

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

**PERFIL DIGESTIVO E METABÓLICO DE JUVENIS DE**  
**TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818),**  
**ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA E**  
**LIPÍDIO.**

**Luciana Cristina de Almeida**

**São Carlos**  
**2006**

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

**PERFIL DIGESTIVO E METABÓLICO DE JUVENIS DE  
TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818),  
ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA E  
LIPÍDIO.**

**Luciana Cristina de Almeida**

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

**São Carlos**

**2006**

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

A447pd

Almeida, Luciana Cristina de.

Perfil digestivo e metabólico de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), alimentados com diferentes teores de proteína e lipídio / Luciana Cristina de Almeida. – São Carlos : UFSCar, 2007.

77 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Bioquímica. 2. Metabolismo. 3. Nutrição. 4. Tambaqui (Peixe). I. Título.

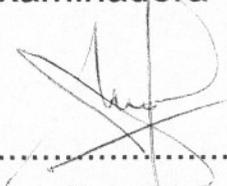
CDD: 574.192 (20<sup>a</sup>)

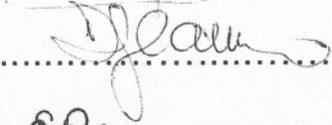
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

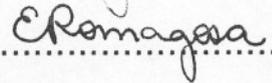
**“PERFIL DIGESTIVO E METABÓLICO DE JUVENIS DE  
TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818),  
ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES DE PROTEÍNA”**

Dissertação de Luciana Cristina de Almeida

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilberto Moraes.....

Prof. Dr. Dalton José Carneiro.....

Profa. Dra. Elizabeth Romagosa.....

---

Prof. Dr. Gilberto Moraes

Orientador

Dedico este trabalho aos meus pais, os quais sempre me deram a oportunidade de aprender e sempre me apoiaram nos meus objetivos e sonhos.

## **Agradecimentos**

*Agradeço ao Prof. Dr. Gilberto Moraes pela orientação e amizade durante estes anos, pelo incentivo e pela paixão contagiante pela ciência e o saber. Também pela receptividade e aconchego familiar que ofereceu durante este período.*

*Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro dado ao projeto.*

*Ao CAUNESP pela doação dos exemplares de tabaqui utilizados neste trabalho e por disponibilizar o uso de equipamento para a manufatura das rações.*

*A Ive, Cláucia e Thori pela amizade e por toda a ajuda nas análises durante todo o trabalho.*

*A Lícia pela amizade e ajuda na manufatura das dietas experimentais e pela orientação neste tema nutrição.*

*A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica Adaptativa, sem os quais este trabalho nunca teria sido realizado, tanto pelo apoio técnico quanto pela força emocional: Luís, Araceli, Livia, Rodrigo, Gustavo, Cássia, Andressa e em especial ao seu Toninho pela sua indispensável ajuda e suporte técnico para a realização do experimento desta dissertação.*

*As colegas do Programa de Genética e Evolução Regiane e Tatiana por toda a paciência e ajuda nos momentos cruciais.*

*Aos amigos que durante todo o tempo estiveram ao meu lado oferecendo apoio incondicional e muitos momentos agradáveis: Cristina, Cristiane, Ana, Aline, Graziela, José Pedro, Katrina, Fúlvio Carol, Fernando, Rodrigo entre tantos outros que guardo dentro do meu coração.*

*Aos meus avós Ivone e Manoel pelo carinho e força durante este período.*

*Aos meus queridos irmãos Roberto e André pela paciência, parceria, companheirismo, saudade, ajuda nos momentos complicados e pelos inúmeros momentos agradáveis.*

*Aos meus pais por todo o incentivo ao estudo, ao esforço financeiro, saudade, e acima de tudo pela compreensão da minha ausência durante estes anos para que eu pudesse dar mais este passo na minha vida. Sem eles nada disso seria possível.*

## RESUMO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, onde propusemo-nos a estudar os aspectos digestivos e metabólicos de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum*, alimentado com quatro dietas isoenergéticas com diferentes níveis de proteína (35, 30, 25 e 20,5 %) e lipídio (4, 8, 11 e 14,5 %). Foram analisados os parâmetros hematológicos, a porcentagem de ganho em peso, as atividades das enzimas digestivas (proteases inespecíficas, lipase inespecífica e amilase), intermediários metabólicos (glicose, lactato, piruvato, amônia, proteína, ácidos graxos livres, triglicerídeos livres, aminoácidos e glicogênio) no fígado, músculo branco e plasma e enzimas do metabolismo (LDH, MDH, GDH, ASAT e ALAT). Os resultados obtidos indicaram que os parâmetros hematológicos não apresentaram alterações em função dos níveis de nutrientes das dietas. As enzimas digestivas foram responsivas à mudança nos teores de proteína e lipídio das dietas. Os tratamentos I e II apresentaram as melhores porcentagens de ganho em peso quando comparados aos tratamentos III e IV. O fígado realizou glicólise, glicogenólise e lipólise conforme aumentou o teor de lipídio na dieta. O músculo branco realizou glicogênese, neoglicogênese a partir de aminoácidos e lipólise para atender a demanda energética quando os teores de lipídio aumentaram nas dietas experimentais. O perfil metabólico do plasma refletiu seu papel de transporte dos diversos intermediários metabólicos entre os tecidos, refletindo os ajustes bioquímicos do metabolismo de tambaqui frente às mudanças na composição das dietas. Concluímos que as enzimas digestivas de tambaqui são induzidas pela concentração de proteína e lipídio da dieta, o aumento do teor de lipídio da dieta diminuiu a porcentagem de ganho em peso dos animais, aumentou a glicólise e a glicogenólise hepáticas, aumentou a glicogênese e a neoglicogênese musculares. A preferência metabólica nas condições ensaiadas para manutenção dos processos de produção de energia foi lipolítica.

## ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the metabolism of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed 4 different protein (35, 30, 25 e 20,5 %) and lipids (4, 8, 11 e 14,5 %) levels in isoenergetic diets. The experiment was carried out in the facilities of the Adaptive Biochemistry Laboratory, located in the Genetics and Evolution Department of the Federal University of São Carlos. Fish growth, hematological parameters, digestive enzymes (unspecific proteases, unspecific lipase and amylase), metabolites (glucose, lactate, piruvate, ammonia, protein, fat acids, triglycerides, amino acids and glycogen), and the enzymes LDH, MDH, GDH, ASAT and ALAT were assayed. The hematological parameters presented no significant alterations. Tambaqui digestive enzymes were responsive to dietary levels of protein and lipids. Fish from the treatments I and II depicted the best growth. In contrast, the lowest one was observed in fish fed with the treatments III and IV. We detected glycolysis, glycogenolysis and lipolysis in livers in accordance the increase of the dietary lipid. It was observed muscular glycogenesis and gluconeogenesis from amino acids and lipolysis to energetic supply in fish fed with high lipid levels. The plasma metabolic profile reflected the function of blood metabolite deliver among the tissues underlining biochemical adaptations due to alterations on the fish feeding. In conclusion, dietary protein and lipid levels induced tambaqui digestive enzymes. The increase of dietary lipid resulted in fish growth decreased, augmented the liver glycolysis and glycogenolysis, increase the muscular glucogenesis and the gluconeogenesis. The fish metabolism seemed to be predominantly lipolitic.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplar de tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> .....	17
Figura 2- Porcentagem de ganho em peso de tambaquis alimentados com teores decrescentes de proteína e crescentes de lipídio nas dietas experimentais.....	31
Figura 3- Atividade de protease, lipase e amilase em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína no canal alimentar de tambaqui alimentado com diferentes níveis de proteína e lipídio na dieta....	35
Figura 4- Valores relativos (%) das atividades das enzimas digestivas e dos macronutrientes da dieta em diferentes porções do trato de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes conteúdos de proteína e lipídio. (a) protease estomacal, (b) lipase do intestino anterior e (c) amilase dos cecos pilóricos. Os valores relativos representam a razão (atividade corrente/atividade máxima) x 100.....	36
Figura 5- Perfil glicídico hepático de <i>C. Macropomum</i> alimentado com diferentes teores de lipídio e proteína na dieta. (a) açúcares totais, (b) glicogênio, (c) lactato, (d) piruvato, (e) atividade da LDH e (f) atividade da MDH.....	39
Figura 6- Perfil protéico do fígado de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) aminoácidos livres, (b) proteína, (c) amônia, (d) atividade da GDH, (e) atividade da ALAT, (f) atividade da ASAT. ....	40
Figura 7- Perfil lipídico hepático de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) TGL e (b) AGL. ....	41
Figura 8- Perfil glicídico do músculo branco de <i>C. Macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) açúcares totais, (b) glicogênio, (c) lactato, (d) piruvato, (e) atividade da LDH.....	43
Figura 9- Perfil protéico do músculo branco de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) aminoácidos livres, (b) proteína, (c) amônia.....	44
Figura 10- Perfil lipídico do músculo branco de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) TGL e (b) AGL.....	44
Figura 11- Perfil glicídico do plasma de <i>C. Macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) açúcares totais, (b) lactato, (c) piruvato.....	46

Figura 12- Perfil protéico do plasma de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) aminoácidos livres, (b) proteína, (c) amônia.....	47
Figura 13- Perfil lipídico do plasma de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) TGL e (b) AGL.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fórmulas e composição das dietas experimentais (baseada na matéria natural).....	20
Tabela 2- Parâmetros hematológicos de tambaquis submetidos a quatro dietas experimentais com diferentes teores de proteína e lipídio. Valores apresentados como média $\pm$ desvia padrão. P = proteína e L = lipídio.....	32
Tabela 3- Atividades específicas das enzimas digestivas (média $\pm$ S.E.M.) nas porções do trato gastrintestinal de tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) alimentado com diferentes níveis de proteína e lipídio na dieta.....	34
Tabela 4- Média $\pm$ desvio padrão dos intermediários metabólicos e enzimas, analisados no fígado de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta.....	38
Tabela 5- Média $\pm$ desvio padrão dos intermediários metabólicos e enzimas, analisados no músculo branco de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta.....	42
Tabela 6- Média $\pm$ desvio padrão dos intermediários metabólicos analisados no plasma de <i>C. macropomum</i> alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta.....	45

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações Gerais.....	1
1.2 Nutrição de Peixes.....	1
1.2.1 Proteína.....	2
1.2.2 Lipídio.....	4
1.2.3 Carboidrato.....	4
1.3 Digestão.....	5
1.4 Destino dos nutrientes: metabolismo intermediário e tecidos.....	6
1.5 <i>Colossoma macropomum</i> : aspectos gerais e importância da espécie.....	12
1.5.1 Nutrição de tambaqui.....	14
1.6 Justificativa.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.1.2 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Material biológico e manejo.....	19
3.1.1 Desenho Experimental.....	19
3.1.2 Condições Ambientais.....	21
3.2 Ganho em peso (GP).....	21
3.3 Determinações Hematológicas.....	21
3.3.1 Hematócrito.....	21
3.3.2 Hemoglobina total.....	21
3.4 Preparação dos homogeneizados celulares.....	22
3.4.1 Extrato enzimático.....	22
3.5 Determinações enzimáticas.....	22
3.5.1 Enzimas digestivas.....	22

Protease Inespecífica.....	22
Lipase.....	23
Amilase.....	24
3.5.2 Transaminases.....	24
3.5.3 Desidrogenases.....	25
Lactato desidrogenase (LDH).....	25
Malato desidrogenase (MDH).....	25
Glutamato desidrogenase (GDH).....	25
3.6 Intermediários metabólicos.....	26
Preparação dos extratos ácidos.....	26
Preparação dos extratos alcalinos.....	26
Preparação dos extratos neutros.....	26
3.7 Determinação dos intermediários metabólicos.....	26
3.7.1 Açúcares totais.....	26
3.7.2 Glicogênio.....	27
3.7.3 Lactato.....	27
3.7.4 Piruvato.....	27
3.7.5 Aminoácidos livres.....	28
3.7.6 Proteínas solúveis.....	28
3.7.7 Amônia.....	28
3.7.8 Triglicerídeos livres.....	29
3.7.9 Ácidos graxos livres.....	29
3.8 Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Condições ambientais.....	31
4.2 Ganho em peso.....	31
4.3 Parâmetros hematológicos.....	32
4.4 Enzimas digestivas.....	32
4.4.1 Protease.....	32
4.4.2 Lipase.....	33

4.4.3 Amilase.....	33
4.5 Metabolismo intermediário.....	37
4.5.1 Fígado.....	37
4.5.2 Músculo branco.....	41
4.5.3 Plasma.....	45
5. DISCUSSÃO.....	48
5.1 Ganho em peso.....	48
5.2 Parâmetros Hematológicos.....	49
5.3 Enzimas Digestivas.....	50
5.3.1 Protease.....	50
5.3.2 Lipase.....	52
5.3.3 Amilase.....	53
5.4 Metabolismo Intermediário.....	54
5.4.1 Fígado.....	54
5.4.2 Músculo branco.....	56
5.4.3 Plasma.....	57
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Considerações Gerais**

Na piscicultura intensiva, os gastos com alimentos representam de 50 a 70 % dos custos de produção, e uma significativa redução nestes custos pode ser alcançada através da utilização de ingredientes de alta qualidade, do uso de técnicas eficazes de processamento das rações e da aplicação de estratégias na alimentação (KUBITZA, 1998). Com isto faz-se necessário buscar parâmetros que reflitam o aproveitamento do alimento pelo peixe (MELO, 2004).

Estudos em nutrição, com ênfase na utilização, digestão e rendimento de macronutrientes, vêm ganhando importância, particularmente na otimização das condições de cultivo das espécies de peixes economicamente viáveis, na tentativa de reduzir o impacto ambiental (HALVER & HARDY, 2002) e aumentar a lucratividade da aquicultura. Estes estudos estão baseados na capacidade do animal aproveitar o alimento e na sua resposta metabólica frente à variação nutricional da dieta (SUÁREZ et al., 1995), e na influência de fatores que possam atuar no aproveitamento destes nutrientes. Entre tais fatores, a inter-relação entre as atividades enzimáticas dos processos digestórios e o perfil metabólico adaptativo tem demonstrado resultados satisfatórios (MORAES & BIDINOTTO, 2000, CORRÊA, 2002, LUNDSTEDT et al, 2004).

### **1.2 Nutrição de peixes**

Segundo CARTER e colaboradores (2001b), a nutrição de peixes é um ramo da fisiologia que se destina amplamente ao estabelecimento da relação entre ração e o crescimento do peixe, à comparação entre possíveis ingredientes alimentares e à determinação dos requerimentos nutricionais da espécie.

De acordo com WEATHERLEY e GILL (1987), as necessidades nutricionais dos peixes, no geral, lembram as dos animais terrestres. A maior parte das informações relacionadas a necessidades na dieta foi derivada de experimentos conduzidos para peixes cultivados. A quantidade crescente de dietas formuladas de maneira conveniente para o cultivo de todos os estágios da vida dos peixes em cativeiro enfatiza a necessidade de

pesquisa em nutrição de peixes. A qualidade nutricional da dieta é importante para a criação de peixes e pode determinar em grande parte o sucesso ou o fracasso desta criação. Os estudos nutricionais têm demonstrado que qualquer dieta, a fim de promover o crescimento, precisa incluir uma fonte de energia, aminoácidos essenciais e, certas vitaminas e minerais. A nutrição influencia o comportamento, integridade estrutural, saúde geral além de várias funções fisiológicas, reprodução e crescimento do peixe.

### **1.2.1 Proteína**

Os alimentos naturais da maioria dos peixes têm grande parte de suas calorias na forma de proteínas (PHILLIPS, 1969), alguns dos quais são utilizados como fonte de energia para satisfazer necessidades metabólicas quando a energia de outras fontes da dieta não é suficiente para suprir essa demanda.

Níveis altos de proteína na dieta demandam um aumento no nível de energia para metabolizá-las. Há um limite no qual o corpo do animal não pode utilizar toda a proteína da dieta para o crescimento e o excesso é armazenado como gordura após deaminação ou usado como fonte de energia. Dietas com excesso de proteína são conseqüentemente a causa deste desperdício. A utilização de proteína como energia pode ser vantajosa para o peixe, do ponto de vista nutricional, por produzir mais energia livre quando comparada ao catabolismo de carboidratos, com mesmo equivalente em peso. Entretanto, a fração protéica, principalmente aquela de maior valor biológico, como a de alimento natural, é mais cara do que os carboidratos em geral. As proteínas seriam mais eficientes sob o ponto de vista econômico, se destinadas ao crescimento, para o qual são essenciais, enquanto as fontes não protéicas mais baratas, como carboidratos e lipídios, seriam utilizadas como energia (HEPHER et al., 1989), poupando proteínas da dieta (CHOU et al. 2001). Além disso, a amônia, a qual é conhecida por ser nociva para a saúde do peixe em altos níveis, é produzida em resposta a utilização de proteína para energia (MCGOOGAN & GATLIN, 1999). E, a perda de amônia para o ambiente contribui para a eutrofização da água se o ambiente estiver em desequilíbrio.

Assim, a substituição de proteína por lipídio pode reduzir a excreção nitrogenada e melhorar a qualidade da água dos tanques de experimentação ou cultivo. Segundo HEPHER e colaboradores (1989), a troca da proteína por carboidratos e/ou lipídios para suprir somente a demanda energética é uma perspectiva promissora. Segundo SUARÉZ e

colaboradores (1995), os lipídios da dieta, como nutrientes produtores de energia, teriam capacidade de reduzir os níveis dietéticos de proteínas, melhorando a retenção de nitrogênio. No entanto, observou-se também que peixes comem para satisfazer suas necessidades metabólicas de energia, então, conseqüentemente, os peixes comerão menos de uma dieta rica em energia do que de uma pobre (WEATHERLEY & GILL, 1987).

A energia em demasia em relação ao conteúdo protéico na dieta pode fazer com que o peixe evite consumir proteína suficiente com propósitos de crescimento (ELLIS et al., 1996). É, portanto, vital em aquicultura ter um equilíbrio entre a proteína da dieta e o conteúdo energético que vai maximizar o suprimento de proteína para o crescimento. Relações inadequadas entre alta energia e os nutrientes na dieta também podem levar à deposição de grandes quantidades de gordura na carcaça (LOVELL, 1988). Neste sentido, o balanço entre proteína e energia é, obviamente, o ponto central para o crescimento (CARTER et al., 2001).

De acordo com WEATHERLEY e GILL (1987), os diferentes tipos de proteínas nas dietas variam muito em seu valor para o crescimento principalmente na dependência de sua composição em aminoácidos. As melhores proteínas são as que contêm maior conteúdo de aminoácidos essenciais. Com base no valor nutricional para peixes, as proteínas são classificadas como de primeira e segunda classes. Proteínas animais como a farinha de peixe, possuem valores nutricionais mais elevados que as proteínas vegetais, porque satisfazem melhor a demanda de aminoácidos. A farinha de peixe tem, portanto, grande demanda resultando em seu custo crescente e oferta decrescente. Estes fatos contribuíram para os preços mais altos de alimentos para peixes, desde que farinha de peixe é utilizada na maior parte das formulações de rações.

Muitos pesquisadores tentaram substituir farinha de peixe por proteínas vegetais (por exemplo, a farinha de soja), devido ao seu conteúdo protéico, custo razoável e suprimento abundante. Esta substituição levou ao crescimento reduzido e a baixas taxas de conversão em carpas e outras espécies, devido à deficiência em alguns aminoácidos na farinha de soja (WEATHERLEY & GILL, 1987).

A proteína consumida pelo peixe é utilizada por duas rotas metabólicas, (1) catabolismo, produzindo energia para manutenção e (2) anabolismo, principalmente pela síntese de proteínas do corpo, função na qual a sua composição em aminoácidos

desempenha um papel crucial (HEPHER et al, 1989). Segundo CARTER e colaboradores (2001a), a quantidade de proteína sintetizada vai depender, não somente da quantidade de proteína absorvida, mas também do seu balanço em aminoácido e energia digestível. Ressaltam ainda que somente uma proporção relativamente pequena das proteínas ingeridas em uma refeição é retida como constituintes que refletem no crescimento.

### **1.2.2 Lipídio**

O lipídio está como fonte primária e mais energética para os animais. Seu papel principal é gerar energia metabólica na forma de ATP via B-oxidação, um processo mitocondrial (SHERIDAN, 1988; HALVER & HARDY, 2002). No ambiente aquático natural, lipídios existem tanto nas fontes animais como vegetais e, são armazenados predominantemente como trigliceróis e ésteres de cera. Em organismos de água doce, contudo, ésteres de cera não são encontrados em grande quantidade e trigliceróis são o principal componente do lipídio ingerido (COWEY & SARGENT, 1979).

Os animais aquáticos são hábeis em metabolizar lipídios, particularmente quando provindos de alimentos. Os lipídios da dieta exercem grandes funções, pois são fontes de energia e ácidos graxos essenciais necessários ao desenvolvimento adequado (CHOU et al. 2001), proporcionam maior palatibilidade ao alimento, servem como veículo para a absorção de vitaminas lipossolúveis e esteróis e, além disso, desempenham um importante papel na estrutura das membranas biológicas na forma de fosfolipídios e ésteres de esteróis (HEPHER et al, 1989; HERTRAMPF & PIEDAD-PASCUAL, 2000; WEIRICH & REIGH, 2001; JOHNSON et al., 2002). Para peixes, os lipídios não são apenas as maiores fontes de energia metabólica para o crescimento, do ovo até o animal adulto, mas também a maior fonte de energia metabólica para a reprodução (HALVER & HARDY, 2002). A maior parte dos ácidos graxos dos depósitos de gordura do corpo pode ser sintetizada pelos peixes a partir de precursores como carboidratos e proteínas quando em excesso (HEPHER et al, 1989).

É amplamente conhecido que quantidades de lipídios variando entre 10 e 20% do peso seco da dieta sejam suficientes para permitir o direcionamento da fração protéica da dieta eficientemente para o crescimento, sem que haja excessiva deposição de gordura na carcaça (COWEY & SARGENT, 1979; WATANABE, 1982). Apesar disto, a quantidade

precisa de lipídio depende do nível de proteína na dieta e, em alguns casos, também do nível de carboidrato (WATANABE, 1982).

### **1.2.3 Carboidrato**

Os carboidratos são necessários aos organismos por desempenharem importantes funções biológicas, tais como fornecer energia para o cérebro e tecido nervoso, na forma de glicose, e ainda, como precursor metabólico de ácidos nucleicos e mucopolissacarídeos (COWEY et al., 1975).

Como o ambiente aquático apresenta escassez de carboidratos, os sistemas digestório e metabólico dos peixes parecem estar melhor adaptados à utilização de proteínas e lipídios como recurso energético. Porém, peixes herbívoros ou onívoros podem digerir e metabolizar carboidratos relativamente bem, quando comparados com espécies carnívoras, como os salmonídeos (WEATHERLEY & GILL, 1987).

## **1.3 Digestão**

A digestão é o processo pelo qual o alimento é transformado em compostos mais simples, capazes de transpor a parede das células intestinais, alcançando a corrente sanguínea para serem transportados aos tecidos. As proteínas são hidrolisadas em aminoácidos livres ou cadeias peptídicas curtas; os carboidratos são hidrolisados em açúcares simples e as gorduras em ácidos graxos e glicerol. Estes processos são facilitados pela ocorrência das enzimas digestivas que atuam ao longo do trato gastrintestinal (JOBILING, 1994). Os peixes possuem proteases para a quebra de proteínas, carbohidrases para a quebra de carboidratos e lipases para a quebra de lipídios. O pâncreas é a fonte provável destas enzimas, mas sua natureza difusa em muitas espécies de teleósteos (BARRINGTON, 1957) se torna um problema na localização da fonte precisa destas secreções.

Segundo WEATHERLEY e GILL (1987), as propriedades digestivas e absorptivas do canal alimentar de peixes são muito importantes para determinar a taxa de digestão, rações diárias, etc. As características do trato digestório determinam até onde os nutrientes da dieta são assimilados. É muito provável que diferenças em desempenho no crescimento entre peixes são, até certo grau, atribuídas as diferenças interespecíficas nas propriedades de seus tratos digestivos e a eficiência com que o alimento ingerido é capaz de ser digerido

e assimilado. A habilidade dos peixes em processar a comida é fundamental e depende de características específicas como o perfil enzimático do canal alimentar da espécie (FAGBENRO et al., 2000), bem como das características adaptativas destas enzimas (LUNDSTEDT et al., 2004).

Estudos com enzimas digestivas ilustram que peixes podem executar processos de digestão na membrana sugerindo que eles apresentam adequadas adaptações à composição química da dieta (KUZ'MINA, 1991). Dessa forma, enzimas digestivas têm sido investigadas por muitos anos como um meio de entender o requerimento nutricional dos animais e o efeito dos constituintes da dieta na atividade destas enzimas (DIVAKARAN et al, 1999). Diferentes hábitos alimentares e preferências por alimento são conhecidos por compor o perfil enzimático do peixe e, este fato, traz importantes conseqüências; por exemplo, o potencial para o uso da dieta artificial e o ajuste do conteúdo desses itens para alcançar o resultado esperado (SABAPATHY & TEO, 1993; HIDALGO et al, 1999; MORAES & BIDINOTTO, 2000; DEGUARA, et al., 2003).

Segundo CHESLEY (1934), a estrutura do trato digestório e a distribuição das enzimas digestivas coexistem em uma correlação fechada. O trato digestório de peixes herbívoros é mais longo que o de peixes carnívoros. A enzima amilohidrolítica está presente em maior extensão em peixes herbívoros que em carnívoros. A capacidade de adaptação dos processos digestivos dos peixes, tais como perfil e secreção enzimáticos, absorção e transporte de nutrientes (KAPOOR et al., 1975; HOFER, 1979; BUDDINGTON et al. 1987 e 1997), parecem variar entre espécies. Os carnívoros, por exemplo, parecem ter uma capacidade limitada em alterar sua função digestiva e de transporte de nutrientes de acordo com a composição da dieta, enquanto os onívoros exibem uma habilidade muito maior em modular sua fisiologia digestiva e absorção (BUDDINGTON et al., 1987 e 1997).

Existem poucos estudos com espécies tropicais relacionando os componentes das dietas com aspectos metabólicos e digestivos. Considerando o grande volume de informações na literatura sobre enzimas digestivas em peixes de regiões temperadas, comparativamente muito pouco se sabe para peixes de clima tropical, inclusive os de interesse para a aquicultura (LUNDSTEDT et al, 2004).

No presente estudo nós nos interessamos nas características adaptativas e na resposta das enzimas digestivas em tambaqui como uma ferramenta para prever e otimizar a composição dos nutrientes da dieta.

#### **1.4 Destino dos nutrientes: metabolismo intermediário e tecidos**

O metabolismo intermediário responde pelo destino dos produtos da dieta após a digestão e absorção. O metabolismo compreende reações catabólicas e anabólicas que ocorrem no organismo, sendo os nutrientes utilizados como substrato para a produção de energia livre de reação para o crescimento (MELO, 2004).

Segundo DE SILVA e ANDERSON (1995), a quantidade de proteína consumida pelos peixes, através da dieta, afeta diretamente seu estado metabólico. Sendo assim, altos níveis de proteína resultam em aumentos nas concentrações de aminoácidos livres circulantes, da excreção de amônia, da síntese protéica, da atividade das enzimas gliconeogênicas e declínio da atividade das enzimas glicolíticas.

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

Os aminoácidos, oriundos da dieta ou da quebra de proteínas, desempenham numerosas funções em peixes e uma das principais é a construção de blocos de proteínas (BALLANTYNE, 2001). No entanto, são também necessários para a síntese de outros compostos associados com o metabolismo incluindo hormônios, neurotransmissores, purinas e enzimas metabólicas. Além disso, podem ser catabolizados para suprir a demanda energética metabólica. Os aminoácidos para este propósito são provenientes da dieta e, o seu “turnover” nos tecidos ocorre constantemente (HALVER & HARDY, 2002).

As mudanças na concentração dos aminoácidos são seqüenciais e refletem as rotas metabólicas através dos tecidos de acordo com a digestão, absorção, metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento (CARTER et al., 2001). O fluxo de aminoácidos e as

mudanças temporais em sua concentração nos diferentes tecidos dão idéia da dinâmica da relação entre ingestão de proteínas, metabolismo tecidual e utilização destes aminoácidos para a síntese protéica. Portanto, a habilidade em regular o grande influxo de aminoácidos, presumivelmente para manutenção da homeostase tecidual, bem como para aperfeiçoar a utilização da energia e proteína da dieta, é o ponto central para o sucesso desta relação (CARTER et al., 2001). A concentração do “pool” de aminoácidos livres é influenciada pela importação e exportação de aminoácidos em sua forma livre, como peptídeos ou proteínas, bem como pela sua utilização dentro de um tecido específico (JÜRS & BASTROP, 1995). A concentração de aminoácidos livres é relativamente baixa, pois a maior parte deles está compondo os tecidos protéicos do corpo (HALVER & HARDY, 2002).

Diferentemente dos carboidratos e lipídios, os aminoácidos não podem ser estocados. Quando em excesso, são desaminados e os resíduos de carbono são oxidados ou convertidos em lipídios, carboidratos ou ainda outros compostos. O grupamento amino é removido dos aminoácidos principalmente por transaminação ou por desaminação oxidativa. A transaminação parece ser a principal rota inicial para desaminação em peixes, envolvendo a transferência da amônia do grupo amino para um  $\alpha$ -ceto ácido, usualmente  $\alpha$ -cetoglutarato. O ceto ácido formado na transaminação inicial pode ser oxidado, convertido a lipídio ou ainda ser usado na síntese de outros compostos (LOVELL, 1988). As enzimas envolvidas neste processo são a alanina aminotransferase (ALAT) e a aspartato aminotransferase (ASAT). Segundo WALTON & COWEY (1989), a ALAT e a ASAT são as mais importantes transaminases quantitativas envolvidas neste processo. Segundo estes autores, os níveis destas enzimas têm sido estudados para um número de peixes em relação à composição da dieta. A enzima GDH está envolvida no processo de desaminação oxidativa do glutamato ocorrida pelas reações de transaminação de grupos alfa-amino de vários aminoácidos. A GDH controla o catabolismo de aminoácidos podendo resultar em uma substancial produção de amônia (WALTON & COWEY, 1989). A desaminação pela GDH representa um meio de remover o nitrogênio dos aminoácidos, e de as cadeias carbonadas serem utilizadas como energia no ciclo de Krebs. A GDH é muito similar em peixes e mamíferos e apresenta as maiores atividades nas brânquias, rim, músculo vermelho

e fígado (CHRISTIANSEN & KLUNGSOYR, 1987). É uma enzima mitocondrial e, sendo assim, a amônia é produzida mitocondrialmente (BALLANTYNE, 2001).

O tecido hepático desempenha papel fundamental no metabolismo de carboidratos, além do metabolismo protéico. Para MOON e FOSTER (1995) o principal papel do fígado no metabolismo glicídico é a conversão de substratos constituídos de 3 carbonos, provenientes da dieta, em compostos energéticos a serem nele estocados, ou a formação de glicose a ser exportada para os demais tecidos. Sendo assim, ao invés de funcionar como um órgão intermediador na manutenção do ciclo de carbono, o fígado também poderia funcionar suprindo os estoques de reserva energética ou glicogênio.

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

O principal produto final do catabolismo de proteínas em teleósteos é a amônia e uma proporção significativa de perda nitrogenada é também excretada como uréia (WOOD et al., 1995). Conseqüentemente, medidas da excreção de amônia e uréia têm sido usadas como indicadoras dos efeitos de vários fatores ambientais e nutricionais no metabolismo protéico e pode dar uma idéia do balanço de nitrogênio do peixe (RYCHLY & MARINA, 1977; JOBLING, 1981; BEAMISH & THOMAS, 1984; PEREIRA et al., 1995). Portanto, a quantificação da excreção de amônia para espécies de peixes em relação à nutrição é importante para operações em cultivo intensivo de peixe porque o metabolismo protéico define parcialmente o sucesso de um regime nutricional particular (DOSDAT et al., 1996; GÉLINEAU et al., 1998). O nível de excreção de amônia aumenta rapidamente em resposta à entrada de alimento (SAVITZ, 1971; BRETT & ZALA, 1975; JOBLING, 1981; BALESTRAZZI et al., 1994) e a maioria do nitrogênio excretado é derivado da deaminação de aminoácidos de proteínas na dieta principalmente dependente da tomada de nitrogênio, temperatura e da espécie do peixe (LIED & BRAATEN, 1984; RAMNARINE et al., 1987; KAUSHIK & COWEY, 1990). De acordo com VAN WAARDE e colaboradores (1983), o aumento do catabolismo de proteínas tem, como conseqüência, um aumento nos teores de amônia plasmática. Em condições normais, o excesso de amônia produzido pelo catabolismo de proteínas é prontamente excretado pelas brânquias.

A absorção de lipídios oriundos da dieta é um processo que, em peixes, assemelha-se ao observado em mamíferos (IZQUIERDO et al. 2000). Entretanto, alguns aspectos do metabolismo de lipídios em peixes, incluindo transporte e deposição, aparentam ser um pouco diferente dos observados para vertebrados homeotérmicos. Conforme proposto por SHERIDAN (1988), os peixes apresentariam um modelo diferenciado de distribuição de ácidos graxos do plasma para os tecidos que são compostos por componentes de liberação rápida e lenta. O de liberação rápida é representado por ácidos graxos livres (AGL) de cadeia curta, solúveis no plasma e AGL de cadeia longa que estariam ligados a proteínas carreadoras. O componente de liberação mais lenta, similar aos de mamíferos, representa um sistema de liberação de triglicerídeos (TG), que consiste na agregação, extrusão e transporte de partículas em TG. Os lipídios são estocados em muitos órgãos de depósitos. Segundo VAN DEN TILLART e VAN RAAIJ (1995), os sítios de estocagem mais importantes em peixes são o mesentério adiposo, o fígado e músculo. Além disso, os lipídios corpóreos refletem os lipídeos da dieta, em termos de qualidade e composição de ácidos graxos, embora possam ser sintetizados de carboidratos e aminoácidos (CARTER et al., 2001).

Os carboidratos são estocados na forma de glicogênio. A quantidade de massa muscular branca do corpo representa um estoque substancial de glicogênio, aproximadamente vinte vezes maior do que o do fígado (MOYES & WEST, 1995). Entretanto, em proporções relativas, o fígado estoca mais glicogênio que o músculo branco. Dados relatam que a variação hepática diurna do conteúdo de glicogênio não demonstra uma relação definida com a ingestão de alimento. Além disso, a maior concentração de glicogênio no fígado pode sofrer um efeito retardado do arraçoamento em função da estação do ano e da idade do peixe (DELAHUNTY et al. 1978; LAIDLEY & LEATHERLAND, 1988). O conteúdo de glicogênio hepático é extremamente variável entre indivíduos e espécies de peixes. Em muitas espécies de peixes o glicogênio muscular não é mobilizado, exceto em condições extremas, sendo mantido à custa da glicose sanguínea, que por sua vez, é provida pelos processos hepáticos de gliconeogênese e glicogenólise (NAVARRO & GUTIÉRREZ, 1995). VAN DEN THILLART e VAN RAAIJ (1995) destacam que os estoques de glicogênio do músculo branco são,

normalmente, direcionados para queima repentina devido ao exercício natatório e não rotineiramente, como para manutenção glicêmica.

A gliconeogênese é a rota responsável pela síntese de glicose de novo e síntese de glicogênio a partir de precursores como lactato, aminoácidos, glicerol e frutose (MOON, 1988). A importância desta via para a manutenção da homeostase dos carboidratos nos tecidos tem sido cada vez mais ressaltada em função dos altos requerimentos protéicos e consequentemente em aminoácidos pelos peixes (SUÁREZ & MONNSEM, 1987; MOON, 1988). A glicogenólise é uma fonte de glicose, mas não parece ser a maior fonte de glicose para o fígado ou músculo quando os níveis de precursores na dieta são adequados. Representa uma estratégia emergencial antes que a glicose esteja disponível a partir da dieta ou pela gliconeogênese de aminoácidos provindos da digestão protéica (WALTON & COWEY, 1989). O tempo de aparecimento da glicose (e outros açúcares simples) no plasma, em relação à alimentação, vai depender de vários fatores. Entre eles, o conteúdo total de carboidratos e dos outros ingredientes da dieta, sua forma de processamento, hábito alimentar, histórico nutricional do indivíduo e temperatura da água (BERGOT & BREQUE, 1983; HUNG, 1991).

Sabe-se muito pouco sobre a concentração dos outros intermediários metabólicos nos diferentes tecidos e, os múltiplos fatores que regulam a capacidade do metabolismo de carboidratos em peixes dificultam extrapolar dados obtidos de uma espécie para outra, em função da diversidade sistemática da classe. Entretanto, o metabolismo de carboidratos é uma rota central do fluxo energético também em peixes (DABROWSKI & GUDERLEY, 2002).

Segundo MELO (2004), as quantificações de atividade das enzimas chaves no controle de diferentes rotas metabólicas contribuem para estabelecer as situações específicas das vias metabólicas e assim inferir sobre o aproveitamento dos nutrientes das dietas. Através desses dados, é possível ainda verificar as possíveis situações metabólicas indesejáveis, tais como a utilização de proteína para a obtenção de energia. Como exemplo, a atividade de enzimas do catabolismo de aminoácidos, tais como GDH, arginase, ALAT e ASAT entre outras, pode servir de base para a indicação de uma alteração do estado metabólico (MELO, 2004). Alguns estudos têm mostrado estreita relação entre as atividades enzimáticas do metabolismo energético e protéico em relação ao estado

nutricional (BAANANTE et al. 1991; BONAMUSA et al. 1992; MOON & FOSTER, 1995). Em *Sparus aurata*, os conteúdos hepáticos de metabólitos como glicogênio, ou das enzimas sinalizam como informações chave para se concluir sobre ativação/inibição da atividade glicolítica (BONAMUSA et al. 1989). Assim, a composição das dietas afeta não somente o crescimento e a quantidade interna de nutrientes dos peixes, mas interfere nas atividades enzimáticas hepáticas (CORRÊA, 2002). Por exemplo, dietas ricas em carboidratos estimulam as enzimas da via glicolítica e enzimas lipogênicas em fígado de peixes. Por outro lado, dietas com alto conteúdo de lipídios diminuem a atividade destas enzimas (KHEYYALI et al., 1989; SHIMENO et al., 1993; 1997). De acordo com MÉTON e colaboradores (1999), diferenças na composição da dieta promovem mudanças nas atividades enzimáticas envolvidas no metabolismo intermediário do fígado de *Sparus aurata* (BAANANTE et al., 1991).

Muitas dessas rotas metabólicas foram inicialmente estudadas em mamíferos, sendo pouca a informação disponível em peixes teleósteos (MÉTON, 1996). Além disto, os trabalhos até o presente momento têm se concentrado em peixes não tropicais. Por isso, nosso entendimento está atualmente baseado em um modelo centrado em estudos com peixes que vivem adaptados a condições bem diferentes das tropicais (MELO, 2004).

Segundo LUNDSTEDT e colaboradores (2004), apesar da importância das proteínas e lipídios, os principais substratos energéticos em peixes, são escassas as informações relacionadas às respostas metabólicas versus a variação destas classes de nutrientes. De acordo com estes autores, a maioria das informações a respeito do fluxo metabólico neste grande grupo de vertebrados dá maior atenção aos efeitos da inclusão de carboidratos na dieta. A semelhança de tal abordagem em pesquisas com mamíferos, nos quais os carboidratos têm papel central no metabolismo energético, é a explicação mais provável para este fato. Outra possível razão seria a relativa simplicidade das técnicas de determinações bioquímicas desta classe de biomoléculas, quando comparadas às investigações com proteínas e lipídios (DE SILVA & ANDERSON, 1995; WEBER & ZWINGELSTEIN, 1995).

O perfil de metabólitos nos tecidos de peixes ainda é pouco utilizado nos estudos de nutrição. Alguns trabalhos (MORAES & BIDINOTTO 2000, CORRÊA 2002, VIEIRA 2002, LUNDSTEDT 2003, MELO, 2004) sugerem que estes intermediários podem se

constituir em importante ferramenta para conhecer as relações metabólicas entre os tecidos e sua correspondência com as concentrações de macronutrientes.

Com a determinação das concentrações dos intermediários metabólicos e das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo, pretendemos avaliar a dinâmica do perfil metabólico de tambaqui em função das variações de proteína e lipídio na dieta.

### **1.5 *Colossoma macropomum*: aspectos gerais e importância da espécie**

Segundo ARAÚJO-LIMA e GOULDING (1998), o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), é o segundo maior peixe da Bacia Amazônica. A região é conhecida por possuir a mais diversa fauna de peixes de água doce do mundo, com algumas das mais extraordinárias espécies entre cerca de 2.000. Considerado um dos mais saborosos peixes de água doce, o tambaqui é hoje um dos principais candidatos para a aquicultura na floresta tropical; além disso, possui carne bastante saborosa e rica em proteínas e sais minerais. É um dos peixes mais apreciados da culinária amazônica e amplamente aceito em outras regiões, devido ao seu excelente sabor, consistência e coloração branca da carne, pouca presença de espinhas e facilidade para obtenção de filés. O tambaqui alcança pelo menos 30 kg e 1 m de comprimento depois de 13 anos no Rio Solimões/Amazonas (GOULDING & CARVALHO, 1982). De acordo com ARAÚJO-LIMA e GOULDING (1998), o tambaqui é uma das principais espécies da piscicultura brasileira e é reconhecido como um alimento de primeira classe tendo boas perspectivas no mercado nacional e internacional. Como uma espécie saborosa, frugívora e oriunda da floresta tropical, o tambaqui tem também grande carisma culinário.

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

GOULDING, 1980; GOULDING & CARVALHO, 1982; SAINT-PAUL, 1984). Um tambaqui adulto pode ter até 75 cecos pilóricos, ou apêndices ligados ao estômago. Acredita-se que este grande número de cecos ajude na digestão de material vegetal. O comprimento do intestino no tambaqui adulto alcança em média cerca de 5-5,5 vezes o comprimento do corpo. Isto é similar a muitas espécies de peixes detritívoros e herbívoros (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998).

O tambaqui se tornou uma alternativa viável e sustentável para substituição da atividade pecuária na região amazônica, evitando e diminuindo o desmatamento que essa atividade causa. Um mercado de exportação foi aberto para espécies de peixes amazônicos e isto oferece grande oportunidade para o desenvolvimento da aqüicultura nesta região (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998).

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

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

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

### **1.5.1 Nutrição de tambaqui**

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

Até o presente momento o custo da alimentação é o principal fator limitante para a expansão do cultivo de tambaqui na Amazônia (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998). Segundo estes autores, o tambaqui foi adaptado com sucesso para o cultivo em cativeiro. Tem crescimento rápido, é rústico e tolera baixos teores de oxigênio dissolvido na água (VAL & HONCZARYK, 1995). Em temperaturas equivalentes, o metabolismo de rotina do tambaqui é aproximadamente igual em tanques e ambientes naturais (SAINT-PAUL, 1983). Com o oxigênio dissolvido a níveis inferiores a 2 mg/L e a 30°C, o tambaqui começa a deprimir sua taxa metabólica. Em alimentação *ad libitum* de *C. macropomum*, somente 80 % da ração é consumida (VAN DER MEER et al., 1997). Em condições normais, as taxas de mortalidade no cultivo de tambaqui em viveiros e gaiolas são muito semelhantes. As taxas de sobrevivência são usualmente maiores que 90 %. Valores abaixo de 75 % raramente foram registrados. Alta mortalidade tem sido encontrada entre jovens com menos de 160 g, quando a temperatura é inferior a 19°C (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998). O nível médio de proteína requerido por jovens e adultos do tambaqui está em torno de 20%, demonstrando que a espécie necessita balancear a sua alimentação, consumindo diversos itens de composição química variável (SILVA et al., 2003). Em condições experimentais, as exigências protéico/calóricas de alevinos de tambaqui foram estimadas

em 25 % de proteína bruta e 500 kcal/100 g de energia bruta na matéria seca da ração (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998). Para manutenção dos indivíduos adultos e jovens do tambaqui, são necessários, respectivamente, 23 e 19-20 kJ/g de alimento seco consumido (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998). Atualmente, considera-se que a concentração de proteína ótima para a ração de tambaqui com mais de 100 g de peso deve variar entre 20-25 % O teor de energia no alimento deve oscilar entre 12-15 kJ/g (2.800-3.500 kcal/kg) (SILVA et al, 2003). Segundo VAN DER MEER et al. (1997) altos níveis de crescimento de *C. macropomum* obtidos dentro de condições laboratoriais sugerem que esta espécie pode ser um candidato apropriado para produção dentro de condições de aqüicultura intensiva.

Considerando a preferência por frutas em sua dieta natural, MENTON (1989) supôs que *C. macropomum* pode digerir melhor carboidrato que muitos outros peixes. Entretanto, a utilização de lipídio e a de carboidrato líquidas (49 e 31%, respectivamente) indicaram que, também em tambaqui, lipídios são mais eficientemente utilizados para estocar energia que carboidratos. De acordo com VAN DER MEER e colaboradores (1997), em *C. macropomum* a deposição de proteína aumenta com a elevação dos teores de lipídio na dieta. Estes autores encontraram o mais típico efeito poupador de proteína em tambaqui (a adição de energia na dieta aumentou a utilização líquida de proteína). Entretanto, segundo estes autores, este processo não foi muito eficiente e resultou em altos teores de gordura na carne.

De acordo com ARAÚJO-LIMA e GOULDING (1998), com relação ao crescimento desta espécie, em geral, peixes muito jovens (5-25 g) mostraram um crescimento rápido quando o teor de proteína bruta no alimento aumentou até 50 %. Já os experimentos realizados com tambaquis maiores encontraram resultados contraditórios. Em alguns casos um aumento na quantidade de proteína acima de 18 % não aumentava a taxa de crescimento, enquanto que em outros casos isto ocorria (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998). Outras fontes alternativas de alimentos para o tambaqui, apesar de serem mais baratas, levam a taxas de crescimento inferiores às obtidas com rações balanceadas. Tabaquis alimentados com rações feitas com pupunha, milho, frutas da floresta, tortas de babaçu, em geral apresentaram taxas de crescimento inferiores às obtidas com as rações granuladas balanceadas (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998).

### **1.6 Justificativa**

O conhecimento sobre a biologia de tambaqui pode possibilitar o estabelecimento de metodologias adequadas ao manejo desses animais no nosso país, visto que a criação artificial envolve o manejo e o desenvolvimento das espécies em condições diversas daquelas do habitat natural (SAINT-PAUL, 1984). Além disso, pesquisas sobre o mecanismo digestivo e o destino de seus produtos finais podem contribuir para a utilização de dietas com melhor custo-benefício, bem como beneficiar o estudo comparativo entre peixes tropicais. Também, dados que relacionam conteúdo de proteína e de lipídio com metabolismo de peixes tropicais permanecem escassos.

O presente estudo utilizou o tambaqui, *C. macropomum*, com o propósito de obter maiores informações sobre seu processo digestivo e perfil metabólico em resposta a diferentes teores proteína e lipídio nas dietas, visando adequar as exigências nutricionais desta espécie.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar o perfil metabólico e a atividade de algumas enzimas digestivas de tambaqui frente a dietas com diferentes teores de proteína e lipídio.

#### 2.1.2 Objetivos específicos

- Verificar: as alterações nos parâmetros hematológicos, o perfil das atividades enzimáticas digestivas, o ganho em peso e as alterações metabólicas de tambaquis alimentados com diferentes teores de proteína e lipídio nas dietas experimentais.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Material biológico e manejo**

O experimento e as análises bioquímicas foram realizados no Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução, na Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, no período de 2004 a 2005.

Cento e vinte exemplares de juvenis de tambaqui foram adquiridos do Centro de Aqüicultura da Unesp, Campus de Jaboticabal (CAUNESP), São Paulo. Os peixes passaram por um período de aclimação de uma semana, recebendo ração extrusada comercial contendo 27% de proteína bruta, antes do início do experimento. Depois deste período os peixes foram igualmente distribuídos em 12 caixas de 250 litros, em um sistema fechado, com água termostatizada sob fluxo contínuo e aeração constante.

##### **3.1.1. Desenho Experimental**

Os peixes receberam dietas extrusadas e isocalóricas (3.700 kcal/kg), com níveis de proteína bruta (PB) e lipídio de 35/4,9% para o tratamento I, 30/8% para o tratamento II, 25/11% para o tratamento III e 20/14% para o tratamento IV (Tabela 1). Cada tratamento foi feito em triplicata (três caixas por tratamento). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 9h e às 17h, até a saciedade, ao longo de 48 dias.

Após o período experimental, quatro peixes de cada caixa, num total de 12 peixes por tratamento, foram amostrados e anestesiados em solução de benzocaína (100 mg/L de água). Imediatamente após, os animais foram puncionados na veia caudal, com seringas heparinizadas, para a coleta de sangue, e posteriormente sacrificados por secção medular. Os peixes foram pesados ( $112,15 \pm 35,31$  g) e medidos ( $18,7 \pm 1,7$  cm) para posteriores cálculos de crescimento. Uma alíquota do sangue total foi utilizada nas determinações hematológicas e o restante centrifugado para obtenção do plasma. O plasma foi congelado em nitrogênio líquido. O fígado e o músculo branco foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para as determinações de atividades enzimáticas e intermediários metabólicos. O trato digestório foi extraído, dividido em estômago (E), cecos pilóricos (CP), intestino anterior (IA) e posterior (IP) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para as determinações das atividades das enzimas digestivas.

Tabela 1. Fórmulas e composição das dietas experimentais (baseada na matéria natural).

Ingredientes	Dietas Experimentais			
	I	II	III	IV
Farinha de peixe <sup>A</sup>	60,34	51,41	42,55	33,63
Milho <sup>B</sup>	35,40	34,60	33,85	33,10
Antioxidante <sup>1</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02
Celulose <sup>2C</sup>	1,59	7,60	13,48	19,45
Vitamina-mineral premix <sup>3</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50
Óleo de soja <sup>D</sup>	0,00	3,72	7,45	11,15
CMC <sup>4</sup>	2,00	2,00	2,00	2,00
Vitamina C <sup>5</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>
<b>Composição Calculada</b>				
Matéria Seca (%)	89,49	89,91	90,31	90,71
Energia Bruta (kcal/kg) <sup>E</sup>	3785,91	3778,17	3776,19	3768,99
Proteína Bruta (%)	35,00	30,15	25,35	20,51
Carboidratos (%) <sup>F</sup>	29,01	29,00	29,07	29,18
Fibra Bruta (%)	2,98	7,55	12,03	16,57
Matéria Mineral (%)	17,60	15,06	12,54	10,01
Extrato Etéreo (%)	4,90	8,10	11,32	14,50
Cálcio (%)	5,42	4,62	3,82	3,03
Fósforo (%)	3,39	2,90	2,41	1,93
Vitamina C (%)	0,05	0,05	0,05	0,05

<sup>1</sup>BHT (3,5-di-ter-butil-4-hidroxitolueno); <sup>2</sup>Celulose microfina RHOSTER Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista, SP, Brasil); <sup>3</sup> Composição do Suplemento Vitamínico-mineral Peixes (Fri-Ribe) Premix, níveis de garantia por 1000g: Vit. A 600 000 IU; Vit. D3 600 000 IU; Vit. E 12 000 IU; Vit. K3 1200 mg; Vit. B1 1200 mg; Vit. B2 1536 mg; Vit. B6 1287 mg; Vit. B12 4000 mg; ácido fólico 198 mg; Ácido pantotênico 3800 mg; Vit. C 48 000 mg; Biotina 20 mg; Colina 30 000 mg; Niacina 19 800 mg; Ferro 25 714 mg; Cobre (Cu) 1 960 mg; Manganês 13 334 mg; Zinco 6000 mg; Iodo 948 mg; Cobalto 2 mg; Selênio 30,10 mg; <sup>4</sup>Carboximetil Celulose Sódica USP. Labsynth®Produtos para Laboratório Ltda (Diadema-SP-Brasil); <sup>5</sup> Fonte de vitamina C com 35% de Ácido Ascórbico – Hoffman La Roche (Basel, Suíça). <sup>A</sup> Composição em porcentagem: 93,08 matéria seca, 28,38 cinzas, 5,87 extrato etéreo, 1,53 fibra bruta, 53,72 proteína bruta, Ca<sup>2+</sup> 8,94, Fósforo 5,46 e energia bruta 3.795 cal/g <sup>B</sup> O milho não foi pré-gelatinizada. Composição em porcentagem: 88,45 matéria seca, 13,1 cinzas, 38,1 extrato etéreo, 22,9 fibra bruta, 73,0 proteína bruta, cálcio 0,06, fósforo 0,24 e energia bruta 4.226 cal/g. <sup>C</sup> Composição em porcentagem: 95,00 matéria seca, 1,3 cinzas, 5,9 extrato etéreo, 78,63 fibra bruta, 1,5 proteína bruta. <sup>D</sup> Composição em porcentagem: energia bruta 9.811 cal/g. <sup>E</sup> Energia bruta foi calculada descontando a energia da cellulose. <sup>F</sup> Carboidrato (%) foi calculado como % MS – (PB+EE+MM+FB), sendo MS = matéria seca, PB = proteína bruta, EE = extrato etéreo, MM = matéria mineral e FB = fibra bruta.

### 3.1.2 Condições Ambientais

Os parâmetros físico-químicos da água foram semanalmente aferidos por processo eletromérico utilizando-se um aparelho HORIBA modelo U10. Na mesma frequência foram aferidas amônia, alcalinidade e dureza pelos métodos de KOROLEFF (1976), GOLTERMAN & CLIMO (1969) e APHA (1980), respectivamente.

### 3.2 Ganho em peso (GP)

O cálculo do ganho em peso foi obtido através da diferença entre o peso inicial (PI) e final (PF) dos peixes durante o período experimental, segundo a expressão:

$$GP (\%) = [ (PF - PI) / PI ] \times 100$$

### 3.3 Determinações hematológicas

#### 3.3.1 Hematócrito

Uma alíquota do sangue total foi utilizada na determinação do hematócrito. As amostras de sangue, em duplicata, foram transferidas para capilares de micro-hematócrito heparinizados, fechados com massa apropriada, centrifugados por 3 minutos a 13.000 x g e a porcentagem de sedimentação dos eritrócitos foi lida em cartão padronizado (GOLDENFARB et al., 1971).

#### 3.3.2 Hemoglobina total

A hemoglobina total foi determinada misturando-se 10 µl de sangue em 2 ml de solução de Drabkin composta de KCN, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em água destilada. A leitura óptica foi determinada em espectrofotômetro (Hach DR/2010) em 540 nm (DRABKIN, 1948) contra um branco contendo somente solução de Drabkin.

Para o cálculo de hemoglobina total utilizou-se a fórmula:

$$Hb \text{ total } g\% = \text{°}D_{.540} \times 1, 6114 \times FD / 11$$

Onde: FD = fator de diluição

### **3.4 Preparação dos homogeneizados celulares**

Os tecidos coletados foram descongelados, cuidadosamente amostrados sobre superfície gelada e pesados em quantidades apropriadas para as determinações.

#### **3.4.1 Extrato enzimático**

As fatias de tecido foram homogeneizadas em tampão de homogeneização composto de fosfato de sódio 10 mM e glicerina 50% (v/v) ajustado para pH 7,0. Os extratos brutos foram feitos adicionando-se quantidade apropriada de tecido a 1,0 ml de tampão e então homogeneizados em um homogeneizador tipo Potter Elvehjem por 1 minuto a 0°C. O homogeneizado foi transferido para tubos de plástico com capacidade de 2,0 ml.

A centrifugação de fígado e músculo branco foi feita a 600 x g por 3 minutos a 3°C e o sobrenadante foi centrifugado à 6.000 x g durante 8 minutos a 3°C. Um volume de apropriado do sobrenadante, determinado por padronização prévia, foi utilizado como fonte de enzima.

### **3.5 Determinações enzimáticas**

O teor de proteína total foi determinado nos homogeneizados utilizados nas determinações enzimáticas e o resultado foi utilizado no cálculo das atividades específicas das enzimas. A quantificação foi feita pelo método descrito por BRADFORD et al. (1976), já descrito no item 3.4.6. Depois de feitas as diluições apropriadas para cada tecido, 10µl de cada amostra foram colocados em duplicata numa microplaca e 200µl do reagente de Bradford foram adicionados aos poços. As placas eram lidas após 5 minutos em 520 nm utilizando um leitor de microplacas.

### 3.5.1 Enzimas digestivas

#### Protease Inespecífica

Nos ensaios da atividade proteolítica inespecífica para o estômago utilizou-se o método de hidrólise da caseína, adaptado de WALTER (1984). Tampão 0,2 M glicina/HCL (pH 2,0) foi usado para esta porção. A mistura de reação foi composta por tampão adequado (500 µl), caseína 1% (500 µl) como substrato e alíquota previamente ajustada do homogeneizado como fonte de enzima. Após 60 minutos de incubação à 25°C, a reação foi paralisada com 500 µl de TCA 20% (ácido tricloroacético), mantida em gelo fundente por aproximadamente 30 minutos e o precipitado removido por centrifugação a 12.000 rpm por 3 minutos para leitura do sobrenadante em 280 nm. Todas as amostras foram realizadas em duplicata e, paralelamente, dois brancos, um de enzima (onde a quantidade de enzima foi substituída por água) e outro de substrato (onde o substrato foi substituído por água destilada), que passaram pelos mesmos procedimentos dos tubos de reação. Tirosina foi utilizada como padrão e uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µg de tirosina, por minuto (U), expressa por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

Nos ensaios da atividade proteolítica em cecos pilóricos, intestino anterior e posterior utilizaram-se o método de hidrólise da azocaseína (SARATH et al., 1989). A mistura de reação foi composta por tampão TRIS-HCl 0.1 M (pH 8.0), azocaseína 5% como substrato e uma alíquota do homogeneizado dos tecidos como fonte de enzima. Após 60 minutos de incubação à 25°C, a reação foi paralisada com 500 µl de TCA 20% (ácido tricloroacético), centrifugada a 13,400 x g por 3 min e 1,2 ml do sobrenadante foi adicionado a 1 ml de NaOH 1,3 N. A leitura óptica foi realizada a 440 nm. Todas as amostras foram realizadas em duplicata e, paralelamente, dois brancos, um de enzima (onde a quantidade de enzima foi substituída por água) e outro de substrato (onde o substrato foi substituído por água destilada), que passaram pelos mesmos procedimentos dos tubos de reação. Tirosina foi utilizada como padrão e uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µg de tirosina, por minuto (U), expressa por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

### **Lípase**

A atividade da lípase não-específica foi determinada segundo metodologia adaptada de ALBRO e colaboradores (1985). A reação foi incubada em meio contendo 0,4 mM  $\rho$ -nitrofenil miristato em solução tampão 24 mM de bicarbonato de amônio pH 7,8 e 0,5% Triton X-100. Após trinta minutos, as reações foram interrompidas pela adição de NaOH 25 mM. A densidade óptica foi registrada a 405 nm e uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1  $\mu$ mol de substrato hidrolisado por minuto (U), expressa por mg de proteína (U/mg proteína).

### **Amilase**

A atividade amilohidrolítica foi estimada segundo o método proposto por BERNFELD (1955) modificado. Na mistura de reação contendo 1,0 ml de solução de amido 5% em tampão Citrato/Fosfato 0,2 M (pH 7,0) e 0,5 ml de solução de NaCl 0,5% como cofator enzimático, foi adicionado um volume adequado de homogeneizado celular. A reação foi incubada a 25°C por 30 minutos e interrompida com 1,0 ml de solução 5% ZnSO<sub>4</sub> : Ba(OH)<sub>2</sub> 0,3N. Posteriormente, a mistura de reação foi centrifugada a 12.000 rpm por 3 minutos e no sobrenadante determinou-se a concentração de glicose livre pelo método colorimétrico de PARK e JOHNSON (1949) a 690 nm. A atividade específica foi expressa como  $\mu$ moles de açúcares redutores totais por minuto (U) por mg de proteína.

### **3.5.2 Transaminases**

As atividades da ALAT e ASAT foram determinadas por uma modificação do método de REITMAN e FRANKEL (1957). Um coquetel foi preparado adicionando-se 500  $\mu$ l de alanina (0,4 M) ou 500  $\mu$ l de aspartato (80 mM) para ALAT e ASAT, respectivamente, 50  $\mu$ l de  $\alpha$ -cetoglutarato (0,21 M), 100  $\mu$ l de piridoxal hidrocloreto (2,5 mM), 10  $\mu$ l de arsenato (20 mM) e 240  $\mu$ l de tampão fosfato de sódio pH 7,5 (0,2 M). Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5, tendo o pH corrigido após a diluição. Utilizou-se como padrão 100 nmol de uma solução de piruvato de sódio ou de oxaloacetato.

A reação foi iniciada pela adição de 500  $\mu$ l de coquetel à mistura de 200  $\mu$ l de tampão fosfato mais homogeneizado. Os tubos foram incubados por 30 minutos em banho-maria a 37°C, a reação foi bloqueada pela adição de 250  $\mu$ l de dinitrofenilhidrazina 0,1 %

(em HCL 2,0 N). O tubo branco de reação passava pelo mesmo procedimento, porém o homogeneizado foi adicionado após a dinitrofenilhidrazina. O tubo padrão foi incubado apenas excluindo-se o coquetel. Após a adição de dinitrofenilhidrazina, os tubos foram resfriados no gelo e centrifugados a 12.000 rpm por 3 minutos. Uma alíquota dos sobrenadantes foi transferida para tubos de ensaio e em seguida 3 ml de NaOH 1,3 N eram adicionados. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 440 nm, sendo o aparelho zerado com NaOH 1,3 N. A atividade das enzimas está expressa em nmol/minuto/mg proteína.

### **3.5.3 Desidrogenases**

A atividade das três desidrogenases foi determinada por uma adaptação do método de HOCHACHAKA e colaboradores (1978) que se baseia na oxidação do NADH determinada cineticamente em espectrofotômetro em 340 nm. O coeficiente de extinção molar do NADH (0,855108/mM.cm) foi determinado em um espectrofotômetro e utilizado no cálculo de atividade específica.

#### **Lactato desidrogenase (LDH)**

A reação da LDH foi monitorada durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos em espectrofotômetro, em um meio contendo 200 µl de ácido pirúvico (0,05 M), 100 µl de NADH (2 mM) e 1,7 ml de tampão Tris pH 7,5 (0,05 M), ao qual era adicionado o homogeneizado. A atividade da enzima está expressa em nmoles/minuto/mg proteína no fígado (mU/mg proteína) e µmoles/minuto/mg proteína no músculo branco (U/mg proteína).

#### **Malato desidrogenase (MDH)**

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

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

A reação da GDH foi monitorada durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos em espectrofotômetro, em um meio contendo 2 ml de um coquetel constituído por tampão imidazol pH 7,0 (0,05 M), NADH 0,1 mM, ADP 1 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 5 mM,

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

### **3.6 Intermediários metabólicos**

#### **Preparação dos extratos ácidos**

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

#### **Preparação dos extratos alcalinos**

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

#### **Preparação dos extratos neutros**

Para a determinação de aminoácidos livres, ácidos graxos, triglicerídeos e proteína, os tecidos foram homogeneizados em água destilada utilizando-se um homogeneizador e centrifugados a 12.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a determinação dos intermediários.

### **3.7 Determinação dos intermediários metabólicos**

#### **3.7.1 Açúcares totais**

As determinações de açúcares totais foram realizadas segundo DUBOIS e colaboradores (1956), em ácido sulfúrico concentrado. Esta técnica foi utilizada sempre que o objetivo era determinar o teor de açúcar total. O procedimento consistia no emprego de um volume adequado de extrato, adicionado a 500 µl de fenol 4,1% e 2,0 ml de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos de reação foram imediatamente resfriados em banho de água e a leitura óptica realizada em 480 nm. A concentração de glicose foi estimada contra

um padrão de glicose contendo 110 nmoles e expressa como  $\mu$ moles de açúcares totais/g tecido ou ml de plasma.

### **3.7.2 Glicogênio**

O glicogênio foi determinado segundo BIDINOTTO e colaboradores (1998). Transferiam-se 250  $\mu$ l do dissolvido alcalino (já citado) para um tubo limpo, ao qual eram adicionados 3 ml de etanol P.A. Em seguida, adicionava-se 100  $\mu$ l de  $K_2SO_4$  10%. Após agitação, o tubo foi centrifugado a 5000 x g por 3 minutos, e o sobrenadante era descartado, invertendo-se o tubo. O pressipitado foi ressuspensionado em 2,5 ml de água destilada, o tubo foi agitado e as amostras, utilizadas para determinação de glicose pelo método de DUBOIS (1956) e expressa como  $\mu$ moles de glicosil-glicose/g tecido.

### **3.7.3 Lactato**

A concentração de lactato nos tecidos foi determinada segundo o método de HARROWER e BROWN (1972), que se baseia na complexação do lactato com o  $CuSO_4$ , sendo o lactato revelado pelo p-fenilfenol e ácido sulfúrico. Para as determinações, o homogeneizado ácido (já citado) foi diluído em 500  $\mu$ l de água destilada e em seguida 20  $\mu$ l de  $CuSO_4$  4% e 3,5 ml de  $H_2SO_4$  concentrado foram adicionados lentamente a um tubo e depois foram agitados para a mistura das fases. Após fervura por 5 minutos, esfriavam-se e adicionavam-se 75  $\mu$ l de p-fenilfenol. Esperava-se 1 hora, agitando a cada 15 minutos, e após nova fervura por 1,5 minutos procedia-se a leitura em espectrofotômetro em 570 nm. Utilizou-se como padrão uma solução de 100 nmoles de ácido láctico e expressa em  $\mu$ moles/g tecido ou ml de plasma.

### **3.7.4 Piruvato**

O piruvato foi determinado segundo LU (1939), pela reação da dinitrofenilhidrazina. O homogeneizado ácido foi diluído em 500  $\mu$ l de água destilada. À mistura foram adicionados 250  $\mu$ l de dinitrofenilhidrazina que permanecia em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, 3 ml de NaOH (1,3 N) foram adicionados à reação e a leitura feita em 440 nm. A concentração de piruvato foi estimada utilizando-se como

padrão uma solução de 100 nmoles de piruvato de sódio e expressa em  $\mu$ moles/g tecido ou ml de plasma.

### **3.7.5 Aminoácidos livres**

Foram determinados por uma modificação do método de COPLEY (1941). Os homogeneizados neutros foram diluídos em 200  $\mu$ l de água destilada e posteriormente 2 ml de Ninhidrina 0,1% (em propanol) foi adicionada à reação. Os tubos de ensaio foram vedados para impedir a evaporação da ninhidrina e mantidos em banho-maria à 40°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em 570 nm e utilizava-se como padrão 100 nmoles de solução de ácido aminoácido e expressa em  $\mu$ moles /g tecido ou ml de plasma.

### **3.7.6 Proteínas solúveis**

Após a homogeneização em água e posterior centrifugação, os sobrenadantes foram diluídos apropriadamente de acordo com o tecido. Uma alíquota de 10 $\mu$ l do homogenato foi utilizada para determinação do conteúdo de proteína total nos tecidos. As amostras foram pipetadas nos poços de uma microplaca e em seguida 200 $\mu$ l do reagente de Bradford foram adicionados (BRADFORD et al., 1976). Esse reagente consiste de uma mistura do pigmento Comassie Brilliant Blue diluído em Etanol P.A e ácido fosfórico. Em cada placa juntamente com as amostras foi realizada uma curva padrão de caseína 1%. A concentração de proteína foi determinada espectrofotometricamente em 520 nm, utilizando um leitor de microplacas e expressa em mg/g tecido ou ml de plasma.

### **3.7.7 Amônia**

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

### 3.7.8 Triglicerídeos

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

### 3.7.9 Ácidos graxos livres

As determinações das concentrações de ácidos graxos livres (AGL) foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por NORVÁK (1965). Foram adicionados 1,0 ml de solução Dole (heptana, álcool isopropílico e ácido sulfúrico na proporção de 1: 4:0,1) na amostra constituída de alíquotas adequadas de plasma, fígado e músculo branco, seguida de agitação por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 1,0 ml de heptano e 2,0 ml de água destilada, agitando-se novamente por inversão. Uma amostra equivalente a 600 µl da fase superior foi 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 foi constituído por 1,32 volume de trietanolamina + 10 volumes de solução A + 7 volumes de solução B. A solução A foi formada por uma solução saturada de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6g CO(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O mais 0,8 ml de ácido acético glacial em água fervente. Na seqüência, as amostras foram fortemente agitadas por 30 segundos e centrifugadas por 2 minutos a 3.000 rpm. Desta mistura, retirava-se uma alíquota de 600 µl à qual adicionava-se 600 µl de solução indicadora, constituída de 0,4% de α-nitroso β-naftal em etanol, diluída 12,5 vezes. A leitura óptica foi realizada em 500 nm e a concentração foi estimada contra um padrão de ácido palmítico 4 mM e expressa em µmoles/g tecido ou ml de plasma.

### **3.8 Análise estatística**

Os dados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. (erro padrão da média) para as enzimas digestivas e como média  $\pm$  desvio padrão para o restante dos dados analisados (n=12). Os dados foram analisados de acordo com teste paramétrico ANOVA. Quando foram encontradas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo pós-teste de Tukey. Correlações de Pearson foram determinadas entre as variáveis pertinentes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Condições Ambientais

Os parâmetros físico-químicos da água dos tanques experimentais foram mantidos constantes ao longo do período experimental e dentro da faixa de conforto para o cultivo de peixes tropicais (VINATEA ARANA, 1997). A temperatura manteve-se em  $26,9 \pm 1,2$  °C, o oxigênio dissolvido (OD) em  $3,8 \pm 0,38$  mg/L e o pH  $7,1 \pm 0,14$ . A amônia em  $0,16 \pm 0,01$  mg/L, alcalinidade em  $46 \pm 3$  mg/L e a dureza em  $57 \pm 4$  mg/L.

### 4.2 Ganho em peso

A diminuição do conteúdo de proteína bruta e o aumento do teor de lipídio na dieta resultaram em diferenças significativas no ganho em peso dos tambaquis durante o período experimental de 48 dias (Figura 2). As maiores porcentagens de ganho de peso foram apresentadas pelos animais submetidos aos tratamentos I (35 %PB e 4 % lipídio) e II (30 % PB e 8 % lipídio) e, a partir do tratamento III (25 % PB e 11 % lipídio), o ganho em peso dos peixes diminuiu significativamente e manteve-se constante no tratamento IV (20,5 %PB e 14,5 % lipídio).

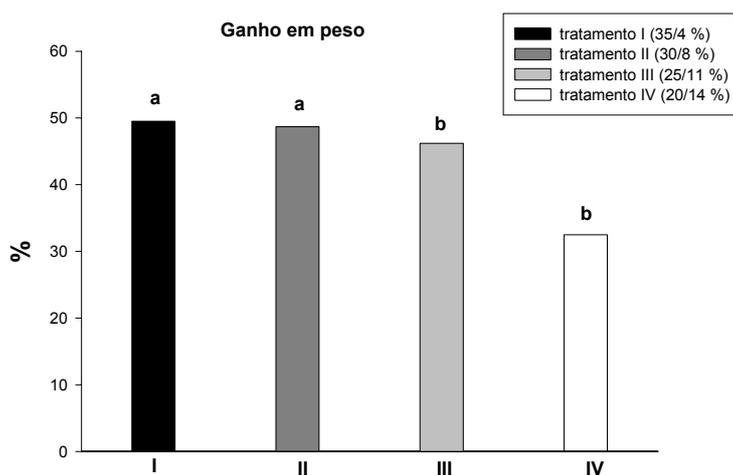


Figura 2. Porcentagem de ganho em peso (GP %) de tambaquis alimentados com teores decrescentes de proteína e crescentes de lipídio nas dietas experimentais depois de 48 dias.

### 4.3 Parâmetros Hematológicos

Os juvenis de tambaqui não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros sanguíneos analisados, hematócrito e concentração de hemoglobina total (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de tambaquis submetidos a quatro dietas experimentais com diferentes teores de proteína e lipídio. Valores apresentados como média  $\pm$  desvia padrão. P = proteína e L = lipídio.

Tratamentos (P/L %)	I (35/4)	II (30/8)	III (25/11)	IV (20/14)
Hematócrito	20,42 $\pm$ 1,45	20,96 $\pm$ 1,07	20,36 $\pm$ 1,37	20,76 $\pm$ 2,7
Hemoglobina Total	5,05 $\pm$ 0,81	5,29 $\pm$ 0,33	5,21 $\pm$ 0,41	5,44 $\pm$ 0,82

### 4.4 Enzimas Digestivas

Os dados referentes às enzimas digestivas de tambaquis alimentados com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta estão apresentados na Tabela 3.

Foi detectada hidrólise de proteína, carboidrato e lipídio ao longo de todo o trato digestório de tambaqui (Figura 3).

#### 4.4.1 Protease

A Tabela 3 mostra que a atividade da protease inespecífica estomacal aumentou significativamente no tratamento III e depois apresentou queda significativa no tratamento IV. Esta porção do trato apresentou a maior atividade desta enzima (2938  $\pm$  348 UI/mg de proteína). A menor atividade específica no estômago ocorreu quando o nível de proteína foi mínimo (tratamento IV). Nos cecos pilóricos a atividade proteásica apresentou queda significativa a partir do tratamento II e manteve-se constante até o tratamento IV. O intestino apresentou pequenas atividades desta enzima. O intestino anterior e o posterior não apresentaram diferenças significativas nas atividades de protease inespecífica entre os tratamentos. Não foi observada correlação entre algum nutriente da dieta e a protease inespecífica estomacal. Entretanto, a atividade máxima desta enzima foi observada quando os valores do teor de fibra, lipídios e proteína convergiram (Figura 4).

#### 4.4.2 Lipase

O estômago apresentou as maiores médias de atividade lipólítica do trato digestório (Tabela 3). A atividade da lipase diminuiu significativamente no tratamento IV. Assim, nesta porção do trato, o aumento do teor de lipídio nas dietas reduziu aparentemente a expressão da lipase. Nos cecos pilóricos observou-se comportamento inverso: a atividade lipásica nesta porção aumentou significativamente no tratamento IV (maior teor de lipídio e menor de proteína na dieta). No intestino anterior, a atividade de lipase apresentou aumento significativo no tratamento II e no tratamento IV. As menores atividades de lipase foram registradas no intestino posterior. Nesta porção do trato a atividade da lipase também apresentou aumento significativo nos tratamentos III e IV. A lipase do intestino anterior apresentou forte correlação positiva com o lipídio da dieta ( $PC=0,931$ ) (Figura 4).

#### 4.4.3 Amilase

No estômago a atividade da amilase manteve-se constante ao longo dos tratamentos (Tabela 3). A região dos cecos pilóricos foi a mais relevante como produtora de amilase, apresentando a maior média de atividade registrada ( $204 \pm 8$  UI/mg de proteína). Nesta região o maior valor observado foi para o tratamento I (maior teor de proteína e o menor de lipídio das dietas) e a atividade desta enzima apresenta queda significativa no tratamento II e no tratamento IV. Nas porções do intestino foi observada uma redução significativa da atividade amilohidrolítica no tratamento IV.

A amilase dos cecos pilóricos foi positivamente correlacionada com a proteína da dieta ( $PC=0,808$ ) (Figura 4).

Tabela 3. Atividades específicas das enzimas digestivas (média  $\pm$  S.E.M.) nas porções do trato gastrintestinal de tambaqui (*C. macropomum*) alimentado com diferentes níveis de proteína e lipídio na dieta.

Enzima	Porção	Dietas Experimentais			
		I (35/4 %)	II (30/8 %)	III (25/11 %)	IV (20/14 %)
<b>U/mg proteína</b>					
Protease	E	1700,9 $\pm$ 278,9 <sup>a</sup>	1987,7 $\pm$ 228,9 <sup>a</sup>	2938,4 $\pm$ 348,4 <sup>b</sup>	1003,9 $\pm$ 104,3 <sup>c</sup>
	C.P.	272,6 $\pm$ 31 <sup>a</sup>	88,9 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	68,4 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	28,3 $\pm$ 4 <sup>b</sup>
	I.A.	16,1 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	13,7 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	17,3 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	13,9 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
	I.P.	4,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	14,6 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	8,8 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	5,5 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
Lipase	E	415,7 $\pm$ 38 <sup>a</sup>	321,7 $\pm$ 12 <sup>ab</sup>	469,4 $\pm$ 41 <sup>a</sup>	238,4 $\pm$ 11 <sup>b</sup>
	C.P.	152,6 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	200,4 $\pm$ 12 <sup>ab</sup>	182,2 $\pm$ 17 <sup>ab</sup>	217,6 $\pm$ 12 <sup>b</sup>
	I.A.	202,6 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	342,3 $\pm$ 16 <sup>b</sup>	332,1 $\pm$ 26 <sup>b</sup>	442,0 $\pm$ 21 <sup>c</sup>
	I.P.	30,5 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	31,6 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	54,1 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	60,0 $\pm$ 7,2 <sup>b</sup>
Amilase	E	24,9 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	15,4 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	23,2 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	17,3 $\pm$ 3 <sup>a</sup>
	C.P.	204,9 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	164,6 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	189,1 $\pm$ 9 <sup>ab</sup>	89,9 $\pm$ 7 <sup>c</sup>
	I.A.	20,4 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	17,5 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	21,3 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	9,4 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
	I.P.	28,5 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	34,0 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	35,8 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	14,4 $\pm$ 1 <sup>b</sup>

E, estômago; C.P, cecos pilóricos; I.A, intestino anterior; I.P, intestino posterior. Letras diferentes na mesma linha significa diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) (média  $\pm$  S.E.M.) (n = 12).

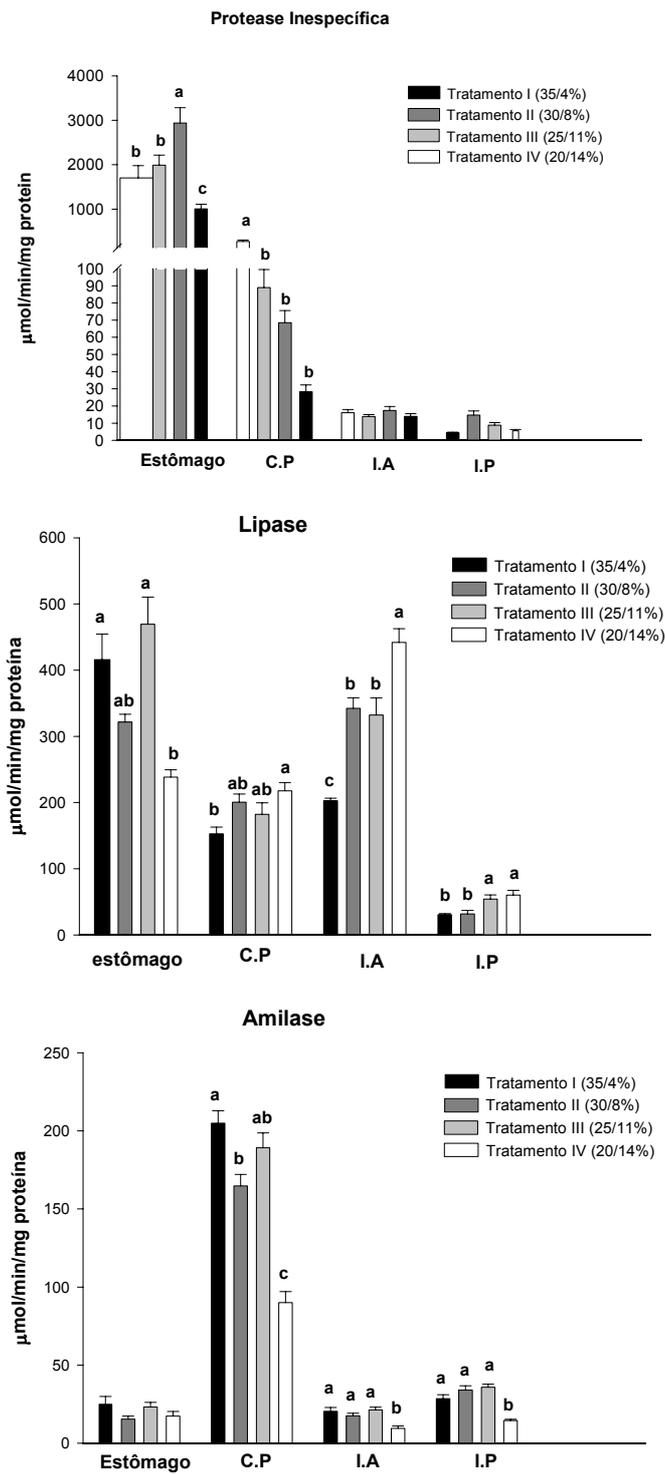
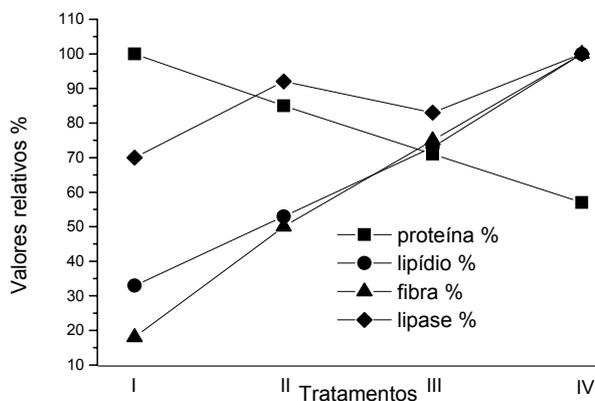
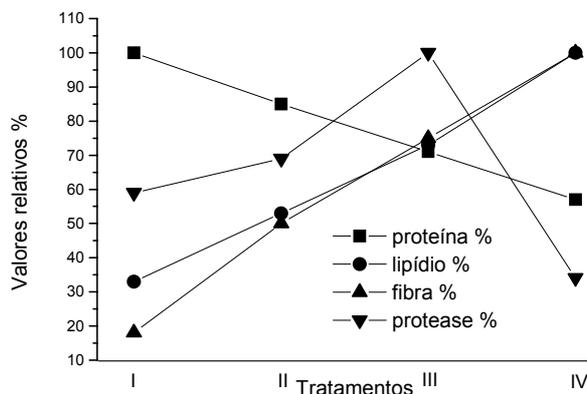
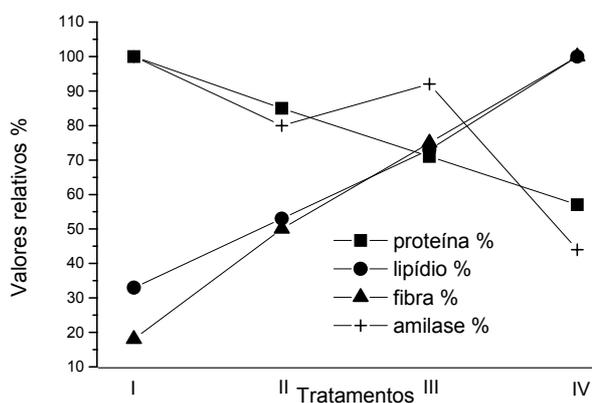


Figura 3. Atividade de protease, lipase e amilase em  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteína no canal alimentar de *C. macropomum* alimentado com diferentes níveis de proteína e lipídio na dieta.



(b)



(c)

Figura 4. Valores relativos (%) das atividades das enzimas digestivas e dos macronutrientes da dieta em diferentes porções do trato de *C. macropomum* alimentado com diferentes conteúdos de proteína e lipídio. (a) protease estomacal, (b) lipase do intestino anterior e (c)

amilase dos cecos pilóricos. Os valores relativos representam a razão (atividade corrente/atividade máxima) x 100.

#### **4.5 Metabolismo Intermediário**

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

##### **4.5.1 Fígado**

O perfil metabólico do fígado frente às mudanças na composição das dietas experimentais está representado na Tabela 4 e nas Figuras 5,6 e 7

Neste tecido a concentração de açúcares totais diminuiu significativamente no tratamento IV e de glicogênio diminuiu significativamente no tratamento III e apresentou pequena recuperação tratamento IV. O teor de lactato não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e o de piruvato apresentou aumento significativo a partir do tratamento III. Este perfil foi acompanhado por uma diminuição significativa da atividade da LDH do tratamento II e posterior recuperação desta atividade nos tratamentos III e IV. A atividade da MDH apresentou diminuição significativa a partir do tratamento I.

O teor de aminoácido não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e a concentração de proteína aumentou significativamente nos tratamentos III e IV. Este perfil foi acompanhado por uma diminuição significativa da atividade da GDH a partir do tratamento I. A atividade da ALAT apresentou queda significativa no tratamento II, recuperação desta atividade no tratamento III e queda significativa no tratamento IV. A atividade da ASAT apresentou queda significativa no tratamento II. A concentração de amônia neste tecido apresentou aumento significativo nos tratamentos II e III e diminuição significativa no tratamento IV.

As concentrações de ácidos graxos livres e triglicerídeos apresentaram queda significativa neste tecido nos tratamentos II, III e IV (conforme o teor de lipídio aumentou e o de proteína diminuiu nas dietas).

Tabela 4. Média  $\pm$  desvio padrão dos intermediários metabólicos e enzimas, analisados no fígado de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta.

<b>Tratamentos (P/L %)</b>	<b>I (35/4)</b>	<b>II (30/6)</b>	<b>III (25/11)</b>	<b>IV (20/14)</b>
Açúcares totais ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	314,2 $\pm$ 66,2 <sup>a</sup>	262,2 $\pm$ 65 <sup>ab</sup>	250,8 $\pm$ 56,3 <sup>ab</sup>	226,2 $\pm$ 65,3 <sup>b</sup>
Lactato ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	3,43 $\pm$ 0,6	3,13 $\pm$ 0,7	3,36 $\pm$ 0,5	2,95 $\pm$ 0,4
Piruvato ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	0,32 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,37 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,46 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,55 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
Amônia ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	19,38 $\pm$ 2,66 <sup>b</sup>	24,38 $\pm$ 2,44 <sup>ab</sup>	35,28 $\pm$ 7,5 <sup>a</sup>	30,04 $\pm$ 6,8 <sup>a</sup>
Glicogênio ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	576,2 $\pm$ 81,8 <sup>a</sup>	566,1 $\pm$ 107,5 <sup>a</sup>	378,9 $\pm$ 45,6 <sup>c</sup>	483,3 $\pm$ 56,9 <sup>b</sup>
Aminoácidos ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	19,9 $\pm$ 2,4	18,8 $\pm$ 2,3	19,5 $\pm$ 1,9	19,5 $\pm$ 1,8
Proteína (mg/g tecido)	85,74 $\pm$ 14,9 <sup>b</sup>	96,7 $\pm$ 22,3 <sup>ab</sup>	114,8 $\pm$ 23,1 <sup>a</sup>	109,5 $\pm$ 18,7 <sup>a</sup>
AGL ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	1,84 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	1,41 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,13 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	0,88 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>
TGL ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	1,47 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,21 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	1,11 $\pm$ 0,14 <sup>bc</sup>
LDH (nmol/min/mg proteína)	354,12 $\pm$ 99 <sup>a</sup>	241,26 $\pm$ 51 <sup>b</sup>	294,72 $\pm$ 79,5 <sup>ab</sup>	337,01 $\pm$ 76,7 <sup>a</sup>
MDH (nmol/min/mg proteína)	50,45 $\pm$ 8,3 <sup>a</sup>	33,12 $\pm$ 7,8 <sup>b</sup>	32,28 $\pm$ 7,3 <sup>b</sup>	33,8 $\pm$ 4,9 <sup>b</sup>
GDH (nmol/min/mg proteína)	357,77 $\pm$ 54 <sup>a</sup>	228,58 $\pm$ 27,6 <sup>b</sup>	203,24 $\pm$ 29,9 <sup>b</sup>	78,6 $\pm$ 9,5 <sup>c</sup>
ALAT (nmol/min/mg proteína)	16,3 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>	11,22 $\pm$ 6,4 <sup>b</sup>	15,31 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	10,12 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>
ASAT (nmol/min/mg proteína)	11,41 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	8,86 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	10,9 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	10,12 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>

Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). P = proteína e L = lipídio.

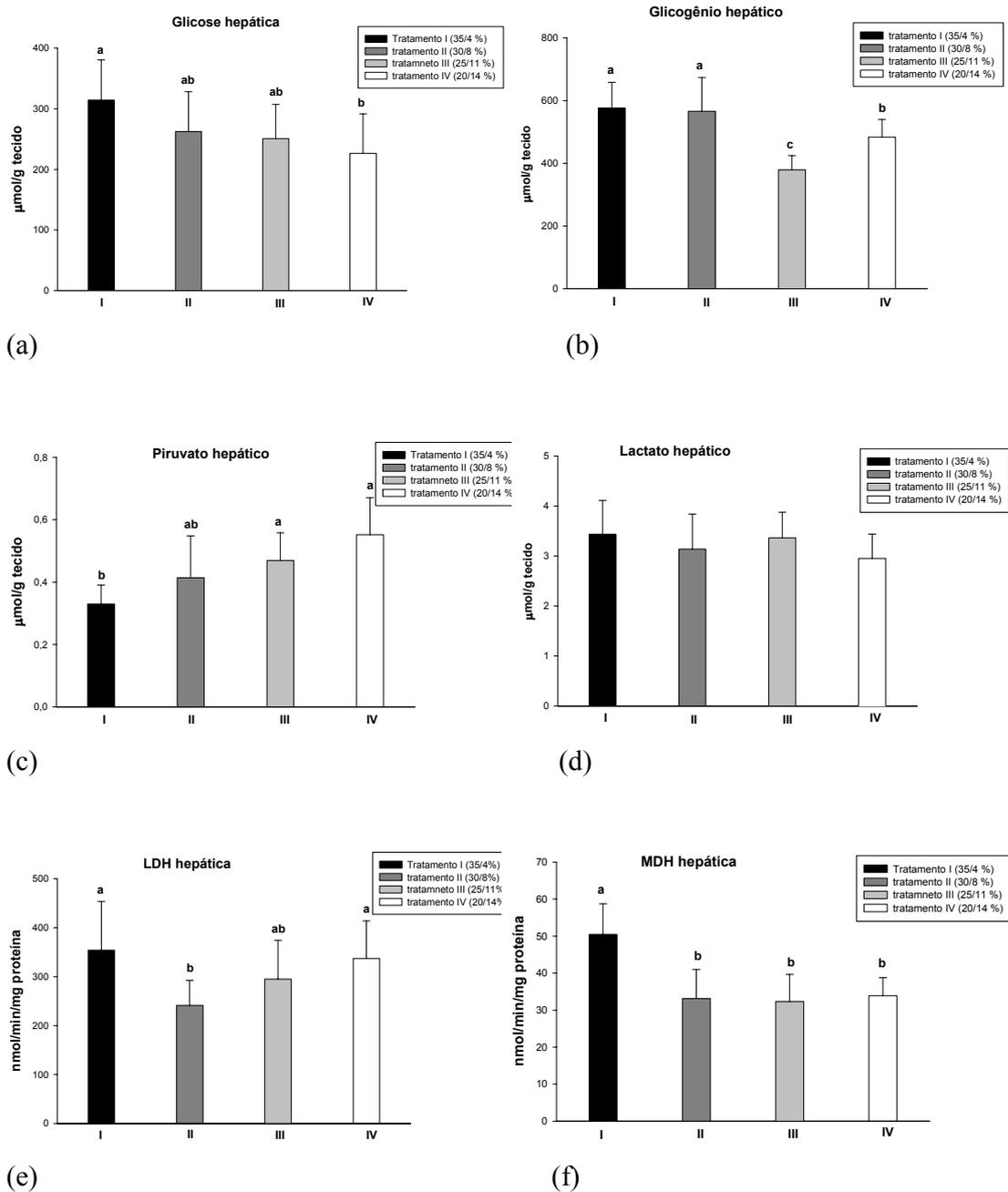


Figura 5. Perfil glicídico hepático de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) açúcares totais, (b) glicogênio, (c) lactato, (d) piruvato, (e) atividade da LDH e (f) atividade da MDH.

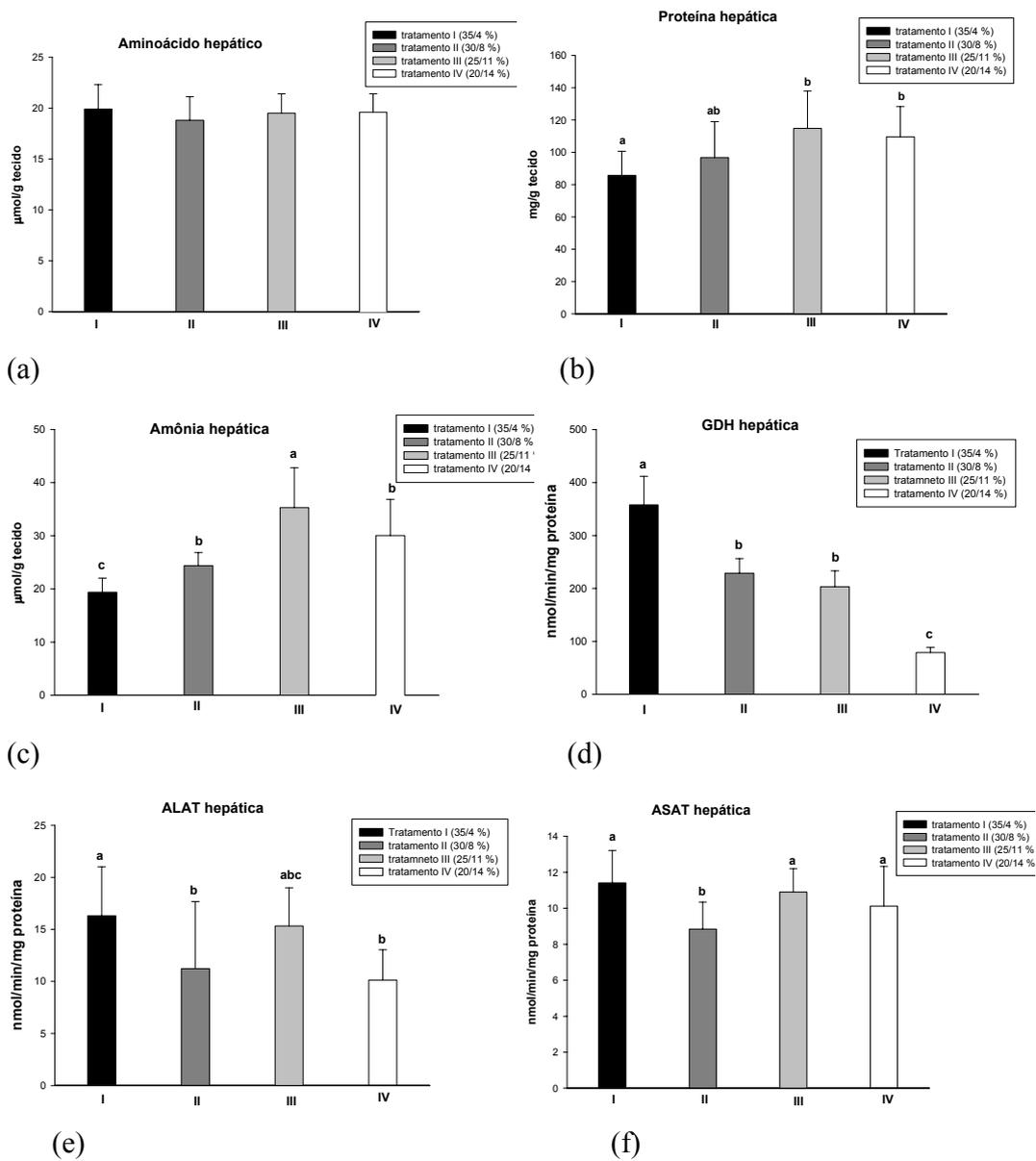


Figura 6. Perfil protéico do fígado de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) aminoácidos livres, (b) proteína, (c) amônia, (d) atividade da GDH, (e) atividade da ALAT, (f) atividade da ASAT.

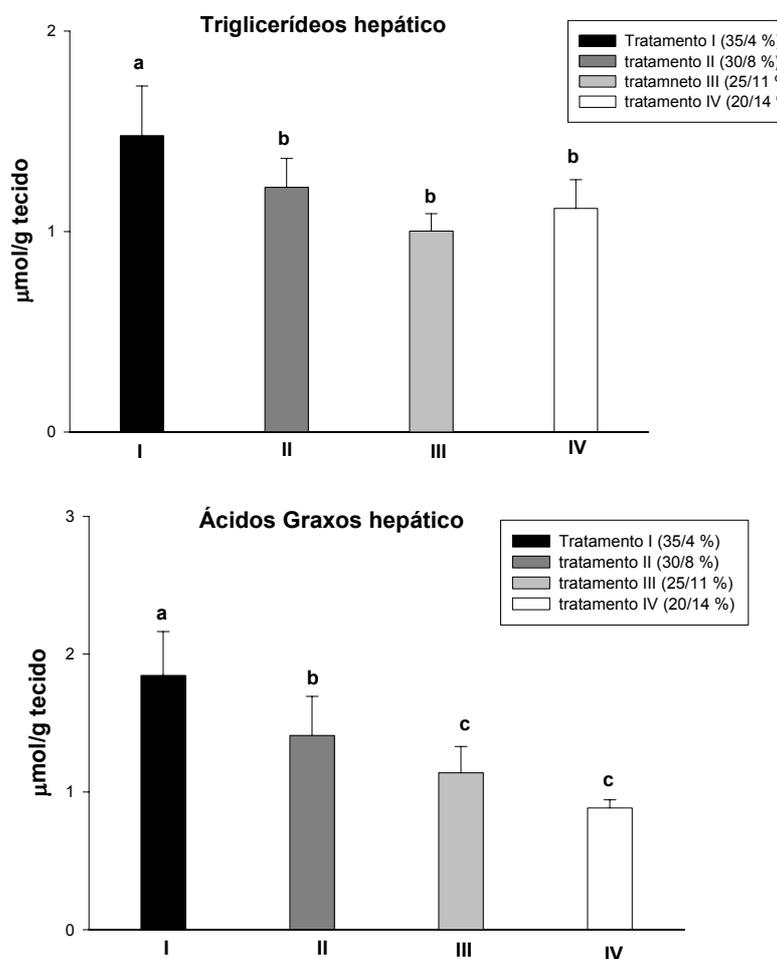


Figura 7. Perfil lipídico hepático de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) triacilgliceróis livres e (b) ácidos graxos livres.

#### 4.5.2 Músculo Branco

O perfil metabólico do músculo branco frente às mudanças na composição das dietas experimentais está representado na Tabela 5 e nas figuras 8, 9 e 10.

Neste tecido não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de açúcares totais. A concentração de glicogênio aumentou significativamente no tratamento IV (em função do aumento de lipídio na dieta). O teor de piruvato apresentou aumento significativo no tratamento IV e o de lactato diminuição significativa a partir do tratamento III (maiores quantidades de lipídio na dieta). Este perfil foi acompanhado por uma diminuição significativa da atividade de LDH nos tratamentos III e IV.

As concentrações de aminoácidos e proteína neste tecido não apresentaram diferenças significativas ao longo dos tratamentos. A concentração de amônia aumentou significativamente no tratamento que tinha mais lipídio e menos proteína (IV).

A concentração de ácidos graxos livres apresentou aumento significativo no tratamento II, diminuição no III e novamente aumento significativo no IV (que tinha o maior teor de lipídio e o menor de proteína) e a concentração de triglicerídeos diminuiu a partir do tratamento I (com o aumento de lipídio e diminuição de proteína nas dietas).

Tabela 5. Média  $\pm$  desvio padrão dos intermediários metabólicos e enzimas, analisados no músculo branco de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta.

<b>Tratamentos (P/L %)</b>	<b>I (35/4)</b>	<b>II (30/6)</b>	<b>III (25/11)</b>	<b>IV (20/14)</b>
Açúcares totais ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	10,9 $\pm$ 1,2	10,4 $\pm$ 0,9	10,7 $\pm$ 1,2	11,8 $\pm$ 1,9
Lactato ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	15,8 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	15,3 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	11,5 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	11,7 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>
Piruvato ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	0,16 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,2 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	0,2 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	0,21 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
Amônia ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	10,47 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	10,52 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	11,21 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	12,61 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>
Glicogênio ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	3,75 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	3,84 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	3,76 $\pm$ 0,8 <sup>ab</sup>	4,62 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
Aminoácidos ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	19,9 $\pm$ 2,1	21,4 $\pm$ 2,2	21,3 $\pm$ 1,6	21,4 $\pm$ 2,2
Proteína (mg/g tecido)	45,6 $\pm$ 5,1	46,2 $\pm$ 5,7	43,3 $\pm$ 4,6	51,4 $\pm$ 14,3
AGL ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	0,02 $\pm$ 0,007 <sup>c</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,03 $\pm$ 0,007 <sup>c</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
TGL ( $\mu\text{mol/g}$ tecido)	0,97 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,25 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
LDH (nmol/min/mg proteína)	27,04 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>	20,9 $\pm$ 6,1 <sup>ab</sup>	16,7 $\pm$ 5,3 <sup>b</sup>	18,7 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>

Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). P = proteína e L = lipídio.

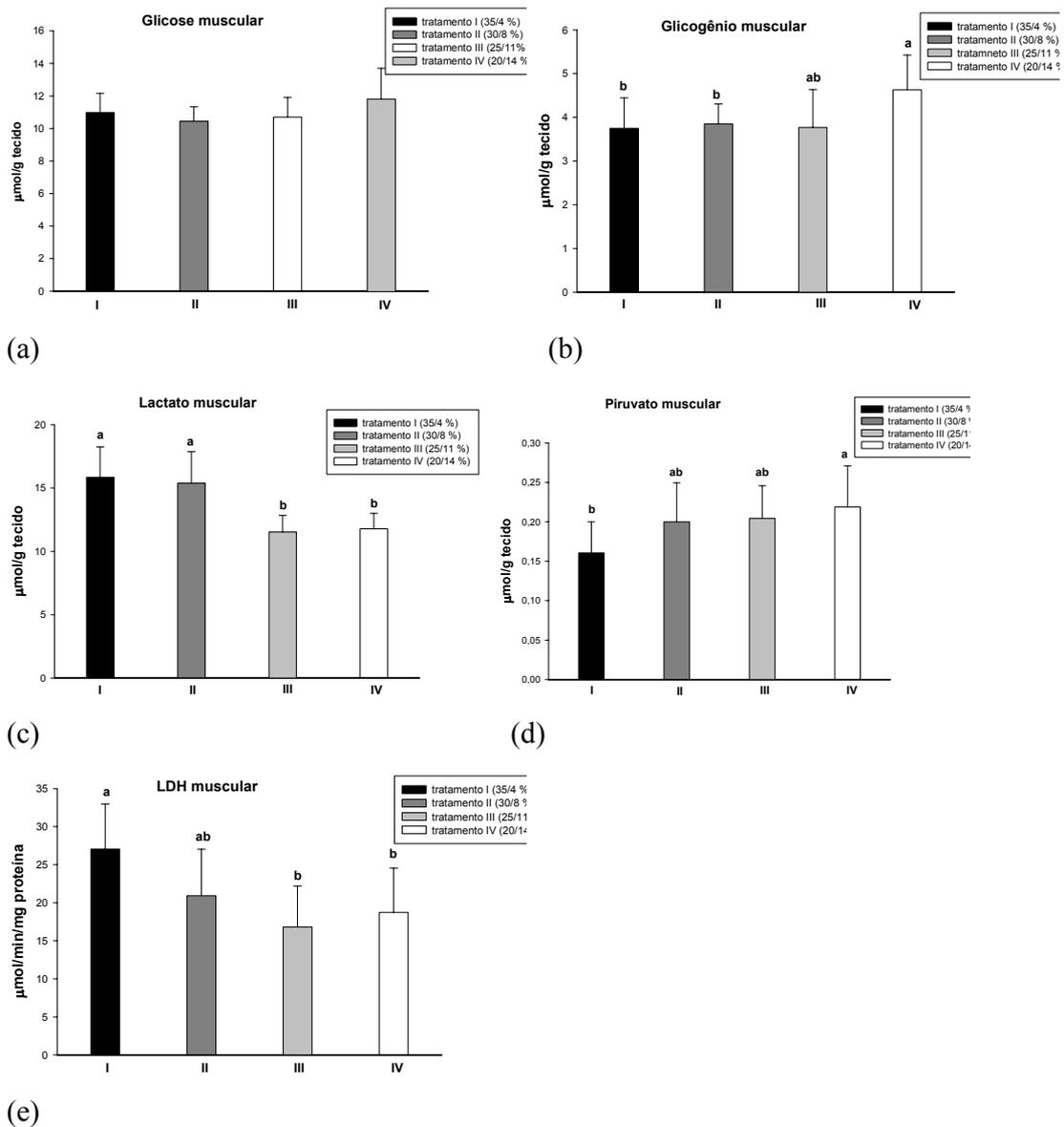
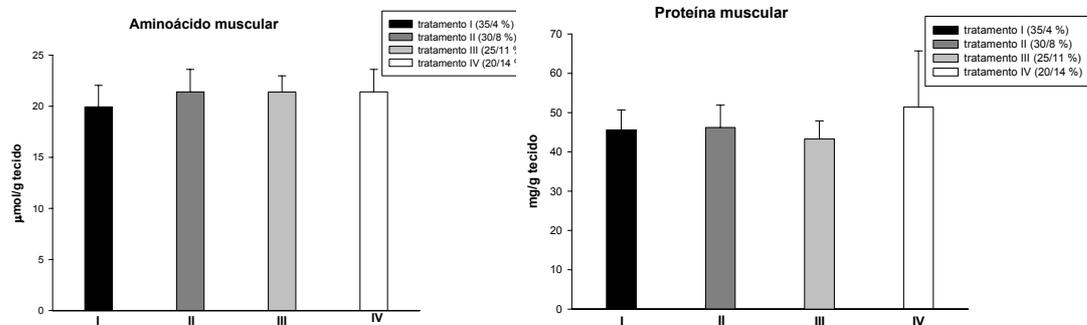
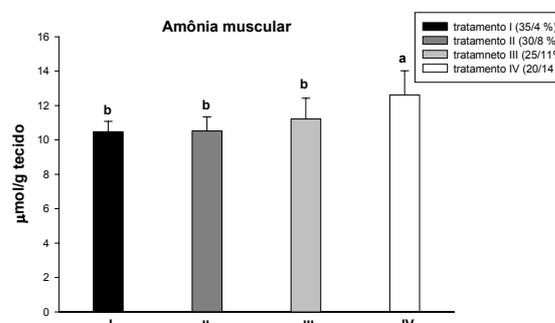


Figura 8. Perfil glicídico do músculo branco de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) açúcares totais, (b) glicogênio, (c) lactato, (d) piruvato, (e) atividade da LDH.

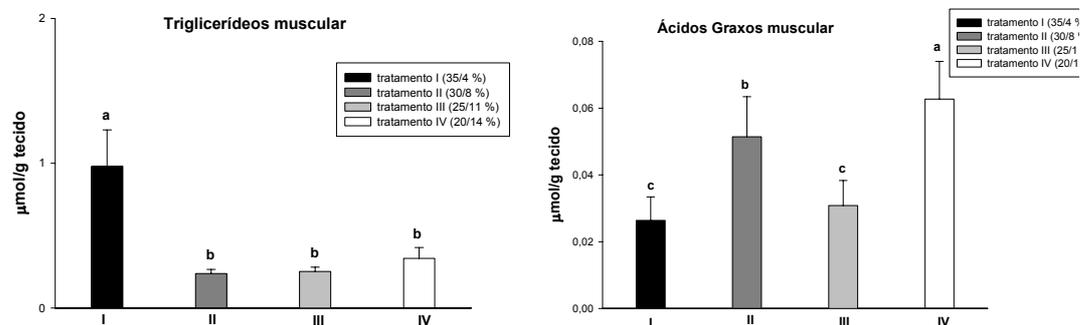


(a)



(c)

Figura 9. Perfil protéico do músculo branco de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) aminoácidos livres, (b) proteína, (c) amônia.



(a)

(b)

Figura 10. Perfil lipídico do músculo branco de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) triacilgliceróis livres e (b) ácidos graxos livres.

#### 4.5.3 Plasma

O perfil metabólico do plasma frente às mudanças na composição das dietas experimentais está representado na Tabela 6 e nas figuras 11, 12 e 13.

Foi observada diminuição significativa na concentração de açúcares totais a partir do tratamento I, diminuição na concentração de lactato no tratamento III e de piruvato no tratamento II e posteriores recuperações destas concentrações no tratamento IV.

As concentrações de aminoácidos e amônia aumentaram significativamente a partir do tratamento I no plasma de *C. macropomum* submetido ao aumento dos teores de lipídio e diminuição dos teores de proteína da dieta. A concentração de proteína não apresentou diferença significativa entre os tratamentos.

A concentração de TGL apresentou queda significativa no tratamento III e posterior recuperação no tratamento IV. A concentração de AGL apresentou diminuição significativa no tratamento IV (maior teor de lipídio e menor de proteína das dietas experimentais).

Tabela 6. Média  $\pm$  desvio padrão dos intermediários metabólicos analisados no plasma de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta.

Tratamentos (P/L %)	I (35/4)	II (30/6)	III (25/11)	IV (20/14)
Açúcares totais ( $\mu\text{mol/ml}$ )	5,74 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	3,8 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	3,7 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>
Lactato ( $\mu\text{mol/ml}$ )	1,71 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	1,39 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	1,11 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	2,3 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
Piruvato ( $\mu\text{mol/ml}$ )	0,17 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	0,13 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,14 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	0,19 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
Amônia ( $\mu\text{mol/ml}$ )	0,92 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,25 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	1,49 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	1,53 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
Aminoácidos ( $\mu\text{mol/ml}$ )	0,92 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,3 <sup>ab</sup>	1,4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
Proteína (mg/ml)	62,5 $\pm$ 10,6	65,9 $\pm$ 8,3	64,7 $\pm$ 15,3	73,2 $\pm$ 18,1
AGL ( $\mu\text{mol/ml}$ )	0,07 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	0,04 $\pm$ 0,003 <sup>ab</sup>	0,03 $\pm$ 0,005 <sup>b</sup>
TGL ( $\mu\text{mol/ml}$ )	1,07 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,07 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,69 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	0,89 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>

Letras diferentes nas linhas representam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). P = proteína e L = lipídio.

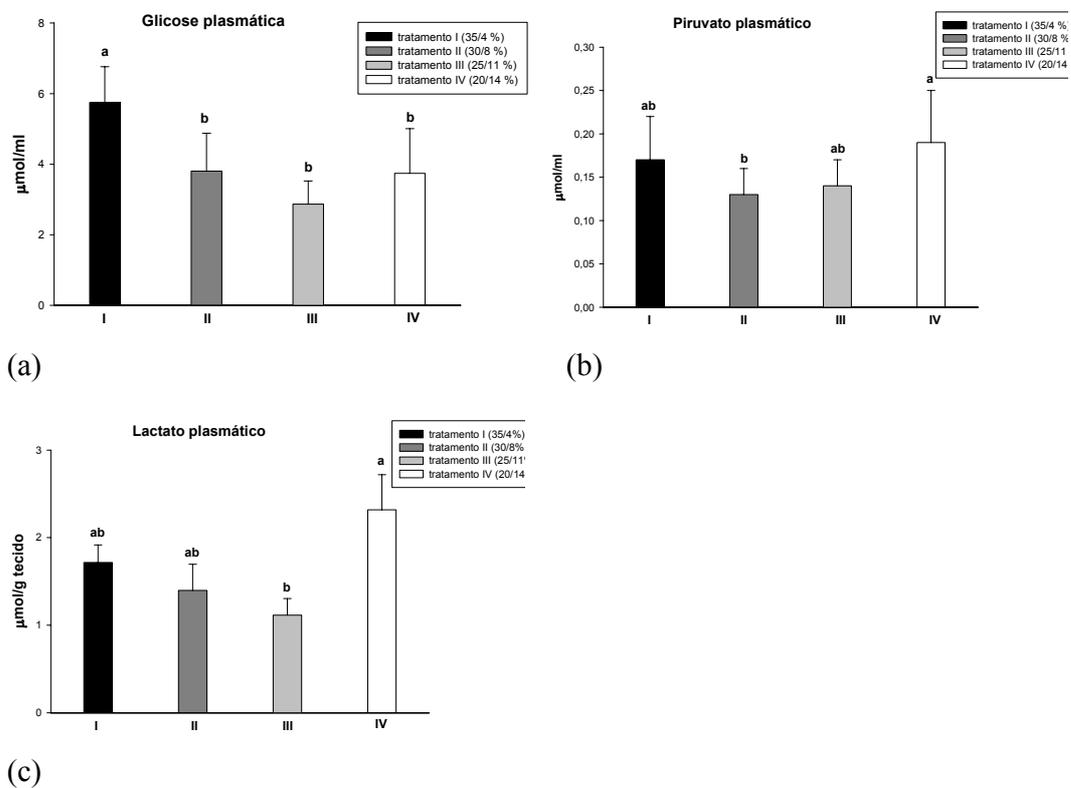


Figura 11. Perfil glicídico do plasma de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) açúcares totais, (b) lactato, (c) piruvato.

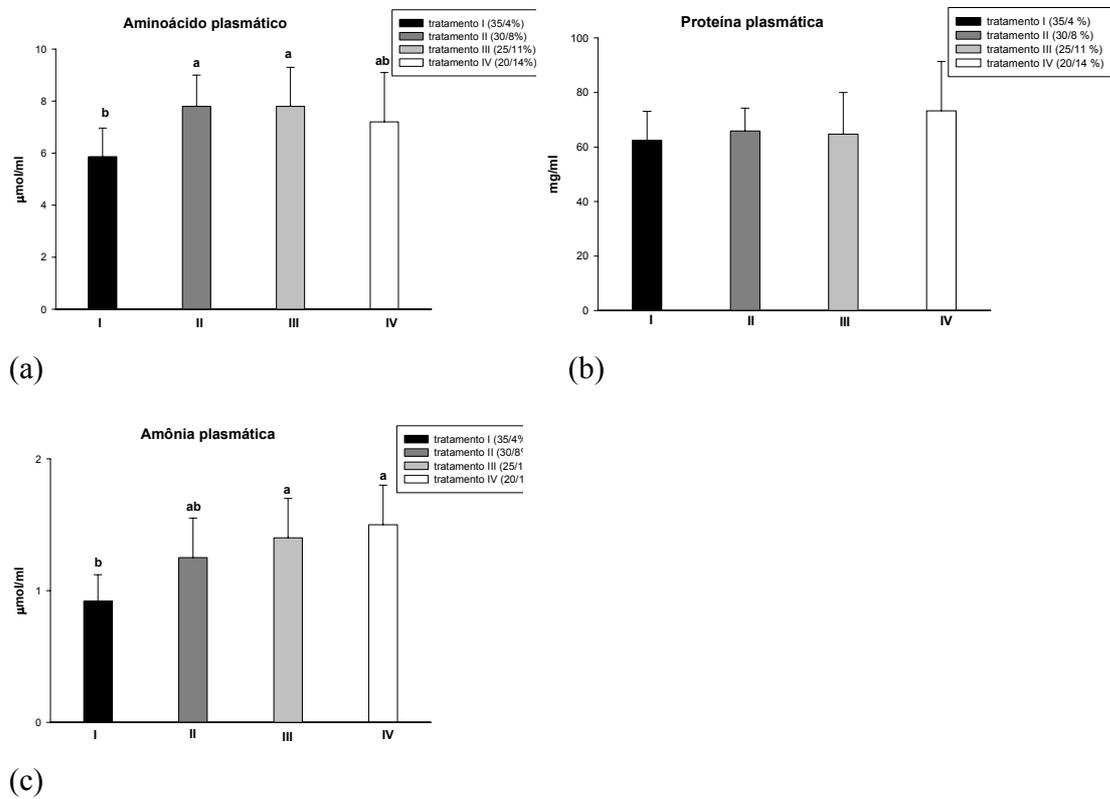


Figura 12. Perfil protéico do plasma de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) aminoácidos livres, (b) proteína, (c) amônia.

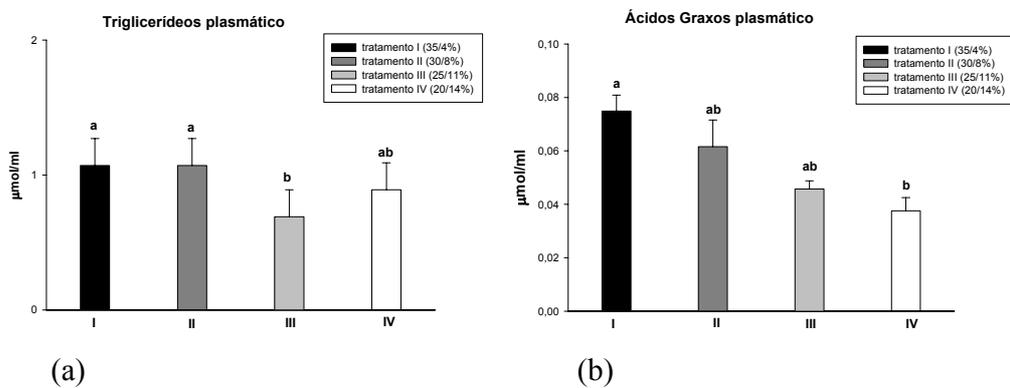


Figura 13. Perfil lipídico do plasma de *C. macropomum* alimentado com diferentes teores de proteína e lipídio na dieta. (a) triacilgliceróis livres e (b) ácidos graxos livres.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Ganho em peso

O ganho em peso de peixes jovens é comumente um indicador valioso da adequação nutricional da dieta (CHO et al., 1986).

As porcentagens de ganho em peso dos peixes no presente estudo foram negativamente correlacionadas ao conteúdo de lipídio na dieta. Apesar de o tratamento III apresentar menor porcentagem de ganho de peso que os tratamentos I e II, essa diferença foi pequena. Isto indica que, tambaquis alimentados com 25 % de proteína bruta e 11 % de lipídio na dieta (tratamento III) apresentaram ganho em peso semelhante aos peixes alimentados com dietas contendo maiores teores de proteína e menores de lipídio (tratamentos I e II).

A redução na porcentagem de ganho em peso nos tratamentos III e IV pode ser devido à quantidade excessiva de lipídio na dieta. De acordo com MANJAPPA e colaboradores (2002), isto acontece devido a um desbalanceamento na proporção proteína/energia indicando a inabilidade do peixe em utilizar o lipídio acima de um determinado nível. Estes autores estudaram *Cyprinus carpio*, alimentado com quatro dietas isonitrogenadas com crescentes níveis de lipídio, e observaram que o maior ganho em peso foi apresentado pelos animais que receberam a dieta contendo 11,4 % de lipídio e 24 % de proteína (T2). Os peixes submetidos à dieta que continha 14,2 % de lipídio e 24 % de proteína tiveram menor ganho em peso que os animais alimentados com T2, refletindo o impacto negativo do lipídio na dieta quando este nutriente está além do nível ótimo. Um estudo realizado por MARTINO e colaboradores (2002) com *Pseudoplatystoma corruscans*, alimentado com dietas isonitrogenadas (46,5 % PB) e com níveis crescentes de lipídio, mostrou que o ganho em peso aumentou conforme aumentou o teor de lipídio na dieta. A melhor performance foi atingida por peixes alimentados com a dieta que continha a maior relação lipídio/proteína (18 % de lipídio). O ganho em peso destes animais foi aproximadamente dez vezes maior do que aquele obtido pelos peixes alimentados com a dieta que continha a menor relação lipídio/proteína (6 % de lipídio). Um trabalho posterior foi realizado pelos mesmos autores (MARTINO et al., 2005), dando continuidade ao citado

acima, onde eles aumentaram os níveis de lipídio da dieta acima de 18 %. Os autores encontraram que o aumento do conteúdo de lipídio acima desta porcentagem não aumentou o ganho de peso dos animais, provavelmente porque inibiu o consumo de alimento.

Resultado parecido foi encontrado para juvenis de *Rachycentron canadum* (CHOU et al., 2001). Estes autores reportaram que o ganho em peso desta espécie aumentou com o aumento de lipídio na dieta, mas só até uma porcentagem limite de lipídio (5,8 %). TAKEUCHI e colaboradores (1978) encontraram que o conteúdo de proteína de truta arco-íris pode ser reduzido de 48 para 35 % sem redução de ganho de peso se a concentração de lipídio for aumentada de 15 a 20 %. Entretanto resultados diferentes já foram reportados por outros autores. Aumento nas concentrações de lipídio da dieta não resultou em diferenças significativas no ganho de peso para juvenis de *Sparus aurata* (SANTINHA et al., 1999) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (BORBA et al., 2003).

As medidas de ganho de peso médio, no primeiro ano de cultivo, registrado experimentalmente para tambaqui alimentado com ração balanceada em viveiros, variaram de 500-1.400 g (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998). Segundo estes autores, nenhuma destas variáveis foram padronizadas entre os diversos experimentos, assim, comparações diretas entre os resultados e o cálculo do crescimento médio são difíceis de realizar. O tamanho alcançado depende principalmente do peso inicial do tambaqui e da duração do cultivo, mas a temperatura da água e a qualidade do alimento e da água também podem influir.

## 5.2 Parâmetros Hematológicos

*C. macropomum*, quando submetido a diferentes dietas experimentais, apresentou valores de hematócrito semelhantes aos resultados descritos por VAL (1993). Segundo este autor, tambaquis juvenis vivendo em seu habitat natural e em situações de normóxia possuem valores de hematócrito em torno de 21 a 24%. CORRÊA (2002), estudando esta espécie submetida a diferentes regimes alimentares, também encontrou valores de hematócrito semelhantes aos encontrados neste estudo.

A constância observada nos parâmetros hematológicos indica que as variações no teor protéico e lipídico das dietas não provocaram hemodiluição, hemoconcentração ou

qualquer tipo de alteração metabólica imposta que comprometesse o quadro hematológico dos peixes.

### 5.3 Enzimas Digestivas

Para falar-se sobre a estratégia alimentar dos peixes deve considerar-se a habilidade enzimática em digerir muitos tipos de comida e, geralmente, a estrutura digestiva do peixe reflete seus hábitos alimentares (CHAKRABARTI et al., 1995). Altas atividades proteolíticas devem ser esperadas em peixes carnívoros e, altas atividades de carboidrases em peixes herbívoros (REIMER, 1982; CHAKRABARTI et al., 1995). A estrutura digestiva no presente estudo foi considerada em termos da composição enzimática, distribuição e quantidade ou atividades específicas.

O tambaqui apresentou todas as enzimas digestivas distribuídas ao longo do trato digestório exceto pela protease inespecífica ácida, a qual foi restrita ao estômago. DEGUARA e colaboradores (2003), estudando a distribuição das enzimas digestivas em *Sparus aurata*, e LUNDSTEDT e colaboradores (2004) estudando *Pseudoplastystoma corruscans*, também observaram essa distribuição e, segundo estes autores e CATALDI e colaboradores (1987), este fato se deve provavelmente à pequena massa de tecido pancreático difusa ao longo do intestino anterior e, nos adultos, infiltrações pancreáticas do fígado.

A distribuição homogênea das enzimas digestivas ao longo do trato digestório de peixes tem sido considerada como uma adaptação à variação na composição da dieta da natureza. De acordo com CHAKRABARTI e colaboradores (1995), este processo deve ser entendido como uma consequência da história de vida dos peixes e a posição deste grupo no curso da evolução dos vertebrados. Segundo estes autores, o canal alimentar dos peixes apresenta vestígios do estado evolucionário onde todas as seções podem produzir as principais enzimas e este estágio é anterior àquele visto em vertebrados superiores, com lugares de produção de enzimas específicas.

O intestino posterior de tambaqui exibiu as mais baixas atividades enzimáticas. Segundo DAS e colaboradores (1987) e TENGJAROENKUL e colaboradores (2000), baixas atividades enzimáticas no intestino posterior de peixes são atribuídas ao papel de reabsorção desta porção do trato, demonstrando seu papel secundário na produção de enzimas.

### 5.3.1 Protease

A alta atividade proteolítica observada em tambaqui já foi reportada para outras espécies de peixes não-carnívoros (KUZ'MINA, 1990; HIDALGO et al., 1999). De acordo com estes autores esse potencial é plausível já que espécies não-carnívoras se alimentam de uma grande quantidade de proteína vegetal. Em metade do ano o tambaqui consome somente zooplâncton (HONDA, 1974). Além disso, peixes onívoros precisam de menos proteína que peixes carnívoros e também utilizam carboidrato mais eficientemente.

O estômago de tambaqui parece ser essencialmente proteolítico. Esta suposição é reforçada pelas altas atividades proteolíticas registradas nesta porção e pela diminuição desta atividade a partir do estômago. Além disto, as proteases do intestino não apresentaram caráter indutivo. Este fato coloca o estômago como uma estrutura pivô para digerir proteína nesta espécie e provavelmente o tambaqui possui habilidade para digerir proteína presente na dieta independente da quantidade oferecida. Segundo CHAKRABARTI e colaboradores (1995), a maior função do estômago em vertebrados é o início da digestão de proteínas.

A protease estomacal apresentou um aumento até o tratamento III e uma redução somente no tratamento IV. Este comportamento não esperado já foi reportado em outros estudos. OLATUNDE e OGUNBIYI (1977) inferiram que nem sempre o comportamento apresentado pelo estômago tem relação com a composição da dieta e que vários fatores como, temperatura, idade do peixe, fase do desenvolvimento, podem afetar a produção enzimática em peixes.

A protease do estômago (tratamento IV) e dos cecos pilóricos de tambaqui apresentou característica indutiva, isto é, apresentou diminuição conforme diminuiu o teor de proteína e aumentou o de lipídio na dieta. Essa característica parece estar relacionada aos níveis de lipídio da dieta experimental, como já foi reportado para *Labeo rohita* (GANGADHAR et al, 1997), cuja atividade proteásica apresentou redução com o aumento da suplementação de óleo na dieta. MANJAPPA e colaboradores (2002), estudando *Cyprinus carpio* alimentado com baixos teores de proteína e crescentes níveis de lipídio na dieta, também encontraram uma redução na atividade da protease. KOHLA e colaboradores

(1992), estudando o tambaqui, observaram que a atividade da tripsina nesta espécie diminuiu quando grandes quantidades de frutas e sementes são ingeridas. Estes autores concluíram que essa redução seria causada pela falta de substrato (proteína), devido à digestão incompleta das plantas ou inibidores enzimáticos normalmente encontrados em sementes.

No entanto, resultado diferente foi observado para o carnívoro pintado *Pseudoplatystoma corruscans* submetido a dietas com crescentes níveis de energia (LUNDSTEDT, 2003). Este autor encontrou que a atividade da protease do estômago e do intestino anterior aumentou em função do teor crescente de energia bruta nas dietas. Segundo este autor, as maiores atividades proteolíticas inespecíficas para animais alimentados com maior quantidade de energia bruta estariam relacionadas à necessidade de suprir em aminoácidos para serem utilizados como fonte de energia.

Observando a Figura 4 e visto que a máxima atividade da protease é observada quando os valores de fibra, lipídio e proteína na dieta convergem, podemos afirmar que o perfil da protease de *C. macropomum* requer um fino ajuste dos componentes da dieta para seu melhor funcionamento e maior atividade.

### 5.3.2 Lipase

O estômago e o intestino anterior foram as porções do trato digestório de tambaqui que apresentaram as maiores atividades específicas de lipase inespecífica. Devido a esta resposta, essas duas porções são, provavelmente, as mais importantes no processo de digestão de lipídio nesta espécie. Estudos *in vitro* e *in vivo* da digestão de diferentes segmentos do trato 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). Também, o padrão de lipase de matrinxã (*Brycon cephalus*), um peixe onívoro de água doce, é ajustado pela quantidade de lipídio presente no conteúdo intestinal (REIMER, 1982).

Os cecos pilóricos, o intestino anterior e posterior foram as porções do trato digestório onde a enzima lipolítica apresentou característica indutiva, ou seja, o aumento do teor de lipídio causou um aumento da atividade enzimática (Figura 3).

Foi observado em todo o intestino de tambaqui o aumento da lipase acoplado ao aumento dos teores de lipídio da dieta (como pode ser evidenciado pela estreita correlação encontrada entre a lipase do intestino anterior e o lipídio da dieta na figura 4). Altas

atividades de lipase devido aos altos teores de lipídio na dieta revelam o papel importante dos lipídios como recurso energético (DIVAKARAN et al, 1999). Semelhantemente ao observado para tambaqui, DAS e TRIPATHI (1991) verificaram que a atividade de lipase, tanto no intestino quanto no hepatopâncreas de carpa capim (*C. idella*), aumentou cerca de dez vezes quando a quantidade de lipídios da dieta subiu de 2 para 8 %. Entretanto, resultados diferentes têm sido observados por vários autores. Por exemplo, em carpas alimentadas com crescentes níveis de lipídio e baixos teores de proteína na dieta a atividade lipásica não demonstrou alteração (MANJAPPA et al., 2002). LUNDSTEDT (2003), estudando *Pseudoplatystoma corruscans* submetido a dietas com crescentes níveis de energia, encontrou que a atividade da lipase das porções anterior e média do intestino diminuiu com o aumento dos níveis de energia da dieta.

### 5.3.3 Amilase

O tambaqui, por ser um peixe onívoro e consumir, além de zooplâncton, grandes quantidades de sementes, frutas e vegetais em sua dieta natural, apresenta altas atividades de carboidrases. Segundo HSU e WU (1979), para digerir carboidratos complexos e/ou polissacarídeos um grupo especial de enzimas deve ser crucial e é esperada a indução destas enzimas para otimizar a digestão de alimento vegetal. Segundo estes autores, este comportamento deve ser esperado no trato digestivo de peixes herbívoros onde as proteases devem ser menos significativas. Os cecos pilóricos de tambaqui apresentaram uma alta atividade de amilase e mais, nesta porção, a amilase apresentou característica indutiva frente às mudanças na composição dos nutrientes da dieta, isto é, altos níveis de gordura, baixos níveis de proteína e conseqüente menor teor de carboidrato relativo, diminuiram a atividade desta enzima. Assim, podemos dizer que os cecos pilóricos são os responsáveis pela maior parte da digestão de amido em tambaqui.

A característica indutiva da amilase em peixes já foi observada para outras espécies. MORAES e BIDINOTTO (2000), estudando o perfil enzimático digestivo do onívoro *Piaractus mesopotamicus* alimentado com diferentes teores de carboidratos, encontraram que a atividade da amilase mudou frente às mudanças na composição da dieta. LUNDSTEDT (2003), estudando *Pseudoplatystoma corruscans*, submetido a dietas com diferentes níveis de energia, encontrou que a atividade da amilase estomacal da espécie aumentou em resposta ao aumento de energia da dieta. MANJAPPA e colaboradores

(2002), estudando *Cyprinus carpio*, alimentado com baixos teores de proteína e crescentes níveis de lipídio na dieta, observaram um aumento na atividade da amilase com o aumento na suplementação de óleo de peixe na dieta. *Brycon melanopterus* apresentou amilase induzida pelos altos níveis de carboidrato na dieta (REIMER, 1982). E, segundo este autor, este comportamento parece ser dependente da composição nutricional da dieta. Nós supomos que a diminuição do teor de proteína na dieta e a conseqüente redução na oferta de alguns aminoácidos foram responsáveis pela redução na expressão da amilase (como pode ser observado pela correlação positiva encontrada entre a amilase dos cecos pilóricos e o teor de proteína na dieta na figura 4). No estômago de tambaqui, onde a proteólise foi preponderante, a atividade amilásica foi baixa.

No presente estudo, o ajuste do perfil enzimático de tambaqui ao uso do carboidrato da dieta, além de ter sido dependente da oferta de proteína, também foi dependente da oferta de lipídio, pois o aumento do teor de lipídio na dieta reduziu a atividade da amilase. Provavelmente o tambaqui usou preferencialmente o carboidrato como recurso quando o nível de lipídio na dieta estava baixo. Quando os teores de lipídio na dieta aumentaram, o tambaqui usou preferencialmente o lipídio. Este fato reflete a habilidade do tambaqui em administrar ambos os recursos de energia oferecidos na ração (carboidrato e/ou lipídio).

#### **5.4 Metabolismo intermediário**

Quando os níveis de lipídio aumentaram e os de proteína diminuíram nas dietas experimentais, o metabolismo intermediário do tambaqui sofreu um rearranjo.

##### **5.4.1 Fígado**

O aumento do teor de lipídio junto com a diminuição do teor de proteína das dietas experimentais provavelmente estimulou a glicólise e a glicogenólise hepáticas de tambaqui evidenciadas pela queda nas concentrações de açúcares totais e glicogênio e aumento da concentração de piruvato. Isto ocorreu provavelmente porque a oferta relativa de carboidrato diminuiu quando a relação lipídio/carboidrato aumentou com o acréscimo de lipídios na dieta. Segundo DE SILVA e ANDERSON (1995), a manutenção dos teores de açúcares totais sanguínea é importante, pois muitos tecidos, como o cérebro, utilizam preferencialmente somente açúcares totais como fonte energética. Dessa forma, a redução na concentração de açúcares totais no fígado de *C. macropomum* sugere o seu fornecimento

com o propósito de manter os níveis plasmáticos de açúcares totais. De acordo com MOON e FOSTER (1995), em peixes, o fígado pode exportar açúcares totais a partir da quebra de glicogênio (glicogenólise) em direção aos tecidos extra-hepáticos. Assim, no presente estudo, este tecido está, provavelmente, exercendo sua função de manutenção da glicemia do corpo através destes processos.

A concentração de glicogênio hepático nos peixes pode variar entre as diferentes espécies, além de poder estar relacionada a outros fatores além da alimentação. De acordo com CORRÊA (2002) o *C. macropomum* não sofre alteração nas concentrações de glicogênio hepático com o aumento de proteína na dieta. Porém, KOHLA e colaboradores (1992) encontraram que a concentração de glicogênio hepático diminuiu com o aumento dos níveis de proteína da dieta para *C. macropomum*. *Cyprinus carpio* alimentado com dietas altamente protéicas (40%) tiveram seu estoque de glicogênio hepático diminuído quase pela metade quando comparado com 20 % de proteína na dieta (FINE & AZILBERG, 1996). VIEIRA e colaboradores (2005), estudando o perfil metabólico de matrinxã submetido ao aumento dos níveis de proteína da dieta, também verificaram uma redução gradual do glicogênio hepático quando o teor de proteína da dieta aumentou. Neste estudo os autores verificaram que as concentrações de piruvato, açúcares totais e lactato não mudaram conforme aumentou o teor de proteína na dieta.

MELO (2004) verificou valores constantes da concentração de glicogênio hepático e um aumento na concentração de açúcares totais neste tecido em *Rhamdia quelen* submetido à dietas com níveis crescentes de proteína. CORRÊA (2002) em um estudo com *C. macropomum* submetido também a dietas com níveis crescentes de proteína verificou uma redução na concentração de açúcares totais hepática e valores constantes das concentrações de piruvato e glicogênio hepáticos.

A atividade da MDH apresentou queda conforme aumentou o teor de lipídio da dieta indicando uma aparente redução do metabolismo oxidativo (provavelmente por falta de oxaloacetato) já que a grande quantidade de lipídio ofertada na dieta provavelmente está sendo armazenada e não oxidada para geração de ATP a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ .

O aumento da concentração de proteína observado no fígado de tambaqui, com a diminuição do teor de proteína e aumento do teor de lipídio nas dietas podem ser devido a uma maior mobilização deste nutriente já que seu teor na dieta diminui ao longo dos

tratamentos. Similarmente ao resultado encontrado no presente estudo, CORRÊA (2001) verificou valores constantes na concentração de aminoácidos em um estudo com *C. macropomum* submetido a dietas com níveis crescentes de proteína.

O fígado não demonstrou indícios de atividade neoglicogênica já que a concentração de aminoácidos manteve-se constante, a concentração de proteína aumentou e a concentração de amônia diminuiu no tratamento IV além da diminuição das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo de proteínas (GDH, ALAT e ASAT). Estas atividades provavelmente diminuiram por causa do aumento do teor de lipídio e diminuição do teor de proteína na dieta indicando, a não ocorrência de catabolismo de aminoácidos para serem utilizados como fonte de energia (neoglicogênese) provavelmente porque este tecido está usando o lipídio como recurso energético. Segundo KIRCHNER e colaboradores (2005), peixes com pouca tomada de proteína não apresentam capacidade gliconeogênica aumentada no fígado. A atividade da GDH está correlacionada, além do catabolismo protéico, com a excreção de amônia. Seus valores de Km, mesmo divergentes entre espécies (WALTON & COWEY, 1989), são geralmente similares ou estão acima da média de concentração de aminoácidos dos tecidos. Assim, as diferenças nestas concentrações determinarão o primeiro arranjo cinético, aumentando o catabolismo com o aumento das concentrações de substrato (BEAMISH & THOMAS, 1984), conseqüente à ingestão de alimento com altas quantidades de proteína (OGATA et al., 1985). Isto explicaria a diminuição da atividade da GDH neste tecido e a redução na concentração de amônia no tratamento IV (apresenta o menor teor de proteína e o maior de lipídio entre as dietas). Segundo MCGOOGAAN e GATLIN (1999), dietas altamente energéticas podem diminuir o catabolismo de glutamina devido à diminuição da necessidade de gliconeogênese de aminoácidos para demanda energética.

Observando o resultado apresentado pela ASAT hepática, supomos que a atividade desta enzima não foi dependente do tipo de recurso energético oferecido. Também em *Salmo salar*, FYNN-AIKINS e colaboradores (1995) encontraram que a ASAT não foi dependente do tipo de recurso energético oferecido ao peixe, enquanto que dietas altamente protéicas promoveram estimulação da ALAT hepática.

A diminuição da concentração e triglicerídeos e de ácidos graxos, a partir do tratamento II, conforme aumentou o teor de lipídio e diminuiu o teor de proteína nas dietas,

sugere lipólise neste tecido e uma possível exportação de ácidos graxos livres para o plasma. MELO (2004) verificou uma forte redução na concentração hepática de AGL em *Rhamdia quelen* submetido a dietas com níveis crescentes de proteína. Segundo este autor, este resultado indica que a demanda metabólica neste tecido é suprida por processos oxidativos de lipídios como ocorreu com *C. macropomum* no presente estudo.

#### 5.4.2 Músculo branco

A diminuição no teor de lactato sugere uma aparente exportação deste metabólito para o plasma para ser reciclado e servir ao metabolismo energético nos demais tecidos.

O aumento da concentração de glicogênio no tratamento IV (maior teor de lipídio e menor de proteína) provavelmente ocorreu porque o músculo branco importou açúcares totais do fígado e realizou glicogênese e, também, devido a uma possível neoglicogênese a partir de aminoácidos indicada pelo aumento na concentração de amônia no tratamento IV (devido à insuficiência de proteína para suprir demanda energética neste tratamento). Segundo HICKLING e MARCH (1982), quando concentrações de açúcares totais na circulação excedem a habilidade do fígado para lipogênese e síntese de glicogênio, ocorre uma elevação dramática na síntese de glicogênio muscular.

VIEIRA e colaboradores (2005) verificaram resultados contrários quando aumentaram o teor de proteína da dieta de *Brycon cephalus*. Estes autores observaram que as concentrações de glicogênio e piruvato diminuíram e as concentrações de aminoácidos e lactato aumentaram. MELO (2004) verificou um aumento na concentração muscular de glicogênio e valores constantes das concentrações musculares de lactato, piruvato e açúcares totais em *R. quelen* submetido a dietas com níveis crescentes de proteína. CORRÊA (2002), em um estudo com *C. macropomum* verificou que as elevações dos teores de proteína não induziram alterações bioquímicas no metabolismo glicídico do músculo branco desta espécie.

Similarmente aos resultados do presente trabalho, MELO (2004) verificou constância nas concentrações musculares de aminoácidos e proteína em *R. quelen* submetido ao aumento de proteína na dieta. CORRÊA (2002), em um estudo com *C. macropomum* submetido também a dietas com níveis crescentes de proteína encontrou um aumento na concentração de aminoácidos musculares.

A diminuição na concentração de triglicerídeos e aumento da concentração de ácidos graxos musculares sugere lipólise neste tecido. O músculo branco de tambaqui submetido a dietas com o mais alto teor de lipídio e mais baixo teor de proteína foi um grande consumidor de triglicerídeos. MELO (2004) também verificou uma redução na concentração de AGL apontando para um processo oxidativo de lipídios para atendimento da demanda energética em *R. quelen* submetido a dietas com níveis crescentes de proteína. MOYES et al. (1995) destaca que as mitocôndrias do músculo branco de peixes, assim como em mamíferos, oxidam piruvato ou outro combustível elementar como o lactato, em preferência a ácidos graxos quando presentes sozinhos. Entretanto, quando presente em conjunto, a oxidação dos ácidos graxos inibe a utilização de piruvato. Estes dados podem ser comparados com as respostas observadas no músculo branco dos animais que apresentaram acúmulo de piruvato e diminuição de ácidos graxos em relação ao aumento de lipídios na dieta.

#### **5.4.3 Plasma**

Segundo VIEIRA e colaboradores (2005), mudanças na concentração dos metabólitos plasmáticos refletem ajustes bioquímicos do metabolismo às mudanças nas dietas. O perfil metabólico plasmático reflete seu papel de transporte dos diversos intermediários metabólicos entre os tecidos.

A diminuição da glicose plasmática a partir do tratamento I ocorreu provavelmente devido a uma exportação deste metabólito para suprimento da demanda energética dos tecidos. O aumento da concentração de lactato plasmático a partir do tratamento II pode ser devido à importação deste metabólito do músculo branco onde sua concentração diminuiu.

A concentração de amônia plasmática aumentou a partir do tratamento I provavelmente porque ela foi importada do músculo branco para ser excretada, pois ela está elevada nestes tecidos. De acordo com MCGOOGAN e GATLIN (1999), é difícil usar a concentração de amônia como ferramenta para diagnósticos. Isto parece fazer sentido já que indivíduos dentro do mesmo tratamento podem ingerir quantidades variadas de comida e assim ter o metabolismo intermediário levemente modificado. Segundo estes autores, esta medida pode ser mais apropriada se o peixe comer uma quantidade conhecida de ração.

As concentrações de triglicerídeos e de ácidos graxos livres plasmáticos diminuíram, quando aumentou o teor de lipídio e diminuiu o de proteína nas dietas,

provavelmente devido à lipólise para suprimento da demanda energética já que a oferta de carboidrato relativa e de proteína diminuiu. Os dados existentes na literatura sobre a concentração destes metabólitos frente a mudanças na composição das dietas são bastante controversos. KIRCHNER e colaboradores (2003), estudando *Oncorhynchus mykiss* encontraram que peixes alimentados com menor tomada de proteína também apresentaram menores níveis de triglicerídeos. LUNDSTEDT (2004), estudando juvenis de pintados submetidos a dietas com teores crescentes de lipídio, ou energia bruta na dieta, verificou que a concentração de TGL plasmáticos decresceu significativamente nos animais alimentados com quantidades crescentes de energia. Resposta oposta foi observada para a variação da concentração de AGL, superior no tratamento com maior nível de lipídios ou energia. Segundo este autor, estes dados sugerem a ocorrência de um quadro metabólico lipolítico em *Pseudoplatystoma corruscans*. Também HEMRE e SANDNES (1999) testaram uma ampla faixa de inclusão de lipídios na dieta, de 31 a 47%, para salmão do Atlântico (*S. salar*) e verificaram que a variação lipídica na dieta não resultou em qualquer alteração na concentração de triacilgliceróis plasmáticos.

## 6. CONCLUSÕES

- O perfil enzimático digestivo de *C. macropomum* se ajusta a baixos teores de proteína na dieta preservando a habilidade em usar lipídio e carboidrato.
- O perfil da protease de *C. macropomum* requer um fino ajuste dos componentes da dieta para seu melhor funcionamento e maior atividade;
- O menor teor protéico que promoveu o máximo crescimento foi de 30 % em uma dieta com 8 % de lipídio (tratamento III).
- O alto teor de lipídio da dieta IV (14,5%) inibiu a ingestão de alimento. Assim, os peixes deste tratamento passaram a utilizar a proteína da dieta mais como recurso energético para suprir a demanda metabólica do que para os processos anabólicos de crescimento, resultando em baixo ganho em peso, aumento da amônia plasmática e neoglicogênese a partir de aminoácidos no músculo branco.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRO, P.W., HALL, R.D., CORBETT, J.T., SCHROEDER, J. Activation of non-specific lipase (EC 3.1.1.) by bile salts. **Biochem. Biophys. Acta**, 835, 477-490, 1985.

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

AOAC, **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of Analysis, 15<sup>th</sup> (edn), Arlington, VA, USA, p. 1298, 1990.

APHA. **American standard methods for examination of water and wastes**. Washington: Joint Editorial Board, DC, 12<sup>th</sup> ed., 1980.

ARAÚJO-LIMA, C., GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Brasília: MCT-CNPq, p.186, 1998.

BAANANTE, I.V., GARCÍA DE FRUTOS, P., BONAMUSA, L. FERNÁNDEZ, F. Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P and PFK-2. **Comp. Biochem. Physiol.** 100(B): 1-17, 1991.

BALLANTYNE, J.S. Amino acid Metabolism. In: Wright, P. & Anderson, P. (eds). **Nitrogen Excretion. Fish Physiology Series**, Vol. XX. Academic Press. pp. 77-107, 2001.

BALLESTRAZZI, R., LANARI, D., D'AGARO, E., MION, A. The effect of dietary protein level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, 127: 197-206, 1994.

BARRINGTON, E.J.W. The alimentary canal and digestion. In: Brown, M.E. **The Physiology of Fish**. New York: Academic Press, p.109-161, 1957.

BEAMISH, F.W. & THOMAS, E. Effect of dietary protein and lipid on nitrogen loss in rainbow trout. **Aquaculture**, 41: 359-371, 1984.

BERGOT, F. & BREQUE, J. (1983). Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and the intake level. **Aquaculture**, 34: 203-212, 1983.

BERNFELD, P. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ : colorimetric assay method. In: Colowich, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), **Methods in Enzymology**. Academic Press, New York, 1955.

BIDINOTTO, P.M., SOUZA, R.H.S., MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Bol. Tec. Cepta**, 10: 53-60, 1998.

BONAMUSA, L., GÁRCIA DE FRUTOS, P., FERNÁNDEZ, F., BAANANTE, I.V. Enzymes as indicators of nutritional conditions in the gilthead sea bream fish, *Sparus aurata*. En. International Aquaculture Conference. Aquaculture Europe, v.89: 37, 1989.

BONAMUSA, L., GÁRCIA DE FRUTOS, P., FERNÁNDEZ, F., BAANANTE, I.V. Nutritional effects on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. **Mol. Mar. Biol. and Biotech.**1(2): 113-125, 1992.

BORBA, M.R., FRACALOSSO, D.M., PEZZATO, L.E., MENOYO, D., BAUTISTA, J.M. Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. **Aq. Liv. Res.** 16: 362-369, 2003.

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.** 72: 248-254, 1976.

BRETT, J.R., ZALA, C.A. Daily pattern of nitrogen excretion and oxygen consumption of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) under controlled conditions. **J. Fish. Res. Board Can.**32: 2479-2486, 1975.

BUDDINGTON, R.K.; CHEN, J.W. & DIAMOND, J.M. Genetic and phenotypic adaptation of the intestinal nutrient transport to diet in fish. **J. Physiol.**393: 261-281, 1987.

BUDDINGTON, R.K.; KROGDHAL, Å & BAKKE-MCKELLEP, A.M. The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiol. Scand.**161 (Supl. 638): 67-80, 1997.

CARTER, C.G. & HOULIHAN, D.F. Protein Synthesis. In: Wright, P. & Anderson, P. (eds). **Nitrogen Excretion. Fish Physiology Series**, Vol. XX. Academic Press. pp. 31-75, 2001.

CARTER, C.G.; HOULIHAN, D.F.; KIESSLING, A.; MÉDALE & JOBLING, M. Physiological effects of feeding. In: Houlihan, D.F.; Boujard, T. & Jobling, M. (eds). **Food intake in fish**. Blackwell Science. pp. 297-331, 2001.

CATALDI, E., CATANDELLA, S., MONACO, G., ROSSI, A., TAUCIONI, L. A study of the histology and morphology of digestive tract of the sea-bream, *Sparus aurata*. **J. Fish Biol.** 30: 135-145, 1987.

CHAKRABARTI, I., GANI, M.D.A., CHAKI, K.K., SUR, R., MISRA, K.K. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. **Comp. Biochem. Physiol.** A 112: 167-177, 1995.

CHERNECKY, C.C., KRECH, R.L. & BERGER, B.J. Laboratory tests and diagnostic procedures. 932-933, 1993.

CHESLEY, L.C. The concentrations of proteases, amylase, and lipase in certain marine fishes. **Biol. Bull.** 66, 133-144, 1934.

CHO, C.Y.; COWEY, C.B. & WATANABE, T. **Finfish nutrition in Asia: Methodological approaches to research and development.** International Development Research Center (IDRC) - 233e.154p., 1986.

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

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

CORRÊA, C.F. **Estudo dos padrões de digestão enzimática e perfil metabólico em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) alimentado com diferentes teores de proteína e carboidrato em regime de confinamento.** Tese (Doutorado) – São Carlos: UFSCar. 115p, 2002.

COWEY, C.B., ADRON, J.W., BROWN, D.A. & SHANKS, A.M. The metabolism of glucose by plaice and the effect of dietary energy source on protein utilization in plaice. **Br. J. Nutr.**, 33:219-231, 1975.

COWEY, C. B. & SARGENT, J.R. Nutrition. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J. & Brett, J. R. (eds). **Fish Physiology, vol. VIII: Bioenergetics and growth.** Academic Press. pp. 1-69, 1979.

CHRISTIANSEN, D.C. & KLUNGSOYR, L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, 88B: 701-711, 1987.

DABROWSKI, K. & GUEDERLEY, H. Intermediary Metabolism. In: Halver, J.E. & Hardy, R. W. (eds.). **Fish Nutrition**. 3 ed, Academic Press. pp.309-365, 2002.

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

DE SILVA, S.S. & ANDERSON, T.A. **Fish nutrition in Aquaculture**. Chapman & Hall. Aquaculture 1 Series. 319p, 1995.

DEGUARA, S., JAUNCEY, K., AGIUS, C. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. **J. Fish. Biol.** 62, 1033-1043, 2003.

DELAHUNTY, G. OLCESE, J.; PRACK, M.; VODICNIK, M.J. SCHERECK, C.B. & DE VLAMING, V. Diurnal variations in the physiology of goldfish *Carassius auratus*. **J. Inter. Cycle Research**, 9: 73-88, 1978.

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** 30, 781-787, 1999.

DOSDAT, A.; SERVAIS, F.; METAILLER, R.; HEULVAN, C. & DESBRUYERES, E. **Aquaculture**, 141: 107-127, 1996.

DRABKIN, D.L. The standardization of hemoglobin measurement. **Am. J. Med. Sci.**, 215(1): 110-111, 1948.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., ROBERTS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 28, 350-358, 1956.

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**, 97, 383-394, 1996.

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** 13, 1-9, 2000.

FINE, M. & AZILBERG, D. The effect of dietary protein level, water temperature and growth hormone administration on growth and metabolism in the common carp. (*Cyprinus carpio*). **Comp. Biochem. Physiol.** 114A, (1): 35-42, 1996.

FYNN-AIKINS, K., HUNG, S.S.O., LIU, W., LI, H. Growth, lipogenesis and liver composition of juvenile White sturgeon fed different levels of D-glucose. **Aquaculture**. 105: 61-72, 1995.

GANGADHAR, B., NANDEESHA, M.C., VARGHESE, T.J., KESHAVANATH, P. Effect of varying protein and lipid levels on the growth of rohu, *Labeo rohita*. **Asian Fish. Sci.**, 10: 139-147, 1997.

GÉLINEAU, A., MÉDALE, F., BOUJARD, T. Effect of feeding time on postprandial nitrogen excretion and energy expenditure in rainbow trout. **J. Fish Biol.** 52: 655-664, 1998.

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

GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Am. J. Clin. Path.**, 56, 35-39, 1971.

GOLTERMAN, H.L. & CLIMO, R.S. **Methods for chemical analysis of firewater**. IBP Handbook 8. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 171, 1969.

GOULDING, M. **The Fish and the Forest. Exploration in Amazonian Natural History**. Los Angeles: University of California Press, 1980.

GOULDING, M., CARVALHO, M.L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Charachidae). An important Amazonian food fish. **Rev. Bras. Zool.**,1: 107-133, 1982.

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.

HARROWER, J.R., BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **J. Appl. Physiol.** 32 (5), 224-228, 1972.

HEMRE, G.I. & SANDNES, K. Effect of dietary lipid level on the muscle composition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Aquaculture Nutrition**, 5: 9-16, 1999.

HEPHER, B., MOSHE SHILO & SHMUELSARIG. **Principles of Fish Nutrition. In: Fish culture in warm water systems: problems and trends**. Boca Raton: CRC, 121-141, 1989.

HERTRAMPF, J. W. & PIEDAD-PASCUAL, F. **Handbook on ingredients for aquaculture feeds**. Kluwer Academic Publishers. 573p, 2000.

HICKLING, D.R. & MARCH, B.E. A comparative study of trout and chicks regarding dietary effects on glycogen concentration in liver and muscle during feeding and subsequent to feed withdrawal. **Comp. Biochem. Physiol.**, 72A: 115-123, 1982.

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

HOCHACHKA, P.W., GUPPY, M., GUDERLY, H.E., STOREY, K.B., HULBERT, W.C. Metabolic biochemistry of water-vs air breathing fishes: muscles enzymes and ultrastructure. **Can. J. zool.** 56, 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.**, 15: 373-379, 1979.

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

HSU, Y.L., WU, J.L. The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. **Bull. Inst. Zool., Academia Sinica** 18(1), 45-53, 1979.

HUNG, S.S.O. Carbohydrates utilization by sturgeon as assessed by oral administration tests. **J. Nutrit.**, 121: 1600-1605, 1991.

IZQUIERDO, M.S.; SOCORRO, J.; ARANTZAMEND, L. & HERNÁNDEZ-CRUZ, C.M. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. **Fish. Physiol. Biochem.**, 22: 97-107, 2000.

JOBLING, M. Some effects of temperature, feeding and body weight on nitrogenous excretion in young plaice (*Pleuronectes platessa* L.). **J. Fish Biol.** 18: 87-96, 1981.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 309p, 1994.

JOHNSON, E.G., WATANABE, W.O. & ELLIS, S.C. Effects of dietary lipid levels and energy: protein ratios on growth and feed utilization of juvenile Nassau Grouper fed isonitrogenous diets at two temperatures. **Nort. Am. J. Aq.**, 64: 47-54, 2002.

JÜRS, K. & BASTROP, R. Amino acid metabolism in fish. In: Hochachka, P.W. & Mommsen, P. (eds). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam. pp. 159-189, 1995.

KAPOOR, B.G.; SMITH, H.; VERIGHINA, I.A. The alimentary canal and digestion in teleosts. **Adv. Mar. Biol.**, 13: 109-139, 1975.

KAUSHIK, S.J., COWEY, C.B. **Dietary factors affecting nitrogen excretion by fish**. In: Cowey, C.B., Cho, C.Y. (Eds), Nutritional Strategies and Aquaculture Waste, Proceedings of the First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste, Ontario, 5-8 June, University of Guelph, Canada, p. 3-19, 1990.

KHEYYALI, D., SHIMENO, S. & TAKEDA, M. **Effect of dietary carbohydrate and lipid levels on hepatopancreatic enzymes and body composition in carp**. In: M. Takeda & T. Watanabe (Editors). The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture. Tokyo University of Fisheries, Tokyo, p. 451-460, 1989.

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.**, 134A: 337-347, 2003.

KOHLA, U.; SAINT-PAUL, U.; FRIEBE, J.; WERNICKE, D. HILGE, V. BRAUM, E. & GROPP, J. Growth, digestive enzyme activities and hepatic glycogen levels in juvenile *Collossoma macropomum* Cuvier from South America during feeding, starvation and refeeding. **Aquaculture and Fisheries Management**, 23: 189-208, 1992.

KOROLEFF, F. **Determination of nutrients**. In : Granshofk (ed). Methods of seawater analysis. Verlag. Chemie. Weinheim: pp. 117-187, 1976.

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** 151, 155-171, 1997.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação de peixes**. Campo Grande-MS, 108p, 1998.

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

KUZ'MINA, V.V. **Evolutionary Features of the Digestive-Transport Function in Fish**, Vol. 27. Plenum Publishing Corporation, pp. 167-175 Translated from Zhurnal Evoyutsionnoi Biokhimii I Fiziologii, 1991.

LADLEY, C.W. & LEATHERLAND, J.F. Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weights in rainbow trout, *Salmo gairdineri* Richardson. **Comp. Biochem. Physiol.**, 89A: 495-503, 1988.

LIED, E., BRAATEN, B. The effects of feeding and starving and different ratios of protein energy to total energy in the feed on the excretion of ammonia in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comp. Biochem. Physiol.** 78A: 49-52, 1984.

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Chapman & Hall, 259p, 1988.

LU, G.D. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.**, 33, 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.** (Tese de Doutorado) Universidade Federal de São Carlos-São Carlos-SP, 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. **Comp. Biochem. Physiol.**, B 137: 331-339, 2004.

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 Ichtyol. Et Piscat.** XXXII, Fasc. 2, 146-155, 2002.

MARTINO, R.C., CYRINO, J.E.P., PORTZ, L., TRUGO, L.C. Effect of dietary lipid level on nutritional performance of the surubim, *Pseudoplatystoma corruscans*. **Aquaculture** 209: 209-218, 2002.

MARTINO, R.C., CYRINO, J.E.P., PORTZ, L., TRUGO, L.C. Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture Nutrition**, 11: 131-137, 2005.

MCGOOGAN, B.B., GATLIN, D.M. III. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*: I. Effects of dietary protein and energy levels. **Aquaculture** 178: 333-348, 1999.

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

MENTON, D.J. Research considerations into the nutrition of *Colossoma* and *Piaractus* in relation to culture conditions. In: **Cultivo de Colossoma**, pp. 75-84, Red Regional de Entidades y Centros de Acuicultura de America Latina, Editora Guadalupe Ltda, Bogotá, Colombia, 1989.

MÉTON, I. **Regulacion nutricional de enzimas clave en la glucolisis-gluconeogenesis: expresión del gen 6-PF 2-K/FRU 2,6-P2ASA en hígado de *Sparus aurata***. (tese doutorado) Universidad de Barcelona-Facultad de Farmacia. -179p, 1996.

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

MOON, T.W. & FOSTER, G.D. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: Hochachka, P.W. & Mommsen, P. (eds). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam. pp. 65-100, 1995.

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

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**. 4. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 367-392, 1995.

NAVARRO, I. & GUTIÉRREZ, J. Fasting and Starvation. In: Hochachka, P.W. & Mommsen, P. (eds.). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 393-434, 1995.

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

OGATA, H.; ARAI, S. & MAS ALVAREZ, B. Effect of dietary protein levels on free aminoacid content of juvenile European eel. **Bull. Japan. Soc. Sci., Fish.**, 51: 537-578, 1985.

OLATUNDE, A.A, OGUNBIYI, O.A. Digestive enzymes in the alimentary tracts of three tropical catfish. **Hydrobiology** 56: 21-24.

PARK, J.T., JOHNSON, M.J. A submicro determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 181, 140-151, 1977.

PEREIRA, C., VIJAYAN, M.M., MOON, T.W. In vitro hepatocyte metabolism of alanine and glucose and the response to insulin in fed and fasted rainbow trout. **J. Exp. Zool.**, 271, 425-431, 1995.

PHILLIPS, A.M.JR. Nutrition, digestion and energy utilization. In: Hoar, W.S.& Randall, D.J. (eds). **Fish Physiology. Vol. I. Excretion, Ion Regulation, and Metabolism.** pp. 391-432, 1969.

RAMNARINE, I.W., PIRIE, J.M., JOHNSTONE, A.D.F., SMITH, G.W. The influence of ration size and feeding frequency on ammonia excretion by juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. **J. Fish Biol.** 31: 545-559, 1987.

REIMER, G. The influence on diet on the digestive enzymes of the amazon fish *Matrincha, Brycon cf melanopterus*. **J. Fish Biol.** 21: 637-642, 1982.

SABAPATHY, U., TEO, L.H. A quantitative study of some digestive enzymes in rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lateolabrax calcarifer*. **J. Fish Biol.** 42: 595-602, 1993.

REITMAN, S., FRANKEL, S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. **Am. J. Clin. Pathol.**, 28: 56, 1957.

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

SABAPATHY, U. & TEO, L.H. A quantitative study of some digestive enzymes in rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. **J. Fish Biol.** 42: 595-602, 1993.

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

**SANTINHA, P.J.M., MEDALE, F., CORRAZE, G. & GOMES, E.F.S. Effects of dietary protein:lipid ratio on growth and nutrient utilization in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.).** **Aquaculture Nutrition** 5:147-156, 1999.

SARATH, G., DE LA MOTTE, R.S., WAGNER, F.W. Protease assay methods. In: **Proteolytic enzymes. A practical approach.** (Ed. By Beymon, R.J., and Bond, J.S.), 1989.

SAVITZ, J. Nitrogen excretion and protein consumption of the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). **J. Fish. Res. Board Can.** 28: 449-451, 1971.

SHERIDAN, M.A. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. **Comp. Biochem. Physiol.** 90B: 679-690, 1988.

SHIMENO, S., DUAN-CUN-MING & TAKEDA, M. Regulation of carbohydrate metabolism in fish XVI. Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, 59: 827-833, 1993.

SHIMENO, S., TAKAFUMI, S. HIDETSUYO, H., MASUMOTO, T., KHEYYALI, D. Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**. 151: 371-377, 1997.

SILVA, J.A.M., PEREIRA-FILHO, M., OLIVEIRA-PEREIRA, M.I. Valor nutricional e energético de espécies vegetais importantes na alimentação do tambaqui. *Acta Amazônica*, 2003.

SUÁREZ, R.K. & MONNSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleosts fishes. **Can. J. Zool.**, 65: 1869-1882, 1987.

SUÁREZ, M.D., HIDALGO, M.C., GARCIA GALLEGO, M., SANZ, A. & DE LA HIGUERA, M. Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. **Comp. Biochem. Physiol.** 111A(3): 421-428, 1995.

TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. & OGINO, C. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 44:, 485. In: Halver, J.E. & Hardy, R. W. (2002). **Fish Nutrition**. 3 ed, Academic Press. 824pp, 1978.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, T. & SMITH, S. A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture** 182: 317-327, 2000.

WALTER, H.E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), **Methods of Enzymatic Analysis**. Vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270-277, 1984.

WALTON, M.J. & COWEY, C.B. Intermediary Metabolism. In: Halver, J.E. (ed.). **Fish Nutrition**. 2 ed. Academic Press, San Diego. pp. 259-329, 1989.

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

WEBER, J.M. & ZWINGELSTEIN, G. Circulatory substrates fluxes and their regulation. In: Hochachka, P.W. & Mommsen, P. (eds). **Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam. pp. 15-32, 1995.

WEIRICH, C.R. & REIGH, R. Dietary lipids and stress tolerance of larval fish. In: Lim, C. & Webster, C.D. (eds.). **Nutrition and fish health**. Food Products Press, Aquaculture. pp. 301-312, 2001.

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.

WOOD, C.M., HOPKINS, T.E., HOGSTRAND, C. & WALSH, P.J. Pulsatile urea excretion in the toadfish *Opsanus beta*: an analysis of the rates and routes. **J. Exp. Biol.** 198: 1729-1741, 1995.

VAL, A.L. **Adaptations of fishes to extreme conditions in fresh waters**. In: Bicudo, J.E.P.W. (Ed). The vertebrate gas transport cascade: Adaptations to environment and mode of life. Boca Raton: CRC Press. p. 43-53, 1993.

VAL, A.L., HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia**. Manaus: INPA. p.160, 1995.

VAN DEN THILLART, G. & VAN RAAIJ, M. Endogenous fuels; non invasive *versus* invasive approaches. In: Hochachka, P.W. & Mommsen, P. (eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Vol. 4, Metabolic Biochemistry. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 33-63, 1995.

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

**VAN WAARDE, A., VAN DEN THILLART, G. & KESBEKE, F. Anaerobic energy metabolism of the European eel, *Anguilla anguilla* L. J. Comp. Biochem. Physiol., 149: 469-475, 1983.**

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

VIEIRA, V.L.P., INOUE, L.A.K., MORAES, G. Metabolic responses of matrinxã (*Brycon cephalus*) to dietary protein level. **Comp. Biochem. Physiol.** 140 (A): 337-342, 2005.

VINATEA ARANA, L. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura.** Florianópolis; Ed. Da UFSC. 166p, 1997.