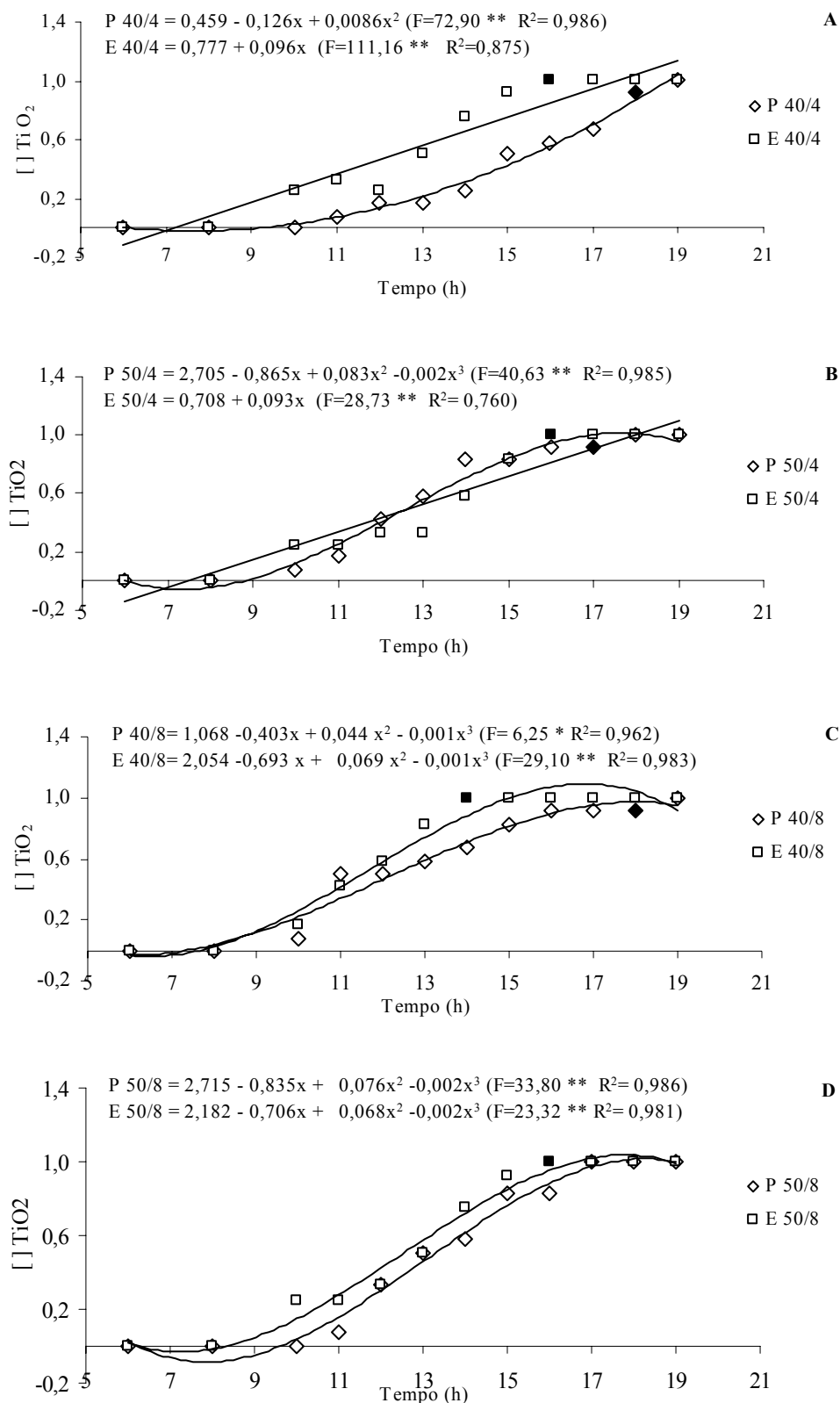
As análises de variância demonstrou que os coeficientes de digestibilidade foram influenciados por todos os parâmetros estudados. Foi revelada interação entre nível de carboidratos e nível de lipídeos ( $P < 0,01$ ) para o coeficiente de digestibilidade da matéria seca (CDMS) e coeficiente de digestibilidade da energia bruta (CDEB). A interação entre níveis de carboidratos e processamentos da dieta ( $P < 0,01$ ) e entre os níveis de lipídeos e processamentos da dieta ( $P < 0,01$ ) foram obtidos nos CDMS, coeficiente de digestibilidade da proteína bruta (CDPB) e CDEB (Tabela 5).

Tabela 5 - Digestibilidade aparente e tempo de trânsito gastrointestinal de pacu.

| Níveis na dieta (%)                      |          | Processamentos | Coeficientes de digestibilidade (%) |                    |                    | TTGI (h)               |
|--|----------|----------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| Carboidratos                             | Lipídeos |                | CD MS                               | CD PB              | CD EB              |                        |
| Efeito das médias                        |          |                |                                     |                    |                    |                        |
| 40                                       |          |                | 80,59±1,7                           | 88,57±1,7          | 83,31±3,1          | 16,08±1,0              |
| 50                                       |          |                | 83,65±2,8                           | 89,79±2,5          | 86,31±3,3          | 15,66±0,8              |
|  | 4        |                | 82,82±1,5                           | 89,93±1,3          | 84,66±2,6          | 16,16±0,9              |
|  | 8        |                | 81,43±2,9                           | 88,43±2,9          | 85,2±3,9           | 15,58±1,0              |
|  |          | Peletização    | 83,68±2,0                           | 89,39±2,4          | 86,53±3,3          | 16,50±1,0 <sup>A</sup> |
|  |          | Extrusão       | 80,77±2,5                           | 88,96±1,8          | 83,33±3,2          | 15,25±0,1 <sup>B</sup> |
| <i>Valor de F (ANOVA)</i>                |          |                |                                     |                    |                    |                        |
| Níveis de carboidratos                   |          |                | 72,17 **                            | 12,89 **           | 75,28 **           | 0,54 <sup>ns</sup>     |
| Níveis de lipídeos                       |          |                | 14,68 **                            | 19,60 **           | 2,82 <sup>ns</sup> | 1,06 <sup>ns</sup>     |
| Processamentos                           |          |                | 74,39 **                            | 1,62 <sup>ns</sup> | 101,11 **          | 4,89 *                 |
| Carboidratos x Lipídeos                  |          |                | 94,26 **                            | 0,76 <sup>ns</sup> | 208,42 **          | 2,63 <sup>ns</sup>     |
| Carboidratos x Processamentos            |          |                | 44,68 **                            | 6,97 *             | 132,65 **          | 2,63 <sup>ns</sup>     |
| Lipídeos x Processamentos                |          |                | 103,66 **                           | 32,17 **           | 146,26 **          | 0,02 <sup>ns</sup>     |
| Carboidratos x Lipídeos x Processamentos |          |                | 125,13 **                           | 59,14 **           | 122,35 **          | 1,76 <sup>ns</sup>     |

Valores expressos em médias  $\pm$  DP de n = 30 peixes. Letras maiúsculas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. \*\* (P < 0,01); \* (P < 0,05); <sup>ns</sup> (não significativo). CDMS - coeficiente de digestibilidade da matéria seca; CDPB - coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDEB - coeficiente de digestibilidade da energia bruta; TTGI - tempo de trânsito gastrointestinal.

O tempo de trânsito gastrointestinal (TTGI) apresentou diferença apenas em relação ao processamento da dieta, sendo que as dietas extrusadas apresentaram média inferior às das dietas peletizadas (Tabela 5). Nas dietas extrusadas 40/4 e 50/4 o TTGI ajustou-se à equação linear. Na dieta peletizada 40/4, o TTGI ajustou-se à equação quadrática e, na dieta 50/4 à equação cúbica. A inclusão de 8% de lipídeos, em quaisquer dietas, não influenciou o ajuste da equação (Figura 1).



**Figura 1-** Regressão das médias do tempo de trânsito gastrointestinal do pacu submetidos a dietas (peletizadas ou extrusadas) com diferentes níveis de carboidratos e lipídeos (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos).

Nas dietas peletizadas, o aumento de lipídeo para 8% resultou em acréscimo nos CDMS e CDEB e para dietas extrusadas diminuição destes parâmetros. Nas dietas com 4% de lipídeos, o processo de extrusão refletiu em aumento no CDPB em relação a dietas peletizadas. Nas dietas com 8% de lipídeos, o processo de peletização revelou médias superiores aos do processo de extrusão para os CDMS, CDPB e CDEB (Tabela 6).

O aumento de carboidrato para 50% revelou aumento nos CDMS, CDPB e CDEB somente para as dietas extrusadas. As dietas com 40% de carboidrato peletizadas apresentaram médias superiores para CDMS, CDPB e CDEB em relação às mesmas dietas extrusadas. Nas dietas com 50% de carboidratos não foi observada diferença entre os processamentos das dietas (Tabela 6).

Tabela 6 - Interação de processamento de dietas e níveis de nutrientes para os coeficientes de digestibilidade do pacu.

| Processamentos  | Níveis de lipídeos (%)  |                         | Níveis de carboidratos (%) |                         |
|---|-------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
|   | 4                       | 8                       | 40                         | 50                      |
| <i>Coefficiente de digestibilidade da matéria seca - CDMS (%)</i>   |                         |                         |                            |                         |
| Peletização   | 82,53±0,9 <sup>Ab</sup> | 84,82±3,1 <sup>Aa</sup> | 83,35±0,4 <sup>Aa</sup>    | 84,00±3,5 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão  | 83,09±2,2 <sup>Aa</sup> | 78,05±2,8 <sup>Bb</sup> | 77,84±3,0 <sup>Bb</sup>    | 83,30±2,0 <sup>Aa</sup> |
| <i>Coefficiente de digestibilidade da proteína bruta - CDPB (%)</i> |                         |                         |                            |                         |
| Peletização   | 89,19±1,2 <sup>Ba</sup> | 89,61±3,6 <sup>Aa</sup> | 89,23±1,0 <sup>Aa</sup>    | 89,56±3,8 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão  | 90,68±1,3 <sup>Aa</sup> | 87,25±2,2 <sup>Bb</sup> | 87,91±2,4 <sup>Bb</sup>    | 90,02±1,1 <sup>Aa</sup> |
| <i>Coefficiente de digestibilidade da energia bruta - CDEB (%)</i>  |                         |                         |                            |                         |
| Peletização   | 84,34±2,7 <sup>Ab</sup> | 88,72±3,9 <sup>Aa</sup> | 86,98±2,2 <sup>Aa</sup>    | 86,08±4,4 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão  | 84,99±2,5 <sup>Aa</sup> | 81,67±3,9 <sup>Bb</sup> | 80,12±4,1 <sup>Bb</sup>    | 86,54±2,3 <sup>Aa</sup> |

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula comparação na coluna, minúsculas comparação na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O aumento de carboidrato para 50% refletiu em diminuição no CDEB das dietas com 4% de lipídeos, porém, nas dietas com 8% de lipídeos, levou ao aumento nos CDMS e CDEB. O aumento no nível de lipídeos para 8% nas dietas com 40% de carboidratos proporcionou diminuição nos CDMS e CDEB e nas dietas com 50% de carboidrato proporcionou aumento nestas variáveis (Tabela 7).

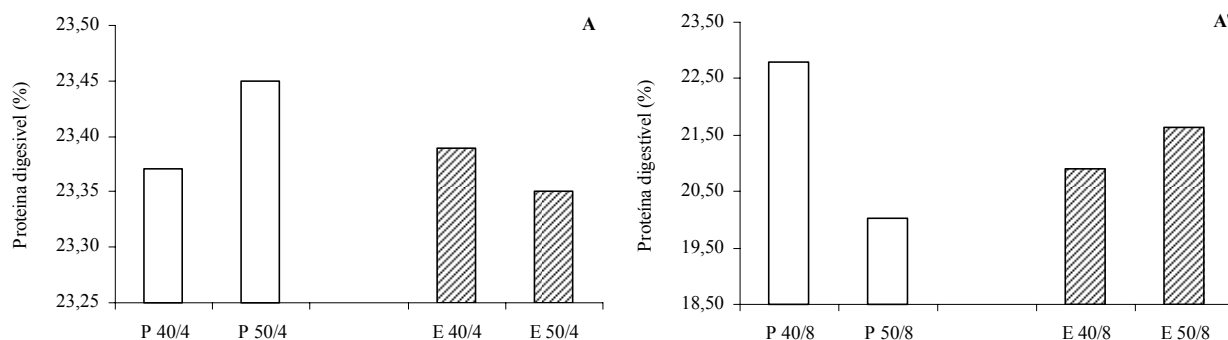


Tabela 7 - Interação níveis de lipídeos e níveis de carboidratos para os coeficientes de digestibilidade do pacu.

| Níveis de lipídeos (%)                                     | Níveis de carboidratos (%) |                         |
|--|----------------------------|-------------------------|
|  | 40                         | 50                      |
| <i>Coefficiente de digestibilidade da matéria seca (%)</i> |                            |                         |
| 4  | 83,03±1,0 <sup>Aa</sup>    | 82,59±2,1 <sup>Ba</sup> |
| 8  | 78,16±2,4 <sup>Bb</sup>    | 84,71±3,4 <sup>Aa</sup> |
| <i>Coefficiente de digestibilidade da energia (%)</i>      |                            |                         |
| 4  | 85,58±2,6 <sup>Aa</sup>    | 83,75±2,6 <sup>Bb</sup> |
| 8  | 81,52±3,6 <sup>Bb</sup>    | 88,87±4,1 <sup>Aa</sup> |

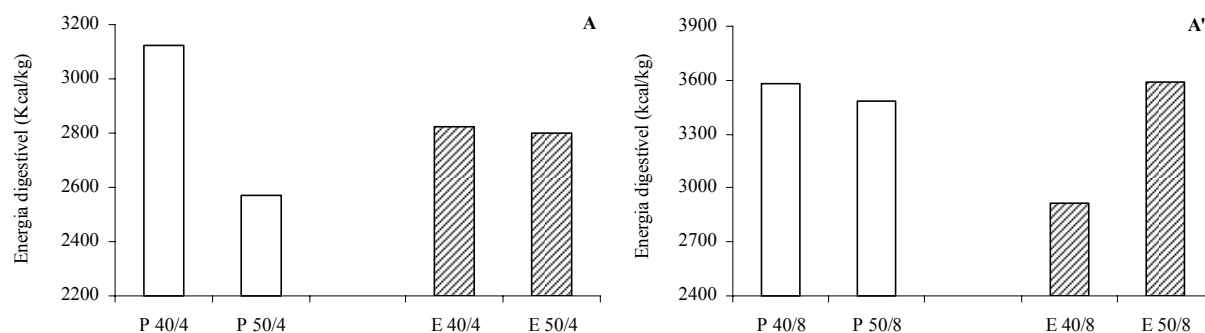
Médias seguidas da mesma letra (maiúscula comparação na coluna, minúsculas comparação na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O aumento de carboidratos em dieta com 4% de lipídeos proporcionou aumento na média de proteína digestível (PD) para as dietas peletizadas e diminuição para dietas extrusadas (Figura 2 A). De forma contrária, nas dietas com 8% de lipídeo, o aumento de carboidrato refletiu em diminuição da PD para dietas peletizadas e aumento para dietas extrusadas (Figura 2 A').



**Figura 2-** Nível de proteína digestível das dietas com 4% (A) e 8% (A') de lipídeos. (P – peletizado; E – extrusado, 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos).

O aumento de carboidratos em dieta com 4% de lipídeos proporcionou diminuição da energia digestível (ED) das dietas peletizadas e não alterou as dietas extrusadas. Nas dietas com 8% de lipídeo, o aumento de carboidrato também refletiu em diminuição da ED para dietas peletizadas, contudo para as dietas extrusadas proporcionou aumento desta variável (Figura 3 A').



**Figura 3-** Nível de energia digestível das dietas com 4% (A) e 8% (B) de lipídeos. (P – peletizado; E – extrusado, 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos).

### 4.3 Enzimas digestivas

No ensaio de crescimento de 20 dias não foi observado diferença significativa no ganho em peso e comprimento (Tabela 8).

Tabela 8 - Desempenho de juvenis de pacu submetidos a 20 dias de alimentação.

|                 | P 40/4   | P 40/8   | P 50/4   | P 50/8   | E 40/4   | E 40/8   | E 50/4   | E 50/8   |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Peso F</b>   | 67,5±8,1 | 67,5±7,9 | 67,4±8,2 | 67,4±7,4 | 67,3±6,5 | 67,4±7,9 | 67,4±6,4 | 67,4±6,6 |
| <b>Comp. F.</b> | 14,1±0,5 | 13,9±0,4 | 13,9±0,5 | 14,5±0,6 | 14,3±0,4 | 14,1±0,6 | 15,7±0,0 | 14,1±0,5 |
| <b>GP</b>       | 0,68     | 0,66     | 0,63     | 0,60     | 0,45     | 0,59     | 0,50     | 0,55     |
| <b>GC</b>       | 0,17     | 0,06     | 0,08     | 0,61     | 0,39     | 0,16     | 1,77     | 0,24     |

Valores expressos em média ± D.P. com n = 9 peixes; F- final; GP - ganho em peso (g); GC - ganho em comprimento (cm).

#### 4.3.1 Aumento de carboidrato em dietas com 4% de lipídeos

As atividades de protease inespecífica, tripsina, quimiotripsina e amilase ao longo do trato digestório não variaram com o aumento de carboidratos. Em dietas peletizadas com 4% de lipídeos. Todavia, a maltase e a lipase dos cecos pilóricos apresentaram diminuição da atividade (Tabela 9).

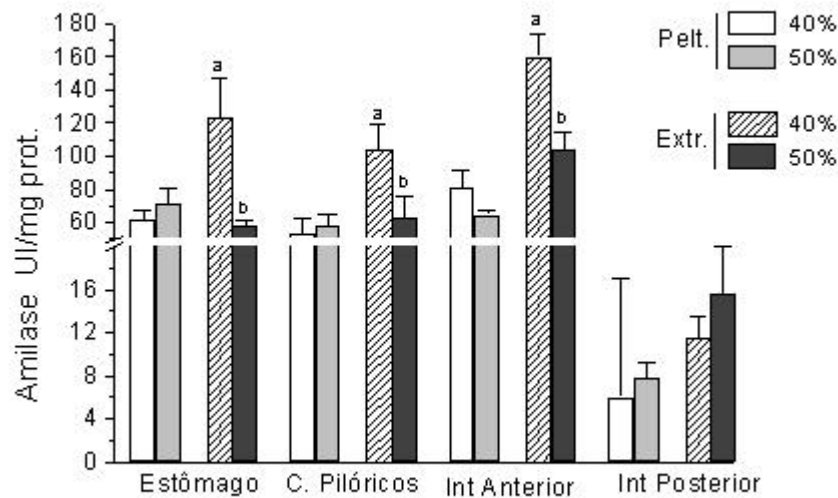
Em dietas extrusadas com 4% de lipídeos, o aumento de carboidrato diminuiu a atividade de protease inespecífica no estômago e aumentou-a no intestino anterior. A atividade de tripsina nos cecos pilóricos aumentou com acréscimo no nível de carboidratos nas dietas. A atividade de amilase diminuiu em todas as seções do trato digestório conforme o aumento de carboidratos na dieta. A maltase apresentou o mesmo comportamento da amilase apenas no cecos pilóricos. A atividade de lipase aumentou no estômago (Tabela 9).

Tabela 9 - Atividades específicas das enzimas digestivas nas porções do trato gastrointestinal do pacu submetidos ao aumento de carboidratos em dietas com 4% de lipídeos.

| Enzimas / Secção<br>U/mg protein | Peletizada               |                           | Extrusada                   |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                  | 40 % CHO                 | 50 % CHO                  | 40 % CHO                    | 50 % CHO                    |
| <b>Protease inespecífica</b>     |                          |                           |                             |                             |
| Estômago                         | 4,16 ± 0,8               | 9,1 ± 3,7                 | 18,48 ± 2,5 <sup>a</sup>    | 13,27 ± 1,5 <sup>b</sup>    |
| Cecos Pilóricos                  | 1,97 ± 0,3               | 2,29 ± 0,5                | 4,73 ± 1,6                  | 2,08 ± 0,3                  |
| Int. Anterior                    | 69,56 ± 10,6             | 58,13 ± 7,1               | 65,90 ± 6,75 <sup>b</sup>   | 125,04 ± 2,8 <sup>a</sup>   |
| Int. Posterior                   | 0,72 ± 0,3               | 0,53 ± 0,12               | 0,91 ± 0,1                  | 0,79 ± 0,1                  |
| <b>Tripsina</b>                  |                          |                           |                             |                             |
| Cecos Pilóricos                  | 0,25 ± 0,078             | 0,26 ± 0,01               | 0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>    | 0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>    |
| <b>Quimiotripsina</b>            |                          |                           |                             |                             |
| Cecos Pilóricos                  | 2,70 ± 0,44              | 2,95 ± 0,08               | 1,30 ± 0,48 <sup>b</sup>    | 4,64 ± 0,74 <sup>a</sup>    |
| Int. Anterior                    | 0,71 ± 0,22              | 0,62 ± 0,07               | 0,48 ± 0,08                 | 0,56 ± 0,08                 |
| Int. Posterior                   | 1,97 ± 0,41              | 1,28 ± 0,25               | 0,97 ± 0,45                 | 0,47 ± 0,21                 |
| <b>Amilase</b>                   |                          |                           |                             |                             |
| Estômago                         | 61,90 ± 5,59             | 71,14 ± 9,37              | 123,22 ± 24,07 <sup>a</sup> | 58,32 ± 2,60 <sup>b</sup>   |
| Cecos Pilóricos                  | 53,27 ± 9,3 <sup>B</sup> | 57,99 ± 7,45 <sup>A</sup> | 103,85 ± 15,02 <sup>a</sup> | 62,66 ± 13,57 <sup>b</sup>  |
| Int. Anterior                    | 81,26 ± 10,3             | 64,47 ± 3,47              | 159,93 ± 14,11 <sup>a</sup> | 104,24 ± 10,58 <sup>b</sup> |
| Int. Posterior                   | 6,00 ± 11,09             | 7,80 ± 1,42               | 11,50 ± 2,0                 | 15,61 ± 4,3                 |
| <b>Maltase</b>                   |                          |                           |                             |                             |
| Estômago                         | 0,86 ± 0,33              | 1,01 ± 0,18               | 0,71 ± 0,33                 | 0,21 ± 0,18                 |
| Cecos Pilóricos                  | 1,76 ± 0,16 <sup>A</sup> | 1,41 ± 0,12 <sup>B</sup>  | 1,42 ± 0,28                 | 1,66 ± 0,70                 |
| Int. Anterior                    | 0,55 ± 0,22              | 0,51 ± 0,11               | 0,62 ± 0,17                 | 0,36 ± 0,11                 |
| Int. Posterior                   | 0,14 ± 0,09              | 0,08 ± 0,01               | 0,20 ± 0,17                 | 0,21 ± 0,06                 |
| <b>Lipase</b>                    |                          |                           |                             |                             |
| Estômago                         | 1,03 ± 0,1               | 1,00 ± 0,1                | 0,77 ± 0,1                  | 1,66 ± 0,1                  |
| Cecos Pilóricos                  | 4,62 ± 0,2               | 3,72 ± 0,1                | 2,25 ± 0,5                  | 4,83 ± 1,7                  |
| Int. Anterior                    | 3,13 ± 0,5               | 3,58 ± 0,2                | 4,70 ± 1,0                  | 3,81 ± 1,0                  |
| Int. Posterior                   | 7,64 ± 0,9               | 7,15 ± 1,2                | 8,24 ± 3,8                  | 5,63 ± 1,2                  |

Valores expressos em média ± D.P. com n = 9 peixes, CHO – carboidratos; C. Pilóricos – cecos pilóricos; Int. Anterior – intestino anterior; Int. Posterior – Intestino posterior, Médias seguidas da mesma letra (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Dentre as enzimas digestivas ensaiadas nas dietas com 4% de lipídeos, a amilase foi a que apresentou as maiores diferenças em relação ao processamento da dieta. O aumento de carboidratos em dietas peletizadas houve aumento da atividade conforme o aumento de carboidrato. Porém, nas dietas extrusadas o aumento de carboidratos diminuiu essa atividade (Figura 4).



**Figura 4-** Atividade específica da amilase no trato digestório estômago, cecos pilóricos, intestino anterior, intestino posterior de pacu. Letras diferentes (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) reportam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média ( $n=9$ )  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E extrusado, 40 e 50 - níveis de carboidratos; 4 e 8 - níveis de lipídeos).

#### 4.3.2 O aumento de carboidratos em dietas com 8% de lipídeos.

O aumento de carboidratos em dietas peletizadas com 8% de lipídeos (P 50/8) aumentou a atividade de protease inespecífica do estômago. A maior atividade de protease inespecífica foi registrada no intestino anterior; nas outras porções do trato digestório não apresentou diferença estatística. A quimiotripsina apresentou diminuição nos cecos pilóricos com o aumento de carboidrato das dietas. A atividade amilohidrolítica aumentou nos cecos pilóricos com acréscimo no nível de carboidratos. A atividade de lipase no intestino anterior aumentou com o nível de carboidratos (Tabela 10).

Em dietas extrusadas com 8% de lipídeos, a atividade da protease inespecífica aumentou com o acréscimo no nível de carboidratos em todas as seções do trato digestório. A atividade da quimiotripsina diminuiu no intestino anterior. A amilase e tripsina não demonstraram diferença significativa. A maltase nos cecos pilóricos aumentou com o acréscimo de carboidratos. A atividade de lipase diminuiu no intestino anterior (Tabela 10).

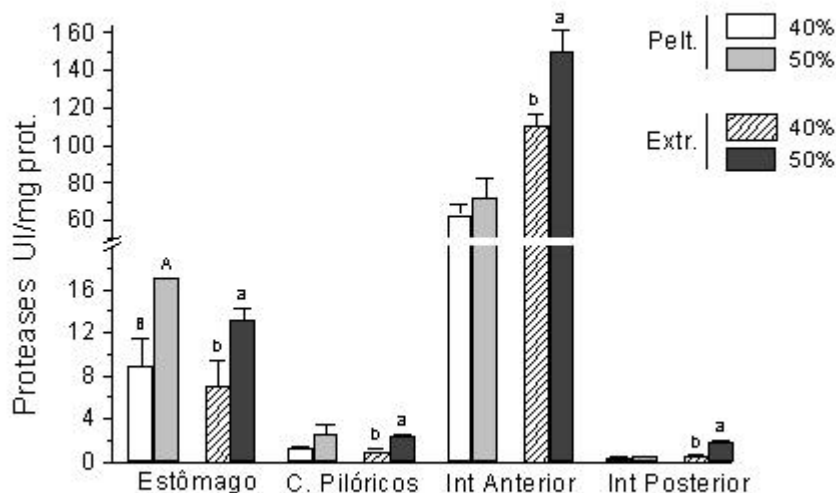
Tabela 10 - Atividades específicas das enzimas digestivas nas porções do trato gastrintestinal do pacu submetidos ao aumento de carboidratos em dietas com 8% de lipídeos.

| Enzimas / Secção<br>U/mg proteína | Peletizada                 |                             | Extrusada                 |                            |
|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|                                   | 40 % CHO                   | 50 % CHO                    | 40 % CHO                  | 50 % CHO                   |
| <b>Protease inespecífica</b>      |                            |                             |                           |                            |
| Estômago                          | 8,82 ± 2,6 <sup>B</sup>    | 17,0 ± 4,1 <sup>A</sup>     | 7,09 ± 2,3 <sup>b</sup>   | 13,13 ± 1,2 <sup>a</sup>   |
| Cecos Pilóricos                   | 1,31 ± 0,2                 | 2,56 ± 0,9                  | 0,99 ± 0,3 <sup>b</sup>   | 2,43 ± 0,2 <sup>a</sup>    |
| Int. Anterior                     | 62,89 ± 5,6                | 72,19 ± 10,2                | 110,21 ± 6,5 <sup>b</sup> | 149,74 ± 11,8 <sup>a</sup> |
| Int. Posterior                    | 0,41 ± 0,1                 | 0,51 ± 0,1                  | 0,61 ± 0,1 <sup>b</sup>   | 1,86 ± 0,2 <sup>a</sup>    |
| <b>Tripsina</b>                   |                            |                             |                           |                            |
| Cecos Pilóricos                   | 0,12 ± 0,054               | 0,11 ± 0,02                 | 0,20 ± 0,005              | 0,22 ± 0,03                |
| <b>Quimiotripsina</b>             |                            |                             |                           |                            |
| Cecos Pilóricos                   | 3,34 ± 0,14 <sup>A</sup>   | 0,98 ± 0,06 <sup>B</sup>    | 4,92 ± 1,02               | 2,24 ± 0,07                |
| Int. Anterior                     | 0,67 ± 0,09                | 0,72 ± 0,07                 | 0,61 ± 0,08 <sup>a</sup>  | 0,27 ± 0,08 <sup>b</sup>   |
| Int. Posterior                    | 0,99 ± 0,50                | 0,99 ± 0,58                 | 0,54 ± 0,21               | 0,45 ± 0,23                |
| <b>Amilase</b>                    |                            |                             |                           |                            |
| Estômago                          | 90,41 ± 17,05              | 146,03 ± 31,52              | 77,14 ± 8,1               | 52,62 ± 19,0               |
| Cecos Pilóricos                   | 63,36 ± 13,34 <sup>B</sup> | 111,00 ± 17,58 <sup>A</sup> | 40,80 ± 11,0              | 51,77 ± 6,2                |
| Int. Anterior                     | 76,32 ± 9,47               | 65,94 ± 7,83                | 90,73 ± 13,12             | 108,85 ± 13,8              |
| Int. Posterior                    | 11,09 ± 1,27               | 11,58 ± 2,46                | 10,79 ± 3,8               | 10,91 ± 3,8                |
| <b>Maltase</b>                    |                            |                             |                           |                            |
| Estômago                          | 1,02 ± 0,31                | 0,91 ± 0,49                 | 0,26 ± 0,06               | 0,22 ± 0,03                |
| Cecos Pilóricos                   | 1,11 ± 0,14                | 1,25 ± 0,33                 | 1,05 ± 0,20 <sup>b</sup>  | 1,49 ± 0,11 <sup>a</sup>   |
| Int. Anterior                     | 0,44 ± 0,08                | 0,46 ± 0,03                 | 0,45 ± 0,06               | 0,36 ± 0,08                |
| Int. Posterior                    | 0,29 ± 0,14                | 0,19 ± 0,14                 | 0,14 ± 0,06               | 0,29 ± 0,10                |
| <b>Lipase</b>                     |                            |                             |                           |                            |
| Estômago                          | 0,96 ± 0,1                 | 0,81 ± 0,0                  | 1,62 ± 0,3                | 1,59 ± 0,2                 |
| Cecos Pilóricos                   | 3,11 ± 0,6                 | 2,37 ± 0,6                  | 5,68 ± 0,6                | 4,13 ± 0,8                 |
| Int. Anterior                     | 2,93 ± 0,3 <sup>B</sup>    | 3,96 ± 0,4 <sup>A</sup>     | 3,76 ± 0,7 <sup>a</sup>   | 2,87 ± 0,3 <sup>b</sup>    |
| Int. Posterior                    | 9,33 ± 3,0                 | 8,11 ± 3,5                  | 4,11 ± 0,7                | 5,8 ± 1,4                  |

Valores expressos em média ± D.P. de n = 9 peixes, CHO – carboidratos; C. Pilóricos – cecos pilóricos; Int. Anterior – intestino anterior; Int. Posterior – Intestino posterior. Médias seguidas da mesma letra (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Dentre as enzimas digestivas ensaiadas nas dietas com 8% de lipídeos, a protease inespecífica foi a que apresentou as maiores diferenças em relação ao processamento da dieta. A atividade de protease inespecífica no estômago aumentou com o teor de carboidratos nas

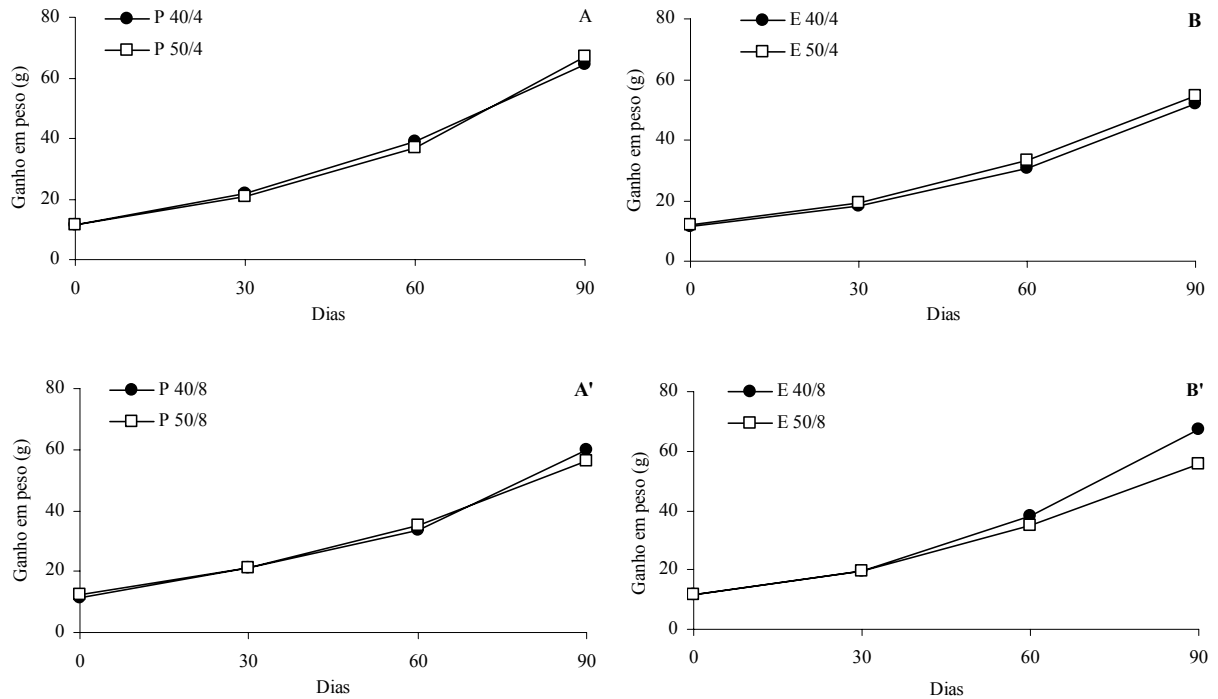
dietas peletizadas. Entretanto, nas dietas extrusadas o aumento de carboidratos aumentou a atividade da protease inespecífica em todas as seções do trato digestório (Figura 5).



**Figura 5-** Atividade específica da protease inespecífica no trato digestório estômago, cecos pilóricos, intestino anterior, intestino posterior) de pacu (n=9). Letras diferentes (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) reportam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E extrusado, 40 e 50 – níveis de carboidratos; 4 e 8 – níveis de lipídeos).

#### 4.4 Crescimento

O crescimento dos pacus foi observado ao longo do período experimental. Entre as dietas peletizadas o aumento de carboidratos resultou em melhores médias de ganho em peso (Figura 6A, A'). Nas dietas extrusadas o acréscimo de carboidratos refletiu em melhor crescimento nas dietas com 4% de lipídeos (Figura 6B, B').



**Figura 6-** Crescimento em peso ao longo do período experimental de pacus submetidos ao aumento de carboidratos em dietas peletizadas (A, A') e em dietas extrusadas (B, B'). (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50% níveis de carboidratos; 4 e 8% níveis de lipídeos).

A análise de variância do desempenho de produção dos peixes não apresentou interação entre os níveis de carboidratos e o processamento das dietas. Contudo, houve interação entre os níveis de lipídeos e o processamento ( $P < 0,01$ ) para ganho em peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) e também entre os níveis de carboidratos e os níveis de lipídeos ( $P < 0,01$ ) para GP, ganho em comprimento (GC), TCE e consumo de dieta (CD). A interação entre os três fatores foi observada para o GC ( $P < 0,05$ ). O processamento da dieta alterou a conversão alimentar (CA) e TEP ( $P < 0,05$ ) proporcionando os melhores resultados para as dietas extrusadas em comparação com as peletizadas (Tabela 11).

Tabela 11 - Parâmetros de crescimento pacu.

| Níveis na dieta (%)                      |          |                | <i>Desempenho de crescimento</i> |                     |                     |                     |                          |                          |
|--|----------|----------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| Carboidratos                             | Lipídeos | Processamentos | GP<br>(g/peixe)                  | GC<br>(cm/peixe)    | TCE<br>(%/dia)      | CD<br>(g/dia)       | CA                       | TEP<br>(g/kg)            |
| <i>Efeito das médias</i>                 |          |                |                                  |                     |                     |                     |                          |                          |
|  |          | 40             | 49,65 ± 6,85                     | 4,49 ± 1,30         | 1,87 ± 0,14         | 5,10 ± 0,93         | 1,16 ± 0,12              | 3,39 ± 0,33              |
|  |          | 50             | 46,27 ± 6,16                     | 3,98 ± 1,15         | 1,77 ± 0,12         | 5,10 ± 0,58         | 1,24 ± 0,13              | 3,25 ± 0,23              |
|  | 4        |                | 47,94 ± 7,37                     | 4,55 ± 0,88         | 1,82 ± 0,14         | 4,94 ± 1,00         | 1,16 ± 0,09              | 3,30 ± 0,26              |
|  | 8        |                | 47,99 ± 6,18                     | 3,93 ± 1,46         | 1,83 ± 0,14         | 5,26 ± 0,36         | 1,24 ± 0,15              | 3,32 ± 0,33              |
|  |          | Peletização    | 50,29 ± 5,00                     | 3,50 ± 1,27         | 1,86 ± 0,12         | 5,63 ± 0,18         | 1,27 ± 0,09 <sup>A</sup> | 3,12 ± 0,16 <sup>B</sup> |
|  |          | Extrusão       | 45,64 ± 7,29                     | 4,98 ± 0,33         | 1,79 ± 0,15         | 4,57 ± 0,65         | 1,12 ± 0,05 <sup>B</sup> | 3,50 ± 0,11 <sup>A</sup> |
| <i>Valor de F (ANOVA)</i>                |          |                |                                  |                     |                     |                     |                          |                          |
| Níveis de carboidratos                   |          |                | 2,78 <sup>ns</sup>               | 3,44 <sup>ns</sup>  | 5,47 <sup>*</sup>   | 0,001 <sup>ns</sup> | 2,22 <sup>ns</sup>       | 0,78 <sup>ns</sup>       |
| Níveis de lipídeos                       |          |                | 0,001 <sup>ns</sup>              | 5,36 <sup>*</sup>   | 0,06 <sup>ns</sup>  | 2,65 <sup>ns</sup>  | 2,22 <sup>ns</sup>       | 0,01 <sup>ns</sup>       |
| Processamentos                           |          |                | 5,25 <sup>*</sup>                | 29,40 <sup>**</sup> | 2,45 <sup>ns</sup>  | 27,77 <sup>**</sup> | 7,13 <sup>*</sup>        | 5,78 <sup>*</sup>        |
| Carboidratos x Lipídeos                  |          |                | 8,01 <sup>*</sup>                | 1,44 <sup>ns</sup>  | 7,85 <sup>*</sup>   | 1,53 <sup>ns</sup>  | 1,36 <sup>ns</sup>       | 1,32 <sup>ns</sup>       |
| Carboidratos x Processamentos            |          |                | 1,35 <sup>ns</sup>               | 2,92 <sup>ns</sup>  | 0,19 <sup>ns</sup>  | 0,13 <sup>ns</sup>  | 0,70 <sup>ns</sup>       | 0,80 <sup>ns</sup>       |
| Lipídeos x Processamentos                |          |                | 15,13 <sup>**</sup>              | 14,43 <sup>**</sup> | 16,01 <sup>**</sup> | 8,63 <sup>**</sup>  | 0,97 <sup>ns</sup>       | 0,24 <sup>ns</sup>       |
| Carboidratos x Lipídeos x Processamentos |          |                | 1,17 <sup>ns</sup>               | 7,27 <sup>*</sup>   | 0,19 <sup>ns</sup>  | 4,11 <sup>ns</sup>  | 1,42 <sup>ns</sup>       | 1,44 <sup>ns</sup>       |

Valores expressos em média ± DP de n = 30 peixes; Letras maiúsculas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; \*\* (P < 0,01); \* (P < 0,05); ns (não significativo). Ganho em peso (GP); ganho em comprimento (GC); taxa de crescimento específico (TCE), consumo de dieta (CD); conversão alimentar (CA); taxa de eficiência protéica (TEP).



A interação entre níveis de carboidratos e de lipídeos proporcionou resultados negativos para GP e TCE nas dietas 50/8. O aumento do nível de lipídeos em dietas com 40% de carboidratos proporcionou melhora na TCE. O aumento de lipídeos em dietas com 50% de carboidratos não mostrou diferenças nas interações (Tabela 12).

Tabela 12 - Interação níveis de carboidratos e lipídeos no crescimento de pacu.

| Níveis de lipídeos<br>(%) | Níveis de carboidratos (%)             |                            |
|---------------------------|--|----------------------------|
|                           | 40                                     | 50                         |
|                           | Ganho em peso (g/peixe)                |                            |
| 4                         | 46,75 ± 8,76 <sup>Aa</sup>             | 49,12 ± 8,98 <sup>Aa</sup> |
| 8                         | 52,55 ± 5,52 <sup>Aa</sup>             | 43,42 ± 0,93 <sup>Ab</sup> |
|                           | Taxa de crescimento específico (%/dia) |                            |
| 4                         | 1,81 ± 0,04 <sup>Ba</sup>              | 1,83 ± 0,14 <sup>Aa</sup>  |
| 8                         | 1,94 ± 0,07 <sup>Aa</sup>              | 1,72 ± 0,05 <sup>Ab</sup>  |

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula comparação na coluna, minúsculas comparação na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

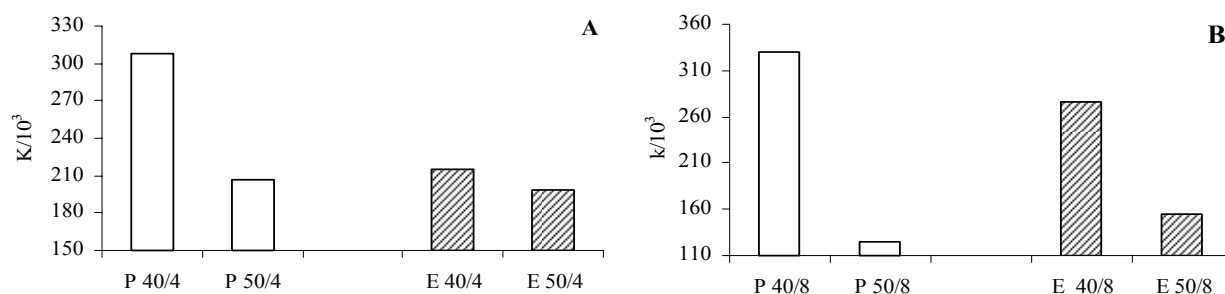
A interação entre níveis de lipídeos e processamento mostrou melhores valores de GP, GC, TEC e CD nas dietas extrusadas com 8% de lipídeos. Nas dietas peletizadas os melhores valores foram observados nas dietas com 4% de lipídeos (Tabela 13).

Tabela 13 - Interação nível de lipídeos e processamento no crescimento de pacu.

| Processamentos | Níveis de lipídeos (%)                                |                            |
|----------------|---|----------------------------|
|                | 4   | 8                          |
|                | Ganho em peso (g/peixe)                               |                            |
| Peletização    | 54,21 ± 0,66 <sup>Aa</sup>                            | 46,37 ± 2,11 <sup>Ab</sup> |
| Extrusão       | 41,66 ± 1,56 <sup>Bb</sup>                            | 49,61 ± 6,08 <sup>Aa</sup> |
|                | Ganho em comprimento (cm/peixe)                       |                            |
| Peletização    | 4,33 ± 1,44 <sup>Aa</sup>                             | 2,67 ± 0,06 <sup>Bb</sup>  |
| Extrusão       | 4,77 ± 0,26 <sup>Aa</sup>                             | 5,18 ± 0,32 <sup>Aa</sup>  |
|                | Taxa de crescimento específico (%/dia <sup>-1</sup> ) |                            |
| Peletização    | 1,94 ± 0,01 <sup>Aa</sup>                             | 1,78 ± 0,13 <sup>Ab</sup>  |
| Extrusão       | 1,70 ± 0,01 <sup>Bb</sup>                             | 1,88 ± 0,18 <sup>Aa</sup>  |
|                | Consumo de dieta (g/dia)                              |                            |
| Peletização    | 5,76 ± 0,16 <sup>Aa</sup>                             | 5,49 ± 0,06 <sup>Aa</sup>  |
| Extrusão       | 4,12 ± 0,52 <sup>Bb</sup>                             | 5,03 ± 0,41 <sup>Aa</sup>  |

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula comparação na coluna, minúsculas comparação na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O fator de condição mostrou respostas diferentes de acordo com o tipo de processamento. De uma forma geral, o aumento de carboidratos diminuiu o fator de condição. Nas dietas peletizadas, seus valores foram maiores quando processadas com 40% de carboidratos independentemente do nível de lipídeos. Nas dietas extrusadas, sua média foi maior quando foram utilizados 40% de carboidratos e 8% de lipídeos (Figura 7A, 7B).



**Figura 7-** Fator de condição de pacu submetido ao aumento de carboidratos em dietas (peletizadas ou extrusadas) com (A) 4% e (B) 8% de lipídeos. (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos).

#### 4.5 Eficiência de retenção de nutrientes

A análise de variância da eficiência de retenção de nutrientes não apresentou interação entre os níveis de carboidratos e os níveis de lipídeos das dietas. Contudo, houve interação entre níveis de carboidratos e processamentos da dieta ( $P < 0,05$ ) para eficiência de retenção de proteína (ERP) e proporção de proteína no ganho em peso (PPGP). A interação entre níveis de lipídeos e processamentos das dietas ( $P < 0,05$ ) foi observada para eficiência de retenção de lipídeos (ERL) e proporção de lipídeos no ganho em peso (PLGP). A eficiência de retenção de energia bruta (ERE) apresentou efeito isolado dos níveis de carboidratos ( $P < 0,01$ ), com os maiores valores para as dietas peletizadas e também para os processamentos das dietas ( $P < 0,01$ ), mostrando as maiores médias para as dietas peletizadas (Tabela 14).

Tabela 14 - Eficiência de utilização de nutrientes do pacu.

| Níveis na dieta (%)                      |          |                | Eficiência de utilização de nutrientes (%) |                    |                           |                    |                    |                    |
|--|----------|----------------|--|--------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Carboidratos                             | Lipídeos | Processamentos | ERP  | ERL                | ERE                       | PPGP               | PLGP               | PEGP               |
| <i>Efeito nas médias</i>                 |          |                |  |                    |                           |                    |                    |                    |
| 40                                       |          |                | 25,85 ± 2,15                               | 20,85 ± 2,04       | 75,72 ± 9,85 <sup>A</sup> | 25,77 ± 3,04       | 20,84 ± 2,04       | 183,75 ± 19,14     |
| 50                                       |          |                | 27,48 ± 1,42                               | 21,55 ± 2,05       | 60,87 ± 3,15 <sup>B</sup> | 27,41 ± 2,09       | 21,53 ± 2,05       | 193,37 ± 16,44     |
|  | 4        |                | 26,58 ± 1,95                               | 20,16 ± 2,03       | 69,03 ± 11,20             | 26,52 ± 2,74       | 20,14 ± 2,04       | 197,48 ± 6,95      |
|  | 8        |                | 26,74 ± 2,15                               | 22,24 ± 1,29       | 67,57 ± 12,51             | 26,67 ± 3,05       | 22,23 ± 1,29       | 179,64 ± 20,82     |
|  |          | Peletização    | 26,30 ± 2,54                               | 20,22 ± 2,39       | 74,20 ± 4,50 <sup>A</sup> | 26,23 ± 3,58       | 20,20 ± 2,39       | 192,85 ± 17,96     |
|  |          | Extrusão       | 27,02 ± 1,28                               | 22,18 ± 0,65       | 62,40 ± 4,71 <sup>B</sup> | 26,95 ± 1,84       | 22,17 ± 0,65       | 184,27 ± 17,39     |
| <i>Valor de F (ANOVA)</i>                |          |                |  |                    |                           |                    |                    |                    |
| Níveis de carboidratos                   |          |                | 2,90 <sup>ns</sup>                         | 1,09 <sup>ns</sup> | 22,14 <sup>**</sup>       | 2,91 <sup>ns</sup> | 1,08 <sup>ns</sup> | 1,00 <sup>ns</sup> |
| Níveis de Lipídeos                       |          |                | 0,27 <sup>ns</sup>                         | 9,94 <sup>**</sup> | 0,21 <sup>ns</sup>        | 0,02 <sup>ns</sup> | 9,90 <sup>**</sup> | 3,44 <sup>ns</sup> |
| Processamentos                           |          |                | 0,57 <sup>ns</sup>                         | 8,78 <sup>**</sup> | 13,97 <sup>**</sup>       | 0,57 <sup>ns</sup> | 8,77 <sup>**</sup> | 0,79 <sup>ns</sup> |
| Carboidratos x Lipídeos                  |          |                | 2,32 <sup>ns</sup>                         | 2,16 <sup>ns</sup> | 0,16 <sup>ns</sup>        | 2,31 <sup>ns</sup> | 2,16 <sup>ns</sup> | 1,84 <sup>ns</sup> |
| Carboidratos x Processamentos            |          |                | 6,61 <sup>*</sup>                          | 3,11 <sup>ns</sup> | 4,37 <sup>ns</sup>        | 6,65 <sup>*</sup>  | 3,14 <sup>ns</sup> | 2,93 <sup>ns</sup> |
| Lipídeos x Processamentos                |          |                | 1,22 <sup>ns</sup>                         | 4,56 <sup>*</sup>  | 4,37 <sup>ns</sup>        | 1,24 <sup>ns</sup> | 4,57 <sup>*</sup>  | 1,58 <sup>ns</sup> |
| Carboidratos x Lipídeos x Processamentos |          |                | 0,17 <sup>ns</sup>                         | 0,10 <sup>ns</sup> | 1,68 <sup>ns</sup>        | 0,17 <sup>ns</sup> | 0,10 <sup>ns</sup> | 0,12 <sup>ns</sup> |

Valores expressos em média ± D.P, de n = 9 peixes; Letras maiúsculas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; \*\* (P < 0,01); \* (P < 0,05); <sup>ns</sup> (não significativo), Eficiência de retenção de proteína (ERP), eficiência de retenção de lipídeos (ERL), eficiência de retenção de energia (ERE), proporção de proteína no ganho em peso (PPGP), proporção de lipídeos no ganho em peso (PLGP), proporção de energia no ganho em peso (PEGP).

A conjugação entre os níveis de lipídeos e os processamentos das dietas afetou a ERL e a PLGP. Os peixes alimentados com ração peletizada com 4% de lipídeos apresentaram os menores valores de ERL e PLGP. As dietas extrusadas apresentaram os maiores valores para ERL e PLGP independente dos níveis de lipídeos das dietas (Tabela 15).

Tabela 15 - Interação de nível de lipídeos e processamento na eficiência de retenção de nutrientes.

| <i>Processamento</i>                              | <i>Lipídeos (%)</i>        |                            |
|---|----------------------------|----------------------------|
|   | 4                          | 8                          |
| <i>Eficiência de retenção de lipídeos (%)</i>     |                            |                            |
| Peletização                                       | 18,47 ± 0,48 <sup>Bb</sup> | 21,97 ± 2,16 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão  | 21,84 ± 0,88 <sup>Aa</sup> | 22,52 ± 0,20 <sup>Aa</sup> |
| <i>Proporção de lipídeos no ganho em peso (%)</i> |                            |                            |
| Peletização                                       | 18,45 ± 0,48 <sup>Bb</sup> | 21,95 ± 2,16 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão  | 21,83 ± 0,88 <sup>Aa</sup> | 22,50 ± 0,20 <sup>Aa</sup> |

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula comparação na coluna, minúsculas comparação na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os níveis de carboidratos e os processamentos das dietas influenciaram a eficiência de retenção de proteína (ERP) e proporção de proteína no ganho em peso (PPGP). Dietas com 50% carboidratos apresentaram as melhores médias ( $p < 0,05$ ) para PPV independentemente do processamento aplicado à dieta (Tabela 16).

Tabela 16 - Interação de nível de carboidratos e processamento na eficiência de retenção de nutrientes.

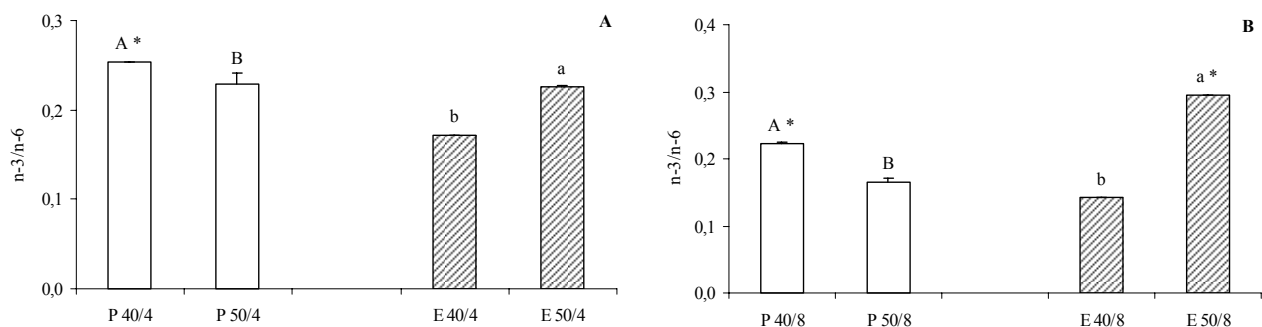
| <i>Processamento</i>                              | <i>Carboidratos (%)</i>    |                            |
|---|----------------------------|----------------------------|
|   | 40                         | 50                         |
| <i>Eficiência de retenção de proteína (%)</i>     |                            |                            |
| Peletização                                       | 24,26 ± 0,11 <sup>Bb</sup> | 28,34 ± 0,68 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão  | 27,44 ± 1,95 <sup>Aa</sup> | 26,61 ± 1,48 <sup>Aa</sup> |
| <i>Proporção de proteína no ganho em peso (%)</i> |                            |                            |
| Peletização                                       | 24,17 ± 0,15 <sup>Bb</sup> | 27,37 ± 0,99 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão  | 28,29 ± 2,73 <sup>Aa</sup> | 26,54 ± 2,09 <sup>Aa</sup> |

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula comparação na coluna, minúsculas comparação na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.6 Perfil de ácidos graxos do filé de pacu

O perfil de ácidos graxos do filé de pacu apresentou grande influência da interação entre os fatores estudados. A interação entre níveis de lipídeos e níveis de carboidratos influenciou a quantidade de lipídeos totais (LT), somatória de ácidos graxos n3 ( $\Sigma n3$ ), ácidos graxos monossaturados (AGM) e ácidos graxos polinsaturados (AGP). A interação entre nível de carboidratos e processamento ( $P < 0,01$ ) foi expressa em  $\Sigma n3$ ,  $\Sigma n6$ , ácidos graxos saturados (AGS), AGM e ácidos graxos insaturados (AGI). Houve interação ( $P < 0,01$ ) entre níveis de lipídeos e processamento em todas as variáveis do perfil de ácidos graxos do filé (Tabela 17).

As dietas peletizadas com 40% de carboidratos apresentaram sempre a maior relação entre n3/n6 em comparação às dietas extrusadas (Figura 8A, B). No entanto a dieta extrusada só mostrou aumento dessa relação em alto conteúdo de lipídeos (8%) e carboidratos (50%) o que coincide com maior deposição de lipídeos muscular (Figura 8B). A relação n3/n6 aumentou conforme o aumento de carboidratos nas dietas extrusadas e diminuiu nas dietas peletizadas (Figura 8A, B).



**Figura 8-** Relação entre n-3/ n-6 dos filés de pacu submetido ao aumento de carboidratos em dietas (peletizadas ou extrusadas) com (A) 4% e (B) 8% de lipídeos. Letra diferente (maiúscula comparação entre dietas peletizadas e minúscula comparação entre dietas extrusadas, (\*) comparação entre processamentos) (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos).

Tabela 17 - Perfil de ácidos graxos do filé do pacu.

| Níveis nas dietas (%)                    |          | Processamento | Ácidos graxos (%) |            |             |             |              |             |             |
|--|----------|---------------|-------------------|------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| Carboidratos                             | Lipídeos |               | LT                | Σ n3       | Σ n6        | Σ AGS       | Σ AGM        | Σ AGPI      | AGI         |
| Efeito das médias                        |          |               |                   |            |             |             |              |             |             |
| 40                                       |          |               | 9,28 ± 3,0        | 4,56 ± 0,5 | 23,88 ± 4,1 | 57,55 ± 3,5 | 12,76 ± 1,1  | 29,20 ± 4,1 | 42,36 ± 3,5 |
| 50                                       |          |               | 10,19 ± 1,9       | 4,27 ± 1,0 | 18,86 ± 3,0 | 60,82 ± 2,8 | 17,13 ± 2,4  | 22,04 ± 3,5 | 38,01 ± 2,8 |
|  | 4        |               | 7,67 ± 1,8        | 4,08 ± 0,5 | 18,89 ± 3,5 | 61,41 ± 2,9 | 15,45 ± 2,2  | 22,66 ± 4,4 | 37,35 ± 2,8 |
|  | 8        |               | 11,79 ± 1,0       | 4,74 ± 1,0 | 23,85 ± 3,8 | 56,96 ± 2,3 | 14,44 ± 3,4  | 28,58 ± 4,6 | 43,02 ± 2,3 |
|  |          | Peletização   | 9,52 ± 1,8        | 4,34 ± 0,8 | 20,26 ± 3,5 | 59,83 ± 4,1 | 16,04 ± 3,3  | 24,09 ± 5,6 | 39,66 ± 4,1 |
|  |          | Extrusão      | 9,95 ± 3,1        | 4,48 ± 0,9 | 22,49 ± 5,2 | 58,54 ± 3,1 | 13,85 ± 2,2  | 27,15 ± 5,1 | 40,71 ± 3,0 |
| F - valores (NOVA)                       |          |               |                   |            |             |             |              |             |             |
| Níveis de carboidratos                   |          |               | 6,94 *            | 61,98 **   | 16115,67 ** | 12452,51 ** | 241776,31 ** | 23522,46 ** | 27,29 **    |
| Níveis de lipídeos                       |          |               | 142,43 **         | 312,00 **  | 15680,13 ** | 23108,26 ** | 12800,56 **  | 16093,93 ** | 46,23 **    |
| Processamentos                           |          |               | 1,56 ns           | 15,94**    | 3184,13 **  | 1967,06 **  | 60859,26 **  | 4288,30 **  | 1,59 ns     |
| Carboidratos x Lipídeos                  |          |               | 8,89 *            | 123,68 **  | 1,24 ns     | 52,20 **    | 213,47 **    | 137,31 **   | 1,16 ns     |
| Carboidratos x Processamentos            |          |               | 0,26 ns           | 806,65 **  | 5670,19 **  | 3655,63 **  | 21732,24 **  | 1,14 ns     | 5,12 *      |
| Lipídeos x Processamentos                |          |               | 13,26 **          | 110,98 **  | 414,85 **   | 7215,76 **  | 21020,21 **  | 306,44 **   | 7,59 *      |
| Carboidratos x Lipídeos x Processamentos |          |               | 38,09 **          | 264,55**   | 652,78 **   | 0,72 ns     | 10383,71 **  | 106,59 **   | 0,01 ns     |

Valores expressos em média ± D.P. de n = 9 peixes; Letras maiúsculas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; \*\* (P < 0,01); \* (P < 0,05); ns (não significativo), LT – lipídeos totais; Σn3 - Somatória de ácidos graxos n3; Σn6 - Somatória de ácidos graxos n6; AGS- ácidos graxos saturados; AGM – ácidos graxos monosaturados; AGP – ácidos graxos poliinsaturados; AGI – ácidos graxos insaturados.

A interação entre níveis de lipídeos e níveis de carboidratos revelou que o aumento de carboidratos e o aumento de lipídeos nas dietas levaram ao acréscimo de LT no filé. O aumento de lipídeos na dieta elevou a quantidade de  $\Sigma n3$  e AGP e diminuição nos AGS e AGM. O aumento de carboidrato elevou as médias de AGS e AGM, já nas dietas com 8% de lipídeos resultou em elevação de  $\Sigma n3$  e diminuição de AGP (Tabela 18).

Tabela 18 - Interação de níveis de carboidratos e lipídeos no perfil de ácidos graxos no filé de pacu.

| Níveis de lipídeos (%) | Níveis de carboidratos (%)                |                            |
|------------------------|---|----------------------------|
|                        | 40  | 50                         |
|                        | <i>Lipídeos totais do filé (%)</i>        |                            |
| 4                      | 6,70 ± 2,5 <sup>Bb</sup>                  | 8,64 ± 0,2 <sup>Ba</sup>   |
| 8                      | 11,85 ± 1,2 <sup>Aa</sup>                 | 11,73 ± 1,0 <sup>Aa</sup>  |
|                        | <i>Somatória de ácidos graxos n 3 (%)</i> |                            |
| 4                      | 4,43 ± 0,5 <sup>Ba</sup>                  | 3,73 ± 0,2 <sup>Bb</sup>   |
| 8                      | 4,67 ± 0,8 <sup>Ab</sup>                  | 4,79 ± 1,5 <sup>Aa</sup>   |
|                        | <i>Ácidos graxos saturados (%)</i>        |                            |
| 4                      | 59,88 ± 3,9 <sup>Ab</sup>                 | 62,93 ± 1,4 <sup>Aa</sup>  |
| 8                      | 55,22 ± 0,4 <sup>Bb</sup>                 | 58,69 ± 2,1 <sup>Ba</sup>  |
|                        | <i>Ácidos graxos monosaturados (%)</i>    |                            |
| 4                      | 13,19 ± 0,7 <sup>Ab</sup>                 | 17,69 ± 0,9 <sup>Aa</sup>  |
| 8                      | 12,31 ± 0,9 <sup>Bb</sup>                 | 16,56 ± 4,0 <sup>Ba</sup>  |
|                        | <i>Ácidos graxos poliinsaturados (%)</i>  |                            |
| 4                      | 25,96 ± 3,0 <sup>Ba</sup>                 | 19,35 ± 2,4 <sup>Ba</sup>  |
| 8                      | 32,43 ± 1,3 <sup>Aa</sup>                 | 24,72 ± 1,89 <sup>Ab</sup> |

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula comparação na coluna minúscula comparação na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A interação entre nível de carboidratos e processamentos mostrou que o aumento de carboidratos elevou as médias de  $\Sigma n3$ ,  $\Sigma n6$  e AGI. As dietas extrusadas com alto nível de carboidratos (50%) apresentaram maiores valores de  $\Sigma n3$  e AGI. Os maiores valores de  $\Sigma n6$  foram observados para as dietas extrusadas (Tabela 19).

Tabela 19 - Interação de níveis de carboidratos e processamentos no perfil de ácidos graxos do filé de pacu.

| Processamentos                           | Níveis de carboidratos    |                           |
|--|---------------------------|---------------------------|
|  | 40                        | 50                        |
| <i>Somatória de ácidos graxos n3 (%)</i> |                           |                           |
| Peletização                              | 4,20 ± 0,3 <sup>Ab</sup>  | 4,46 ± 0,05 <sup>Ba</sup> |
| Extrusão                                 | 3,96 ± 0,1 <sup>Bb</sup>  | 5,00 ± 1,4 <sup>Aa</sup>  |
| <i>Somatória de ácidos graxos n6 (%)</i> |                           |                           |
| Peletização                              | 17,37 ± 3,3 <sup>Bb</sup> | 23,13 ± 4,7 <sup>Ba</sup> |
| Extrusão                                 | 20,41 ± 3,6 <sup>Ab</sup> | 24,56 ± 2,1 <sup>Aa</sup> |
| <i>Ácidos graxos saturados (%)</i>       |                           |                           |
| Peletização                              | 63,30 ± 5,0 <sup>Aa</sup> | 56,36 ± 4,7 <sup>Bb</sup> |
| Extrusão                                 | 59,51 ± 1,5 <sup>Ba</sup> | 57,55 ± 1,2 <sup>Ab</sup> |
| <i>Ácidos graxos monosaturados (%)</i>   |                           |                           |
| Peletização                              | 15,89 ± 0,3 <sup>Ab</sup> | 16,18 ± 0,7 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão                                 | 14,99 ± 1,9 <sup>Ba</sup> | 12,69 ± 2,4 <sup>Bb</sup> |
| <i>Ácidos graxos insaturados (%)</i>     |                           |                           |
| Peletização                              | 35,67 ± 5,0 <sup>Bb</sup> | 43,64 ± 4,7 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão                                 | 39,02 ± 1,6 <sup>Ab</sup> | 42,39 ± 1,2 <sup>Aa</sup> |

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula comparação na coluna minúscula comparação na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A interação entre níveis de lipídeos e processamentos das dietas mostrou que o aumento de lipídeos elevou as médias de LT, AGS, AGM e AGP. As dietas extrusadas em comparação com as dietas peletizadas apresentaram médias superiores de AGP e AGI e médias inferiores de AGM. Contudo, as dietas extrusadas com baixo lipídeos revelaram aumento de LT e  $\Sigma n6$  e diminuição de  $\Sigma n3$  e AGS, e as com alto nível de lipídeos mostraram aumento de  $\Sigma n3$  e AGS e diminuição de  $\Sigma n6$ , em comparação com as dietas peletizadas (Tabela 20).



Tabela 20 - Interação de nível de lipídeos e processamentos no perfil de ácidos graxos do pacu.

| Processamentos                           | Níveis de lipídeos (%)    |                           |
|--|---------------------------|---------------------------|
|  | 4                         | 8                         |
| <i>Lipídeos totais do filé (%)</i>       |                           |                           |
| Peletização                              | 6,83 ± 1,2 <sup>Bb</sup>  | 12,20 ± 1,5 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão                                 | 8,51 ± 5,0 <sup>Ab</sup>  | 11,37 ± 2,8 <sup>Aa</sup> |
| <i>Somatória de ácidos graxos w3 (%)</i> |                           |                           |
| Peletização                              | 5,00 ± 0,8 <sup>Aa</sup>  | 3,66 ± 0,2 <sup>Bb</sup>  |
| Extrusão                                 | 4,10 ± 1,1 <sup>Bb</sup>  | 4,86 ± 1,2 <sup>Aa</sup>  |
| <i>Somatória de ácidos graxos w6 (%)</i> |                           |                           |
| Peletização                              | 21,27 ± 2,1 <sup>Ba</sup> | 19,23 ± 4,9 <sup>Ab</sup> |
| Extrusão                                 | 26,48 ± 0,7 <sup>Aa</sup> | 18,48 ± 6,4 <sup>Bb</sup> |
| <i>Ácidos graxos saturados (%)</i>       |                           |                           |
| Peletização                              | 59,08 ± 0,9 <sup>Ab</sup> | 60,58 ± 3,3 <sup>Ba</sup> |
| Extrusão                                 | 56,01 ± 1,2 <sup>Bb</sup> | 61,05 ± 3,7 <sup>Aa</sup> |
| <i>Ácidos graxos monosaturados (%)</i>   |                           |                           |
| Peletização                              | 13,19 ± 3,4 <sup>Ab</sup> | 18,88 ± 1,8 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão                                 | 12,31 ± 4,5 <sup>Bb</sup> | 15,37 ± 1,4 <sup>Ba</sup> |
| <i>Ácidos graxos poliinsaturados (%)</i> |                           |                           |
| Peletização                              | 20,72 ± 5,4 <sup>Bb</sup> | 27,46 ± 4,0 <sup>Ba</sup> |
| Extrusão                                 | 24,59 ± 3,6 <sup>Ab</sup> | 29,69 ± 3,5 <sup>Aa</sup> |
| <i>Ácidos graxos insaturados (%)</i>     |                           |                           |
| Peletização                              | 40,89 ± 0,9 <sup>Ba</sup> | 38,42 ± 3,2 <sup>Aa</sup> |
| Extrusão                                 | 43,83 ± 1,2 <sup>Aa</sup> | 37,58 ± 3,7 <sup>Ab</sup> |

Médias seguidas da mesma letra (maiúscula comparação na coluna, minúscula comparação na linha) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 4.7 Intermediários metabólicos

### 4.7.1 Aumento de carboidratos em dietas com 4% de lipídeos

O aumento de carboidratos nas dietas peletizadas diminuiu o teor de aminoácidos livres e aumentou a amônia no fígado. No músculo branco houve diminuição de lactato, aminoácidos livres e amônia, bem como aumento no conteúdo de triglicerídeos (TG) e ácidos graxos livres (AGL). No plasma houve diminuição de lactato. Os demais parâmetros mantiveram-se constantes.

O aumento de carboidratos nas dietas extrusadas aumentou as concentrações de piruvato, aminoácidos livres e amônia no tecido hepático. No plasma não foram observados

mudanças significativas. No músculo branco houve aumento da concentração de glicose (Tabela 21).

Tabela 21 - Intermediários metabólicos de pacus submetidos ao aumento de carboidratos em dietas com 4% de lipídeos.

| Órgão /<br>Metabólitos | Dietas peletizadas        |                            | Dietas extrusadas         |                           |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                        | 40% CHO                   | 50% CHO                    | 40% CHO                   | 50%CHO                    |
| <b>Fígado</b>          |                           |                            |                           |                           |
| Glicogênio             | 419,79 ± 61,7             | 342,59 ± 68,7              | 418,68 ± 84,5             | 504,55 ± 27,2             |
| Glicose                | 124,57 ± 32,7             | 97,73 ± 30,7               | 151,97 ± 16,60            | 133,88 ± 27,4             |
| Piruvato               | 0,81 ± 0,1                | 0,93 ± 0,1                 | 0,26 ± 0,2 <sup>b</sup>   | 0,61 ± 0,1 <sup>a</sup>   |
| Lactato                | 13,83 ± 2,7               | 13,88 ± 2,8                | 24,08 ± 5,5 <sup>a</sup>  | 13,18 ± 1,6 <sup>b</sup>  |
| Proteína               | 5,49 ± 2,2                | 4,47 ± 1,0                 | 4,76 ± 1,7                | 5,26 ± 1,4                |
| AAL                    | 18,21 ± 0,6 <sup>A</sup>  | 14,26 ± 2,1 <sup>B</sup>   | 13,33 ± 1,5 <sup>b</sup>  | 16,81 ± 1,3 <sup>a</sup>  |
| Amônia                 | 71,84 ± 13,1 <sup>B</sup> | 108,14 ± 10,8 <sup>A</sup> | 27,98 ± 12,3 <sup>b</sup> | 71,33 ± 13,9 <sup>a</sup> |
| TG                     | 14,49 ± 2,0               | 17,99 ± 2,0                | 35,08 ± 2,0               | 56,71 ± 11,3              |
| AGL                    | 2,81 ± 0,7                | 3,84 ± 0,7                 | 1,87 ± 0,3                | 3,11 ± 0,5                |
| <b>Plasma</b>          |                           |                            |                           |                           |
| Glicose                | 55,35 ± 7,8               | 59,56 ± 5,3                | 67,63 ± 0,8               | 75,63 ± 6,8               |
| Piruvato               | 0,18 ± 0,0                | 0,22 ± 0,0                 | 0,29 ± 0,0                | 0,27 ± 0,0                |
| Lactato                | 4,63 ± 0,6 <sup>A</sup>   | 2,98 ± 0,4 <sup>B</sup>    | 7,03 ± 2,1                | 5,82 ± 0,7                |
| Proteína               | 12,66 ± 1,9               | 14,65 ± 2,4                | 6,95 ± 1,7                | 5,64 ± 0,5                |
| AAL                    | 8,72 ± 0,8                | 7,09 ± 1,0                 | 6,92 ± 0,3                | 7,65 ± 0,7                |
| Amônia                 | 3,44 ± 0,2                | 3,80 ± 0,1                 | 3,76 ± 0,5                | 4,32 ± 0,5                |
| TG                     | 1,87 ± 0,2                | 1,39 ± 0,2                 | 1,54 ± 0,1                | 1,53 ± 0,2                |
| <b>Músculo Branco</b>  |                           |                            |                           |                           |
| Glicogênio             | 14,52 ± 0,8               | 13,74 ± 1,6                | 13,42 ± 1,1               | 12,89 ± 1,6               |
| Glicose                | 35,40 ± 3,5               | 32,32 ± 3,7                | 31,89 ± 1,0 <sup>b</sup>  | 42,06 ± 3,3 <sup>a</sup>  |
| Piruvato               | 0,66 ± 0,1                | 0,83 ± 0,0                 | 0,74 ± 0,1                | 0,64 ± 0,1                |
| Lactato                | 9,96 ± 0,5 <sup>A</sup>   | 7,04 ± 1,3 <sup>B</sup>    | 8,40 ± 1,7                | 9,04 ± 0,7                |
| Proteína               | 2,56 ± 0,6                | 4,01 ± 1,5                 | 2,90 ± 0,7                | 3,93 ± 0,5                |
| AAL                    | 28,01 ± 8,2 <sup>A</sup>  | 14,16 ± 0,4 <sup>B</sup>   | 7,25 ± 0,9                | 6,08 ± 2,2                |
| Amônia                 | 3,43 ± 0,6 <sup>A</sup>   | 2,38 ± 0,2 <sup>B</sup>    | 2,65 ± 0,4                | 3,35 ± 0,2                |
| TG                     | 3,50 ± 0,8 <sup>B</sup>   | 11,98 ± 2,8 <sup>A</sup>   | 21,81 ± 7,4               | 18,00 ± 8,8               |
| AGL                    | 4,88 ± 0,01 <sup>B</sup>  | 8,77 ± 0,8 <sup>A</sup>    | 8,52 ± 1,5                | 8,51 ± 0,1                |

Valores expressos em média ± D,P, de n=9 peixes, AAL – aminoácidos livres, AGL – ácidos graxos livres, TG - triglicerídeos, Glicogênio (μmolglicosil/mg de tecido); proteína (mg/g de tecido ou ml de plasma); demais metabólitos (μmol/g de tecido ou ml de plasma). Médias seguidas da mesma letra (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.7.2 Aumento de carboidratos em dietas com 8% de lipídeos

O aumento de carboidratos nas dietas peletizadas ocasionou um aumento da amônia no fígado. No plasma ocorreu aumento de glicose e diminuição do lactato. As respostas do

músculo branco foram: aumento de glicose e TG, diminuição de piruvato, lactato, aminoácidos livres e amônia.

Nas dietas extrusadas, o aumento de carboidratos resultou em aumento de glicogênio e de TG hepático, e diminuição da proteína plasmática. No músculo branco houve aumento de piruvato e diminuição de aminoácidos livres (Tabela 22).

Tabela 22 - Intermediários metabólicos de pacus submetidos ao aumento de carboidratos em dietas com alto (8%) nível de lipídeos.

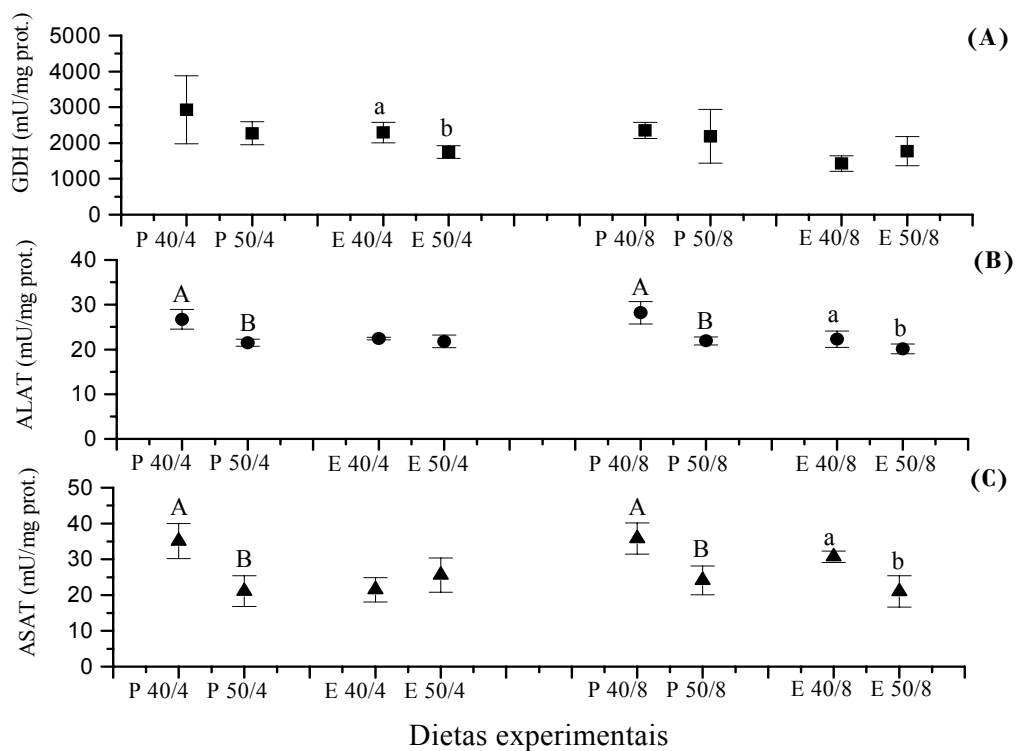
| Órgão /<br>Metabólitos | Dietas peletizadas        |                            | Dietas extrusadas          |                            |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                        | 40% CHO                   | 50% CHO                    | 40% CHO                    | 50% CHO                    |
| <b>Fígado</b>          |                           |                            |                            |                            |
| Glicogênio             | 389,04 ± 69,7             | 475,67 ± 74,0              | 538,27 ± 47,1 <sup>b</sup> | 659,97 ± 56,9 <sup>a</sup> |
| Glicose                | 153,40 ± 32,9             | 125,45 ± 12,4              | 168,51 ± 38,0              | 185,35 ± 26,8              |
| Piruvato               | 0,95 ± 0,1                | 0,86 ± 0,1                 | 0,52 ± 0,1                 | 0,55 ± 0,1                 |
| Lactato                | 13,23 ± 0,4               | 13,19 ± 1,1                | 10,86 ± 0,6                | 11,73 ± 1,3                |
| Proteína               | 4,29 ± 1,5                | 4,01 ± 2,1                 | 4,74 ± 0,2                 | 3,72 ± 0,9                 |
| AAL                    | 18,23 ± 2,4               | 18,17 ± 0,6                | 15,88 ± 2,7                | 18,88 ± 0,8                |
| Amônia                 | 81,51 ± 13,9 <sup>B</sup> | 161,57 ± 12,2 <sup>A</sup> | 69,31 ± 8,5                | 77,39 ± 13,7               |
| TG                     | 18,21 ± 3,6               | 16,27 ± 2,1                | 46,03 ± 6,5 <sup>b</sup>   | 57,53 ± 6,6 <sup>a</sup>   |
| AGL                    | 2,27 ± 0,3                | 3,38 ± 0,3                 | 2,56 ± 0,2                 | 2,70 ± 0,4                 |
| <b>Plasma</b>          |                           |                            |                            |                            |
| Glicose                | 62,78 ± 7,7 <sup>B</sup>  | 81,64 ± 8,8 <sup>A</sup>   | 77,45 ± 5,1                | 72,42 ± 5,4                |
| Piruvato               | 0,23 ± 0,0                | 0,21 ± 0,0                 | 0,28 ± 0,1                 | 0,26 ± 0,0                 |
| Lactato                | 3,11 ± 0,4 <sup>A</sup>   | 1,93 ± 0,4 <sup>B</sup>    | 5,99 ± 1,6                 | 6,30 ± 2,1                 |
| Proteína               | 12,37 ± 1,0               | 11,29 ± 2,4                | 5,92 ± 0,3 <sup>a</sup>    | 4,72 ± 0,6 <sup>b</sup>    |
| AAL                    | 7,27 ± 1,1                | 8,28 ± 0,4                 | 8,19 ± 0,4                 | 8,02 ± 0,3                 |
| Amônia                 | 3,41 ± 0,5                | 3,88 ± 0,2                 | 4,30 ± 0,3                 | 4,18 ± 0,8                 |
| TG                     | 1,87 ± 0,3                | 1,47 ± 0,1                 | 1,59 ± 0,1                 | 1,26 ± 0,1                 |
| <b>Músculo Branco</b>  |                           |                            |                            |                            |
| Glicogênio             | 13,74 ± 3,1               | 14,16 ± 0,1                | 14,33 ± 2,0                | 13,26 ± 1,1                |
| Glicose                | 30,22 ± 3,7 <sup>B</sup>  | 45,89 ± 3,2 <sup>A</sup>   | 34,89 ± 2,5                | 39,57 ± 7,9                |
| Piruvato               | 0,91 ± 0,1 <sup>A</sup>   | 0,57 ± 0,1 <sup>B</sup>    | 0,55 ± 0,1 <sup>b</sup>    | 0,69 ± 0,0 <sup>a</sup>    |
| Lactato                | 9,85 ± 1,5 <sup>A</sup>   | 6,79 ± 0,6 <sup>B</sup>    | 8,57 ± 0,4                 | 9,06 ± 0,8                 |
| Proteína               | 2,55 ± 0,4                | 3,61 ± 0,5                 | 4,69 ± 0,8                 | 3,64 ± 1,0                 |
| AAL                    | 20,37 ± 2,3 <sup>A</sup>  | 15,08 ± 2,0 <sup>B</sup>   | 11,19 ± 1,0 <sup>a</sup>   | 6,83 ± 1,2 <sup>b</sup>    |
| Amônia                 | 3,52 ± 0,3                | 2,98 ± 0,4                 | 2,89 ± 0,6                 | 3,57 ± 0,5                 |
| TG                     | 4,10 ± 0,5 <sup>B</sup>   | 14,86 ± 4,3 <sup>A</sup>   | 16,94 ± 6,6                | 21,20 ± 6,4                |
| AGL                    | 13,41 ± 0,6               | 10,99 ± 0,5                | 10,28 ± 0,1                | 12,47 ± 0,3                |

Valores expressos em média ± D,P, (n=9 peixes), AAL – aminoácidos livres, AGL – ácidos graxos livres, TG - triglicerídeos, Glicogênio (μmolglicosil/mg de tecido); proteína (mg/g de tecido ou ml de plasma); demais metabólicos (μmol/g de tecido ou ml de plasma). Médias seguidas da mesma letra (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.8 Enzimas metabólicas

Nas dietas peletizadas com 4 e 8% de lipídeos o aumento de carboidratos, levou a diminuição da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALAT) e aspartato aminotransferase (ASAT) (Figura 9 B, C).

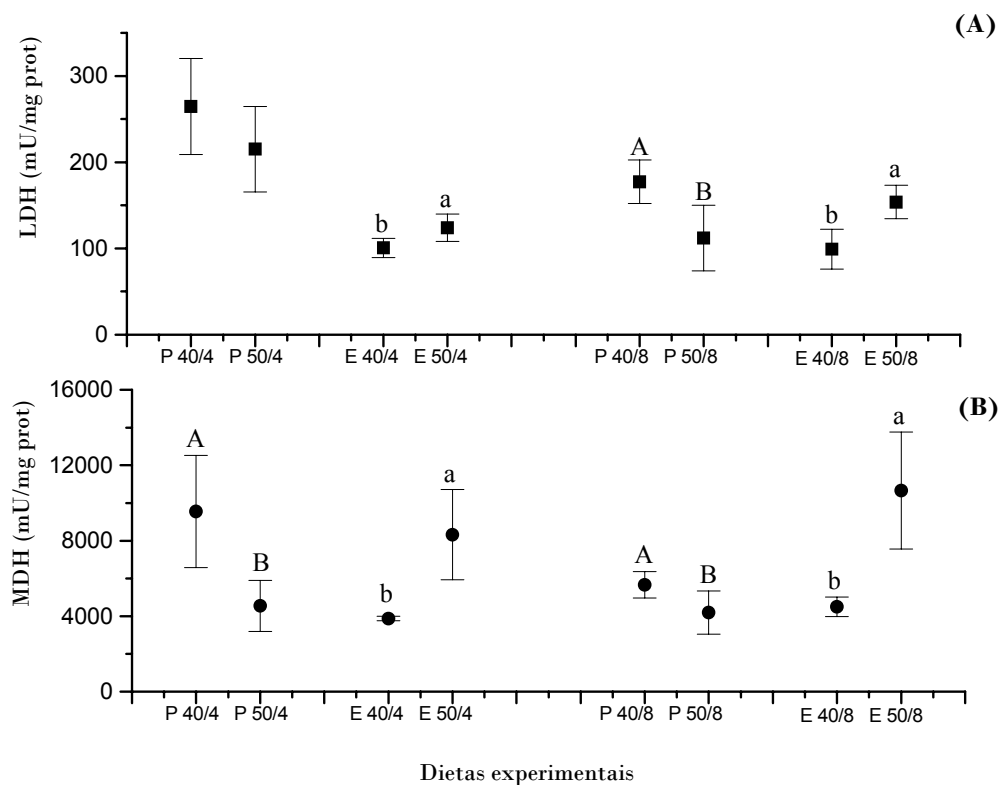
Nas dietas extrusadas com 4% de lipídeos e 50% de carboidratos (E 50/4), o aumento de carboidratos levou à diminuição da atividade da glutamato desidrogenase (GDH) (Figura 9A). Nas dietas E 50/8, ocorreu diminuição da atividade da ALAT e da ASAT (Figura 9 B, C).



**Figura 9-** Atividade enzimática da (A) glutamato desidrogenase (GDH), (B) alanina aminotransferase (ALAT) e da (C) aspartato aminotransferase (ASAT) no fígado de pacu. Letra diferente (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) reporta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média ( $n=9$ )  $\pm$  D.P. (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos).

Nas dietas peletizadas com 4% de lipídeos, o aumento de carboidratos resultou em diminuição da atividade da malato desidrogenase (MDH) (Figura 10B). O aumento de carboidratos em dietas com 8% de lipídeos causou diminuição da atividade da MDH (Figura 10B) e da lactato desidrogenase (LDH) (Figura 10A).

Nas dietas extrusadas, independentemente do nível de lipídeos, o aumento de carboidratos aumentou a atividade da MDH e da LDH (Figura 10A, B).



**Figura 10-**Atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) e da malato desidrogenase (MDH) no fígado de pacu. Letra diferente (maiúscula para peletizadas e minúscula para extrusadas) reporta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média ( $n=9$ )  $\pm$  D.P. (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos).

## 4.9 Análises Histológicas

### 4.9.1 Morfologia do fígado

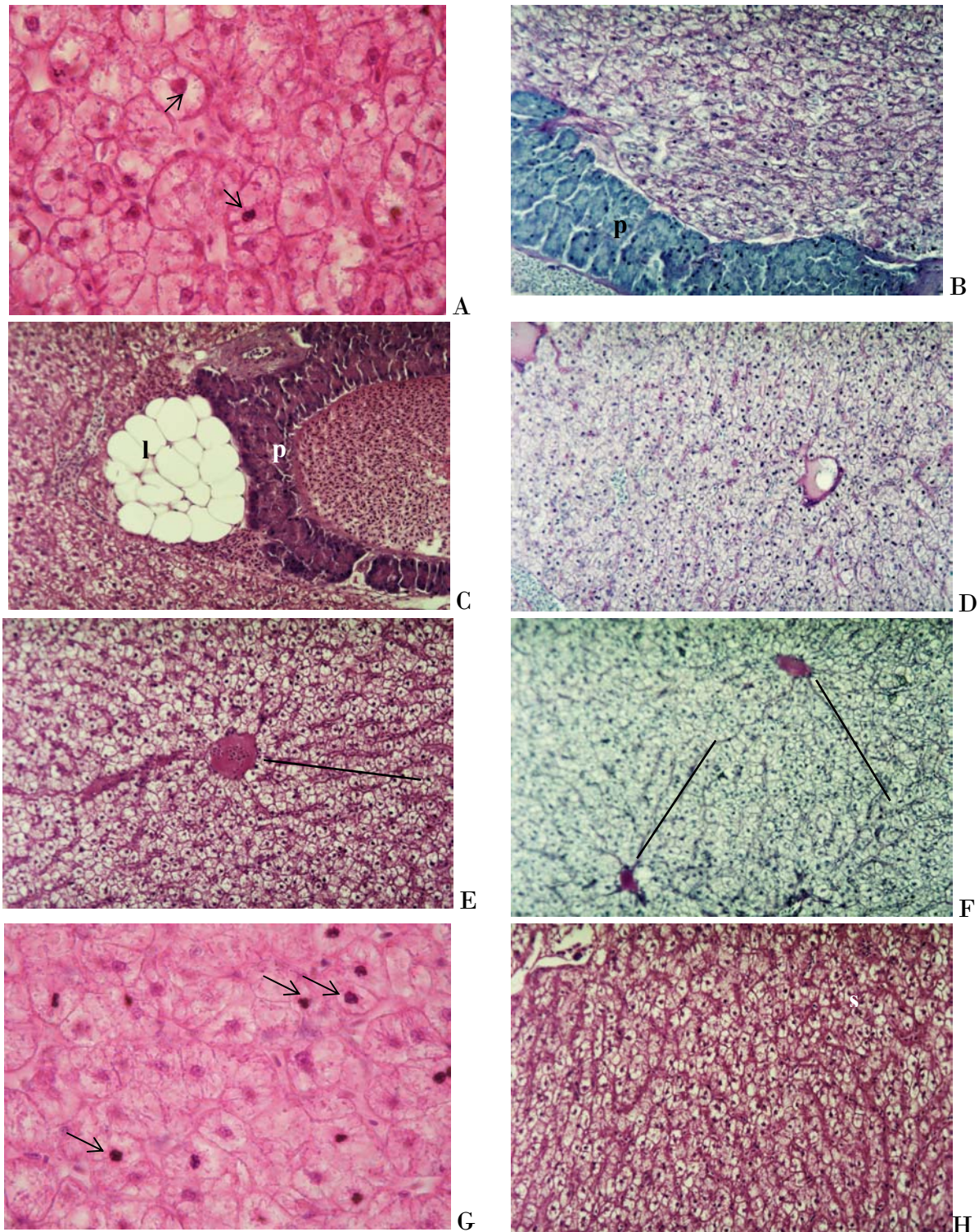
No parênquima hepático do pacu observamos hepatócitos arranjados em cordões, podendo ou não apresentar vacuolização, núcleos com variação de diâmetro e condensação da cromatina (Figura 11).

Os peixes alimentados com a dieta P 40/4 e com a dieta E 40/4 apresentaram tecido hepático com arranjo cordonal normal com hepatócitos organizados.

O fígado dos peixes alimentados com a dieta P 40/8 apresentou alguns hepatócitos arredondados. O tecido hepático de pacus alimentados com a dieta E 40/8 exibiram hepatócitos com núcleo central e citoplasma acidófilo e alguns núcleos deslocados para a periferia da célula. O padrão de arranjo cordonal apresentou-se com pequenas alterações em algumas partes.

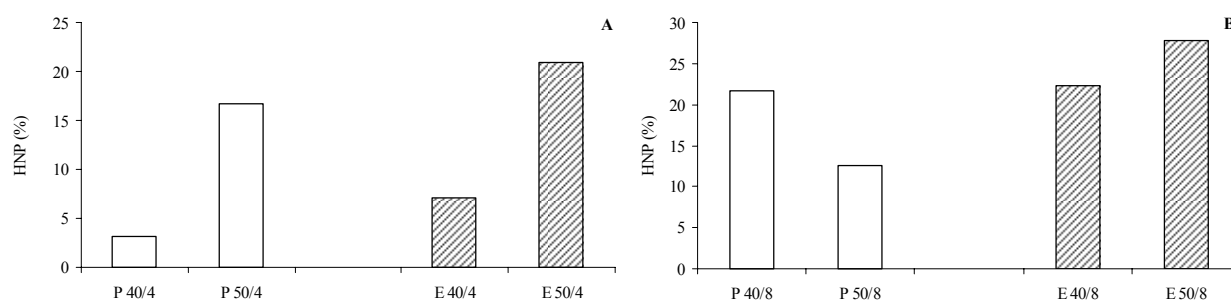
Nos peixes alimentados com a dieta P 50/4, o tecido hepático se apresentou vascularizado, com a grande maioria dos hepatócitos de forma arredondada e maior número de núcleos acidófilos. Nas dietas E 50/4 houve um desarranjo cordonal por toda extensão do tecido. Os hepatócitos apresentaram formato arredondado com núcleo deslocado para a periferia. O tecido apresentou-se com profunda congestão sanguínea.

Nos peixes alimentados com a dieta P 50/8, o desarranjo cordonal foi evidente. Por outro lado, o citoplasma apresentou-se menos acidófilo e com diminuição da vascularização. Os peixes alimentados com a dieta E 50/8 apresentaram as mesmas alterações que os tratamentos E 50/4: desarranjo cordonal, formato arredondado com núcleo deslocado para a periferia e profusa congestão sanguínea.



**Figura 11-**Foto micrografia do hepatócito de juvenis de pacu submetidos às dietas peletizadas ou extrusadas. (A) hepatócito com núcleos picnóticos (*ponta da seta*). H/E 100x. P 40/4 (B) hepatopâncreas (p). PAS/H 20 x. E 40/4, (C) inclusão de lipídeo (l). H/E 20 x. P 50/4, (D) acúmulo de glicogênio. PAS/H 20 x. E 50/4, (E) arranjo cordonal dos hepatócitos (*linha*). H/E 20 x. P 40/8, (F) desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos (*linha*) PAS/H 20 x. E 40/8, (G) H/E 100x. P 50/8, (H) congestão sanguínea nos sinusóides (s) e desarranjo cordonal (*linha*). H/E 20 x. E 50/8.

Os peixes submetidos as dietas extrusadas apresentaram maior porcentagem de hepatócitos com núcleo picnótico (HNP), essa diferença acentuou-se com o aumento de carboidratos nas dietas. O aumento de carboidratos nas dietas com baixo nível de lipídeos aumentou 5,3 vezes a porcentagem de HNP para as dietas peletizadas e 2,9 vezes para as extrusadas (Figura 12 A). O aumento de carboidratos em dietas com alto nível de lipídeos reduziu a porcentagem de HNP nas dietas peletizadas e aumentou 1,33 vezes para as extrusadas (Figura 12B).

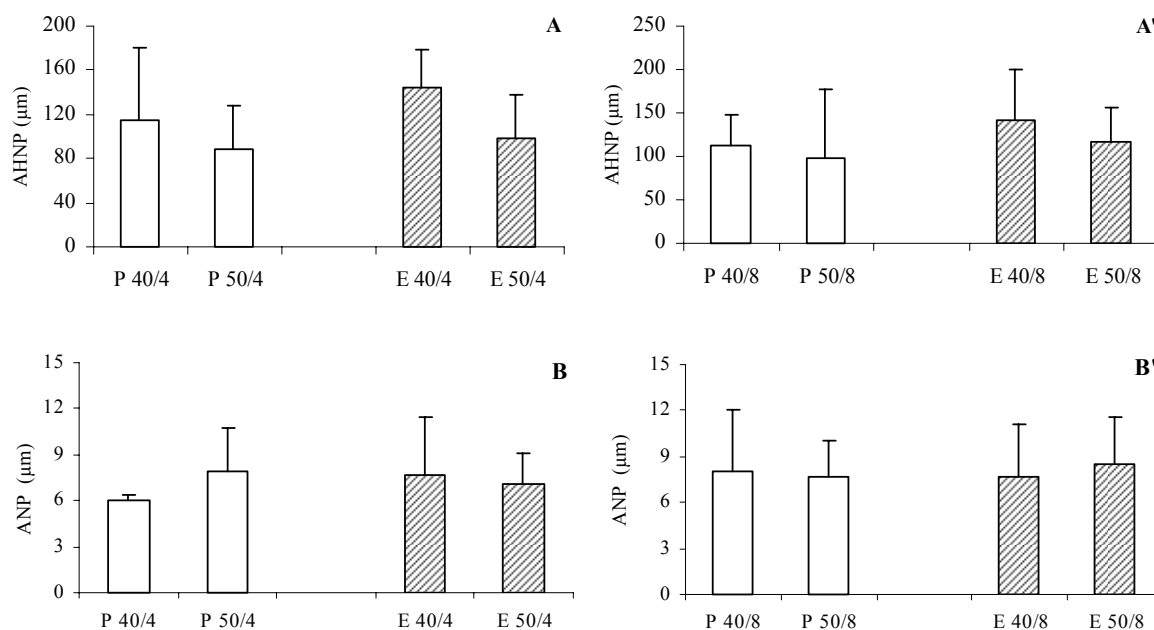


**Figura 12-**Porcentagem de hepatócitos com núcleos picnóticos (HNP) de pacu submetidos ao aumento de carboidratos em dietas (peletizada ou extrusada) com (A) baixo e (B) dietas com alto nível de lipídeos. (P – peletizado; E – extrusado; 40 e 50 níveis de carboidratos; 4 e 8 níveis de lipídeos).

Foi realizada a morfometria do hepatócito e de seus respectivos núcleos. Para isso, foram separados os hepatócitos com núcleo picnótico e os hepatócitos com núcleo normal (não picnótico).

A área dos hepatócitos (AHNP) e a área dos núcleos picnóticos (ANP) dos peixes submetidos ao aumento de carboidratos em dietas com baixo nível (Figura 13 A, B) e alto nível (Figura 13 A', B') de lipídeos, processadas por peletização e extrusão não foram significativamente diferentes.

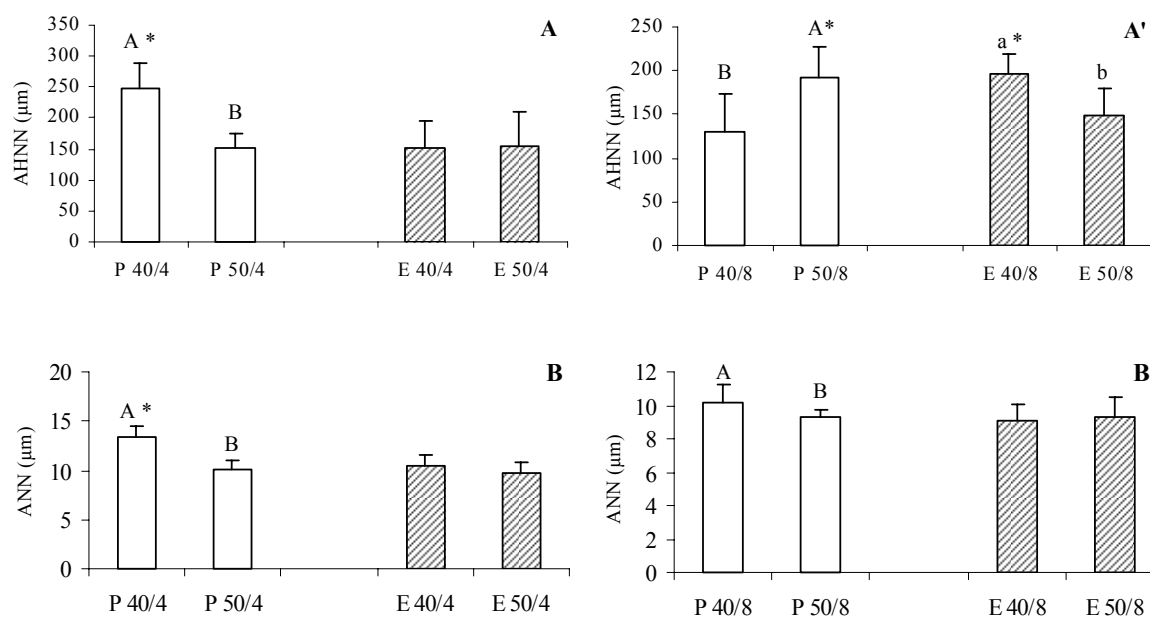




**Figura 13-**Hepatócitos com núcleo picnótico: A) AHNP - Área do hepatócito que apresentavam núcleo picnótico B) ANP - área do núcleo picnótico de pacu. Letra diferente (minúscula comparação entre dietas peletizadas e maiúscula comparação entre dietas extrusadas, (\*) comparação entre processamentos) reporta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E - extrusado, 40 e 50 – níveis de carboidratos; 4 e 8 – níveis de lipídeos).

A morfometria dos hepatócitos com núcleos considerados normais (não picnóticos) dos peixes alimentados com dietas extrusadas revelaram área de hepatócitos (AHNN) menor que nos peixes de dietas peletizadas, com exceção da dieta com 40% de carboidratos e 8% de lipídeos (Figura 14A, A'). O aumento de carboidratos nas dietas peletizadas com 4% de lipídeos (Figura 14A) e das dietas extrusadas com 8% de lipídeos diminuiu a área do hepatócito (Figura 14A').

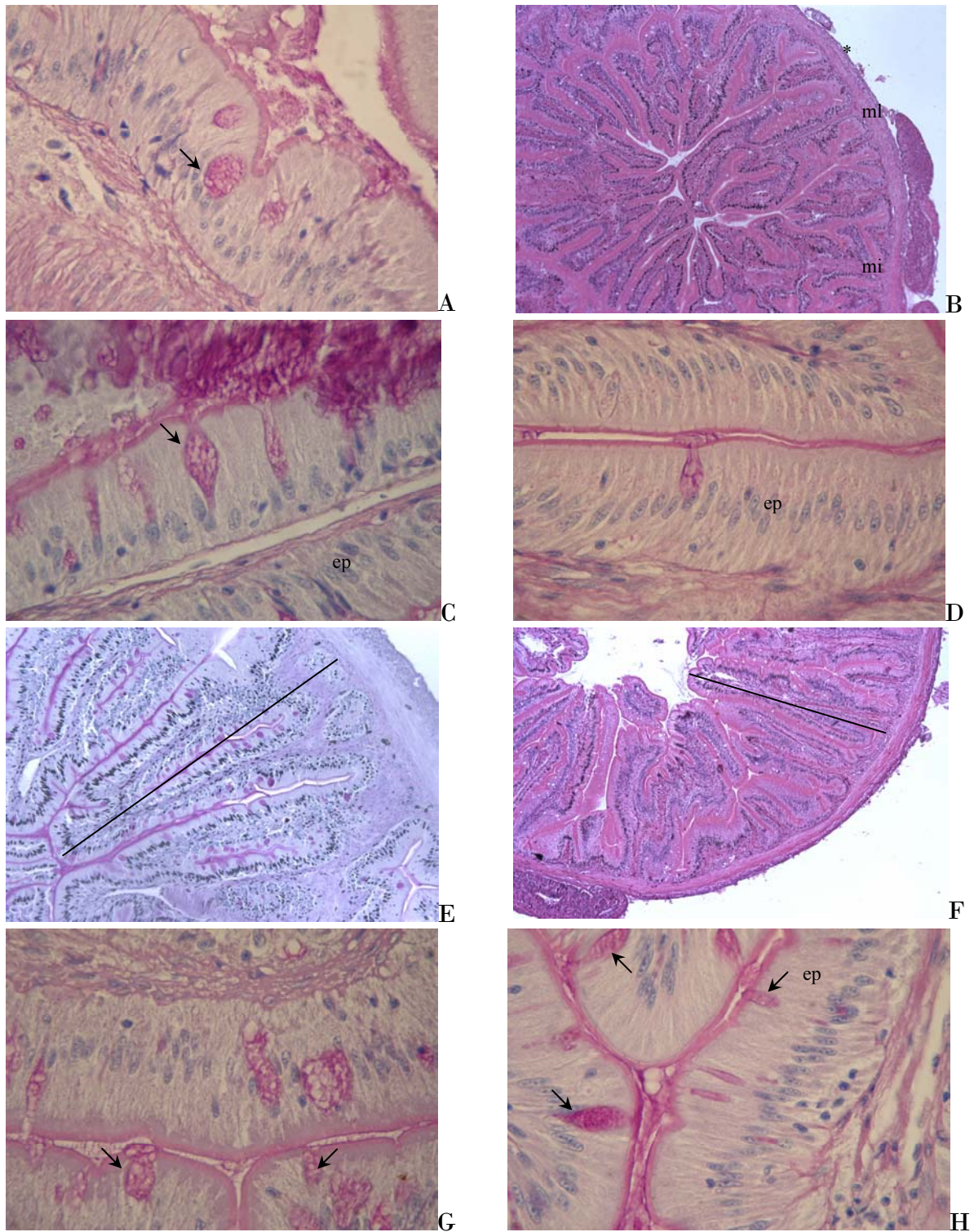
Os peixes alimentados pelas dietas extrusadas apresentaram menor área do núcleo (ANN) em relação às dietas peletizadas. O aumento de carboidratos nas dietas peletizadas, independentemente do nível de lipídeos, diminuíram a área do núcleo do hepatócito (Figura 14B, B').



**Figura 14-**Hepatócitos com núcleo normal: A, A') AHNN - Área do hepatócito com núcleo normal; B, B') ANN - área do núcleo do hepatócito. Letra diferente (maiúscula comparação entre dietas peletizadas e minúscula comparação entre dietas extrusadas, (\*) comparação entre processamentos) reporta diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  D.P. (P-peletizado, E - extrusado, 40 e 50 - níveis de carboidratos; 4 e 8 - níveis de lipídeos).

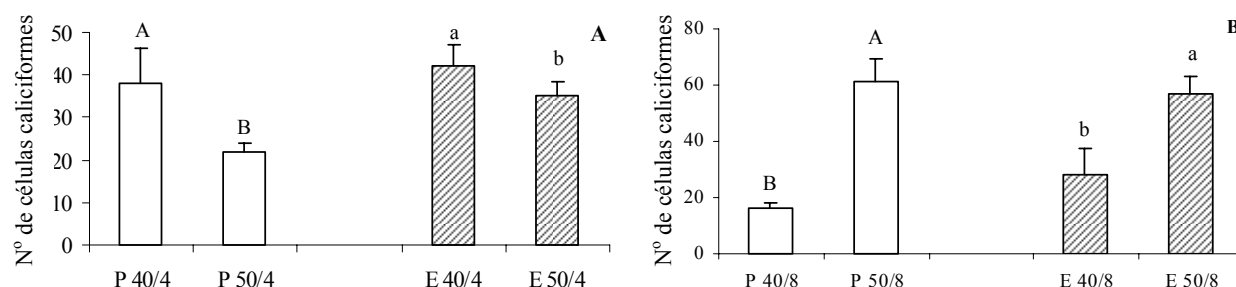
#### 4.9.2 Morfologia do intestino anterior

No tubo digestório, a porção do intestino anterior exibiu uma camada mucosa composta por epitélio colunar simples. A submucosa é constituída por tecido conjuntivo frouxo e elástico, e a camada muscular é dividida em camada circular interna e longitudinal externa, recobertas externamente pela camada serosa (Figura 15).



**Figura 15-**Foto micrografia de intestino anterior de juvenis de pacu submetidos às dietas peletizadas ou extrusadas - (A) células caliciformes (seta), PAS/H 100x, P40/4; (B) muscular longitudinal (ml), camada muscular interna (mi), serosa (\*), H/E 20x, E40/4; (C) P50/4; (D) epitélio da mucosa (ep) E50/4; (E) altura da camada longitudinal (linha) PAS/H 20x, E40/4, (F) altura da camada da mucosa (linha) H/E 10x, E40/8, (G) células caliciformes PAS/H 100x, P50/8; (H) células caliciformes PAS/H 100x, E50/8.

Na mucosa a reação de PAS mostrou células caliciformes, e a intensidade de coloração variou em relação à dieta ofertada. Nas dietas com baixo nível de lipídeos (Figura 16 A) o aumento de carboidratos diminuiu o número de células caliciformes. No entanto, nas dietas com alto nível de lipídeos (Figura 16B) observou-se maior número de células caliciformes conforme o aumento de carboidratos.



**Figura 16-**Quantidade relativa de células caliciformes nas vilosidades do intestino anterior do pacu submetidos ao aumento de carboidratos em dietas (peletizadas ou extrusadas) com (A) baixo e (B) alto nível de lipídeos. Letras diferentes (maiúscula comparação entre dietas peletizadas e minúscula comparação entre dietas extrusadas) reportam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E - extrusado, 40 e 50 – níveis de carboidratos; 4 e 8 – níveis de lipídeos).

A reação de PAS na borda escovada (glicocalix) mostrou que os peixes alimentados com dietas extrusadas apresentaram células mais reativas do que os peixes alimentados com dietas peletizadas. Contudo, o aumento de carboidratos aumentou a intensidade da reação (Tabela 23).

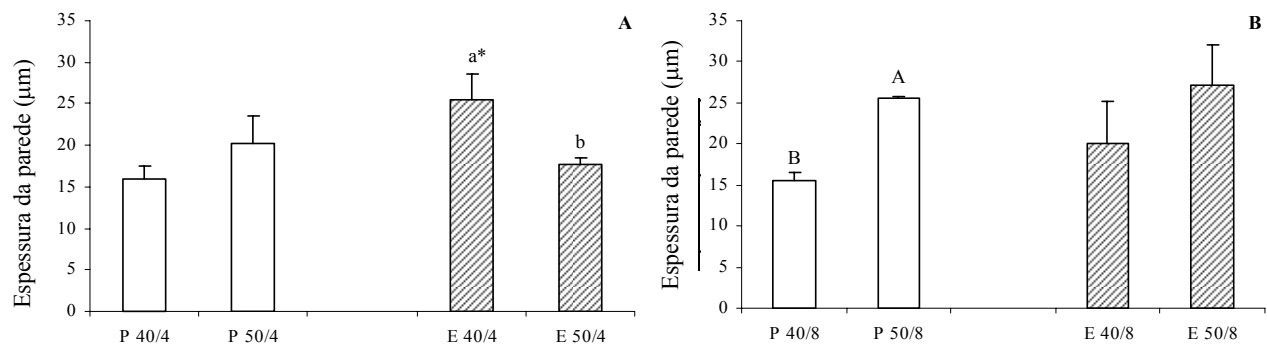
**Tabela 23 -** Teste histoquímico realizado no intestino anterior do pacu evidenciando a intensidade de reação do glicocalix.

| Dietas peletizadas | PAS | Dietas extrusadas | PAS |
|--------------------|-----|-------------------|-----|
| P 40/4             | +   | E 40/4            | ++  |
| P 50/4             | ++  | E 50/4            | +++ |
| P 40/8             | ++  | E 40/8            | ++  |
| P 50/8             | ++  | E 50/8            | +++ |

Intensidade da coloração da borda escovada: (+) fraca; (++) média; (+++) forte, (P- peletizado, E extrusado, 40 e 50 – níveis de carboidratos; 4 e 8 – níveis de lipídeos),

A espessura da parede intestinal nos peixes alimentados com dietas extrusadas apresentou-se maior em relação às dietas peletizadas, nas dietas com baixo conteúdo de carboidratos e lipídeos (40/4). O aumento de carboidratos em dietas extrusadas com 4% de lipídeos diminuiu a espessura da parede intestinal (Figura 17 A). Contudo, o aumento de

carboidratos em dietas com 8% de lipídeos aumentou a espessura da parede intestinal em ambos os processamentos (Figura 17B).



**Figura 17-** Espessura da parede do intestino anterior do pacu submetidos ao aumento de carboidratos em dietas (peletizada ou extrusada) com (A) baixo e (B) alto nível de lipídeos. Letras diferentes (maiúscula comparação entre dietas peletizadas e minúscula comparação entre dietas extrusadas) reportam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  D.P. (P- peletizado, E - extrusado, 40 e 50 – níveis de carboidratos; 4 e 8 – níveis de lipídeos).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização das dietas experimentais

Metodologias relacionadas à preparação das dietas, tais como extrusão ou peletização, são utilizadas com o objetivo de incrementar a eficiência da dieta, aproveitando o potencial de digestão e a absorção do animal (FARIA & STABILLE, 2007). Diversos trabalhos vêm enfatizando que as dietas extrusadas para peixes apresentam melhor eficiência do que as peletizadas (BOOTH et al., 2000; VENOU et al., 2003; CHENG & HARDY, 2003), mas o pacu obteve boas respostas de crescimento com dietas peletizadas.

O processo de peletização confere às dietas maior preservação dos carboidratos, os quais são liberados lentamente no organismo. Esta característica intrínseca à forma de processamento pode ter proporcionado as melhores respostas de crescimento para pacu, visto que, por ser uma espécie de hábito alimentar onívoro, ele utiliza muito bem os carboidratos complexos (MUNÓZ-RAMIREZ, 2005).

O processo de extrusão ocasiona rompimento dos grânulos de amido através das rupturas das pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxilas (LAWRENCE, 1985), promovendo assim amidos modificados (GROSSMANN et al., 1998). A utilização de amidos modificados pode melhorar a digestibilidade (MELLO Jr., 1991) e a eficiência de retenção de nutrientes em espécies carnívoras (VENOU et al., 2003; CHENG & HARDY (2003).

As características das dietas foram alteradas pelo processamento aplicado à matéria prima. De forma geral, a peletização é uma operação de moldagem na qual a partícula fina é aglomerada em forma compacta (BEHNKE, 1996; DONZIER, 2001) e o processo de extrusão permite a obtenção de matéria prima com amido gelatinizado (LEONEL et al., 2006).

Os níveis de nutrientes como os carboidratos e os lipídeos são fatores que afetam a eficiência de produção de pellets pela peletizadora e também pela extrusora (LEONEL, et al., 2006) e como consequência altera as características do produto final como acabamento do pellets e estabilidade deste na água (GUO et al., 2006).

As dietas extrusadas e as peletizadas com altos níveis de lipídeos apresentaram redução da flutuabilidade e na lixiviação de proteínas, o que aumentou a sua estabilidade. Este fato se deve a maior coesão das partículas, o que reflete o aumento da densidade e da estabilidade do pellet.

Segundo Furuya et al. (1998) o efeito da extrusão sobre os nutrientes influencia o crescimento do animal devido a menor perda de nutrientes pela lixiviação melhorando a

qualidade da água. Dietas extrusadas comparadas com dietas peletizadas apresentaram-se mais densas conforme o aumento de lipídeos. Toledo, (2004) relata que altos níveis de lipídeos na massa que será extrusada provocam diminuição do atrito da massa no canhão de extrusão consequentemente altera a eficiência de expansão dos pellets (TOLEDO, 2004).

Dentre as alterações provocadas pelo processo de extrusão a mais comum é a gelatinização do amido. A gelatinização do amido resulta em aumento na absorção de água pela molécula resultando em aumento a fluabilidade do pellet (BATAGLIA, 1990). Dietas processadas a temperaturas entre 50 e 80° C gelatinizam o amido tornando-o mais solúvel e levando a absorção de grandes quantidades de água (GOELEMA, 1999). Com isso o presente conjunto de resultados ressalta o alto grau de gelatinização do amido das dietas extrusadas.

O aumento de carboidratos nas dietas extrusadas diminuiu a lixiviação de proteína. O sucesso no processo de extrusão está relacionado ao nível de carboidrato das dietas (TOLEDO, 2004). Portanto, o aumento de carboidrato nas dietas refletiu em aumento de amido gelatinizado e maior coesão da partícula que consequentemente aumentou a estabilidade do pellet, diminuindo as perdas de nutrientes para água.

## 5.2 Digestibilidade aparente e tempo de trânsito gastrointestinal das dietas

O processamento aplicado à dieta tem conseqüências diretas sobre a digestibilidade e o tempo de trânsito. Observou-se que o processo de extrusão provocou alterações na estrutura da dieta alterando os coeficientes de digestibilidade de nutrientes para o pacu. Também se observou que os níveis de carboidratos e lipídeos das dietas interagiram contribuindo assim para essas alterações observadas nos coeficientes de digestibilidade. De forma geral, os níveis de carboidratos e de lipídeos estão correlacionados com o processamento aplicado à dieta. Diversos autores vêm ressaltando que o processo de extrusão provoca alterações na composição química dos ingredientes, melhorando os coeficientes de digestibilidade das dietas de *O. mykiss* (CHENG & HARDY et al. 2003) e de *Oreochromis niloticus* (AMIRKOLAIE et al., 2006). Neste trabalho ficou evidente que o aumento de carboidratos nas dietas extrusadas aumentou os coeficientes de digestibilidade.

A melhora dos coeficientes de digestibilidade das dietas extrusadas em comparação com as dietas peletizadas deve-se primeiramente à gelatinização do amido pelo processo de extrusão tornando assim mais eficiente a digestão. O processamento do amido, resultando em gelatinização, facilita a interação com a  $\alpha$ -amilase (RAWLES & GATLIN, 2000). A eficiência

do processo de extrusão aumenta linearmente com o nível de amido da dieta, e a gelatinização do amido apresenta essa correspondência.

A melhora na disponibilidade da energia das dietas extrusadas foi demonstrada para *O. mykiss* (KAUSHIK & OLIVA-TELES, 1985), *Cyprinus carpio*, tilápia híbrida *Oreochromis niloticus* X *O. aureus* e carpa-do-limo *Ctenopharyngodon idella* (TAKEUCHI et al., 1994). Os coeficientes de digestibilidade da energia e do amido são melhores proporcionalmente ao nível de amido gelatinizado em dietas para *C. carpio* (HERNÁNDEZ et al., 1994). O processo de extrusão de diferentes fontes de carboidratos na dieta de *S. aurata* proporcionou os melhores coeficientes de digestibilidade dos nutrientes (VENOU et al., 2003). O processo de gelatinização do amido pela extrusão aumenta o coeficiente de digestibilidade do amido, porém não altera o CDPB para *O. niloticus* (AMIRKOLAIE et al., 2006).

As diferentes respostas observadas nos CDPB revelam que o tipo de processamento interage com o nível de lipídeos dietário. Nas dietas peletizadas constatou-se aumento no CDPB conforme o aumento de lipídeos da dieta. Nas dietas extrusadas não se observou diferença para inclusão de lipídeos, provavelmente pela disponibilidade de carboidratos gelatinizado. Contudo, para *O. niloticus* o aumento no nível de lipídeos em dietas extrusadas melhora gradativamente os CDEB, CDPB e CDMS, possibilitando o uso conjugado de fontes energéticas (TOLEDO, 2004). O uso conjugado de altos níveis de fontes de energia (carboidratos e lipídeos) refletiu em aumento dos CDMS e CDEB. O uso de grandes quantidades de fontes energéticas para estimular o efeito poupador de proteína é um dos artifícios utilizados na nutrição de organismos aquáticos. O aumento de carboidratos em dietas com baixo conteúdo de proteína aumenta o CDEB para o *P. mesopotamicus* (ABIMORAD & CARNEIRO, 2007). Porém, o aumento de carboidratos em dietas para *S. salar* prejudica os CDEB e CD do amido. Essas diferenças entre as espécies devem-se principalmente ao hábito alimentar (HEMRE et al., 2002). O *P. mesopotamicus* por ser uma espécie onívora que apresenta habilidade em digerir altos níveis de carboidratos também aproveita eficientemente a fração lipídica (MUÑOZ-RAMIREZ, 2005).

O aumento no nível de lipídeos para 8% nas dietas com 40% de carboidratos proporcionou diminuição nos CDMS e CDEB, o que não ocorreu nas dietas com 50% de carboidrato. Estes resultados podem ser associados à formação do complexo estável entre a amilose e o lipídeo denominada de complexos do tipo V (CORRADINI et al., 2005), diminuindo assim a exposição dos nutrientes ao ataque enzimático. Tharanathan (2002)



relata que a digestibilidade do amido também pode ser afetada por fatores intrínsecos, como a presença de complexos amido-lipídio e amido-proteína.

A influência da dieta no tempo de trânsito gastrointestinal (TTGI) já foi avaliada para *C. macropomum* (SILVA et al., 2003; MENDONÇA et al., 2006) para *O. niloticus* (LANNA et al., 2004) para *S. auratus* (VENOU et al., 2003) e bacalhau *Atlantic cod* (HANSEN et al., 2006). A influência do processamento da dieta na permanência do alimento no trato digestório do *P. mesopotamicus* resultou em TTGI inferior nos peixes alimentados com dietas extrusadas. Isto pode estar associado à maior disponibilidade dos nutrientes provocada pela gelatinização do amido. Leenhouders et al., (2006) descrevem que altos níveis de carboidrato nas dietas afetam a viscosidade do bolo alimentar que consequentemente aumenta a velocidade de passagem da dieta pelo trato digestório diminuindo assim a ação das enzimas digestivas e as possibilidades de absorção dos nutrientes.

Silva et al. (2003) ressalta que a curta permanência das dietas no trato digestório resulta em menor aproveitamento do alimento devido ao menor tempo de exposição às enzimas digestivas. Contudo, tempo excessivo de permanência do alimento no trato digestório também seria prejudicial, afetando o desempenho (MEURER et al., 2003) ocasionando proliferação de microorganismos (BEDFORD, 1995) e enterotoxinas bacterianas (YIN et al., 2000). O processamento do amido gera diferenças na sua absorção e interfere na estabilidade fecal (AMIRKOLAIE et al., 2006) o que certamente muda as características da digestão.

Vários modelos foram propostos para descrever o esvaziamento gástrico em diversas espécies (GARCIA & ADELMAN, 1985; HOSSAIN et al., 2000; VENOU et al., 2003). Neste trabalho, o TTGI ajustou-se o modelo ao processamento aplicado à dieta. Estes dados evidenciaram a adaptação dos peixes ao aumento de nutrientes e ao processamento aplicado a dieta, possibilitando desta forma otimização dos processos digestivos. Para *S. auratus* o TTGI adequou-se a um modelo exponencial (VENOU et al., 2003). O uso de diferentes fontes de proteína de origem vegetal na alimentação do *Atlantic cod* levou a adequação do TTGI para modulação em equação linear (HANSEN et al., 2006).

### 5.3 Enzimas digestivas

As mudanças no tipo, fonte e quantidade de alguns nutrientes podem alterar o perfil enzimático ou a quantidade de enzimas digestivas. Estudos de enzimas digestivas já foram

realizados em algumas espécies neotropicais como *P. mesopotamicus* (MORAES & BIDINOTTO, 2000); *Pseudoplatystoma coruscans* (LUNDSTEDT, 2003); *Colossoma macropomum* (ALMEIDA et al., 2006; CORRÊA et al., 2007); *Brycon amazonicus* (Camilo et al., 2008 *no prelo*), sendo que o aumento da atividade das enzimas digestivas pode estar relacionado à melhora de utilização de nutrientes (LHOSTE et al., 1994).

Atualmente, o maior desafio da nutrição de organismos aquáticos é a utilização de carboidratos como substituto de proteína (KIRCHNER et al., 2003). A utilização dos carboidratos entre as diversas espécies de peixes depende da complexidade da fonte de carboidratos (YAMAMOTO et al., 2000), do nível de carboidratos (KAUSHIK, 1989) e do processamento aplicado à dieta (VENOU et al., 2003). A extrusão vem se mostrando eficiente na destruição da ordem na molécula de amido produzindo assim amidos modificados solúveis (ROONEY & PFLUGFELDER, 1986) e mais suscetíveis à ação das enzimas digestivas (KAUSHIK & OLIVA-TELES, 1985).

A atividade amilohidrolítica do trato digestório de pacu apresentou-se relacionada ao processamento aplicado à dieta, sendo que os maiores valores relativos foram obtidos para as dietas extrusadas, podendo se atribuir à diferença conferida às mudanças nas propriedades da molécula de amido extrusado, o que o torna mais suscetível à ação enzimática (ROONEY & PFLUGFELDER, 1986) conferindo assim maior disponibilidade de glicose. A glicose pode influenciar diretamente a produção de amilase pelo tecido pancreático, ou indiretamente, estimulando a liberação de insulina pelo pâncreas que atuaria estimulando sua produção (JOBILING, 1994). O aumento da atividade da amilase intestinal também é maior em *Labeo rohita* alimentada com amido gelatinizado (KUMAR et al., 2006). O uso de fontes de carboidratos extrusados também apresenta maior valor da atividade da amilase no trato digestório de *S. aurata* em comparação a fontes cruas (VENOU et al., 2003).

Contudo, nas dietas extrusadas com 4% lipídeos, o aumento de carboidratos diminuiu a atividade amilohidrolítica. Estes resultados podem ser reflexos da diminuição da ingestão da dieta devido ao aumento do aporte energético. Lemos et al. (2002) relatam que o aumento da viscosidade do meio reflete-se no aumento da saciedade, em menor taxa de absorção no intestino e no decréscimo do índice glicêmico. A diminuição da atividade da amilase de *O. mykiss* em função do aumento de carboidratos na dieta é atribuída à adsorção da enzima na molécula de amido (SPANNOF & PLANTKOW, 1983). Outra hipótese que pode ser considerada é a diminuição do substrato (amido) em função da formação de complexo estável entre a amilose e o lipídeo durante o processo de extrusão. Estas estruturas cristalinas

tridimensionais são altamente estáveis o que confere resistência à hidrólise enzimática (LOBO et al., 2003) associado a isto, o sucesso do processo de extrusão apresenta correlação positiva com o aumento de carboidratos das dietas.

Nas dietas com alto nível de lipídeos, o aumento de carboidratos resultou em indução da atividade da amilase nos cecos pilóricos dos peixes alimentados com as dietas peletizadas, mas nas extrusadas não acarretou diferença. Em *C. macropomum* alimentado com dietas peletizadas com altos níveis de carboidratos também há aumento na atividade das carboidratases no trato digestório (CORRÊA et al., 2007). A variação na atividade da amilase ao longo do trato digestório do *P. coruscans* é responsiva ao nível de amido nas dietas peletizadas (LUNDSTEDT et al., 2004). Desta forma, pode-se inferir que a atividade distinta da amilase em dietas com níveis diferentes de lipídeos foi resultado da indução por outros fatores que não unicamente os carboidratos adicionados à dieta.

Alguns autores ressaltam que o ajuste do perfil enzimático pode estar associado a substratos não específicos (CORRÊA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2006; CAMILO et al., 2008 *no prelo*). O estímulo das carboidratases (amilase e maltase) no trato digestório de *C. macropomum* também não é unicamente devido aos seus substratos (CORRÊA et al., 2007). A atividade da amilase no trato digestório de *Brycon amazonicus* é responsiva à adição de aminoácidos à dieta sem amido (CAMILO et al., 2008 *no prelo*). O ajuste da amilase no trato digestório de *C. macropomum* também é dependente da oferta de proteína e de lipídeo da dieta (ALMEIDA et al., 2006).

A maltase no trato digestório de *P. mesopotamicus* segue o mesmo comportamento da amilase nas dietas com 4% de lipídeos, contudo observou-se diminuição da atividade. Corrêa et al. (2007) observaram comportamento conjugado entre amilase e maltase e indutivos ao aumento de carboidratos nas dietas. No geral, a atividade das carboidratases do trato digestório de peixes está associada ao nível de carboidratos da dieta (MORAES & BIDINOTTO, 2000; CORRÊA et al., 2007). O processamento de carboidratos, que afeta sua disponibilidade, alterou a atividade das carboidratases provavelmente pela maior oferta de energia disponível. Apesar de espécies onívoras apresentarem um alto potencial amilohidrolítico isso não implica em que a digestibilidade de carboidratos seja maior que a digestibilidade de proteína (HIDALGO et al., 1999).

A maior atividade de lipase foi verificada no intestino posterior do pacu. Estudos da digestão *in vitro* e *in vivo* em diferentes frações do trato digestório de *Scophthalmus maximus* sugerem que lipólise não específica na região posterior do canal alimentar é a maior

responsável pela digestão de lipídio (KOVEN et al., 1997). Contudo, estudos sobre alterações na atividade da lipase apresentam-se muito divergentes na literatura. Enquanto *C. carpio* submetidas a níveis crescentes de lipídeo na dieta não alteram a atividade da lipase (MANJAPPA et al., 2002), em *P. corruscans* o aumento de lipídeos na dieta provoca diminuição da atividade da lipase nas porções anterior e média do trato digestório (LUNDSTEDT, 2003) e em *Brycon cephalus* essa atividade é ajustável pela quantidade de lipídeo na dieta (REIMER, 1982). Os processos tecnológicos aplicados à dieta podem proporcionar mudanças na digestibilidade dos nutrientes (WILSON, 1994; STONE, 2003) e com isso alterar o comportamento das enzimas digestivas. No presente trabalho foi observado que o processamento de dieta influenciou o comportamento desta enzima.

O aumento de carboidratos em dietas extrusadas com baixo conteúdo de lipídeos aumentou a atividade da lipase. Amaral et al. (2007) também observou que *B. amazonicus* apresentam a lipase estomacal indutivas a baixo conteúdo de lipídeo da dieta, atribuindo estas respostas à preferência energética lipídica da espécie. Com isso podemos inferir com base na resposta da lipase digestiva do pacu, que o lipídeo é uma fração indispensável para esta espécie.

A atividade da protease inespecífica no intestino anterior foi maior nas dietas extrusadas do que nas peletizadas. O aumento da atividade das proteases digestivas das dietas extrusadas pode ser atribuída à maior disponibilidade de nutrientes, tanto pela gelatinização do amido como também pela destruição de fatores anti-nutricionais (EXTRUSADOS, 2003). A presença de fatores anti-nutricionais (inibidores enzimáticos) devido a grandes quantidades de frutos e sementes na alimentação de *C. macropomum* diminui a atividade da tripsina (KOHILA et al., 1992). A maior atividade das proteases frente ao amido gelatinizado também é observada em *Labeo rohita*, alimentado com dietas contendo baixo teor de proteína (KUMAR et al., 2006).

O aumento de carboidratos nas dietas com 8% de lipídeos induziu ao aumento das proteases inespecífica no pacu. Kumar et al. (2006) também observaram aumento da atividade proteolítica no fígado de *Labeo rohita* alimentados com dietas contendo níveis crescentes de amido, correlacionando esta maior atividade proteolítica ao efeito poupador de proteína pelo carboidrato. A maior atividade proteolítica para *C. macropomum* é observada quando os valores de fibra, lipídio e proteína convergem, atribuindo-se esta resposta à necessidade de um ajuste desses componentes para a indução desta enzima (ALMEIDA, 2006). De forma controversa, o aumento de carboidratos na dieta de *C. macropomum* resultou

em diminuição da atividade específica da protease ácida, sendo atribuída a diminuição na relação proteína/carboidrato (CORRÊA et al., 2007). Neste contexto, o aumento de carboidratos com diminuição da concentração de proteína na alimentação de *P. coruscans* também não altera a atividade de protease inespecífica sendo estas consideradas constitutivas (LUNDSTEDT et al., 2004).

A tripsina é considerada uma enzima chave no processo digestivo de proteínas, uma vez que é responsável pela ativação de outras enzimas proteolíticas, dentre elas a quimiotripsina (SUNDE et al., 2004). As proteases alcalinas (tripsina e quimiotripsina) foram observadas em algumas secções do trato digestório do pacu, sendo que a tripsina ficou restrita aos cecos pilóricos e a quimiotripsina aos cecos pilóricos e intestinos. Este mesmo padrão de comportamento das proteases alcalinas é encontrado em *C. macropomum* cujas atividades de proteases alcalinas encontram-se nos cecos e intestinos (CORRÊA et al., 2007). Em *S. salar* a tripsina é a enzima proteolítica dominante na digestão nos cecos pilóricos enquanto que a quimiotripsina é mais expressiva na digestão ao longo do intestino (RUNGRUANGSAK-TORRISSEN et al., 2006).

A tripsina e a quimiotripsina dos cecos pilóricos de pacu alimentado com dietas extrusadas com 4% de lipídeos seguem o mesmo padrão da protease inespecífica, onde o aumento de carboidratos induziu a atividade proteolítica. Isto sugere que ambas as enzimas são responsáveis pela digestão proteolítica nesta secção do trato digestório. Porém a tripsina secretada nos cecos pilóricos aparentemente era a responsável pela ativação da quimiotripsina tornando-se atuante nas demais secções do trato digestório de pacu. Em *B. amazonicus*, a semelhança entre o perfil da atividade de tripsina e de protease inespecífica nos cecos pilóricos revela que tripsina é uma enzima chave na digestão protéica nesta seção do trato digestório (CAMILO et al., 2008 *no prelo*). Este fato também foi reportado em *S. auratus* onde houve aumento da atividade da tripsina nos peixes alimentados com amido extrusado em comparação aos amidos crus (VENOU et al., 2003).

Os pacus submetidos à alimentação peletizada com 4% de lipídeos não revelaram qualquer diferença na atividade de tripsina e quimiotripsina. Neste contexto, *C. macropomum* submetido ao aumento de carboidratos e diminuição de proteína não revela respostas na indução da atividade destas enzimas (CORRÊA et al., 2007).

De forma geral, observa-se que as enzimas digestivas de pacu são moduladas tanto pelos nutrientes, com já reportado para outras espécies aquáticas (LUNDSTEDT et al., 2004;

ALMEIDA, et al., 2006; CORRÊA et al., 2007; VENOUE et al., 2003; MELO, 2004; KUMAR et al., 2006), como pelo processamento aplicado à dieta.

Igualmente, o pacu apresenta capacidade de se adaptar a diferentes processamentos aplicados à dieta uma vez que nas extrusadas com baixo lipídeo houve adaptação da amilase e nas dietas com alto conteúdo de lipídeos houve indução das proteases digestivas. Sendo assim inferimos que há modulação das enzimas digestivas do pacu frente ao processamento aplicado à dieta.

#### 5.4 Crescimento

Diversos trabalhos vêm enfatizando o direcionamento da proteína da dieta para o crescimento, tornando-a economicamente eficiente e ambientalmente sustentável. Esse efeito está diretamente ligado ao processamento das dietas tais como observado no presente trabalho. A complexidade, o processamento e a concentração de carboidratos na dieta são fatores que afetam sua utilização pelos peixes (HERMER et al., 2002). As fontes energéticas, tais como carboidratos solúveis e lipídeos refletem-se na otimização da proteína dietética assim como na sua disponibilidade (NANKERVIS et al., 2000). Diversos autores enfatizam ainda que o aumento na taxa de eficiência protéica deve-se à utilização de carboidratos digestíveis, o que varia entre as espécies principalmente devido aos seus hábitos alimentares (KIM & KAUSHIK, 1992; MUÑOZ-RAMIREZ, 2005).

O consumo de dietas extrusadas foi inferior ao consumo das dietas peletizadas. A inclusão de amido gelatinizado em dietas reduz o consumo de dietas em peixes carnívoros como *Dicentarchus labrax* (PERES et al., 1999). No entanto, Andrigueto et al. (1981) descreve que as dietas extrusadas apresentam-se mais palatáveis o que pode levar ao aumento do consumo. No presente trabalho, o aumento do consumo das dietas peletizadas não se refletiu em baixo índice de conversão alimentar, dado o crescimento satisfatório dos pacus. A taxa de eficiência protéica e a conversão alimentar foram maiores nos peixes alimentados com dietas extrusadas, o que demonstrou sua eficiência na disponibilização dos nutrientes.

Em dietas com 4% lipídeos, o aumento do nível de carboidratos melhorou o ganho em peso e a taxa de crescimento específico, mostrando um efeito poupador de proteína para este nível. O efeito poupador de proteína pelo carboidrato também foi observado para tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) (CARNEIRO et al., 1994), para o pacu alimentado com dietas com níveis crescentes de proteínas digestíveis (ABIMORADI &

CARNEIRO, 2007) e para alevinos de *Catala catala* alimentados com dietas com baixos níveis de lipídeos e altos níveis de carboidratos (SEENAPPA & DEVARAJ, 1995).

A utilização de lipídeo como fonte de energia está relacionada ao processamento aplicado à dieta devido às interações ocorridas e à disponibilização de glicose. Alevinos de *Paralichthys olivaceus* apresentam decréscimo no crescimento quando alimentados com altos níveis de lipídeos e diminuição de carboidratos (LEE & KIM, 2005). O efeito poupador de proteína pelo lipídeo em *S. aurata* é improvável, pois há aumento no consumo (VALÁZQUES et al., 2006).

Não obstante, pacus submetidos a dietas extrusadas apresentaram boas respostas de crescimento e diminuição do consumo conforme o aumento de lipídeo nas dietas, sugerindo o efeito poupador de proteína pelo lipídeo. Esses dados são sugestivos de uma estrita relação entre o processo de extrusão e a inclusão de lipídeo. Resultados semelhantes de efeito poupador de proteína pelo lipídeo são relatados para alevinos de *Sciaenops ocellatus*, cuja combinação entre baixo nível de energia e alto nível de lipídeo (15.8 MJ·kg<sup>-1</sup> e 100 g/kg lipídeos) é a que mais se destaca (ELLIS & REIGH, 1991).

No entanto, não se pode deixar de enfatizar que o processo de extrusão provoca modificações na molécula de amido, alterando assim a sua digestibilidade e contribuindo como fonte energética na alimentação de pacu. O uso do processamento do amido para torná-lo gelatinizado interfere nas características das dietas, aumentando a superfície de contato para otimização da ação enzimática, refletindo no desempenho animal (KAUSHIK & OLIVATELES, 1985, BOOTH et al., 2002).

O bem estar dos peixes no presente experimento foi avaliado pela correlação entre peso e comprimento denominada fator de condição. A relação peso/comprimento é utilizada para facilitar a estimativa de peso dos peixes e indicar sua condição, o bem estar geral, o acúmulo de gordura ou o desenvolvimento gonadal (ROSSI – WONGTSCHOWKI, 1977). O fator de condição, segundo Weatherley & Gill (1987), é uma forma de mensurar o grau de atividade alimentar da espécie, e se fonte de alimento está sendo aproveitada. A modulação do fator de condição frente à qualidade nutricional da dieta foi verificada em *O. niloticus* submetida a diferentes dietas microencapsuladas (HONORATO et al., 2004). De uma forma geral, o aumento de carboidrato revelou diminuição do fator de condição. Isto pode ser um indicativo de crescimento referente ao acúmulo de gordura. Hemre et al. (2002) não verificaram alteração no fator de condição de *S. salar* alimentados com dietas com níveis crescentes de carboidrato.

### 5.5 Eficiência de retenção de nutrientes

A interação entre nível de carboidratos e nível de lipídeos não foi observada para nenhum dos parâmetros de eficiência de retenção de nutrientes. Isto se deve provavelmente ao fato de os carboidratos e lipídios terem a mesma função energética podendo ambos ser estocados na forma de gordura visceral. Neste contexto, não se observa diferenças na eficiência de retenção de nutrientes e composição corporal de *P. coruscans*, alimentado com dietas com diferentes proporções de carboidratos e lipídeos (MARTINO et al., 2005). Porém, Hemre et al. (2002) relatam que o balanço entre carboidrato e lipídeo na dieta afeta o efeito poupador de proteína e as eficiências de retenção de nutrientes.

Os valores de eficiência de retenção de proteína e proporção de proteína no ganho em peso foram responsivos ao aumento de carboidrato independentemente do processamento aplicado, indicando assim maior produção de músculo pelo uso de carboidrato para fins energéticos e poupando assim as proteínas.

Em peixes, a importância dos carboidratos como fonte de energia ainda é controversa, particularmente com efeito poupador de proteína. Vários autores têm demonstrado melhora na utilização de proteína conforme o aumento da digestibilidade de carboidratos (KIM & KAUSHIK, 1992, AMIRKOLAIE et al., 2006). Contudo, o crescimento e a eficiência de retenção de nutrientes não são afetados, em *O. mykiss* pelo aumento de carboidrato na dieta (KAUSHIK et al., 1989).

O efeito conjugado entre níveis de lipídeos e processamento da dieta influenciou a eficiência de retenção de lipídeo e proporção de lipídeo no ganho em peso. As dietas extrusadas apresentaram as maiores deposições de lipídeo na carcaça. O aumento de lipídeo na carcaça é indício de deterioração do produto final podendo resultar em rejeição do produto pelo mercado consumidor. O incremento do teor de lipídeos na carcaça do *P. mesopotamicus* foi demonstrado ao utilizar-se carboidrato digestível na alimentação (MUÑOZ-RAMIREZ, 2005). Dietas extrusadas favorecem a deposição de lipídeo na carcaça de *O. niloticus* alimentada com dietas com níveis crescentes de carboidratos (TOLEDO, 2004).

Não foram observadas diferenças na eficiência de retenção de lipídeo e na proporção de lipídeo no ganho em peso devidas à inclusão de lipídeos, confirmando assim o uso de lipídeo como fonte de energia em dietas extrusadas e resultando em efeito poupador de proteína pelo lipídeo. Em dietas peletizadas, o aumento de lipídeo contribuiu para o aumento de retenção de lipídeo, mostrando assim a baixa tolerância na utilização de lipídeo e a preferência por carboidrato como fonte de energia não protéica. O efeito poupador de proteína foi



demonstrado em *S. aurata* através de uma fina correlação entre carboidratos e lipídeos na alimentação (VELÁZQUEZ et al., 2006).

### 5.6 Perfil de ácidos graxos do filé de pacu

O nível de lipídeo e a composição de ácidos graxos do filé refletem a qualidade do produto que será comercializado. Rungruangsak-Torrissen et al. (2006) descrevem que a qualidade do músculo é um dos fatores preponderantes para avaliação da qualidade nutricional da dieta.

O aumento de lipídeos totais do filé de pacu foi reflexo do aumento da eficiência de retenção de lipídeos e da proporção de lipídeo no ganho em peso da carcaça dos peixes alimentados com dietas extrusadas. O aumento de lipídeo nas dietas reflete-se na regulação do consumo e no maior acúmulo de lipídeos na carcaça (YAMAMOTO et al., 2001). Em *Lates calcarifer* o aumento de carboidratos e de lipídeos na dieta reflete-se em aumento no conteúdo de lipídeos na carcaça o que conseqüentemente diminui a qualidade do produto final (CATACUTAN & COLOSO et al., 1997). Quanto ao conteúdo lipídico, os animais aquáticos fornecem comumente ácidos graxos de importante valor nutritivo, destacando-se os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (AGPI n-3), alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3), eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3).

Como os AG essenciais não são sintetizados “de novo”, os AG incorporados nos tecidos representam o conteúdo destes nos alimentos ingeridos (FRACALOSSO & LOVELL, 1995; JOBLING et al., 1998). Contudo, o organismo pode fazer síntese de AG a partir de outros nutrientes como carboidratos e proteína, porém, necessita de enzimas que insiram insaturações entre os carbonos 3-4 e 6-7 da sua porção terminal (CURI et al., 2002). Com relação à demanda de ácidos graxos essenciais (AGE) em peixes (TOCHER & GHIONI, 1999), os dulcícolas possuem todas as enzimas capazes de alongar e dessaturar ácidos graxos precursores dessas substâncias (MARTINO & TAKAHASHI, 2001). O aumento de AGPI n-3 foi observado no fígado de *P. coruscum* alimentados com dietas à base de óleo de soja, sugerindo alongamento e desaturação (MARTINO et al., 2002).

Nas dietas extrusadas tanto o aumento de lipídeos como o aumento de carboidratos foi benéfico por proporcionar aumento na quantidade de AGPI n-3 no filé. As concentrações de ácidos graxos AGPI n-3 na carne de peixes, como se sabe, variam de acordo com a espécie e dependem especialmente da dieta consumida pelo peixe. A maior concentração de AGPI nos filés dos peixes alimentados com dietas extrusadas pode representar a melhora na

digestibilidade da fração lipídica, especialmente da farinha de peixe (fonte de n-3). O processo de extrusão afeta a composição dos ingredientes e conseqüentemente altera os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes melhorando em particular o coeficiente de digestibilidade do lipídeo para *O. mykiss* (CHENG & HARDY, 2003).

Nutricionalmente, quanto maior o teor de poliinsaturados melhor é a qualidade do alimento. O aumento de carboidrato nas dietas extrusadas favoreceu a relação n3/n6, principalmente nas dietas com 8% de lipídeos. Diversos estudos vêm enfatizando que a relação entre n-3 e n-6 fornece informações importantes quanto à saúde. Enquanto o n-3 é benéfico o n-6 não tem mesma eficácia (MAYSER et al., 1998; MARTINO et al., 2002; SUÁREZ-MAHECHA et al., 2002). A razão entre n3/n6 é variável entre as espécies de *Brycon* (matrinxã, piraputanga e piracanjuba) e observa-se também diferença entre peixes criados em cativeiro e peixes de ambiente natural (MOREIRA et al. 2003). Druzian et al. (2007) observaram em *Cyprinus carpio* que a alimentação modifica a razão entre n-3/n-6. Moreira et al. (2003) observaram que *Brycon microlepis* no ambiente natural apresenta relação n-3/n-6 maior que peixes cultivados em cativeiro.

## 5.7 Intermediários metabólicos

A preferência metabólica e a regulação das vias metabólicas estão diretamente relacionadas com a exigência nutricional da espécie e a disponibilidade dos nutrientes na dieta. Por isso, a variação na taxa de utilização de diferentes tipos de carboidratos para o crescimento pode ser abordada pelas diferenças nas taxas de digestão (WILSON, 1994; HUTCHINS et al., 1998) que conseqüentemente vão se refletir nas respostas metabólicas.

### 5.7.1 Aumento de carboidrato em dietas peletizadas com 4% de lipídeos

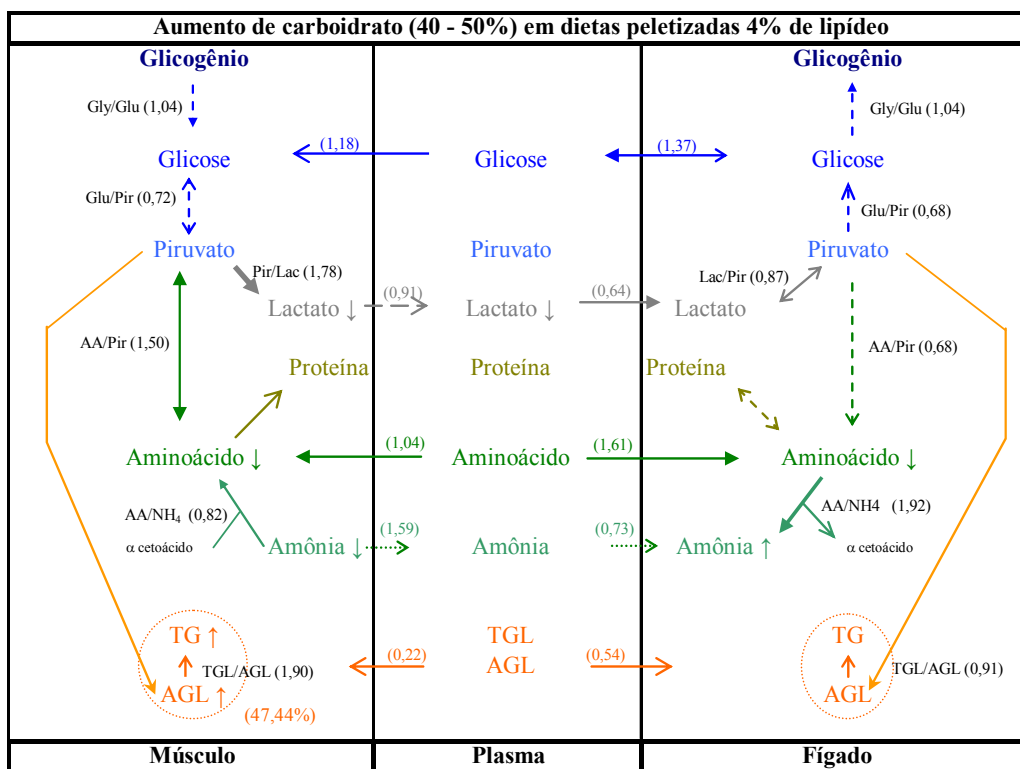
Em dietas peletizadas com 4% de lipídeos o aumento de carboidrato diminuiu as concentrações de lactato e manteve a concentração de piruvato muscular. A diminuição no teor de lactato muscular sugere sua exportação para o fígado e conversão em glicose para posterior metabolismo energético nos demais tecidos. A relação desses dados com o aumento da concentração de ácidos graxos livres e de triglicerídeos do músculo sugere que os pacus alimentados com dietas peletizadas e baixo conteúdo de lipídeo apresentam uma preferência metabólica lipídica em função do aumento de carboidrato. Esses dados não convergem com a proposta de que o músculo branco de peixes que oxida piruvato e lactato em preferência a ácidos graxos (MOYES & WEST, 1995). A utilização de fontes de carboidratos de diferentes

graus de complexidade para “*striped bass*” não revelou a utilização do lactato como precursor gliconeogênico (RAWLES et al., 2008).

Os estoques de glicogênio e glicose do músculo branco de pacu não se alteraram, tal como observado em striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) frente ao aumento do teor ou do grau de complexidade do carboidrato da dieta (RAWLES et al., 2008).

A diminuição da concentração de aminoácidos com aumento na concentração de amônia no fígado sugere a utilização deste substrato para fins energéticos, contudo, apenas vestigial uma vez que aparentemente há entrada de aminoácidos da dieta no fígado.

A figura 18 representa o perfil metabólico e o destino dos metabólitos dos pacus submetidos ao aumento de carboidrato em dietas peletizadas com baixo teor de lipídeos.



**Figura 18-** Resposta metabólica entre músculo e fígado frente ao aumento de carboidrato em dietas peletizadas com 4% de lipídeo na alimentação do pacu. Valores referentes às relações entre as concentrações.

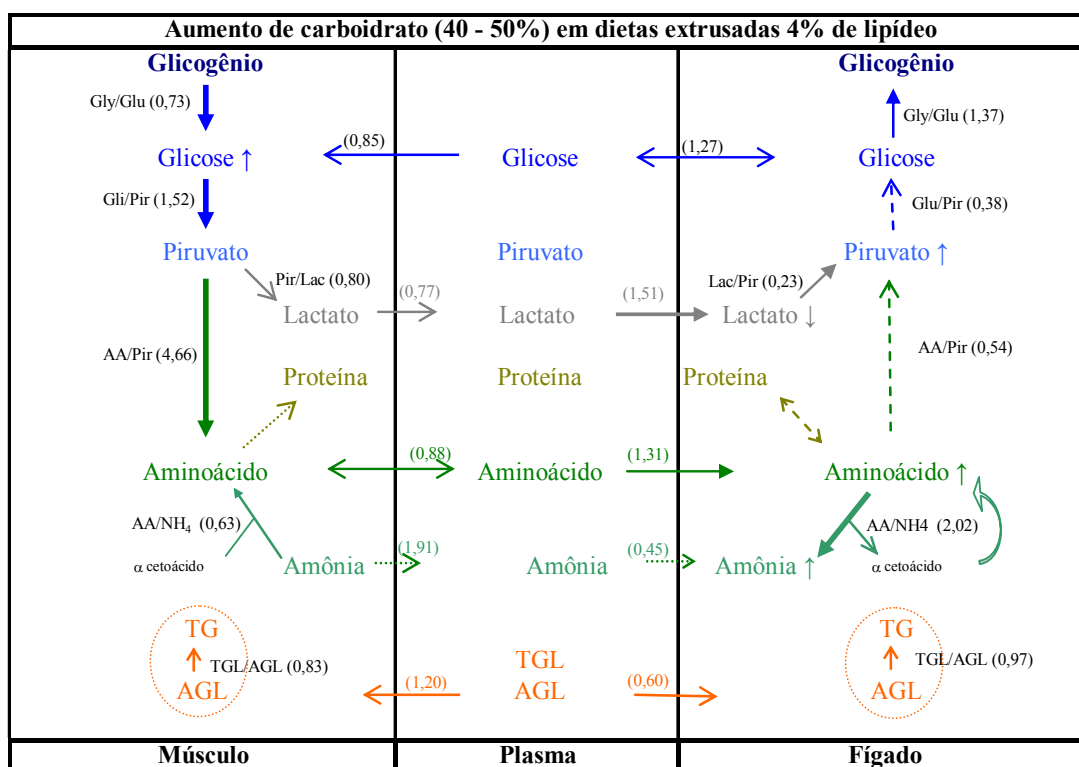
### 5.7.2 Aumento de carboidrato em dietas extrusadas com 4% de lipídeos

Em dietas extrusadas com 4% de lipídeos o acréscimo de carboidratos levou ao aumento de glicose no músculo branco, o que sugere que este metabólito está sendo adquirido através da alimentação devido à sua maior disponibilidade. Esse aumento da disponibilidade dos nutrientes, devido ao processo de extrusão, já foi relatado para *S. aurata* (VENOU et al., 2003) e para *Dicentrarchus labrax* (MOREIRA et al., 2008).

O aumento de carboidratos nas dietas extrusadas resultou em diminuição do lactato com concomitante aumento na concentração de piruvato hepático, o que indica a utilização do lactato como precursor gliconeogênico para a manutenção da glicemia e dos estoques de glicogênio hepático. A manutenção da glicemia em *B. amazonicus* privados de amido na dieta deve-se a precursores não glicídios, como lactato e aminoácidos (CAMILO, 2007). O lactato é um dos substratos mais usados no metabolismo hepático, ressaltando a importância do ciclo de Cori nos peixes para a reciclagem do lactato muscular, *lactato muscular*→*glicose hepática*→*glicogênio muscular* (SUÁREZ & MOMMSEN, 1987).

A concentração de proteína hepática não variou, porém observou-se um aumento nos aminoácidos livres e amônia hepática. No entanto, o teor de proteínas e a concentração de aminoácidos encontravam-se em equilíbrio o que sugere que o catabolismo de proteínas não está exacerbado. O aumento de aminoácidos revela que este metabólito está sendo suprido eficientemente através da alimentação ou por produção do tecido hepático.

A figura 19 representa o perfil metabólico e o destino dos metabólitos dos pacus submetidos ao aumento de carboidrato em dietas extrusadas com baixo lipídeo.



**Figura 19-** Resposta metabólica entre músculo e fígado frente ao aumento de carboidrato em dietas extrusadas com 4% de lipídeo na alimentação do pacu. Valores referentes às relações entre as concentrações.

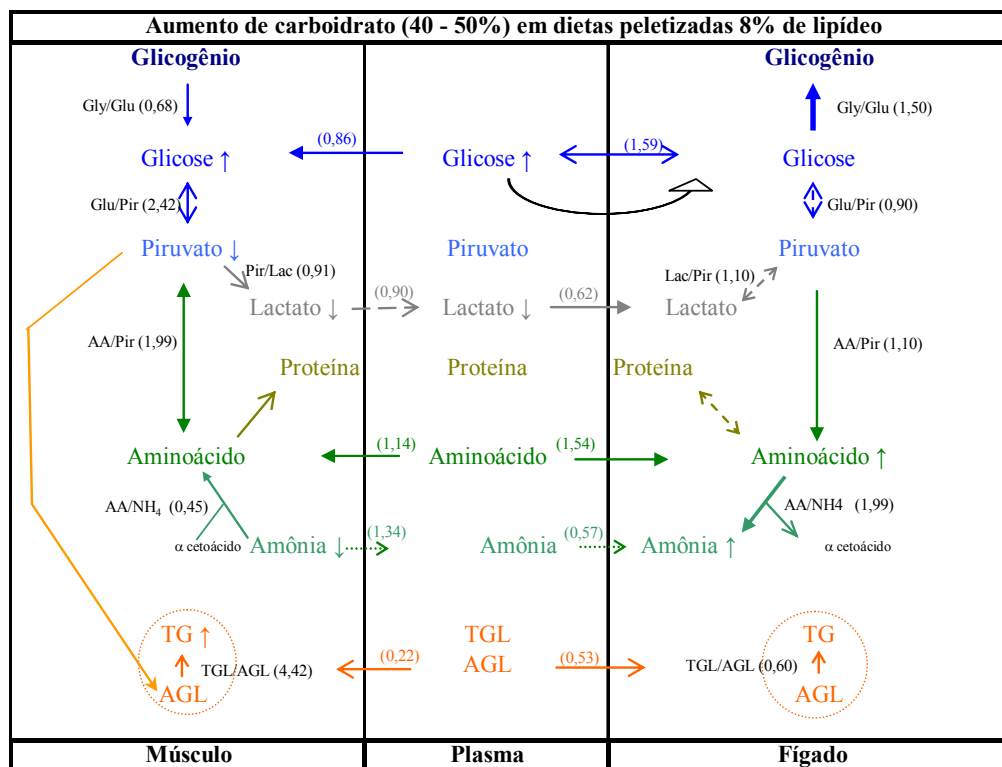
### 5.7.3 Aumento de carboidrato em dietas peletizadas com 8% de lipídeos

Em dietas peletizadas com 8% de lipídeo, o aumento de carboidratos resultou em diminuição do lactato e piruvato com concomitante aumento dos níveis de triglicerídeos e glicose muscular. O aumento da glicose muscular sugere seu uso na produção de energia e na produção de gordura. O aumento de triglicerídeos foi verificado em *O. mykiss* alimentado com dietas contendo altos níveis de carboidratos e lipídeos (BRAUGE et al., 1995). Todavia, em estudo sobre o efeito poupador de proteína pelo carboidrato em *Paralichthys dentatus*, não se observa alteração na concentração de triglicerídeos (DANIELS & GALLAGUER, 2000).

O aumento na concentração de glicose e concomitante diminuição do lactato plasmático revelam que estes metabólitos estão sendo conduzidos para o fígado. Lundstedt (2003) relata que *P. corruscans* arraçoados com alto conteúdo energético apresentam redução nos níveis plasmáticos de lactato sugerindo um quadro neoglicogênico associado à diminuição do consumo de dieta.

O aumento na concentração de glicose plasmática pode estar associado à exportação deste metabólito pelo fígado para manter a glicemia. O aumento da glicose plasmática é verificado para *R. quelen* (MELO et al., 2006) alimentado com níveis crescentes de proteína e decrescente de carboidratos. Brauge et al., (1995) observaram que em trutas arco-íris alimentadas com altos níveis de carboidratos e lipídeos ocorre aumento da glicose e dos triglicérides plasmáticos. O aumento de carboidratos em dietas com baixo conteúdo de proteína em *P. mesopotamicus* aumenta a glicemia plasmática (ABIMORAD et al., 2007). No tecido hepático foi observado aumento de glicose e de glicogênio evidenciando o quadro de glicogênese. O aumento na concentração de amônia com manutenção nas concentrações de proteína e aumento de aminoácidos livres hepáticos revelou um equilíbrio entre degradação e/ou síntese de proteína.

A figura 20 representa o perfil metabólico e o destino dos metabólitos de pacu submetido ao aumento de carboidrato em dietas peletizadas com alto teor de lipídeos.



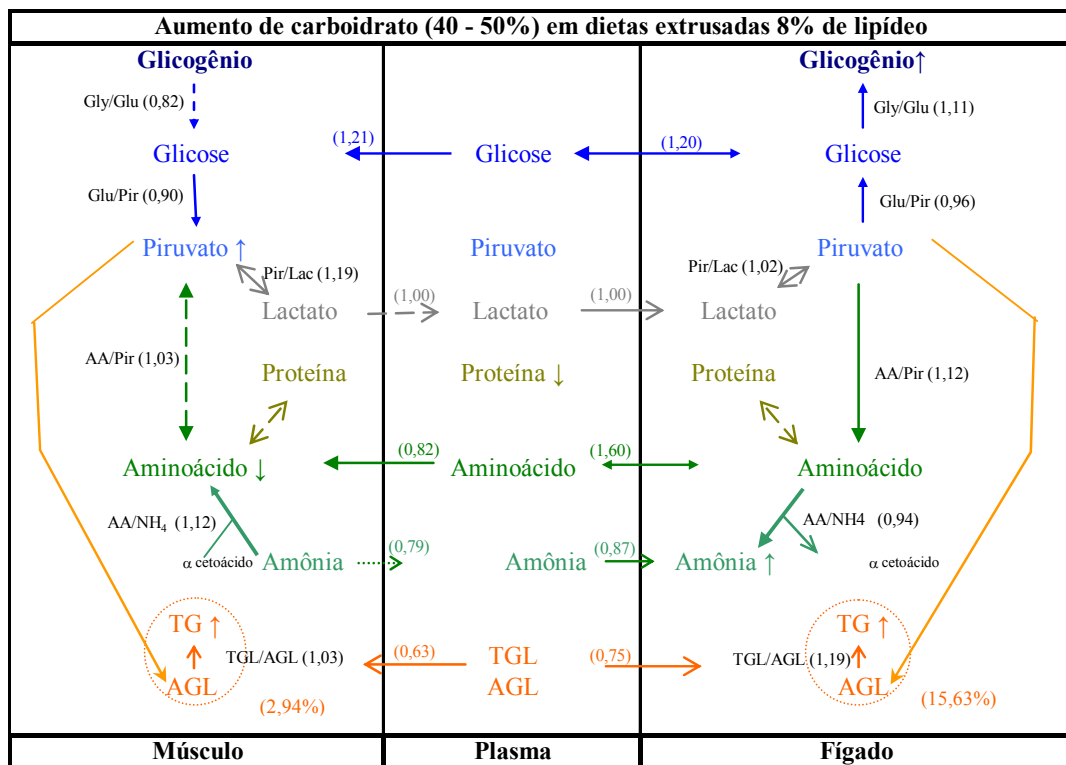
**Figura 20-** Resposta metabólica entre músculo e fígado frente ao aumento de carboidrato em dietas peletizadas com 8% de lipídeo na alimentação do pacu. Valores referentes às relações entre as concentrações.

#### 5.7.4 Aumento de carboidrato em dietas extrusadas com 8% de lipídeos

Para os pacus alimentados com a dieta E50/8, o estoque de glicogênio hepático aumentou significativamente pelo aumento de energia bruta da dieta ofertada. Moreira et al. (2008) observaram aumento de glicogênio hepático em juvenis de *Dicentrarchus labrax* alimentados com níveis crescentes de carboidratos. O aumento de carboidratos na alimentação de *C. macropomum* reflete-se no aumento de glicogênio hepático, indicando também síntese de lipídeo (CORRÊA et al., 2007).

A concentração de triglicerídeos hepático e muscular acompanhou o aumento de carboidratos da dieta, revelando seu armazenamento na forma de gordura em ambos os tecidos. Isso reflete a maior disponibilidade de energia das dietas extrusadas. No músculo branco houve aumento de piruvato, o que revela o excesso de glicose disponível. O aumento da concentração hepática de triglicerídeos responsivos ao aumento de carboidrato dietário também é observado em *Dicentrarchus labrax* (MOREIRA et al., 2008). O uso de carboidrato extrusado aumenta a deposição de lipídeo hepático em juvenis de *Solea senegalensis* devido à sua maior digestibilidade em comparação ao amido cru (DIAS et al., 2004). O aumento de ácidos graxos livres e de triglicerídeos hepáticos em *P. coruscans* é observado em resposta ao aumento de energia da dieta (LUNDSTEDT, 2003).

A figura 21 representa o perfil metabólico e o destino dos metabólitos dos pacus submetidos ao aumento de carboidrato em dietas extrusadas com alto lipídeo.



**Figura 21-**Resposta metabólica, entre músculo e fígado frente ao aumento de carboidrato em dietas extrusadas com 8% de lipídeo na alimentação do pacu. Valores referentes às relações entre as concentrações.

### 5.8 Enzimas metabólicas

O efeito poupador de proteína pode ser resultado da utilização de carboidratos e/ou lipídeos como fonte de energia. Vários trabalhos relatam a relação entre enzimas metabólicas, metabolismo protéico e o estado nutricional dos peixes (HEMRE et al., 2002; MELO et al., 2006; ENES et al., 2008; MOREIRA et al., 2008). Neste trabalho verificou-se que as enzimas relacionadas ao catabolismo de proteínas foram influenciadas pelos níveis de carboidratos das dietas independente dos níveis de lipídeos. A atividade das transaminases e desaminase podem ser indicadoras metabólicas de excesso de aminoácidos em peixes. O excedente dos aminoácidos requeridos para biossíntese de proteínas é desaminado e seus resíduos de carbono são convertidos no ciclo de Krebs em carboidrato ou gordura (DRIEDZIC & HOCHACHKA, 1978).

O aumento de carboidratos em dietas peletizadas levou à diminuição da atividade das enzimas ALAT (alanina aminotransferase) e ASAT (aspartato aminotransferase) sem

alterar a atividade da GDH (glutamato desidrogenase). A diminuição do catabolismo protéico pela inclusão de carboidrato nas dietas é relatada em *S. aurata* dada à diminuição da atividade da ALAT e GDH (ENES et al., 2008). No mesmo contexto, é observado em *S. aurata* que a diminuição de carboidratos nas dietas resulta em aumento da atividade de ALAT e ASAT, devido à utilização de aminoácidos com substrato gliconeogênico (MÉTTON et al., 1999). Por outro lado o aumento de carboidrato na dieta de *S. salar* não alterou a atividade enzimática de ALAT e ASAT hepáticas (HEMRE et al., 2007). A correlação positiva entre a atividade das enzimas do metabolismo protéico e os níveis de proteína em *Diplodus sargus* é um indicativo que esta espécie é capaz de adaptar-se ao catabolismo de proteína (SÁ et al., 2006). Em nosso trabalho pode-se evidenciar que o pacu usa carboidrato como fonte de energia e poupa proteínas para o crescimento.

Nas dietas extrusadas o aumento de carboidratos com baixos níveis de lipídeo provocou diminuição da atividade de GDH. A desaminação oxidativa pela GDH representa um meio de remover o nitrogênio dos aminoácidos e das cadeias carbonadas serem utilizadas como substratos no ciclo de Krebs. A GDH controla o catabolismo de aminoácidos podendo resultar em substancial produção de amônia (COWEY & WALTON, 1989). Nas dietas com altos níveis de lipídeos o aumento de carboidratos levou à diminuição da atividade da ALAT e da ASAT, demonstrando que o efeito poupador de proteína é reflexo da combinação entre carboidratos e lipídeos. Almeida (2006) reporta em *C. macropomum* a diminuição da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo protéico frente ao aumento de lipídeos mostrando o efeito poupador de proteína pelos lipídeos. Por outro lado, a GDH apresenta correlação positiva com o nível de proteína e correlação negativa com o nível de lipídeo em *Diplodus sargus* indicando a baixa habilidade de aproveitamento de lipídeo desta espécie (SÁ et al., 2006).

O aumento da relação proteína/carboidrato resulta em aumento da atividade da ALAT, ASAT e da GDH em *R. quelen* (MELO et al., 2006), aumento da atividade da ALAT em *S. aurata* (FERNANDEZ et al., 2007) e aumento da GDH para *Diplodus sargus* (SÁ et al., 2006). Sánchez-Muros et al. (1998) associaram a alta atividade da GDH e da ALAT ao aumento da neoglicogênese. A invariabilidade nas concentrações dos compostos nitrogenados, associados à diminuição da atividade da ALAT, ASAT e GDH, revela que as proteínas da dieta não foram utilizadas como fonte de energia. Rychly (1980) relata que a diminuição de carboidratos e lipídeos em *O. mykiss* leva ao aumento da excreção de compostos nitrogenados. Segundo Kirchner et al. (2005), peixes com baixa disponibilidade de proteína



não apresentam capacidade gliconeogênica aumentada no fígado. Nesse estudo, as atividades das enzimas envolvidas no metabolismo de proteína provavelmente diminuíram por causa do aumento do nível de carboidrato da dieta, o qual estaria sendo usado como recurso energético diminuindo a neoglicogênese a partir de aminoácidos.

A atividade da MDH diminuiu frente ao aumento de carboidratos das dietas peletizadas indicando uma redução do metabolismo oxidativo devido à falta de oxalacetato, uma vez que os carboidratos estariam sendo desviados para armazenamento de gordura. A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi menor conforme o aumento de carboidratos nas dietas peletizadas com alto nível de lipídeo. A enzima LDH hepática catalisa a oxidação de lactato para piruvato, com redução simultânea de NAD para NADH, onde o piruvato é convertido em oxalacetato e subseqüentemente em fosfenolpiruvato via neoglicogênese.

O aumento nas atividades de MDH e LDH, conforme o aumento de carboidratos nas dietas extrusadas, sugere maior degradação de intermediários da glicose gerando outros que podem ser utilizados em processos como, por exemplo, a glicólise ou a neoglicogênese. Hemre & Sandnes (1999) observaram diminuição linear da LDH com a queda de amido na dieta para *S. salar* sugerindo aumento do metabolismo anaeróbico. Almeida (2006) verificou diminuição da MDH hepática de *C. macropomum* submetido a dietas com níveis crescentes de lipídeos. Contudo, em *S. salar* o aumento de carboidrato não altera a atividade hepática da LDH (HEMRE et al., 2007).

As diferenças encontradas no que tange o processamento da dieta podem estar relacionadas à digestibilidade das dietas e conseqüentemente a disponibilização da glicose. A melhor utilização da glicose em peixes é atribuída à rápida absorção de monossacarídeos em comparação com os polissacarídeos (SHIAU & LIN, 2002). O processo de extrusão disponibiliza de forma eficiente os nutrientes (CHENG & HARDY, 2003; AMIRKOLAIE et al., 2006) levando à absorção mais rápida da glicose e resultando em efeito poupador de proteína. Spannof & Plantkow (1983) observaram ineficiência de utilização do amido cru acima de 20% para *O. mykiss* atribuindo esta resposta à adsorção da amilase digestiva pela molécula de amido e ao aumento na velocidade de passagem da dieta pelo trato digestório, reduzindo assim a possibilidade de absorção.

Estes resultados confirmam os dados de crescimento onde o uso de carboidrato e lipídeo poupou as proteínas, assim como aos encontrados também em *Cirrhinus mrigala* (SINGH et al., 2006) e *Puntius gonionotus* (MOHANTA et al., 2007).

## 5.9 Análises Histológicas

### 5.9.1 Morfologia do fígado

Alterações morfológicas no fígado podem ser provocadas por substâncias químicas, drogas e até mesmo pela alimentação, as quais são importantes causas de adaptações, lesão e até morte celular. O fígado é um órgão altamente suscetível às mudanças no estado nutricional de peixes, e a qualidade da dieta interfere diretamente na sua estrutura histomorfo funcional, alterando seu tamanho e sua função celular (BRUSLÉ & ANADON, 1996).

Existem três tipos de adaptação celular que são: atrofia, hipertrofia e hiperplasia. Os tipos de lesão celular são: tumefação, esteatose, necrose (coagulação com liquefação e caseosa) e apoptose (KUMAR, 1994). O tamanho do fígado em relação ao corpo (índice hepatossomático) pode variar conforme a alimentação ofertada principalmente de acordo com a digestibilidade dos carboidratos da dieta (KAUSHIK et al., 1989), e o tamanho do hepatócito também conforme o conteúdo de glicogênio no tecido (ESCAFFRE et al., 2007).

Os hepatócitos dos pacus alimentados com dietas extrusadas apresentavam-se mais reativos (PAS positivo) dos que os alimentados com dietas peletizadas. Isto mostra que há maior atividade metabólica e maior estoque de glicogênio, o que já havia sido relatado no perfil metabólico apresentado pela espécie neste trabalho. As diferentes concentrações de glicogênio hepático observadas pelo PAS em resposta a variações nas dietas já haviam sido demonstrada como um indicativo de adaptação de *P. mesopotamicus* (OSTASZEWSKA et al., 2005).

A presença de regiões vacuolizadas nos hepatócitos dos peixes alimentados com dietas peletizadas é um indicativo de aumento dos estoques de lipídeo, o que confirmam os resultados de metabolismo. Esta mesma resposta também foi observada por Santos et al. (2004) em *O. niloticus*. Segundo Sá (1998) o citoplasma das células hepáticas pode apresentar aspectos variáveis, dependendo do estado nutricional do indivíduo, e o acúmulo de lipídeos e diminuição de glicogênio hepático podem prejudicar as atividades metabólicas (RODRIGUES & FANTA, 1998). O aumento de lipídeo nas dietas de *Pagrus pagrus* provoca alterações morfológicas no fígado, migração do núcleo do hepatócito, vacúolo de lipídeo aumentados e perda do arranjo cordonal (SCHUCHARDT et al., 2008). A presença de maiores estoques de lipídeos no tecido hepático também foi observada em *P. mesopotamicus* quando alimentados com dietas à base de soja (OSTASZEWSKA et al., 2005).

Observou-se o aumento no número de hepatócitos com núcleo picnótico nas dietas extrusadas, o que indica maior atividade hepática resultando em morte celular. SANTOS et al.

(2004) observaram que o tecido hepático de *O. niloticus* apresenta núcleo com variação do diâmetro e condensação da cromatina, semelhante a peixes expostos a agentes tóxicos. O aumento de hepatócitos com núcleo picnótico também foi observado em *Clarias gariepinus* expostos a organofosforado (SAKR & JAMAL AL LAIL, 2005). A variação no tamanho do hepatócito e do seu núcleo em resposta à variação ocorrida na dieta também foi evidenciada por OSTASZEWSKA et al. (2005) em *P. mesopotamicus* submetido a dietas com diferentes fontes de proteína. Segundo Segner et al., (1988) o tamanho do núcleo do hepatócito está diretamente relacionado com a atividade metabólica das células do fígado.

### 5.9.1 Morfologia do intestino anterior

Diversos trabalhos vêm demonstrando a adaptação morfológica do intestino frente às variações nutricionais para *O. mykiss* e *P. mesopotamicus* (OSTASZEWSKA et al., 2005), *Ictalurus punctatus* (EVANS et al., 2005), *Rachycentron canadum* (ROMARHEIM et al., 2008), *S. aurata* (WASSEF et al., 2007), e *Pagrus pagrus* (SCHUCHARDT et al., 2008).

A estrutura da mucosa intestinal está relacionada com os processos fisiológicos de digestão e absorção, e as regiões de pregas mais complexas estão envolvidas nos processos absorptivos dado o aumento da área efetiva para absorção de nutrientes (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

Os enterócitos do intestino anterior dos peixes têm habilidade de absorver lipídeos e proteínas. Portanto, o aumento da altura do epitélio, do número de células e da espessura da parede do intestino anterior são indícios de melhora na absorção. Estas alterações morfológicas foram observadas no intestino anterior dos pacus submetidos a dietas com alto conteúdo de lipídeo e carboidrato, independente do processamento. As alterações morfológicas no trato digestório também foram observadas no intestino de *Rachycentron canadum* submetidos a dietas com diferentes fontes de proteína (ROMARHEIM et al., 2008).

A redução da área de absorção devida à menor altura das vilosidades intestinais resulta em menor trabalho enzimático e conseqüentemente diminuição do transporte de nutrientes e de baixa absorção (CERA et al., 1988; REOPEREZ et al., 1993).

A digestão intestinal depende da secreção de substâncias glicoproteicas das células caliciformes, da ação proteolítica do suco pancreático e também da digestão intracelular que está ligada à presença de glândulas gástricas (KAPOOR et al., 1975). A flutuação no número de células caliciformes no intestino de peixes está relacionada a diferentes condições de

alimentação e sua principal função está relacionada à proteção contra a atividade bacteriana (TIBBETTS, 1997).

Observou-se que o número de células caliciformes foi maior nos peixes alimentados com dietas extrusadas com baixos níveis de lipídeos. Nas dietas com altos níveis de carboidratos e lipídeos, o número de células caliciformes foi alto para ambos os processamentos. O aumento no número de células caliciformes pode estar relacionado com sua função de proteção do epitélio contra a digesta provinda do estômago, rica em enzimas digestivas e com pH acentuadamente ácido (LUNDSTEDT, 2003). Fato este que pode ter ocorrido devido ao aumento da atividade das proteases inespecífica ao longo do trato digestório de pacu submetido a dietas com altos níveis de carboidratos e lipídeos. Tibbetts (1997) descreve que as células caliciformes são responsáveis pelo aumento da viscosidade fazendo um fluxo laminar de proteção ao ataque das enzimas digestivas.

Os resultados encontrados neste trabalho reforçam a idéia de que há adaptação da estrutura morfológica frente à variação de nutrientes na dieta, uma vez que no intestino anterior há aumento do número de células caliciformes, aumento da espessura da parede, e a borda escovada é mais reativa (PAS +) em pacus submetidos à alimentação com alto nível de carboidrato e lipídeo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A protease digestiva se revelou indutivas frente ao aumento de carboidrato nas dietas extrusadas com 8% de lipídeos;
- O efeito poupador de proteína pelo carboidrato foi encontrado nas dietas peletizadas, recomendando-se a utilização de 50% de carboidratos com 4% de lipídeos.
- O efeito poupador de proteína pelo lipídeo foi encontrado nas dietas extrusadas, recomendando-se a utilização de 8% de lipídeos com 40% de carboidratos.
- As dietas peletizadas e extrusadas proporcionaram perfis metabólicos distintos;
- O aumento de carboidrato nas dietas peletizadas e nas extrusadas diminuiu o catabolismo de proteína;
- A histologia revelou adaptações morfológicas no fígado e no intestino anterior devido ao aumento de carboidratos e lipídeos nas dietas extrusadas;

## 7 CONCLUSÕES

O efeito poupador de proteína pelo carboidrato foi observado para as dietas peletizadas recomendando-se 4% de lipídeo nas dietas.

O efeito poupador de proteína pelo lipídeo só foi observado para as dietas extrusadas independente do nível de carboidrato.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMORAD, E.G., CARNEIRO, D.J. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles - fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Nutrition**, v.13, n.1, p. 1-9, 2007.
- ABIMORAD, E.G., CARNEIRO, D.J., URBINATI, E. C. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Research**, v. 38, p.36-44, 2007.
- ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia dos alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 5, p. 1001-1109, 2004.
- ALBRO, P.W., HALL, R.D., CORBETT, J.T., SCHROEDER, J. Activation of non-specific lipase (EC 3.1.1.1) by bile salts. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 835, p. 477-490, 1985.
- ALMEIDA, L. C. **Perfil digestivo e metabólico de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com diferentes teores de proteína e lipídeo**. 2006. 77f Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, São Paulo, 2006.
- ALMEIDA, L.C.; LUNDSTEDT, L.M. & MORAES G. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12; p. 443–450, 2006.
- ALVES, R.M.L.; GROSSMANN, M.V.E. Parametros de extrusão para produção de snacks de farinha de cará (*Dioscorea alata*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.1, p.32-38, 2002.
- AMARAL, A.G.; LUNDSTEDT, L.M., MORAES, G. Effect of dietary lipid and carbohydrate on the expression of digestive amylase, lipase and unspecific protease of matrinxá (*Brycon cephalus*). Submitted. 2007.
- AMIRKOLAIE, A.K.; VERRETH, A.J.; SCHRAMA, J.W. Effect of gelatinization degree and inclusion level of dietary starch on the characteristics of digesta and faeces in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)). **Aquaculture**, v. 260, p. 194-205, 2006.
- ANDRIGUETTO, J.M., PERLY, L. & MINARDI, I. ET AL. **Nutrição animal**. 4.ed. São Paulo: Nobel, 1985. v.1, p.71-134, 1981.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: UFV, p.282, 1999.
- ARZEL, J.; METAILLER, R.; KERLEGUER, C.; DELLIOU, H.; GUILLAUME, J. The protein requirement of brown trout (*Salmo trutta*) fry. **Aquaculture**, v. 130, p. 67-78, 1994.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 17th edn. AOAC, Gaithersburg, MD, USA, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17th ed. AOAC Inc., Gaithersburg, MD, USA, 2000.
- BATAGLIA A. M. A extrusão no preparo de alimentos para animais. In: Simpósio Brasileiro de Nutrição Animal, 3. Seminário sobre Tecnologia da Produção de Rações, 2, 1990, Campinas. **Anais....** Campinas:CBNA, 1990. p.73-81.
- BEAMISH, F. W. H; MEDLAND, T.E. Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquaculture**, v. 55, p. 35-42, 1986.
- BEDFORD, M.R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 53, p. 145-155, 1995.
- BEHNKE, K. C. Feed manufacturing technology: current issues and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v.62, p.49-57, 1996.
- BERGOT, F.; BREQUE, J. Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and of the intake level. **Aquaculture**, v. 34, p. 543-547, 1983.

- BERNFELD, P. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$  In: Colowick, S. P., Kaplan, N. (Eds). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press. v. 1, p. 149-158, 1955.
- BHATNAGAR, S; HANNA, M. A. Amylose-lipid complex formation during singlescrew extrusion of various corn starches. **Cereal Chem.**, v. 71, p. 582-7, 1994.
- BIDINOTTO, P.M., SOUZA, R.H.S., MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do Cepta**.v. 10, p. 53-60, 1997.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, 37, p. 911-17, 1959.
- BOOTH, M.A., ALLAN, G.L., EVANS, A.J.; GLEESON, V.P. Effects of steam pelleting or extrusion on digestibility and performance of silver perch *Bidyanus bidyanus*. **Aquaculture Research**, v. 33, p. 1163-1173, 2002.
- BOOTH, M.A., ALLAN, G.L.; WARNER-SMITH, R. Effects of grinding, steam conditioning and extrusion of a practical diet on digestibility and weight gain of silver perch, *Bidyanus bidyanus*. **Aquaculture**, v. 182, p. 287-299, 2000.
- BRADFORD, M.M., MCRORIE, R.A., WILLIAM, W.L. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAUGE, C. CORRAZE, G.; MÉDALE, F. Effects of dietary levels of carbohydrate and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) reared in fresh water or in sea water. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 111, p. 117-124, 1995.
- BRUSLÉ, J., ANADON, G.G. The structure and function of fish liver. In: Munshi, J.S.D., Dutta, H.M. (Eds.), Fish morphology. Oxford and IBH Publishing Co. PVT. LTD, New Delhi, pp. 77-93, 1996.
- BUDDINGTON, R.K.; CHEN, J.W. & DIAMOND, J.M. Genetic and phenotypic adaptation of the intestinal NUTRIENT TRANSPORT TO IET IN FISH. **J. Physiology**, v.393, p. 261-281, 1987.
- BUDDINGTON, R.K.; KROGDAHAL, Å & BAKKE-MCKELLEP, A.M. The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiol. Scand.**, v. 161, p. 67-80, 1997.
- CAMILO, R. Y. Efeito da Adição de aminoácidos essenciais livres á dieta e da ausência de nutrientes na atividade de enzimas digestivas e no metabolismo intermediário de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*). 2007.56f Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, São Paulo, 2007
- CAMILO, R.Y.; HONORATO, C.A.; MORAES, G. The role of nutrients on digestive enzymes production in *Brycon amazonicus* (matrinxã). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, Submitted. 2008.
- CARNEIRO D.J., FRAGNITO P.S. & MALHEIROS E.B. Influence of carbohydrate and energy level on growth and body composition of tambacu, a hybrid of tambaqui (*Colossoma macropomum*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) **Aquaculture**, v. 124, p. 129-130, 1994.
- CARNEIRO, D. J. Níveis de proteína e energia na alimentação do pacu, *Colossoma mitrei* (BERG, 1895). 1983. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1983.
- CATACUTAN, M.R.; COLOSO, R.M. Growth of juvenile Asian seabass *Lates calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture**, v.149, p.137-144, 1997.
- CATALDI, E., CATANELLA, S., MONACO, G., ROSSI, A., TAUCIONI, L. A study of the histology and morphology of digestive tract of the sea-bream, *Sparus aurata*. **Journal of Fish Biologycal**, v. 30, p. 135-145, 1987.

- CERA, K.R.; MAHAN, D.C.; CROOS, R.F., REINHAT, G.A.; WITMOYER, R.E. Effect of age weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. **Journal of Animal Science**, v.66, n.5, p. 57-584, 1988.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Lippincott's illustrated reviews: biochemistry**. Philadelphia: Lippincott, p. 443, 1994.
- CHENG, Z. J. & HARDY, R.W. Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture nutrition**, v.9, p.77-83, 2003.
- COELHO, S. R. C. Situação atual e perspectivas da indústria de rações para organismos aquáticos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997, Piracicaba. **Anais...** Campinas: CBNA, 1997. p. 102-116.
- COPLEY, N.G. Alloxan and ninhydrin test. **Analyst.**, v.66, p. 492-493, 1941.
- CORRADINI, E., LOTTI, C., MEDIROS, E.S., CARVALHO, A.J.F., CURVELO, A. A. S., MATTOSO, L. H.C. Estudo Comparativo de Amidos Termoplásticos Derivados do Milho com Diferentes Teores de Amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.
- CORRÊA, C. F.; AGUIAR, L. H., LUNDSTEDT, L. M., MORAES, G. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.147, p. 857-862, 2007.
- COWEY, C. B., WALTON, M. J. Intermediary metabolism. In: Halver, E. (ed). **Fish Nutrition**. New York: Academic Press., pp. 259-329. 1989.
- CURA, J.A.; Jansson, P.E.; Krisman, C.R. **Starch**, v. 47, p.207, 1995
- CURI, R. et al. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo:Manole, 598p. 2002
- DABROWSKI, K. & GUEDERLEY, H. Intermediary Metabolism. In: Halver, J.E. & Hardy, R. W. (eds.). **Fish Nutrition**. 3 ed, Academic Press. p.309-365, 2002.
- DANIELS, H.CV.; GALLAGUER, M.L. effect of dietary protein level on growth and blood parameters in summer flounder, *Paralichthys dentatus*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 45-52, 2000.
- DE SILVA, S., ANDERSON, T.A. **Fish Nutrition in Aquaculture**. Chapman may. London, Great Britain. 340p, 1995.
- DEGUARA, S., JAUNCEY, K., AGIUS, C. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. **J. Fish. Biol.**, v.62, p.1033-1043, 2003.
- DIAS, J., RUEDA-JASSO, R.; PANSERAT, S.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; GOMES, E.F.; DINIS, M.T. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegales sole (*Solea senegalensis*, Kaup). **Aquaculture Research**, v.35, p. 1122-1130, 2004.
- DIVAKARAN, S., KIM, B.G., OSTROWSKI, A.C. Digestive enzymes present in Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis* (Block an Schneider 1801) and bluefin trevally *Caranx melampygus* (Cuvier 1833). **Aquaculture Research**, v.30, p. 781-787, 1999.
- DONZIER, W. A. Pelet de calidad para obtener carne de ave más económica. In: **Alimentos balanceados para animales**, p.16-19, 2001.
- DRIEDZIC, W. R.; HOCHACHKA, P.W. **Metabolism in fish during exercise**. In Fish Physiology (Edited by Hoar W.S. e Randall D.J.) vol. VII. Academic Press, New York. P. 503-534, 1978.
- DRUZIAN, J.I.; MARCHESI, C.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Perfil de ácidos graxos e composição centesimal de carpas (*Cyprinus carpio*) alimentadas com ração e com dejetos suínos. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p. 539-544, 2007.



- DUBOIE, M.G., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Ana. Chem.**, 28, p.350-358, 1960.
- ELLIS, S.C.; REIGH, R.C. Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, v. 97, p. 283-394, 1991.
- ENES, P.; PANSERAT, S.; KAUSHIK, S.; OLIVA-TELES, A. Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. **Aquaculture**, v. 274, p. 101-108, 2008.
- ESCAFFRE, A.M.; KAUSHIK, S.; MAMBRINI, M. Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. **Aquaculture**, v. 273, p. 127-138, 2007.
- EVANS, J.J.; PASNIK, D.J.; PERES, H.; LIM, C.; KLESIUS, P.H. No apparent differences in intestinal histology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed heat-treated and non-heat-treated raw soybean meal. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 123-129, 2005
- EXTRUSADOS, Disponível em <http://www.milly.com.br/estrusados.html>. Acesso em 12 de fevereiro de 2003.
- FAGBENRO, O., ADHDIRH, C.O, AYOTUNDE, E.O, FAMINI, E.O. Haematological profile, food composition and digestive enzyme assay in the gut of the African bony-tongue fish, *Heterotis (Clupisudis) niloticus* (Cuvier 1829) (Osteoglossidae). **Tropical Zoology**, v. 13, p. 1-9, 2000.
- FANGE, I.S., CHIOU, S. F. Effects of salinity on the actives of digestive protease from the tilapia fish, *Oreochromis niloticus* in different culture environments. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 93A, p. 439-443, 1989.
- FARHAT, I.A. & BLANSHARD, J.M.V. - **Carbohydr. Polym.**, v. 34, p.263, 1997.
- FARIA, H.G.; STABILLE, S.R. Desempenho de ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar em crescimento alimentados com dietas extrusadas e peletizadas. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 29, p. 75-79, 2007.
- FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N.K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Rev. Bra. Zootec.**, v. 29, p. 646-653, 2000.
- FERNANDEZ, F.; MIGUEL, A.G.; CÓRDOBA, M.; VARAS, M.; MÉTON, I., CASERAS, A.; BANANTE, I.V. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth, body composition and liver intermediary enzymes activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 343, p. 1-10, 2007.
- FERRAZ DE LIMA, J.A. Aspectos práticos da criação de pacu-guaçu: Biologia e importância econômica do Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) no Pantanal Mato Grossense. **ABRAPOA**, 1988
- FIDEU, M.D., SOLER, G. AND RUIZ-AMIL, M. Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) **Comp. Biochem. Physiol.** , v. 74B, p. 795-799, 1983.
- FRACALOSSO, D.M.; LOVELL, R.T. Growth and polar fatty acid composition of year-1 channel catfish fed various lipid source at two water temperatures. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 57, p. 107-113, 1995.
- FURUKAWA, A. & TSUKAHARA, H. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. **Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries**, v. 32, p. 502-506, 1976.
- FURUYA, W.M.; SOUZA, S.R.; FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C.; RIBEIRO, R.P. Dietas peletizadas e extrusadas para machos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), na fase de terminação. **Ciência Rural**, v. 28, p. 483-487, 1998.
- GARCIA, L.M.; ADELMAN, R. *In situ* estimate of daily food consumption and alimentary canal evacuation rates of common carp *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 27, p. 487-493, 1985.

- GARGIULO, A.M.; CECARELLI, P.; DALL'ALIO, C.; PEINI, V. Histology and ultrastructure of the gut the tilapia (*Tilapia epp*), a hybrid teleost. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 27, p. 89-94, 1998.
- GATLIN, D. M. Nutrition and feeding of red drum and hybrid striped bass. In: CHAND; WANG, S. S. (Eds.). **Advences in extrusion technology**, Lancaster: Technomic, p. 43-52, 1999.
- GAUTHIER, S.F., VACHON, C., JONES, J.D., SAVOI, L. Assessment of protein digestibility by in vitro enzymatic hydrolysis with simultaneous dialysis. **J. Nutrition**, v. 112, p. 1718-125, 1982.
- GENTZKOW, C. J. & MAZEN, J. M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. Biol. Che.**, v. 143, p. 531-544, 1942.
- GLASS, H.J.; MACDONALD, N.L.; MORAN, R.M. ET AL. Digestion of protein in different marine species. **Comp. Biochem. Physiol.** Oxford, v.91 B (3), p. 607-611, 1989.
- GODOY, M.P. **Peixes do Brasil: superordem Characoidei – Bacia do Rio Mogi – Guaçu, Piracicaba, Franciscana.** v.2, pp.217–397, 1975.
- GOELEMA, J. O. **Processing of legume seed: effects on digestive behaviors in dairy cows.** 221p, 1999.
- GOMES, M. H.; AGUILERA, J. M. A. physicochemical model for extrusion of corn starch. **J. Food. Sci.**, v.49, p.40-63, 1984.
- GROSSMANN, M.V.E.; EL- DASH, A.A.; CARVALHO, J.F. Extrusion cooking effects on hydration properties of moniac starsh. **Arg. Biologyc. Tecnologc.**, v. 31, p. 329-335, 1998.
- GUO, R., LIU, Y.-J., TIAN, L.-X. & HUANG. J.-W. Effect of dietary cornstarch levels on growth performance, digestibility and microscopic structure in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, p. 83-88, 2006.
- HALVER, J.E. & HARDY, R.W. Nutrient Flow and Retention. In: Halver, J.E. & Hardy, R.W. (eds). **Fish Nutrition.** 3 ed, Academic Press. Pp. 755-770, 2002.
- HANSEN, A.C.; ROSENLUND, G.; KARLSEN, Ø., OLSVIK,P.A., HEMRE, G.I. The inclusion of plant protein in cod diets, its effects on macronutrient digestibility, gut and liver histology and heat shock protein transcription. **Aquaculture Research**, v. 37, p. 773-784, 2006.
- HARROWER, J.R., BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **J. Appl. Physiol.**, v. 32, n. 5, p. 224-228, 1972.
- HEMRE, G.-I., SAGSTAD, A.; BAKKE-MCKELLEP, A.M.; DANIELI, A.; ACIERNO, R.; MAFFIA, M.; FRØYSTAD,M.; KROGDAHL, Å.; SANDEN, M. Nutricional, physiological and histological responses in Atlantic salmo, *Salmo salar* L. fed diets with genetically modified maize. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, p. 186-199, 2007.
- HEMRE, G.-I.; BJØRNEVIK,M.; BEATTIE,C.; BJÖRNSON, B.T.; HANSEN, T. Growth ans salt-wather tolerance of juvenile Altantic salmon *Salmo salar*, reared under different combinations of dietary carbohydrate and photoperid regime. **Aquaculture Nutrition**, v.8, p.23-32, 2002
- HEMRE, G-I.; MOMMSEN, T.P.; KROGDAHL, Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p. 175-194, 2002.
- HEMRE, G-I.; SANDNES, K. Effect of dietary lipid level on muscle composition i Atlantic salmon *Salmo salar*. **Aquaculture Nutrition**, v. 5, p. 9-16, 1999.
- HENKEN, A.M.; MACHIELS, M.A.M.; DEKKER, W.; HOGENDOORN, H. The effect of dietary protein and energy content on growth rate and feed utilization of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). **Aquaculture**, v. 58, p. 55-74, 1986.
- HEPHER, B., MOSHE SHILO ; SHMUELSARIG. **Principles of Fish Nutrition. In: Fish culture in warm water systems: problems and trends.** Beca Raton: CRC, 121-141. 1989.
- HERNÁNDEZ, M.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Effect of gelatinized corn meal as carbohydrate source on growth performance, intestinal evacuation, and starch digestion in carp. **Fisheries Sci.**, v. 60, p. 579-582, 1994.

- HIDALGO, M.C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, v. 170, p. 267-283, 1999.
- HILTON, W. J.; ATKINSON, J. L. Responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. **Br. J. Nutr.**, v. 39, p. 1229-1234, 1982.
- HOCHACHKA, P.W., GUPPY, H.E., GUDERLEY, STOREY K.B. AND HULBERT, W.C. Metabolic biochemistry of water vs air-breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructures. **Can. J. Zool.**, 56, p.736-750, 1978.
- HOFER, R. The adaptation of the digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus*, and rudd, *Scardinius erythrophthalmus*, Proteases. **J. Fish. Biol.**, v. 15, p. 373-379, 1979.
- HOLAY, S.H., HARPER, J.M. Influence of the extrusion shear environment on plant protein texturization. **J. Food Sci.**, 47(6):1869-1874, 1982.
- HONORATO, C. A. **Utilização de dietas microencapsuladas para reversão sexual de larvas de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. 2004. 47f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- HOSSAIN, M.A.R.; HAYLOR, G.S.; BEVERIDGE, M.C.M. The influence of food particle size on gastric emptying and grow rates of fingerling African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell, 1982. **Aquaculture Nutrition**, v. 6. p. 73-76, 2000.
- HSU, Y.L., WU, J.L., The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. **Bull. Inst. Zool.**, v. 18, n. 1, p. 45-53, 1979.
- HUMMEL, B. C. A. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and trombin. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, n. 12, p. 1393-1399, 1959.
- HUTCHINS, D.F.; MATHERS, E.; FOSTER, A.R. Effects of ratio on protein turnover in cod. **Aquaculture**, v. 79, p. 103-110, 1998.
- INOUE, L. A. K. A., SANTOS NETO, C. & MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciencia Rural**, v. 33, p. 943-947, 2003.
- JANG, J.K. & PYUN, Y.R. - **Starch**, 48, p.48 (1996).
- JAYARAM, M.G.; BEAMISH, F.W.H. Influence of dietary protein and lipid on nitrogen and energy losses in lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 49, p. 2267-2272, 1992.
- JAYARAM, M.G.; SHETTY, H.P.C. Formulation, processing and water stability of two new pelleted fish feeds. **Aquaculture**, v. 23, p. 355-359, 1981.
- JOBLING, M. et al. In: *Fish Bioenergetics*, Chapman and Hall, London, p.309, 1994.
- JOBLING, M. KOSKELA, J.,; SAVOLAINEN, R. Influence of dietary fat level and increased adiposity on growth and fat deposition in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 601-607, 1998.
- KAPOOR, B.G.; SMITH, H.; VERIGHINA, I.A. The alimentary canal and digestion in teleosts. **Adv. Mar. Biol.**, v. 13, p. 109-139, 1975.
- KAUSHIK, S.J., MÉDALE, F., FAUCONNEAU, B., BLANC, D. Effect of digestible carbohydrates on protein/energy utilization and on glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, v. 79, p. 63-74, 1989.
- KAUSHIK, S.J., OLIVA-TELES, A., 1985. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 50, p. 89-101, 1985.
- KEETELS, C.J.A.M.; OOSTERGETEL, G.T. & VLIET, T. -**Carbohydr. Polym.**, v. 30, p. 61, 1996.
- KIM, J.D. & KAUSHIK, S.J. Contribution of digestible energy from carbohydrate and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) **Aquaculture**, v. 106, p. 161-169, 1992.

- KIRCHNER, S.; KAUSHIK, S. & PANSERAT, S. 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.**, v. 134A, p. 337-347, 2003.
- KIRCHNER, S.; SEIXAS, P., KAUSHIK, S. & PANSERAT, S. Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.140B, p. 333-340, 2005.
- KOHLA, U.; SAINT PAUL, U.; FRIEBE, J.; WERNICKE, D.; HILGE, V.; BRAUM, E.; GROPP, J. Growth, digestive enzyme activities and hepatic glycogen levels in juvenis *Collossoma macropomum* Cuvier from South America during feeding, starvation and refeeding. **Aquaculture Fish Mange**, v. 23, p. 189-208, 1992.
- KOPOOR, B. G.; SMITH, H.; VERIGHINA, I.A. The alimentary canal and digestion in teleostes. **Adv. Mar. Biol.**, v.13, p.109- 139, 1975.
- KOVEN, W.M., HENDERSON, R.J., SARGENT, J.R.. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*): in-vivo and in-vitro studies of the lipolytic activity in various segments of the digestive tract. **Aquaculture**, v. 151, p.155-17, 1997.
- KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. Campo Grande, MS: 108p. 1998.
- KUMAR, S.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; CHOUDHURY, D.; MUKHERJEE, S.C. Studies on digestibility and digestive enzyme activities in *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles: effect of microbial  $\alpha$ -amylase supplementation in non-gelatinized or gelatinized corn-based diet at two protein levels. **Fish Physiol Biochem.**, v.32, p. 209-220, 2006.
- KUMAR, V. et al. **Patologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 608p, 1994.
- KUPERMAN, B.I.; KUZ'MINA, V.V. The structure of the intestinal epithelium in fish with different types of feeding. **Journal of Fish Biology**, v. 44, p. 181-193, 1994.
- LANNA, E.A.T.; PEZZATO, L.E.; CECON, P.R.; FURUYA, W.M.; BOMFIM, M.A.D. Digestibilidade aparente e trânsito gastrointestinal em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em Função da Fibra Bruta da Dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 2186-2192, 2004.
- LAWRENCE, T.L.J. Processing and preparation of cereals for pig diets. In: COLE, D.J.A., HARESIGN, W. (Eds.) **Recent developments in pig nutrition**. London: Butterworths. p. 230-45, 1985.
- LEE, S.M.; KIM, K.D. Effect of various of lipid exchanged with dextrin at different protein level in diet on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* .**Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 435-442, 2005.
- LEMONS, M.C.C.; TEODÓSIO, N.R.; CASTRO, R.M.; SILVA, S.R.F.; BANDEIRA, F. Glycemic index of tropical fruits in normal individuals, patients with type 2 diabetes and patients with impaired glucose tolerance. **Anais... Faculdade Médica UFPE**, v.74, n.1, p.50-53, 2002.
- LEENHOUWERS, J.I., ADJEI-BOATENG, D., VERRETH, J.A.J., SCRAMA, J.W. Digesta viscosity, nutrient digestibility and organ weights in African catfish (*Clarias gariepinus*) fed diets supplemented with different levels of a soluble non-starch polysaccharide. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, p. 111-116, 2006.
- LEONEL, M.; MISCHAN, M.M.; PINHO, S.Z.; IATAURO, R.A.; DUARTE FILHO, J. Efeito de parâmetros de extrusão nas propriedades físicas de produtos de inhame. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 459-464, 2006.
- LHOSTE, E.F., FISZLEWICZ, M., GUEUGNEAU, A.M. & CORRING, T. Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: Effect of the nature of protein and rat strain on enzyme activities and messenger RNA levels. **Journal Nutrition Biochemistry**, v. 5, p. 84-94, 1994.
- LOBO, A.R., LEMOS SILVA, G.M. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**. v. 16, n.2, p.219-226, 2003.
- LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Chapman & Hall, 1989. 260p, 1989.

- LU, G.D. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.**, v. 33, p. 249-254, 1939.
- LUNDSTEDT, L.M. **Aspectos adaptativos dos processos digestivo e metabólico de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia.** 2003. 140f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos. 2003.
- LUNDSTEDT, L.M., MELO, J. F. B., MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137, Part B, p. 331-339, 2004.
- MACHIELS, M.A.M.; HENKEN, A.M. A dynamic simulation model for growth of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). II. Effect of feed composition on growth and energy metabolism. **Aquaculture**, v. 60, p. 33-53, 1987.
- MANJAPPA, K., KESHAVANATH, P., GANGADHARA, B. Growth performance of common carp, *Cyprinus carpio* fed varying lipid levels through low protein diet, with a note on carcass composition and digestive enzyme activity. **Acta Ichthyol. Et Piscat.** XXXII, Fasc. 2, 146-155, 2002.
- MARTINO, R.; TAKAHASHI, N.S. A importância da adição de lipídios em rações para a aqüicultura. **Óleos e Grãos**, n.58, p.32-37, 2001.
- MARTINO, R.C., CYRINO, J.E.P., PORTZ, L. & TRUGO, L.C. Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 131-137, 2005.
- MARTINO, R.C., CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; TRUGO, L.C. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. **Aquaculture**, v. 209, p. 233-246, 2002.
- MAYER, P.; MROWIETZ, U.; ARENBERGER, P.; BARTAK, P.; BUCHVALD, J.; CHRISTOPHEERS, E; JABLONSKA, S.; et al. Omega-3 fatty acid-based lipid infusion in patients with chronic plaque psoriasis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. **Journal of American Academy of Dermatology**, v.38, p.421-424, 1998.
- MÉDALE, D.; BLANC, D.; KAUSHIK, S.J. Studies on the nutrition of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. II. Utilization of dietary non-protein energy by sturgeon. **Aquaculture**, v. 93, p. 143-154, 1991.
- MELLO JR., C. A. Processamento de grãos de milho e sorgo visando aumento do valor nutritivo. In: Simpósio Sobre nutrição de Bovinos, 4. 1991, Piracicaba. **Anais...**, Piracicaba: Esalq, p. 263 -83, 1991.
- MELO J. F. B, LUNDSTEDT L. M, METÓN I, BAANANTE IV, MORAES G. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae) **Comp. Biochem. Physiol.**, v.145, Part A, p.181-187, 2006.
- MELO, J.F.B., **Digestão e metabolismo de jundiá *Rhamdia quelen* submetido a diferentes regimes alimentares.** 2004, 80f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- MENDONÇA, P.P.; TONINI, W.C.T.; VIDAL JR, M.V.; FERREIRA, R.A.; ANDRADE, D.R. Tempo de passagem em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, 2. 2006, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Aquaciência, CD, 2006.
- METÓN, I.; MEDIAVILLA, D.; CASERAS, A.; CANTÓ, E.; FERNÁNDEZ, F. & BAANATE, I.V. 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**, v.82, p. 223-232, 1999.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R. Influência do processamento da ração no desempenho e sobrevivência da tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.2, p.262-267, 2003.

- MILLÁN, L. M.; HERRERO, A. V.; GUERRERO, I. C. Tecnología de fabricación de piensos para la acuicultura. In. MONTEROS, J. E. de los; LABARTA, U. **Alimentacion en acuicultura**. Madrid: Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, p. 131-166, 1987.
- MOHANTA, K.N.; MOHANTY, S.N.; JENA, J.K. Protein-sparing effect of carbohydrate in silver barb, *puntius gonionotus* fry. **Aquaculture Nutrition**, v.13, p. 311-317, 2007.
- MORAES, G., BIDINOTTO, P.M. Induced changes in the amylohydrolytic profile of the gut of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1885) fed different levels of soluble carbohydrate: its correlation with metabolic aspects. **Revista de Ictiologia**, v. 8, p. 47-51, 2000.
- MORAES, G., BIDINOTTO, P.M. J. Digestive proteases of pacu *Piaractus mesopotamicus*, fed on distinct protein starch diets. **Journal Applied Aquaculture**, v.15, n3/4, p.197-207, 2002.
- MORAES, G., VIEIRA, V.L.P AND INOUE, L.A.K. Metabolic responses of matrinxã (*Brycon cephalus*) to dietary protein level. **Comparative Biochemistry and Physiology**, A-Molecular and Integrative Physiology, v. 140, p. 337-342, 2005.
- MORAES, G.; HONORATO, C.A.; DE ALMEIDA, L.C.; CAMILO, R. Aspectos adaptativos Metabólicos da Nutrição de peixes neotropicais de água doce. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 101-107, 2007.
- MOREIRA, A.B.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V.; MATSUSHITA, M. Composição de ácidos graxos e teor de lipídios em cabeças de peixes: matrinxã (*B. Cephalus*), piraputanga (*B. Microlepis*) e piracanjuba (*B. Orbignyanus*), criados em diferentes ambientes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p. 179-183, 2003.
- MOREIRA, I.S.; PERES, H.; COUTO, A.; ENES, P.; OLIVA-TELES, A. Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in Europa sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 274, p. 153-160, 2008.
- MOYES, C.D. & WEST, T.G. Exercise metabolism of fish. In: Hochachka, P.W. & Mommsen, P. (eds.). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Elsevier Science, 4: 367-392, 1995.
- MUÑOZ-RAMÍREZ, A. P. **Utilização de carboidratos digestíveis em dietas para pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)**. 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aquicultura da UNESP – Univesidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2005.
- NACHI, A.M. **Intestino de “Prochilodus scrofa” (Curimatá): Estudo histológico, histoquímico de glicoconjugados e da absorção de lipídeos utilizados diferentes métodos de inclusão**. 1988. 180f. Dissertação (Mestardo em Histologia) - Intituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 1988.
- NANKERVIS, L.; MATTHEWS, S. J.; APPLEFORD, P. Effect of dietary non-protein energy source on growth, nutrient retention and circulating insuline-like growth factor I and triiodothyronine levels in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. **Aquaculture**, v. 191, p. 323-335, 2000.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestics animals**. Washington, D.C: p. 114, 1993.
- NETO, G. **Soja integral na alimentação de aves e suínos**. Avic. Ind. p 4 – 15. 1992.
- NILSSON, G.S.; BERGQUIST, K.E., NILSSON, U & GORTON, L. - **Starch**, v.48, p.352, 1996.
- NORVÁK, M. Colorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. **J. of Lipid Research**, v.6, p.431-433, 1965.
- OSTASZEWSKA, T., DABROWSKI, K., PALACIOS, M.E., OLEJNICZAK, M., WIECZOREK, M. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. **Aquaculture**, v. 245, p. 273–286, 2005.

- OWENS, F. N. Limits starch digestion in the ruminant small intestine. **Journal Animal Sci.**, v. 63, n. 1, p. 1634-48, 1986.
- PARK, J.T., JOHNSON, M.J. A submicro determination of glucose. **Journal Biology Chem.** 181, 140-151, 1949.
- PERES, H., GONÇALVES, A. & OLIVEIRA-TELES, A. Glucose tolerance in gilthead seabream (*Saprus aurata*) and European seabass (*Dicentarchus labrax*) **Aquaculture**, v. 179, p. 415-423, 1999.
- 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. p. 391-432, 1969.
- RAGHEB, A.A.; EL-THALOUTH, I.A. & TAWFIK, S. - **Starch**, v.48, p.57, 1996.
- RAWLES, S.D.; SMITH, S.B.; GATLIN, D.M. Hepatic glucose utilization and lipogenesis of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) in response to dietary carbohydrate level and complexity. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, p. 40-50, 2008.
- RAWLES, S.D; GATLIN, D.M. Nutrient digestibility of common feedstuffs in extruded diets for sunshine bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. **J. World Aquac. Society**, v. 31, n. 4, p. 570-579, 2000.
- REITMAN, S., FRANKEL, S. A colrimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 28, p. 56, 1957.
- REIMER, G.. The influence on diet on the digestive enzymes of the amazon fish Matrincha, *Brycon cf melanopterus*. **J. Fish Biol.**, v. 21, p. 637-642, 1982
- REOPEREZ, J.; TORTUERO, F.; RODRÍGUEZ, M.L.; FERNÁNDEZ, E. Efecto de la alimentación com harina de soja sometida a distintos tratamientos sobre el crecimiento y morfología intestinal del lechon. **Archivos de Zootecnia**, v. 42, p. 125 – 135, 1993.
- RODRIGUES, E.L.; FANTA, E. Liver histopatology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal level of the organophosphate Dimethoate500. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n. 2. p. 441-450, 1998.
- ROMARHEIM, O.H.; ZHANG, C.; PENN,M.; LIU, Y.-J.; TIAN, L.-X. A.; SKREDE, KROGDAHL, Å.; STOREBAKKEN, T. Growth and intestinal morphology in cobia (*Rachycentron canadum*) fed extruded diets with two types of soybean meal partly replacing fish meal. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, n 2, p. 174-180, 2008.
- ROONEY, L.W.; PFLUGFELDER, R.L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1607-1623, 1986.
- ROSSI-WONGSTSCHOWKI, C. L. D. B. Estudo das variações da relação peso total/comprimento total e função do ciclo reprodutivo e comportamento de *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) da costa do Brasil entre 23°S e 28°S. **Boletim Instituto Oceanográfico**, v. 26, p. 131-180, 1977.
- ROTTA, M. A.-**Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestório dos peixes relacionados à piscicultura**. EMBRAPA-CPAP. Corumbá, MS, (Documento 53), p.48, 2003.
- RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K.; MOSS, R.; ANDRESEN,L.H.; BERG, A.; WAAGBØ. Different expression of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 7-23, 2006.
- RYCHLY, J. Nitrogen balance in trout. II Nitrogen excretion after feeding diets with varying protein and carbohydrate levels. **Aquaculture**, v. 20, p. 343-350, 1980.
- SÁ, O.R. (1998). **Toxicidade do herbicida Roundup (Glifosato) e do acaricida (Propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes)**. São Carlos. 307p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. 1998.
- SÁ, R.; POSÃO-FERREIRA, P. OLIVA-TELES, A. Effect of dietary and lipid levels on growth and feed utilization of white sea bream (*Diplodus sargus*) juvenis. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, p. 310-321, 2006.

- SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. **Aquaculture**, v. 54, p. 205-240, 1986.
- SAKOMURA, N. K. **Estudo do valor nutricional das sojas integrais processadas e de sua utilização na alimentação de frangos e poedeiras**. 1996. 178p. (Livre- Docência em Avicultura) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.
- SAKR, S.A.; JAMAL AL LAIL, S.M. Fenvalerante induced histopatological and histological changes in the liver of the catfish *Clarias gariepinus*. **Journal Applied Sciences Research**, v. 1, n. 3, p. 263-267, 2005.
- SÁNCHEZ-MUROS, M.J., GÁRCIA-REJÓN, L., GÁRCIA-SALGUERO, L., LAHIGUERA, M.; LUPIÁÑES, J.A. 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**, v. 30, p. 55-63, 1998.
- SANTOS, A.A.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FELIZARDO, N.N.; RODRIGUES, E.L. Análise histopatológica de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n. 2, p.141-145, 2004.
- SAS (STATICAL ANALYSIS SYSTEM). Institute, SAS/STAT. **User's guide: statistic**. Cary, North Caroline: Versão 6.08, 4 ed., (2): 846 p. 1996.
- SCHUCHARDT, D.; VERGAR, J.M.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; KALINOWSKI, C.M.; HERNANÁNDEZ-CRUZ, C.M.; IZQUIERDO, M.S.; ROBAINA, L. Effects of different dietary protein and lipid levels on growth feed utilization and body composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) fingerlings. **Aquaculture nutrition**, v. 14, p. 1-9, 2008.
- SEENAPPA, D. & DEVARAJ, K.V. Effect of different level of protein, fat and carbohydrate on growth, feed utilization and body carcass composition of fingerlings in *Catala catala* (Ham.) **Aquaculture**, v. 129, p. 243-249, 1995.
- SEGNER, H.; RÖSCH, R.; SCHMIDT, H.; VON POEPPINGHAUSEN, .J. Studies on the suitability of commercial dry diets for rearing of *coregonus lavaretus* larvae from Lake Contance. **Aquatic Living Resourth**, v. 1, p. 231-238, 1988.
- SHIAU, S. Y. & LIN, Y. H. Utilization of glucose and starch by the grouper *Epinephelus malabaricus* at 23°C. **Fisheries Science**, v. 68, p. 991-995, 2002.
- SHIAU, S.Y. Utilization of carbohydrates in warm water fish- with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. **Aquaculture**, v. 151, p. 79-96, 1997.
- SHIAU, S.Y.; CHEN, M.J. Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis nilo-ticus* x *O. aureus*) as influenced by different chromium sources. **Journal Nutrition**, v. 123, p. 1747-1753, 1993.
- SHIMENO, S. Studies on carbohydrate metabolism in fishes. **Rep. Fish. Lab. Kochi Univ.** (Japan), v. 2, p. 1-107, 1974.
- SILVA, A.J. **Aspectos da alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (BERG, 1985) (PISCES, CHARACIDAE), no pantanal de Mato Grosso**. 1985. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Zoología) -. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1985.
- SILVA, J.A.M.; FILHO, M.P.; OLIVEIRA-PEREIRA, M.I. Frutos e sementes consumidas pelo tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) incorporados em rações. Digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1815-1824, 2003.
- SINGH, R.K.; BALANGE, A.K.; GHUGHUSKAR, M.M. Protein sparing effect carbohydrate in the diet of *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822) fry. **Aquaculture**, v.258, p. 680-684, 2006.
- SMITH, L.S. **Digestive functions in teleost fish**. In **Lecture presented at the FAO/UNDP Training Course in fish feed technology**, ACDP/REP/ 80/11. p. 3-17, 1989.



- SOEST J. J. G.; HULLEMAN, S. H. D., WIT, D., VLIEGENTHART, J.F.G - **Ind. Crop Prod.**, v.5, p.11, 1996.
- SPANNHOF, L. & PLANTKOW, H. Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 30, p. 95-108, 1983.
- STONE, D.A.J.; ALLAN, G.L. ANDERSON, A.J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidynus* (Mitchell) IV. Can dietary enzymes increase digestible energy from wheat starch, wheat and dehulled lupin?. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 135-147, 2003.
- SUÁREZ, M.D. HIDALGO, M.C.; GALLEGO, M.G.; SANZ, A.; DE LA HIGUERA, M. Influence of relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the Europa eel. **Comparative Biochemistry and Physiology.**, v. 111, Parte A, p. 421-428, 1995.
- SUÁREZ, R.K.; MOMMSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fish. **Can. J. Zool.**, v. 65, p. 1869-1882, 1987.
- SUÁREZ-MAHECHA, H.; FRANCISCO, A.; BEIRÃO, L.H.; BLOCK, J.M.; SACCOL, A. A importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Boletim do Instituto de Pesca**, v28, n.1, p.101-110, 2002.
- SULLIVAN, J. A.; REIGH, R. C. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). **Aquaculture**, v. 138, p. 313-322, 1995.
- SUNDE, J.; EIANE, S.A.; RUSTAD, A., JENSEN, H.B.; OPSTVEDT, J.; NYGÅRD, E.; VENTURINI, G.; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. Effect of fish processing conditions on digestive parameters, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture Nutrition**, v. 10, p. 261-277, 2004.
- TACON, A. G. J. **Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados – Manual de capacitacion**. FAO, Doc 4. Brasília-DF . 136 p, 1989.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An Atlas of Fish Histology – Normal and Pathological Features**. 2ed. Tokio: Kondansha Ltda; Stuttgart, New York: Fisher. 195p, 1995.
- TAKEUCHI, T., HERNANDEZ, M., WATANABE, T. Nutritive value of gelatinized corn meal as a carbohydrate source to grass carp and hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Fisheries Science**, v. 60, p. 573-577, 1994.
- TAKEUCHI, T.; JEONG, K. S.; WATANABE, T. Availability of extruded carbohydrate ingredients to rainbow trout *oncorhynchus mykiss* and carp *cyprinus carpio*. **Bulletin Japanese Society Science Fish**, Tokio, v. 56, n. 11, p. 1839-1845, 1990.
- THARANATHAN, R. N. Food-derived carbohydrates – Structural complexity and functional diversity. **Crit Rev Biotechnol**, v.22, p.65-84, 2002.
- THAKUR, S.; SAXENA, D.C. Formulation of extruder snack food gum based cereal-pulse blend: optimization of ingredients levels using response surface methodology. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v. 33, p. 354-361, 2000.
- THEURER, C. B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. **J. Anim. Sci.**, v. 63, p. 1649 – 62, 1986.
- TIBBETTS, I.R. The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhamphus sclerolepis krefftii*. **Journal of Fish Biology**, v. 50, p. 809-820, 1997.
- TOCHER, D.R.; GHIONI, C. Fatty acid metabolism in marine fish: Low activity of fatty acyl Δ5 desaturation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cells. **Lipids**, v. 34, p. 433-40, 1999.
- TOLEDO, M.P. **Processamentos de dietas práticas com diferentes fontes de energia para o crescimento e a digestibilidade da tilápia do Nilo**. 2004. 98 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura), Centro de Aqüicultura, UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2004.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annal. Clin. Biochem**, v. 6, p. 24-27, 1969.

- VAN DEN THILLART, G., VAN RAAIJ, M. Endogenous fuels; non invasive versus invasive approaches. In: Hochachka, P.W., Mommsen, P. (eds). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v.4, pp. 33-63, 1995.
- VAN DER MEER, M.B.; ZAMORA, J.E. VERDEGEM, M.C.J. Effect of dietary lipid level on protein utilization and the size and proximate composition of body compartments in *Collossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 28, p. 405-417, 1997.
- VELÁZQUEZ, M., ZOMURA, S. & MARTINEZ, F.J. Effect of dietary energy content on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) feeding behaviour and nutritional use of the diet. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, p. 127-133, 2006.
- VENOU, B., ALEXIS, M. N., FOUNTOULAKI, E., NENGAS, I., APOSTOLOPOULOU, M. & CASTRITSI-CATHARINOU, I. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 225, p. 207-223, 2003.
- WALTER, H.E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 5: 270-277, 1984.
- WASSEF, E.A.; WAHBY, O. M.; SAKR, E. M. Effect of dietary vegetable oils on health and liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*) growers. **Aquaculture Research**, v 38, p. 852-861, 2007
- WATANABE, T. Lipid nutrition in fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 73B, p. 3-16, 1982.
- WEATHERLEY, A.H, GILL, H.S. Growth increases produce by bovine growth hormones in grass pickerel, *Esox american vermiculatus* (Le Sueur), and the underlying dynamics of muscle fiber growth. **Aquaculture**, 65: 55-66, 1987.
- WILSON, R. P.; POE, W. E. Apparent digestibility Protein and energy coefficients of common feed ingredients for Channel Catfish. **Prog. Fish-Cult.**, v. 47, n 3, p. 155-158, 1985.
- WILSON, R.P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v. 124, p. 67-80, 1994.
- WILSON, R.P. **Amino acids and proteins**. In: Halver, J.E. (Ed.), **Fish Nutrition**. 2 ed. Academic Press, San Diego. p.111-153, 1989.
- WULANSARI, R.; MITCHELL, J.R.; BLANSHARD, J.M.V. Starch onversion durin extrusion as affected by added gelatin. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1055-1058, 1999.
- YAMAMOTO, T.; KONISHI, K. SHIMA, T.; FURUITA, H.; SUZUKI, N., TABATA, M. Influence in dietary fat and carbohydrate levels on growth and body composition of raibow trout *Oncorhynchus mykiss* under self- feeding conditions. **Fisheries Science**, v.67, p.221-227, 2001.
- YAMAMOTO, T.; UNUMA, T.; AKIYAMA, T. The influence of dietary protein and fat levels on tissue free amino acid levels of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 180, p. 353-372, 2000.
- YIN, Y.L.; MCEVOY, J.D.G.; SCHULZE, H. Apparent digestibility (ileal an overall) of nutrients and endogenous nitrogen losses in growing pigs fed wheat (var. Soissons) or its by-products without or with xylanase supplementation. **Livestock production Science**, v. 62, p. 119-132, 2000.
- YOSHITOMI, B. Effect of extrusion cooking temperature on the microstructure of extruded pellets. **Fisheries Science**, v. 70, p. 1157-1163, 2004.
- YOUNG, A., MORRIS, P.C., HUNTINGFORD, F.A. & SINNOTT, R. Replacing fish oil with pre-extruded carbohydrate in diets for Atlantic salmon, *Salmo solar*, during their entire marine grow-out phase: Effects on growth, composition and colour. **Aquaculture**, v. 253, p. 531-546, 2006.
- ZAPATA, C.R.O. Efeitos da somatostatina-14 (Srif-14) sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios no Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (**Pisces – Characidae**), publicado em 2001. Disponível em: <http://www.dedalus.ups.br>. Acesso em 18/01/04.