

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

**ESTUDOS DOS PROCESSOS DIGESTIVOS PROTEOLÍTICO E  
AMILOHIDROLÍTICO DE JUVENIS DE PACU *Piaractus mesopotamicus*  
(HOLMBERG, 1887), ALIMENTADOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE  
PROTEÍNA**

**JOYCE VISENTAINEL**

**São Carlos – SP**  
**2008**

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

**ESTUDOS DOS PROCESSOS DIGESTIVOS PROTEOLÍTICO E  
AMILOHIDROLÍTICO DE JUVENIS DE PACU *Piaractus mesopotamicus*  
(HOLMBERG, 1887), ALIMENTADOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE  
PROTEÍNA**

**JOYCE VISENTAINEL**

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.

**São Carlos – SP**  
**2008**

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

V829ep

Visentainel, Joyce.

Estudos dos processos digestivos proteolítico e amilohidrolítico de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), alimentados com níveis crescentes de proteína / Joyce Visentainel. -- São Carlos : UFSCar, 2008. 64 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Enzimas digestivas. 2. Pacu (Peixe). 3. Nutrição de peixes. 4. Bioquímica adaptativa. 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

**ESTUDOS DOS PROCESSOS DIGESTIVOS PROTEOLÍTICO E  
AMILOHIDROLÍTICO DE JUVENIS DE PACU *Piaracatus  
mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), ALIMENTADOS COM  
NÍVEIS CRESCENTES DE PROTEÍNA**

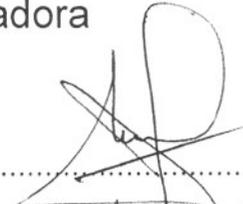
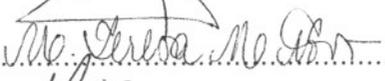
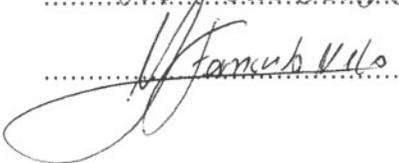
Dissertação de Mestrado de Joyce Visentainel

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilberto Moraes

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo

Prof. Dr. José Fernando Bibiano Melo

  
.....  
  
.....  
  
.....

---

Orientador

Prof. Dr. Gilberto Moraes

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus genitores, artífices da vida,  
pela dedicação, renúncia, doação e  
confiança em meu sucesso.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, supremo criador, pelo dom do Espírito Santo iluminando-me o entendimento;

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes, o guia incansável nas horas de dúvidas, pela orientação e amizade;

À CAPES pelo apoio financeiro concedido ao projeto;

Ao CAUNESP pela doação dos exemplares de pacu utilizados neste trabalho;

À Juliana, meia-irmã, companheira de quarto, de todas as horas, a amizade sincera;

Aos companheiros e amigos do laboratório de Bioquímica Adaptativa, pelos momentos agradáveis de colaboração, descontração e interessante troca de idéias;

À Cláucia, Marcelo e Clejosí pela ajuda na formulação e confecção das dietas utilizadas neste trabalho;

À Regiane e Greisse pela disponibilidade crescente, pela paciência inesgotável em solucionar problemas burocráticos;

Ao Sr. Toninho, alicerce inabalável, ajuda presente indispensável nos trabalhos rudes;

À minha família, sempre presente no dia-a-dia incansável, nas preocupações, nas alegrias, nas decepções, nos sucessos;

Ao Eduardo, pela compreensão nas ausências, pelo apoio incondicional, pela firmeza de sentimentos;

À Sra. Lourdes Massari, pela revisão gramatical desta dissertação;

A todos que direta e indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse realizado,

O meu reconhecimento sincero e eterno,

Muito Obrigada.

## RESUMO

O conhecimento sobre as enzimas digestivas permite entender alguns aspectos da necessidade nutricional dos animais e o efeito dos componentes da dieta sobre a atividade dessas enzimas. Considerando-se a carência de dados em relação às enzimas proteolíticas e amilohidrolítica na parede *versus* quimo de *P. mesopotamicus*, surge o interesse pelo seu comportamento, distribuição e dinâmica de produção destas enzimas de forma associada. Inicialmente foi proposta a investigação dos aspectos digestivos da parede e do quimo de juvenis de pacu em diferentes intervalos (0,5; 2; 6; 12 e 24 horas) após a última alimentação. Em um segundo momento foram investigados os aspectos digestivos na parede e no quimo de juvenis de pacu arraçoados com quatro níveis de proteína bruta (20, 26, 32 e 38 %). Foram analisadas enzimas digestivas proteolíticas inespecíficas, tripsina, quimiotripsina e amilase de todas as seções do trato digestório (estômago, cecos pilóricos, intestino anterior e posterior) tanto no primeiro quanto no segundo experimento. Os resultados obtidos no primeiro experimento indicaram que o pacu apresenta atividade enzimática digestiva desde o período pós-prandial até 24 horas após a alimentação, tanto na parede quanto na luz. Porém, essa atividade enzimática apresenta-se de maneira diferenciada, quer para os diferentes tipos de enzimas quer nas diferentes seções do trato. No segundo experimento os resultados indicaram que a amilase e as proteases digestivas foram responsivas aos níveis de carboidrato e proteína da dieta e que a secreção enzimática pode ser direta ou inversamente proporcionais ao teor do substrato específico da dieta dependendo da enzima e da seção do trato digestório. Concluímos que a produção de protease é prejudicada por jejuns superiores a 12 horas e que o conteúdo de enzimas da parede de todo o trato não se esgota em função da alimentação sendo o teor de protease alcalina da luz proporcional ao teor da parede. As enzimas digestivas de pacu são induzidas pela concentração de proteína e carboidrato da dieta.

## ABSTRACT

The knowledge on digestive enzymes allows understanding some aspects of animal nutritional needs and dietary components effects on the activity of those enzymes. Considering the lack on the information about proteolytic and enzymes from the gut wall versus digesta in *P. mesopotamicus*, it is interesting to see the behavior, distribution and production dynamic of those enzymes. Initially the investigation of digestive processes was proposed in the gut wall and digesta of pacu juveniles over distinct time intervals (0,5; 2; 6; 12 and 24 hours) following the last feeding. At a second time, the digestive aspects in the wall and digesta of pacu were investigated in fish fed with four levels of crude protein (20, 26, 32 and 38%). The digestive, unespecific-proteolytic enzymes, trypsin, chymotrypsin and amylase were assayed in all sections of digestive tract (stomach, piloric caecae, foregut and hindgut) in the first and in the second experiment. The results from the first experiment have shown that pacu presents digestive enzyme activity from the post-prandial moment until 24 hours post-feeding, either in the gut wall or in digesta. However, such enzymatic activity is much differentiated, either to different enzymes types or to different gut sections. In the second experiment our results have shown that digestive amylase and proteases were responsive to the levels of dietary carbohydrate and protein. Moreover, the enzymatic secretion may be direct or conversally proportional to specific substrat of diet and dependent on the enzyme and the gut section. In conclusion the protein production is impaired by fasting longer than 12 hours and the enzyme gut content from all gut is not emptied in consequence of feeding. The alkaline protease content is proportional to its gut wall content. The digestive enzyme of pacu are induced by dietary protein and carbohydrate concentrations.

## Lista de figuras

- Figura 1. Perfil da atividade proteolítica inespecífica na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* após 15 dias de alimentação, determinada após a interrupção da dieta em diferentes intervalos de tempo. .... 30
- Figura 2. Perfil da atividade da tripsina na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* após 15 dias de alimentação, determinada após a interrupção da dieta em diferentes intervalos de tempo. (\*) Atividade não detectada. .... 31
- Figura 3. Perfil da atividade da quimiotripsina na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* após 15 dias de alimentação, determinada após a interrupção da dieta em diferentes intervalos de tempo. (\*) Atividade não detectada. .... 32
- Figura 4. Perfil da atividade da amilase na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* após 15 dias de alimentação, determinada após a interrupção da dieta em diferentes intervalos de tempo. .... 33
- Figura 5. Perfil da atividade proteolítica inespecífica na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína bruta. .... 36
- Figura 6. Perfil da atividade da tripsina na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína bruta. (\*) Atividade não detectada. .... 37
- Figura 7. Perfil da atividade da quimiotripsina na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína bruta. (\*) Atividade não detectada. .... 38
- Figura 8. Perfil da atividade da amilase na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína bruta. .... 39
- Figura 9. Intersecção das atividades da amilase da parede e do quimo do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína bruta. .... 40

## Lista de tabelas

Tabela 1. Fórmula e composição das dietas experimentais.....	23
Tabela 2. Atividade das enzimas digestivas da parede do trato digestório de <i>P. mesopotamicus</i> após a alimentação. .....	28
Tabela 3. Atividade das enzimas digestivas do quimo de <i>P. mesopotamicus</i> após a alimentação.....	29
Tabela 4. Atividade das enzimas digestivas da parede do trato digestório de <i>P. mesopotamicus</i> alimentados com níveis crescentes de proteína. ....	34
Tabela 5. Atividade das enzimas digestivas do quimo de <i>P. mesopotamicus</i> alimentados com níveis crescentes de proteína.....	35

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	10
1.1. Considerações gerais .....	10
1.2. Nutrição em peixes .....	11
1.3. Digestão e enzimas digestivas .....	13
1.4. A espécie <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	18
2. Justificativa e objetivos .....	20
3. Material e métodos .....	21
3.1. Desenho experimental .....	21
3.1.1. Experimento I .....	21
3.1.2. Experimento II .....	22
3.2. Preparação dos extratos enzimáticos .....	24
3.2.1. Quimo .....	24
3.2.2. Homogeneizados celulares .....	24
3.3. Determinações enzimáticas .....	24
3.3.1. Protease inespecífica .....	24
3.3.2. Tripsina .....	25
3.3.3. Quimiotripsina .....	25
3.3.4. Amilase .....	26
3.4. Proteína total .....	27
3.5. Análise estatística .....	27
4. Resultados .....	27
4.1. Experimento I .....	27
4.2. Experimento II .....	33
5. Discussão .....	41
5.1. Experimento I .....	41
5.2. Experimento II .....	46
6. Conclusões .....	52
6.1. Experimento I .....	52
6.2. Experimento II .....	52
Referências bibliográficas .....	54

## 1. Introdução

### 1.1. Considerações gerais

O Brasil é um país que apresenta uma riqueza incomparável em espécies de peixes (CRESCÊNIO, 2005). São encontradas espécies das mais variadas formas e tamanhos, muitas promissoras à piscicultura, tanto para produção comercial ou ornamental quanto para pesca esportiva. Como consequência, a produção aquícola brasileira é uma atividade em crescimento e a piscicultura vem apresentando aumento contínuo nos últimos anos, sendo que, em treze anos (1992-2005), apresentou aumento de 650 % (CRESCÊNIO, 2005). Porém o potencial para a expansão dessa atividade é pouco aproveitado. Isso se deve, entre outros motivos, à falta de uma política efetiva para organizar e promover o desenvolvimento da aquíicultura como produtora de alimentos (RESENDE, 2003) e, também, à falta de informações sobre as espécies nativas (PRIETO et al., 2006). Entre as espécies com potencial para produção, o pacu se destaca por apresentar facilidade de adaptação aos sistemas de aquíicultura, boas taxas de crescimento e uma ótima aceitação no mercado consumidor devido à qualidade de sua carne. Porém muitos são os entraves no sistema de produção do pacu, havendo demanda por técnicas de produção (JOMORI et al., 2003; JOMORI et al., 2005), principalmente, na área de manejo alimentar (SOUZA et al., 2003, DIAS-KOBERSTEIN et al., 2005) uma vez que este é um dos fatores mais onerosos no sistema de produção (TACON, 1989).

Os maiores gastos presentes na piscicultura dizem respeito à alimentação, e uma redução nesses gastos pode ser alcançada com o uso de estratégias aplicadas na fabricação das rações. Proteína é o ingrediente mais caro de uma dieta (KIM & LEE, 2005; LEE & KIM, 2005) e uma redução desse macro nutriente em função do aumento de macro nutrientes não-protéicos, como carboidratos e lipídeos, pode reduzir os custos e aumentar a lucratividade.

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de conhecer as necessidades nutricionais das espécies nativas com potencial zootécnico, visando otimizar as condições de cultivo e aperfeiçoar o desempenho dos peixes com o emprego mínimo de proteína na dieta (FERNANDES et al., 2000; FERNANDES et al., 2001; IZIEL et al., 2004; ABIMORAD et al., 2007). Porém só nos últimos anos estão sendo apresentados dados a respeito da composição da dieta *versus* adaptação das enzimas digestivas (CORRÊA et al., 2007) e

respostas satisfatórias estão sendo obtidas (MORAES & BIDINOTTO, 2000; LUNDSTEDT et al., 2004; MELO, 2004; ALMEIDA et al., 2006; CORRÊA et al., 2007). Esta abordagem está sendo usada como uma ferramenta para otimizar a composição dos nutrientes das dietas, e também para desvendar a estratégia alimentar das diferentes espécies de peixes.

## **1.2. Nutrição em peixes**

A nutrição é um ramo da fisiologia que estuda todos os conjuntos de ações que assegurem o fornecimento dos nutrientes requeridos para os processos vitais de um organismo (GUILLAUME et al., 2001). Essas ações incluem vários estágios, como comportamento e ingestão do alimento, digestão, absorção, metabolismo dos nutrientes e eliminação dos resíduos (GUILLAUME et al., 2001).

O interesse pela nutrição em peixes é assunto recente no meio científico. Até a metade do século XX os estudos eram dirigidos em relação à anatomia do trato digestivo e aspectos fisiológicos de animais em seu ambiente natural. Com o início da criação de peixes em sistemas de cultivo, o estudo dos requerimentos nutricionais em peixes tornou-se necessário (GUILLAUME et al., 2001). A seqüência básica do processo nutricional consiste da ingestão do alimento, digestão e assimilação dos produtos da digestão (MUNILLA-MORÁN & SABORIDO-REY, 1996a). Os estudos voltados para a nutrição têm demonstrado que a dieta que visa promover o crescimento precisa incluir uma fonte de energia, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais (ALMEIDA, 2006) e que o valor nutricional de uma dieta depende não só de um balanço adequado entre nutrientes como também da capacidade digestiva do peixe, a qual é afetada pela atividade das enzimas digestivas no trato digestivo (EUSEBIO & COLOSO, 2002). Outros estudos nutricionais têm demonstrado que a dieta influencia o comportamento, a integridade estrutural, a saúde, as funções fisiológicas, a reprodução e o crescimento dos peixes (PEZZATO et al., 2004). Portanto esses autores salientam que a determinação das necessidades qualitativas e quantitativas dos nutrientes essenciais na dieta é de fundamental importância para a adequada formulação de rações para peixes.

A proteína, considerada o ingrediente mais caro de uma dieta, afeta não somente o crescimento do peixe, mas também os custos da produção (KIM & LEE, 2005; LEE & KIM, 2005; LEE et al., 2006). Sua qualidade depende de sua digestibilidade e composição de

aminoácidos (N.R.C., 1993). A exigência protéica em peixes pode apresentar variações quanto a suas fontes, digestibilidade, espécie e outros fatores como a temperatura e a taxa de estocagem (MELO, 2004).

Para diferentes espécies de peixes comercialmente importantes, o requerimento protéico varia entre 30 – 55 % de proteína bruta da dieta (N.R.C., 1993). Em um estudo realizado com juvenis de *Platichthys stellatus* (LEE et al., 2006) e *Pagrus pagrus* (SCHUCHARDT et al., 2008), observou-se um nível ótimo de 50 % de proteína bruta para proporcionar um ótimo crescimento. Para juvenis de *Piaractus mesopotamicus*, este requerimento protéico para melhor desempenho está ao redor de 25 % de proteína bruta (ABIMORAD & CARNEIRO, 2007). Dietas para *Brycon amazonicus* devem conter pelo menos 28 % de proteína (IZIEL et al., 2004). *Pseudobagrus fulvidraco* exige 42 % de proteína (KIM & LEE, 2005).

Todavia um excesso deste macronutriente na dieta resulta em menor desempenho do peixe (MOHANTA et al., 2008), aumento no custo da produção (KIM & LEE, 2005) e deterioração na qualidade da água (BECHARA et al., 2005; SÁ et al., 2008).

Carboidratos e lipídeos utilizados em níveis adequados como fonte de energia não protéica na dieta podem minimizar o uso de proteína como fonte de energia (N.R.C., 1993), direcionando a proteína para o crescimento e diminuindo os custos da produção. Além de serem utilizados como uma fonte de energia barata, os carboidratos exibem propriedades aglutinantes de importância relevante na produção das dietas (KROGDAHL, et al., 2005).

As diferentes espécies de peixes diferem grandemente em sua habilidade de digerir carboidratos. Esta variabilidade reflete as diferenças anatômicas e funcionais do trato gastrintestinal e órgãos associados (KROGDAHL et al., 2005), assim como a temperatura (KUZ'MINA et al., 1996). De acordo com Wilson (1994) a capacidade de utilização de carboidratos pelos peixes de águas doce e quente seria muito maior que de peixes marinhos e de água fria, e que os primeiros utilizariam mais eficientemente carboidratos complexos como amido e a dextrina enquanto os outros estariam mais adaptados a utilizar mono e dissacarídeos. Espécies onívoras ou herbívoras geralmente toleram maiores níveis de carboidrato, usando-o com maior eficiência como fonte de energia do que espécies carnívoras (HEMRE, et al., 2002; KROGDAHL et al., 2005). Do mesmo modo, peixes carnívoros utilizam os lipídeos muito melhor que os carboidratos devido à baixa atividade específica de enzimas para digeri-lo e às deficiências metabólicas (HEMRE, et al., 2002). Porém foi observado em *Pseudoplatystoma corruscans*, uma espécie carnívora, a habilidade de

aproveitar o amido, pois a atividade amilohidrolítica mostrou-se indutiva neste peixe (LUNDSTEDT et al., 2004).

Se os carboidratos não são fornecidos na dieta, outros componentes como proteínas e lipídeos são catabolisados para obtenção de energia (KUMAR et al., 2006) e para a síntese de vários componentes biologicamente importantes. Porém um excesso deste macronutriente pode ser estocado na forma de lipídeo corporal (ABIMORAD et al., 2007) além de causar redução de sua própria digestibilidade (WILSON, 1994). Este efeito foi observado em *Oncorhynchus mykiss* (SPANNHOF & PLANTIKOW, 1983), *Sparus aurata* (FOUNTOULAKI et al., 2005) e *Hippoglossus hippoglossus* (HATLEN et al., 2005). Assim, é importante fornecer uma concentração apropriada de carboidratos na dieta de espécies de peixes utilizadas na aquicultura (N.R.C., 1993; WILSON, 1994).

Os lipídeos são uma fonte importante de energia e de ácidos graxos essenciais necessários para o crescimento e desenvolvimento (CHOU et al., 2001), além de servirem como vetores para vitaminas lipossolúveis durante a absorção intestinal (N.R.C., 1993). Adicionalmente, os lipídeos são altamente energéticos e rapidamente metabolizados pelos peixes, especialmente pelos carnívoros (N.R.C., 1993) servindo como uma fonte importante de energia, principalmente, para espécies marinhas, as quais geralmente apresentam uma capacidade limitada em utilizar carboidratos como energia (CHOU et al., 2001).

### **1.3. Digestão e enzimas digestivas**

Os nutrientes dos alimentos, antes de serem utilizados metabolicamente, devem passar por processos de digestão e absorção. Esses processos dependem da disponibilidade de enzimas digestivas adequadas presentes em locais apropriados ao longo do trato gastrintestinal (CHONG et al., 2002; JUN-SHENG et al., 2006; KUMAR et al., 2007). Geralmente, a distribuição e intensidade da atividade destas enzimas ao longo do intestino variam com o hábito alimentar e morfologia do intestino (HOFER & SCHIEMER, 1981; SABAPATHY & TEO, 1993; TENGJAROENKUL et al., 2000). Assim, as enzimas derivadas do estômago, pâncreas e intestino, que são secretadas no lúmen, e as enzimas que estão anexas na borda em escova da mucosa intestinal trabalham juntas para completar a hidrólise e absorção dos nutrientes ingeridos (JUN-SHENG et al., 2006).

Diferentes hábitos alimentares e preferências por certos alimentos revelam o perfil enzimático do peixe e este fato traz importantes conseqüências, como por exemplo, o potencial para o uso da dieta artificial e a necessidade de um ajuste do conteúdo de seus itens para alcançar melhores resultados (SABAPATHY & TEO, 1993; HIDALGO et al., 1999; MORAES & BIDINOTTO, 2000; DEGUARA, et al., 2003). Até mesmo espécies com hábitos alimentares iguais apresentam diferenças na habilidade em digerir o alimento, trazendo implicações para a formulação de dietas práticas (DIVAKARAN et al., 1999). Os peixes herbívoros e onívoros são conhecidos por possuírem altos níveis de carboidrases em relação aos carnívoros, e os peixes carnívoros mostram maiores atividades proteolíticas (SABAPATHY & TEO, 1993; KUZ'MINA, 1996; HIDALGO et al., 1999; CHAN et al., 2004) e lipolíticas (CHAKRABARTI et al., 1995; TENGJAROENKUL et al., 2000) quando comparados aos herbívoros e onívoros. Porém o comprimento relativo do trato digestivo destes é maior do que em carnívoros, o que permite que o alimento ingerido permaneça maior tempo em contato com o baixo nível de proteases (HOFER & SCHIEMER, 1981). Essa combinação do comprimento intestinal com a ampla distribuição das enzimas digestivas ao longo do intestino aumenta a capacidade do peixe de utilizar os vários componentes da dieta (TENGJAROENKUL et al., 2000). De acordo com Fountoulaki et al. (2005), a capacidade digestiva depende do nível de enzimas digestivas bem como do tempo que os nutrientes estão sujeitos à ação das enzimas.

Glass et al. (1989) atestam que o conhecimento da quantidade e especificidade de cada enzima presente em um sistema digestório, bem como as condições em que ocorre a hidrólise, é uma ferramenta de grande importância para prognosticar o processo digestivo em peixes, assim como a digestibilidade de novos alimentos. Além disso, esse conhecimento sobre as enzimas digestivas permite entender a necessidade nutricional dos animais e o efeito dos componentes da dieta sobre a atividade das enzimas (DIVAKARAN et al., 1999).

Os peixes apresentam a capacidade de modular seu perfil digestivo diante de diferentes fontes, tipos e quantidades de nutrientes da dieta, e, segundo Reimer (1982) e Moraes & Bidinotto (2000), esta é uma característica adaptativa para melhor aproveitamento dos nutrientes das dietas. O aumento da ingestão de proteína provoca aumento da atividade proteolítica em *Clarias batrachus* (MUKHOPADHYAY et al., 1978), *Lates calcarifer* (EUSEBIO & COLOSO, 2002), *P. mesopotamicus* (MORAES E BIDINOTTO, 2004), *Labeo rohita* (DEBNATH et al., 2007) e *Puntius gonionotus* (MOHANTA et al., 2008). *Brycon melanopterus* exibe atividade proteolítica aumentada no conteúdo gastrintestinal, quando recebeu dieta com maior porcentagem de proteína (REIMER, 1982).

O lipídeo dietético, principalmente na forma de triacilglicerol, é hidrolisado em ácidos graxos livres e 2-acilglicerol por lípases, enzimas estas secretadas no lúmen intestinal pelo hepatopâncreas (ZAMBONINO INFANTE & CAHU, 2007). Os ácidos graxos e glicerol são absorvidos e usados para processos biossintéticos de vários componentes celulares ou então, catabolizados para obtenção de energia.

Os carboidratos são digeridos por uma série de enzimas, e entre elas se destaca a  $\alpha$ -amilase. Esta enzima, produzida pelo pâncreas exócrino, ataca as ligações glicosídicas  $\alpha$  1-4, produzindo a partir do amido uma variedade de oligossacarídeos (KROGDAHL et al., 2005). Segundo alguns autores, a produção da  $\alpha$ -amilase é independente da dieta (HOFER, 1979; CHAN et al., 2004). Porém Fernández et al. (2001), observaram que as diferenças na amilase entre cinco espécies de “Sparids” está associada principalmente com seus hábitos alimentares, ou seja, atividade específica relativamente maior em herbívoros quando comparados aos carnívoros. O aumento de amido na dieta em *B. melanopterus* (REIMER, 1982), *P. mesopotamicus* (MORAES & BIDINOTTO, 2000) e *Colossoma macropomum* (CORRÊA et al., 2007), resulta em aumento da atividade da  $\alpha$ -amilase, revelando a capacidade de modulação desta enzima por essas espécies. Em contraste, o aumento do nível de amido dietético ocasiona redução da atividade da  $\alpha$ -amilase no quimo de *O. mykiss* (SPANNHOF & PLANTIKOW, 1983). Esses autores sugerem que a redução da amilase é devida à inibição da enzima pela adsorção às moléculas de amido.

A digestão das proteínas envolve a ação de muitas e diferentes proteases, cada qual com sua ação específica nas diferentes partes da cadeia polipeptídica (GUILLAUME & CHOUBERT, 2001). A utilização das proteínas pelos peixes depende da atividade das proteases digestivas presentes em seus órgãos digestivos (NATALIA et al. 2004). Hsu & Wu (1979) destacam que a pepsina, a tripsina e a quimiotripsina são as três enzimas proteolíticas mais importantes do trato gastrintestinal de peixes, e que o produto de reação destas enzimas, os oligopeptídeos, podem ser digeridos pelas várias endo e exo-peptidases a aminoácidos aproveitáveis. As exo-peptidases clivam ligações peptídicas no lado amino terminal (aminopeptidases) ou carboxi terminal (carboxipeptidase), e as endo-peptidases, clivam ligações internas em uma cadeia polipeptídica. Entre essas últimas encontra-se a pepsina, tripsina e quimiotripsina.

A pepsina apresenta sua atividade em pH ácido, o qual é encontrado na porção gástrica. Esta enzima é responsável pela hidrólise inicial e parcial de proteínas no estômago, com a ajuda do ácido clorídrico secretado (NATALIA et al., 2004) e subsequentemente, este processo é completado pela ação combinada da tripsina e quimiotripsina no intestino. Sua

forma inativa, o pepsinogênio, é ativada quando entra em contato com o suco gástrico, mostrando preferência pela clivagem em sítios aromáticos e hidrofóbicos da proteína (WALSH, 1979) os quais se tornam resíduos aminoterminais (NELSON & COX, 2005). De acordo com Zambonino Infante e Cahu (2007), os níveis de atividade da pepsina parecem pouco influenciados pela proteína da dieta, e considerando que algumas espécies de peixes não apresentam estômago, a presença desta enzima não parece determinante para a digestão da proteína. Porém outros resultados mostram que para algumas espécies, a atividade proteolítica do estômago é importante para a digestão de proteínas. Em *P. corruscans*, mesmo não sendo responsiva aos níveis crescentes de proteína bruta da dieta, a protease ácida apresenta altas atividades, o que certamente está associado com o hábito alimentar da espécie (LUNDSTEDT et al., 2004). Por outro lado o onívoro *C. macropomum* apresenta caráter indutivo desta protease no estômago e os autores argumentam que este traço adaptativo parece estar relacionado a um par de fatores, ou seja, à diminuição da proteína da dieta ou ao aumento de lipídeo (ALMEIDA et al., 2006). Da mesma forma, *Rhamdia quelen* também apresenta caráter indutivo da protease ácida no estômago (MELO, 2004).

Em vista da grande importância da proteína na nutrição de peixes, uma série de estudos têm sido focados no papel da tripsina como um indicador nutricional por ser considerada um enzima chave no processo da digestão (CARA et al., 2007). A forma precursora da tripsina, o tripsinogênio, é ativada por uma enteropeptidase, uma enzima proteolítica secretada por células intestinais (NELSON & COX, 2005), assim como pela própria tripsina ativa. Além disso, esta enzima ativa as formas precursoras de outras proteases, incluindo a quimiotripsina (SUNDE et al., 2001; SUNDE et al., 2004). Em meio alcalino, a tripsina cliva as ligações peptídicas internas de uma proteína, com especificidade para os resíduos de arginina ou lisina, os quais se tornam os resíduos carboxiterminais de fragmentos de peptídeos (WALSH, 1979). A secreção desta enzima no lúmen intestinal está relacionada à entrada do alimento nesta porção do trato (EINARSSON et al., 1996). A tripsina mostra-se responsiva, no intestino de *B. amazonicos*, à adição de aminoácidos essenciais livres na dieta (CAMILO, 2007), assim como no trato digestório de *R. quelen* frente a teores crescentes de proteína (MELO, 2004).

A quimiotripsina é ativada quando o quimiotripsinogênio é secretado no lúmen e entra em contato com a tripsina. Esta enzima tem a habilidade de clivar ligações onde o resíduo de aminoácido do lado carboxílico (NELSON & COX, 2005) da proteína é aromático. Assim, ela cliva em fenilalanina, tirosina e triptofano (WALSH, 1979). Para a espécie carnívora *P. corruscans* foi sugerido que estas duas enzimas (tripsina e quimiotripsina) são constitutivas

por apresentarem pouca mudança na atividade frente aos diferentes níveis de proteína da dieta (LUNDSTEDT et al., 2004). Diferentemente, *R. quelen* apresenta responsividade dessas mesmas enzimas frente a variações nos níveis de proteína das dietas experimentais (MELO, 2004).

O estudo das enzimas digestivas em peixes pode elucidar algumas características da fisiologia da nutrição desses animais (SUNDE et al., 2004; PAPOUTSOGLU & LYNDON, 2006) e também ajudar a resolver alguns problemas na alimentação, tais como a vantagem de uma dieta artificial e a capacidade nutritiva dos peixes (HIDALGO et al., 1999). Todavia estes estudos revelam a atividade enzimática digestiva presente no trato gastrintestinal desprovido de seu conteúdo (FISH, 1960; GARCÍA-CARREÑO et al., 2002; LUNDSTEDT et al., 2004; KUMAR et al., 2006) e isto pode ocultar parte do processo químico da digestão (JUN-SHENG et al., 2006). Em vista disso, alguns trabalhos apresentam a atividade enzimática digestiva presente no conteúdo intestinal. Uys et al. (1987), após analisarem o conteúdo intestinal de *Clarias gariepinus* em diferentes intervalos após a alimentação, concluem que a atividade das enzimas digestivas é induzida pela ingestão do alimento. Seixas Filho et al. (1999) analisaram a atividade amilohidrolítica no conteúdo intestinal de três espécies tropicais dos teleósteos de água doce *Brycon orbignyanus*, *Leporinus friderici* e *P. corruscans* e concluíram que a diferença de atividade entre *B. orbignyanus* e *L. friderici* está relacionada à morfometria dos intestinos e que a atividade presente em *P. corruscans* sugeriu a possibilidade de utilização de dieta artificial em sua alimentação. Chiu & Pan (2002), observaram atividade proteolítica no tecido e conteúdo intestinal de *Anguilla japonica* aumentada até 11 horas após a alimentação. *S. aurata* apresenta atividade amilohidrolítica e proteolítica em seu conteúdo intestinal em diferentes intervalos de tempo após a alimentação (FOUNTOULAKI et al., 2005). Jun-sheng et al. (2006) observaram a atividade digestiva proteolítica, amilohidrolítica e lipolítica no trato intestinal, provido de seu conteúdo, do híbrido *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* em diferentes estágios de crescimento. Em vista disso, no presente estudo, além das enzimas digestivas presentes na parede do trato gastrintestinal, foi analisado também a atividade destas enzimas no lúmen de cada porção do trato.

#### 1.4. A espécie *Piaractus mesopotamicus*

O pacu, *P. mesopotamicus*, também conhecido como pacu do pantanal, pacu-guaçu, pacu-caranha ou somente caranha, é uma espécie neotropical natural das bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, ocupando a seguinte posição sistemática:

Classe Osteichthyes

Subclasse Actinopterygii

Superordem Ostariophysi

Ordem Characiforme

Família Characidae

Subfamília Myleinae

Gênero *Piaractus*

Espécie *Piaractus mesopotamicus*

A superordem Ostariophysi inclui os peixes de maior valor comercial na pesca e na piscicultura brasileiras. A ordem Characiformes é um grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul e compreende formas herbívoras, onívoras, iliófagas e carnívoras, algumas das quais muito especializadas. A família Characidae apresenta o maior número de espécies descritas dentro da ordem e é a mais complexa, com grande número de subfamílias. A subfamília Myleinae, a qual inclui o pacu, está representada por peixes herbívoros, preferencialmente frugívoros (URBINATI & GONÇALVES, 2005).

Entre as espécies com potencial para a criação comercial, o pacu destaca-se em termos de rusticidade ao manejo, boas taxas de crescimento e aprovação no mercado consumidor devido à carne de boa qualidade. No ambiente natural, o pacu tem uma dieta muito diversificada, variando em função da sazonalidade e, conseqüentemente, da disponibilidade de alimento. Seu ciclo de vida está estreitamente relacionado a períodos de alta ingestão de carboidratos. De acordo com Silva (1985), o pacu tem uma dentição especializada para fragmentar e triturar os alimentos duros e o tipo de alimento encontrado no estômago do pacu é constituído principalmente de folhas, frutos, sementes, assim como de restos e esqueletos de peixes e ou moluscos ou crustáceos, podendo ser caracterizado como uma espécie onívora.

O pacu é hoje a espécie nativa da bacia do Paraná mais cultivada no Brasil (CRESCÊNIO, 2005). Embora as exigências nutricionais do pacu não estejam totalmente estabelecidas, referências à proteína (FERNANDES et al, 2000; FERNANDES et al 2001), carboidratos (MORAES E BIDINOTTO, 2000; MUÑOZ-RAMÍREZ, 2005), lipídeos

(ABIMORAD et al, 2007), bem como a digestibilidade de alguns ingredientes (ABIMORAD & CARNEIRO, 2004; ABIMORAD & CARNEIRO, 2007), encontram-se disponíveis na literatura. Contudo estudos a respeito de suas exigências nutricionais e capacidade digestiva frente a variedades de ingredientes da dieta ainda permanecem escassos. Abimorad et al., 2007, concluíram que o pacu utiliza lipídeos tão eficientemente quanto carboidratos para a maximização do uso de proteínas. As exigências nutricionais quanto ao requerimento protéico, desempenho e composição corporal já foram reportadas para alevinos e juvenis (FERNANDES et al., 2000; FERNANDES et al., 2001), como também sua habilidade de modular seu perfil amilohidrolítico (MORAES & BIDINOTTO, 2000). Considerando a carência de dados em relação às enzimas proteolíticas na parede *versus* quimo desta espécie, surge o interesse pelo seu comportamento, distribuição e dinâmica destas enzimas de forma associada.

## 2. Justificativa e objetivos

Há um crescente interesse científico sobre a atividade digestiva enzimática em diferentes espécies de peixes tanto de ambientes marinhos como de água doce, principalmente aquelas de importância na aquicultura. Ultimamente, temos proposto o ajuste de teores protéicos, lipídicos e de carboidratos nas rações de peixes através da ferramenta bioquímica que consiste na análise da variação adaptativa do perfil enzimático digestivo. Esta ferramenta vem se mostrando eficiente em algumas espécies já estudadas por nosso grupo de pesquisas (LUNDSTEDT et al., 2004; MELO, 2004; ALMEIDA, 2006; CAMILO, 2007; CORRÊA et al., 2007). Em vista disso, da carência desses dados em *P. mesopotamicus* e da importância comercial desta espécie, propomos o presente estudo. Além disso, uma nova avaliação foi proposta. O fato de termos uma resposta adaptativa do trato digestório, com a indução de enzimas digestivas, não é o suficiente para que possamos afirmar que os teores de enzima liberados para a luz do trato sejam diferentes, por isso propomos a avaliação da atividade enzimática digestiva também no suco digestivo.

O presente trabalho teve por objetivo o estudo de proteases digestivas e da amilase da parede e do suco digestivo no trato gastrintestinal de *P. mesopotamicus*. As estratégias empregadas para se alcançar esse objetivo foram: 1) determinação da dinâmica do processo digestivo, na parede e quimo, em diferentes intervalos após a alimentação; 2) determinação do nível de proteína capaz de maximizar a indução de proteases no trato digestório de pacu alimentado com dietas isoenergéticas; 3) determinação das atividades proteolíticas e amilohidrolítica na luz do trato digestório de pacu durante o processo digestivo nas condições de máxima indução; 4) comparação das atividades proteolíticas e amilohidrolíticas da luz do trato digestório de pacu com as atividades da parede nas condições de máxima indução.

### 3. Material e métodos

Exemplares de juvenis de pacu, fornecidos pelo Centro de Aqüicultura da Unesp (CAUNESP), Campus de Jaboticabal, foram aclimatados nas instalações do Laboratório de Bioquímica Adaptativa do Departamento de Genética e Evolução na Universidade Federal de São Carlos, em tanques de 2000 L, por um período de 30 dias, recebendo ração comercial contendo 36 % de proteína bruta. Esses tanques tiveram circulação de água, aeração e temperatura controladas, e os parâmetros físico-químicos da água foram mantidos constantes (temperatura  $27,25 \pm 1,32$  °C; oxigênio dissolvido  $6,20 \pm 0,27$  mg/L; pH  $7,33 \pm 0,05$ ; amônia  $0,17 \pm 0,08$  mg/L; alcalinidade  $9,24 \pm 0,62$  mg/L (como  $\text{CaCO}_3$ ) e dureza  $30,51 \pm 1,06$  mg/L (como  $\text{CaCO}_3$ ). Após este período, os peixes foram distribuídos em tanques de 250 L, de acordo com os desenhos experimentais pertinentes. Esses tanques apresentavam as mesmas condições dos tanques de aclimação.

#### 3.1. Desenho experimental

##### 3.1.1. Experimento I

O objetivo desse experimento foi avaliar o perfil de atividades enzimáticas digestivas na parede do trato digestório e no quimo de *P. mesopotamicus* ao longo de 24 horas pós-alimentação. Assim, 36 peixes, com peso inicial de  $183,3 \pm 7,3$  gramas, foram distribuídos igualmente em seis caixas de 250 L para realização do seguinte desenho experimental: uma caixa, escolhida aleatoriamente, onde os peixes foram mantidos em jejum; cinco caixas onde os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 36 % de proteína bruta. O período experimental foi de 15 dias. Decorrido este período, as caixas foram aleatoriamente escolhidas para os tempos de coleta correspondentes a 0,5; 2; 6; 12 e 24 horas após a última alimentação. Decorridos os intervalos de tempo pré-estabelecidos, os peixes foram coletados, anestesiados em solução de eugenol 40 mg/L (INOUE et al., 2003) e abatidos por secção medular. O trato digestório foi extraído sobre superfície gelada e dividido em estômago, cecos pilóricos, intestino anterior e intestino posterior. Cada porção teve seu conteúdo extraído com

2 mL de salina gelada para a retirada do conteúdo digestivo, exceto nos peixes em jejum em que a luz do tubo estava totalmente limpa. O conteúdo digestivo foi centrifugado a 4000 x g por 15 minutos e os sobrenadantes foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para posteriores ensaios enzimáticos. Os tecidos coletados foram igualmente congelados e armazenados a -80 °C para os ensaios enzimáticos.

### 3.1.2. Experimento II

Os objetivos deste experimento foram: determinar o nível de proteína bruta na dieta capaz de maximizar a síntese das enzimas digestivas na parede do trato digestório para comparar, nessa situação, as atividades enzimáticas da parede do trato com as atividades do quimo no intervalo de tempo pós-alimentação já previamente estabelecido no experimento I. Isso permitiria avaliar se o teor de enzimas liberadas no lúmen é proporcional aos teores de enzimas presentes na parede. Para isso, 120 exemplares de *P. mesopotamicus*, com peso inicial de  $97,9 \pm 5,7$  gramas, foram igualmente distribuídos em 15 caixas de 250 L. Os peixes foram alimentados até a saciedade por um período de 24 dias com dietas isoenergéticas (4000 Kcal/Kg) com quatro níveis de proteína bruta (PB): 20 %; 26 %; 32 % e 38 % (Tabela 1). Cada tratamento foi realizado em triplicata, além da triplicata mantida em jejum. Decorrido o período experimental de 24 dias, três peixes de cada caixa, totalizando nove por tratamento, foram amostrados aleatoriamente 6 horas após a última alimentação (tempo pré-estabelecido a partir do experimento I, onde os peixes ainda apresentavam conteúdo na luz do trato). Os peixes foram anestesiados em solução de eugenol 40 mg/L (INOUE et al., 2003) e posteriormente abatidos por secção medular. O trato digestório foi extraído sobre superfície gelada e dividido em estômago, cecos pilóricos, intestino anterior e intestino posterior. Assim como descrito no experimento I, cada porção teve seu conteúdo extraído com 2 mL de salina gelada, com exceção do jejum. Esse conteúdo passou pelos procedimentos descritos no experimento I, e o sobrenadante e tecidos foram congelados e armazenados a -80 °C para posteriores análises das atividades das enzimas digestivas.

Tabela 1. Formulação e composição das dietas experimentais

Proteína	Dietas experimentais			
	20 %	26 %	32 %	38 %
<b>Ingredientes</b>				
Milho	58	50,5	36,7	22,4
Q. arroz	5	5	5	5
F. soja	10	17,5	26	35
F. peixe (60,9%PB)	16,4	21,3	26,3	31,2
Óleo de soja	2,4	2,2	2	1,8
Mistura vitamínica e mineral*	1	1	1	1
Celulose microfina**	7,2	2,5	3	3,6
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>Composição Calculada</b>				
Matéria seca	89,08	88,96	89,25	89,65
Matéria mineral	4,74	6,10	7,44	8,81
Proteína bruta	20,20	26,16	32,05	38,15
Proteína digestível <sup>3</sup>	16,92	21,62	26,21	30,95
Fibra bruta	8,83	4,55	5,17	5,91
Extrato etéreo	6,38	6,56	6,54	6,51
Extrato não nitrogenado <sup>1</sup>	48,9	45,58	38,03	30,25
Amido <sup>2</sup>	40,08	36,56	29,35	21,92
Energia bruta (Kcal/Kg)	3832,28	4033,53	4008,65	4019,29
Energia digestível (Kcal/Kg) <sup>3</sup>	3210,71	3299,69	3252,89	3090,68

\*ROVIMIX PEIXE - Roches (Hojman La Roche, Switzerland) (ingredientes/kg suplementado): vitaminas: A 55.000.000IU, D35 200.000IU, E 55.000IU, K35 1.000,0mg, B1 (tiamina) 51.500,0mg, B2 (riboflavina) 51.500,0mg, B6 (piridoxina) 51.500,0mg, B12 254.000,0mcg, C5 15.000,0mg, ácido fólico 5.500,0mg, ácido pantotênico 54.000,0mg, BHT5 12.25 g, biotin 550.0mg, inositol 51.000,0mg, nicotinamida 57.000,0mg, colina 540.0mg, cobalto 510.0mg, cobre 5.500,0mg, ferro 55.000,0mg, iodo 550.0mg, manganês 51.500,0mg, selênio 510.0mg, zinco 55.000,0mg, veículo q.s.p 51.000,0g. \*\*RHOSTER Indústria e Comércio LTDA. (Vargem Grande Paulista, SP, Brasil).

<sup>1</sup> ENN = MS – (proteína bruta – lipídeo – fibra bruta – matéria mineral).

<sup>2</sup> Amido segundo Rostagno et al., 2000.

<sup>3</sup> Digestibilidade dos ingredientes para o pacu de acordo com Abmorad & Carneiro 2004.

## **3.2. Preparação dos extratos enzimáticos**

### **3.2.1. Quimo**

O conteúdo de cada porção do trato gastrintestinal foi tratado como descrito no item 3.1.1 para depois ser utilizado direto como fonte de enzima. A alíquota de extrato utilizada nos ensaios enzimáticos foi padronizada previamente.

### **3.2.2. Homogeneizados celulares**

Os tecidos utilizados como fonte de enzima foram previamente triturados em nitrogênio líquido e 50 mg foi homogeneizado em 1 mL de tampão de homogeneização composto por fosfato de sódio 10 mM e glicerina 50 % (v/v) pH 7,0. A homogeneização era realizada em um homogeneizador rotativo por 30 segundos em banho de gelo. Após este processo os extratos brutos eram centrifugados a 13000 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado como fonte enzimática.

## **3.3. Determinações enzimáticas**

### **3.3.1. Protease inespecífica**

A atividade proteolítica inespecífica foi ensaiada segundo o método da hidrólise enzimática da caseína adaptado de Walter (1984). Os valores adequados de pH ótimo para cada segmento do trato digestório foram previamente determinados. A mistura de reação era composta por: 500 µL de tampão Glicina/HCl 0,2 M pH 2,0 para estômago e Tris/HCl 0,2 M pH 8,0 para as outras porções do trato; 500 µL de caseína 1 % como substrato de reação e uma alíquota previamente padronizada de homogeneizado de tecido como fonte de enzima.

Após 45 minutos de incubação a 25 °C, a reação era interrompida com 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20 %. O precipitado protéico era removido por centrifugação a 14.400 x g por 3 minutos e o teor de tirosina (produto de reação) era determinado no sobrenadante através da leitura de absorbância a 280 nm. Os mesmos procedimentos, exceto o tempo de incubação que era de 60 minutos, foram realizados para os ensaios das atividades proteolíticas do conteúdo gastrointestinal (quimo) das diferentes porções do trato. Todas as determinações foram realizadas em duplicata e, paralelamente, dois brancos, um de enzima (em que a fonte de enzima foi substituída por tampão de homogeneização) e outro de substrato (em que o substrato foi substituído por tampão de homogeneização), passaram pelos mesmos procedimentos dos tubos de reação. Uma solução padrão de tirosina foi utilizada como referência. A atividade específica foi expressa em µmol de tirosina por minuto (U) por mg de proteína (U/mg proteína = UI) para os tecidos e em U/mL de quimo para o conteúdo gastrointestinal.

### **3.3.2. Tripsina**

A atividade da tripsina foi determinada cineticamente segundo Hummel (1959) adaptado. Como substrato de reação foi utilizado N α-p-tosil-L-arginina metil ester (TAME) em um meio de reação contendo: 1,04 mM de TAME; tampão Tris/HCl 0,2 M pH 8,1; CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 0,01 M e uma alíquota previamente padronizada de homogeneizado celular, como fonte enzimática, para um volume final de 2,0 mL. A reação era acompanhada em uma densidade óptica de 247 nm e registrada por 1 minuto a 25 °C. A atividade específica da tripsina nos tecidos foi expressa em µmol de arginina por minuto (U) por mg de proteína (U/mg proteína = UI). No conteúdo gastrointestinal (quimo) a atividade específica foi expressa como U/mL de quimo.

### **3.3.3. Quimiotripsina**

A atividade da quimiotripsina foi ensaiada segundo método proposto por Hummel (1959) modificado. Foi utilizado como substrato N-benzoil-L-tyrosine etil ester (BTEE) em

um meio de reação contendo: 1 mM de BTEE em metanol: água 2:3 (v:v); tampão Tris/HCl 0,1 M pH 7,8;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,1 M e uma alíquota previamente padronizada de homogeneizado celular como fonte de enzima, para um volume final de 2,0 mL. A reação era acompanhada em uma densidade óptica de 256 nm e registrada por 1 minuto a 25 °C. A atividade específica da quimiotripsina dos tecidos foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de tirosina formada por minuto (U) por mg de proteína ( $\text{U}/\text{mg}$  proteína = UI). No conteúdo gastrointestinal (quimo) a atividade específica foi expressa em U/mL de quimo.

#### 3.3.4. Amilase

A atividade amilohidrolítica foi ensaiada de acordo com a metodologia proposta por Bernfeld (1955) modificada. Como substrato de reação foi utilizado amido de milho altamente purificado e sem resíduos de hidrólise em um meio de reação contendo: 500  $\mu\text{L}$  de solução de amido 5 %; 500  $\mu\text{L}$  de tampão citrato/fosfato 0,2 M pH 7,0 e 125  $\mu\text{L}$  de solução de NaCl 0,5 % como co-fator enzimático e alíquota previamente padronizada de homogeneizado celular para um volume final de 1,375 mL. A reação era incubada a 25 °C por 30 minutos e interrompida com a adição de 125  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{ZnSO}_4$  5 % e 125  $\mu\text{L}$  de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  0,3 N. Posteriormente, a mistura era centrifugada a 3500 x g por 3 minutos e no sobrenadante era determinada a concentração de açúcares redutores a 690 nm pelo método colorimétrico de Park & Johnson (1949). Esse método consiste na incubação a 100 °C por 15 minutos de uma alíquota previamente padronizada da reação descrita acima em meio contendo 500  $\mu\text{L}$  de ferricianeto de potássio 0,05 % e 500  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 0,53 %. Após a incubação eram adicionados 2,5 mL de sulfato férrico de amônio 0,15 % em solução ácida com Dupanol sódico. O mesmo procedimento foi realizado para o conteúdo gastrointestinal (quimo). Uma solução padrão de glicose 1 mM foi utilizada como referência. A atividade específica dos tecidos foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores totais por minuto (U) por mg de proteína ( $\text{U}/\text{mg}$  proteína = UI). A atividade do conteúdo gastrointestinal (quimo) foi expressa em U/mL de quimo.

### 3.4. Proteína total

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). Depois de feitas as diluições apropriadas para cada tecido, 10 µl de cada amostra foram colocados em duplicata numa microplaca e 200 µl do reagente de Bradford foram adicionados aos poços. As concentrações de proteína foram estimadas contra uma solução padrão de albumina e a leitura das amostras era feita em leitor de micro-placas (Molecular Devices) a 620 nm.

### 3.5. Análise estatística

Depois de avaliada a parametricidade dos dados, os valores médios obtidos para as diferentes enzimas ensaiadas, nas diferentes condições experimentais, foram comparados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney observando-se um nível de significância de  $P < 0,05$ . Todos os valores estão apresentados como média  $\pm$  DP (desvio padrão).

## 4. Resultados

### 4.1. Experimento I

As atividades enzimáticas digestivas de *P. mesopotamicus* em jejum foram menores em relação aos peixes alimentados, na maioria dos casos (Tabela 2). As atividades amilohidrolítica e proteolíticas do trato gastrointestinal (Tabela 2) e do quimo (Tabela 3) de *P. mesopotamicus* foram maiores entre seis e 12 horas após a alimentação, apresentando redução significativa após 24 horas.

Tabela 2. Atividade das enzimas digestivas da parede do trato digestório de *P. mesopotamicus* após a alimentação

Enzima Seção	Período pós-alimentação (horas)					
	Jejum	0,5	2	6	12	24
<b>Protease inespecífica</b>						
Estômago	0,13±0,018 <sup>d</sup>	0,23±0,063 <sup>b</sup>	0,23±0,04 <sup>b</sup>	0,27±0,025 <sup>b</sup>	0,42±0,086 <sup>a</sup>	0,24±0,065 <sup>b</sup>
Cecos pilóricos	0,059±0,022 <sup>d</sup>	0,324±0,11 <sup>b</sup>	0,361±0,044 <sup>b</sup>	0,355±0,093 <sup>b</sup>	0,684±0,108 <sup>a</sup>	0,280±0,082 <sup>b</sup>
Intestino anterior	-	0,134±0,045 <sup>b</sup>	0,069±0,009 <sup>c</sup>	0,309±0,046 <sup>a</sup>	0,29±0,057 <sup>a</sup>	-
Intestino posterior	-	0,038±0,015 <sup>c</sup>	0,096±0,02 <sup>b</sup>	0,186±0,071 <sup>a</sup>	0,148±0,038 <sup>a</sup>	0,003±0,001 <sup>d</sup>
<b>Tripsina</b>						
Estômago	-	-	-	-	-	-
Cecos pilóricos	0,24±0,09 <sup>c</sup>	0,37±0,11 <sup>c</sup>	0,52±0,07 <sup>b</sup>	0,82±0,19 <sup>a</sup>	0,6±0,12 <sup>ab</sup>	0,34±0,05 <sup>c</sup>
Intestino anterior	-	-	-	0,227±0,066 <sup>a</sup>	0,194±0,033 <sup>a</sup>	-
Intestino posterior	0,15±0,035 <sup>b</sup>	0,1±0,01 <sup>c</sup>	0,16±0,05 <sup>b</sup>	0,29±0,09 <sup>a</sup>	0,22±0,06 <sup>ab</sup>	0,071±0,01 <sup>c</sup>
<b>Quimiotripsina</b>						
Estômago	-	-	-	-	-	-
Cecos pilóricos	0,747±0,072 <sup>ab</sup>	0,44±0,03 <sup>c</sup>	0,94±0,17 <sup>ad</sup>	0,87±0,09 <sup>a</sup>	0,62±0,05 <sup>b</sup>	0,73±0,1 <sup>bd</sup>
Intestino anterior	0,63±0,02 <sup>d</sup>	1,15±0,12 <sup>b</sup>	0,86±0,05 <sup>c</sup>	1,16±0,03 <sup>b</sup>	1,34±0,11 <sup>a</sup>	0,95±0,13 <sup>c</sup>
Intestino posterior	0,416±0,031 <sup>d</sup>	0,316±0,037 <sup>e</sup>	0,662±0,082 <sup>b</sup>	1,154±0,084 <sup>a</sup>	0,645±0,12 <sup>bc</sup>	0,515±0,088 <sup>c</sup>
<b>Amilase</b>						
Estômago	1,46±0,12 <sup>b</sup>	1,07±0,19 <sup>c</sup>	1,39±0,29 <sup>bc</sup>	1,72±0,51 <sup>a</sup>	1,6±0,62 <sup>b</sup>	1,71±0,43 <sup>a</sup>
Cecos pilóricos	11,22±2,36 <sup>b</sup>	11,21±2,19 <sup>b</sup>	11,4±1,94 <sup>b</sup>	6,66±1,54 <sup>c</sup>	15,18±2,73 <sup>a</sup>	11,9±2,5 <sup>ab</sup>
Intestino anterior	6,85±1,22 <sup>a</sup>	2,95±0,36 <sup>b</sup>	4,02±1,14 <sup>b</sup>	3,25±0,8 <sup>b</sup>	6,88±0,88 <sup>a</sup>	2,03±0,77 <sup>c</sup>
Intestino posterior	2,93±0,5 <sup>a</sup>	1,3±0,21 <sup>d</sup>	1,97±0,5 <sup>bc</sup>	1,96±0,5 <sup>bc</sup>	2,55±0,58 <sup>ac</sup>	1,96±0,44 <sup>b</sup>

As médias (±DP) das atividades enzimáticas para n=6 estão expressas em U/mg de proteína. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas (p<0,05).

Tabela 3. Atividade das enzimas digestivas do quimo de *P. mesopotamicus* após a alimentação

Enzima Seção	Período pós-alimentação (h)				
	0,5	2	6	12	24
<b>Protease inespecífica</b>					
Estômago	0,47±0,08 <sup>a</sup>	-	0,284±0,054 <sup>b</sup>	0,177±0,043 <sup>c</sup>	0,196±0,055 <sup>c</sup>
Cecos pilóricos	9,02±1,64 <sup>cd</sup>	11,54±1,61 <sup>bd</sup>	13,38±0,58 <sup>ab</sup>	13,99±0,23 <sup>a</sup>	7,57±1,75 <sup>c</sup>
Intestino anterior	11,48±1,6 <sup>b</sup>	13,82±0,8 <sup>a</sup>	14,19±0,3 <sup>a</sup>	13,67±0,66 <sup>a</sup>	1,47±0,82 <sup>c</sup>
Intestino posterior	1,6±0,3 <sup>ab</sup>	2,02±0,23 <sup>a</sup>	1,86±0,13 <sup>ab</sup>	1,54±0,26 <sup>b</sup>	0,37±0,07 <sup>c</sup>
<b>Tripsina</b>					
Estômago	5,26±0,33 <sup>a</sup>	2,44±0,38 <sup>b</sup>	6,13±0,82 <sup>a</sup>	0,73±0,13 <sup>c</sup>	0,61±0,14 <sup>c</sup>
Cecos pilóricos	20,27±2,98 <sup>d</sup>	44,96±0,75 <sup>b</sup>	53,31±5,33 <sup>a</sup>	33,63±5,96 <sup>c</sup>	10,20±1,38 <sup>c</sup>
Intestino anterior	30,83±3,57 <sup>d</sup>	161,02±14,71 <sup>b</sup>	230,3±35,4 <sup>a</sup>	89,36±13,09 <sup>c</sup>	0,097±0,034 <sup>e</sup>
Intestino posterior	3,04±0,4 <sup>b</sup>	27,89±0,9 <sup>a</sup>	26,04±3,14 <sup>a</sup>	27,04±6,55 <sup>a</sup>	-
<b>Quimiotripsina</b>					
Estômago	-	-	-	-	-
Cecos pilóricos	12,35±1,97 <sup>bc</sup>	13,82±2,44 <sup>bd</sup>	16,9±2,1 <sup>ad</sup>	19,19±2,36 <sup>a</sup>	10,24±1,35 <sup>c</sup>
Intestino anterior	15,01±2,71 <sup>c</sup>	38,44±3,87 <sup>b</sup>	49,89±1,61 <sup>a</sup>	36,42±1,8 <sup>b</sup>	4,3±1,06 <sup>d</sup>
Intestino posterior	-	-	-	-	-
<b>Amilase</b>					
Estômago	43,48±8,61 <sup>a</sup>	34,77±2,69 <sup>a</sup>	2,06±0,87 <sup>d</sup>	17,11±7,49 <sup>c</sup>	32,64±0,035 <sup>a</sup>
Cecos pilóricos	164,8±43,6 <sup>c</sup>	329,3±23,1 <sup>ab</sup>	308,73±9,14 <sup>b</sup>	376,6±37,5 <sup>a</sup>	202,8±23,5 <sup>c</sup>
Intestino anterior	132,27±24,1 <sup>c</sup>	227,1±45,6 <sup>b</sup>	341,6±27,3 <sup>a</sup>	318,9±36,9 <sup>a</sup>	79,33±22,29 <sup>d</sup>
Intestino posterior	-	152,4±75,1 <sup>a</sup>	142,49±16,94 <sup>a</sup>	77,41±0,6 <sup>b</sup>	29,49±6,23 <sup>c</sup>

As médias (±DP) das atividades enzimáticas para n=6 estão expressas em U/mL de quimo. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas (p<0,05).

A atividade proteolítica inespecífica foi observada em toda parede e quimo do trato digestório. Na parede do estômago, essa atividade foi menor de 0,5 até 6 horas após a alimentação apresentando um aumento significativo após as 12 horas, enquanto que no quimo, a maior atividade foi observada 0,5 horas após a alimentação seguida de uma diminuição nos horários subseqüentes. A não detecção de atividade enzimática 2 horas após a alimentação no quimo está, provavelmente, relacionada a erros na coleta. As maiores atividades proteolíticas inespecíficas no período pós-alimentação foram observadas nos cecos pilóricos (Tabelas 2 e 3). Nesta porção do trato digestório, observou-se uma correlação fortemente positiva ( $P= 0,72$ ) entre as atividades enzimáticas da parede e do quimo. As atividades enzimáticas das paredes dos cecos pilóricos, intestino anterior e posterior apresentaram um perfil muito semelhante (Figura 1a). As atividades enzimáticas do quimo destas porções apresentaram um perfil semelhante ao observado nas respectivas paredes (Figura 1b).

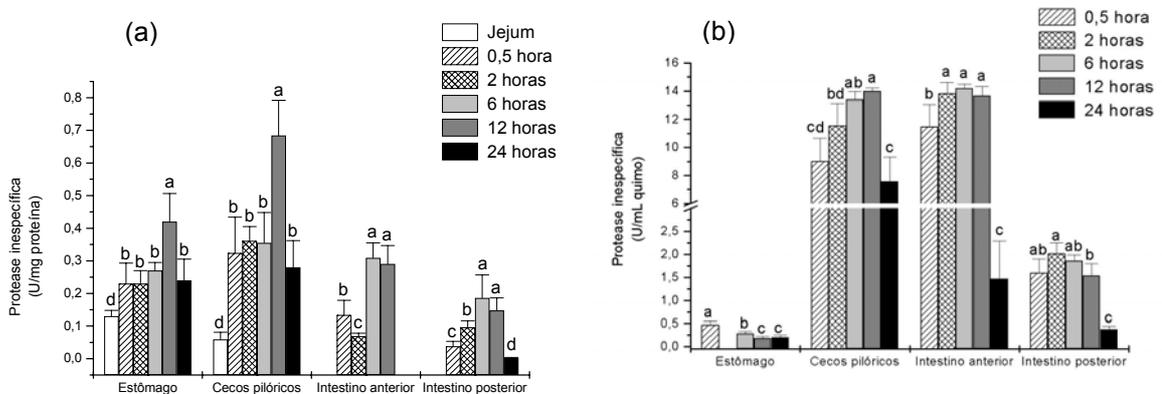


Figura 1. Perfil da atividade proteolítica inespecífica na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* após 15 dias de alimentação, determinada após a interrupção da dieta em diferentes intervalos de tempo.

Exceto a parede do estômago, a atividade triptica foi observada em todas as porções do trato digestório e no quimo (Tabelas 2 e 3). As atividades triptica dos cecos pilóricos e do intestino anterior apresentaram o mesmo perfil tanto na parede do trato digestório quanto no quimo, embora não tenha sido detectada atividade na parede do intestino anterior até 2 horas após a alimentação e 24 horas após (Figura 2). No intestino posterior a atividade triptica mostrou-se discretamente maior na parede do trato 6 horas após a alimentação, enquanto que no quimo a atividade manteve-se constante das 2 até as 12 horas após a alimentação. Os menores valores da atividade da tripsina foram observados nesta porção do trato digestório (Tabelas 2 e 3). Foi encontrada nos cecos pilóricos e intestino posterior uma alta correlação entre as atividades da parede e do quimo.

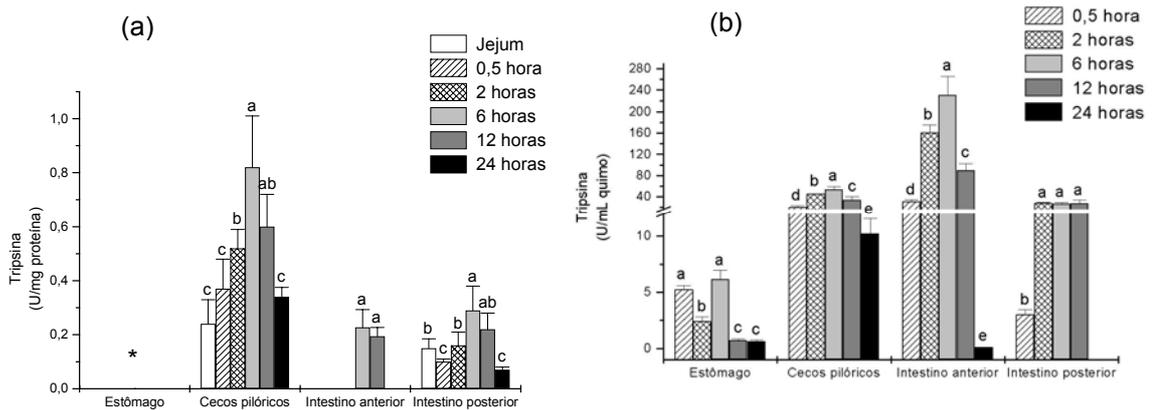


Figura 2. Perfil da atividade da tripsina na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* após 15 dias de alimentação, determinada após a interrupção da dieta em diferentes intervalos de tempo. (\*) Atividade não detectada.

A atividade da quimi tripsina não foi observada no estômago e no quimo do intestino posterior (Figura 3). As maiores atividades para esta enzima foram observadas na parede e no quimo do intestino anterior (Tabelas 2 e 3). Na parede dos cecos pilóricos, a atividade da quimi tripsina foi maior em 2 e 6 horas após a alimentação e no quimo entre 6 e 12 horas (Tabelas 2 e 3). Na parede do intestino anterior, a quimi tripsina apresentou maior atividade em 12 horas após a alimentação, e no quimo, 6 horas após a alimentação. No intestino posterior a maior atividade foi observada na parede 6 horas após a alimentação. A correlação entre as atividades da parede e do quimo foi baixa.

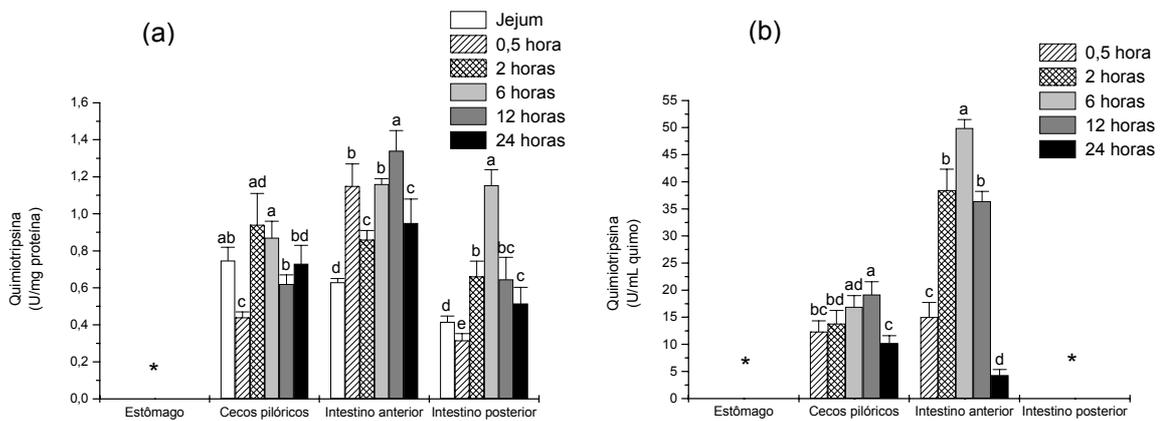


Figura 3. Perfil da atividade da quimi tripsina na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* após 15 dias de alimentação, determinada após a interrupção da dieta em diferentes intervalos de tempo. (\*) Atividade não detectada.

A atividade amilohidrolítica foi observada em todo trato digestório de *P. mesopotamicus*. As maiores atividades registraram-se nos cecos e intestino anterior, tanto na parede quanto no quimo (Tabelas 2 e 3). Na parede do estômago, a menor atividade foi observada 0,5 e 2 horas após a última alimentação, elevando seus valores a partir de 6 horas (Tabela 2). No quimo do estômago as maiores atividades foram observadas após 0,5 e 2 horas (Tabela 3). Nos cecos pilóricos, a parede apresentou maior atividade em 12 horas (Tabela 2). No quimo dos cecos pilóricos, a amilase manteve-se praticamente constante desde 2 até 12

horas após a alimentação (Tabela 3). No intestino anterior, a atividade amilohidrolítica decresceu até 6 horas apresentando aumento após 12 horas e retornando aos menores valores após 24 horas. No quimo desta porção do intestino, a atividade amilohidrolítica aumentou até 6-12 horas decrescendo aos menores valores em 24 horas após a última alimentação (Tabelas 2 e 3). O perfil de ambas as atividades (Figura 4) mostra uma correlação positiva de  $P = 0,7$ . Na parede do intestino posterior, a atividade da amilase manteve-se constante de 2 a 12 horas, decrescendo após 24 horas. No quimo a amilase foi constante entre 2 e 6 horas, decrescendo de 12 a 24 horas após a alimentação (Tabelas 2 e 3).

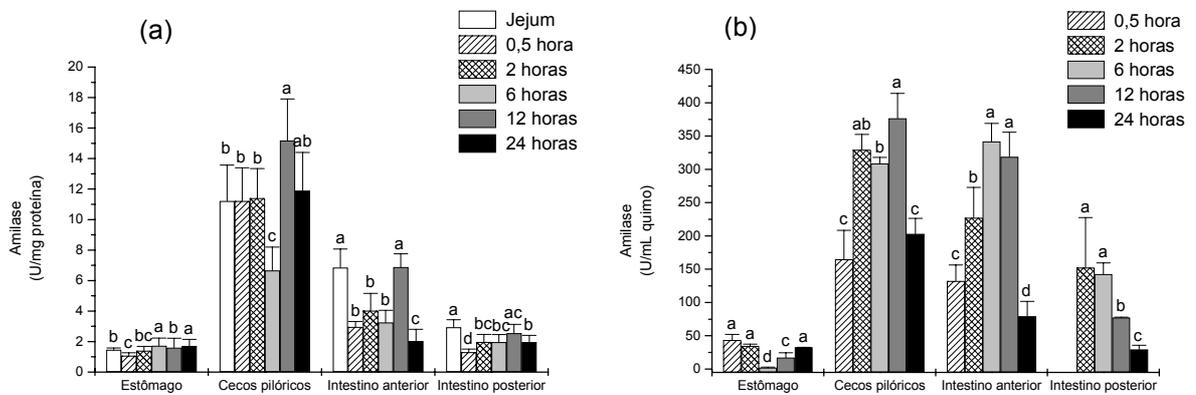


Figura 4. Perfil da atividade da amilase na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* após 15 dias de alimentação, determinada após a interrupção da dieta em diferentes intervalos de tempo.

## 4.2. Experimento II

As atividades das enzimas amilohidrolítica e proteolíticas na parede e no quimo do trato gastrintestinal de *P. mesopotamicus* estão apresentadas nas tabelas 4 e 5. Os valores das atividades enzimáticas para os peixes que permaneceram em jejum estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Atividade das enzimas digestivas da parede do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína

Enzima Seção	Proteína Bruta na dieta				
	Jejum	20 %	26 %	32 %	38 %
<b>Protease inespecífica</b>					
Estômago	-	0,151±0,076 <sup>b</sup>	0,187±0,044 <sup>b</sup>	0,406±0,099 <sup>a</sup>	0,469±0,056 <sup>a</sup>
Cecos pilóricos	0,14±0,032 <sup>c</sup>	0,13±0,058 <sup>c</sup>	0,31±0,058 <sup>b</sup>	0,44±0,044 <sup>a</sup>	0,4±0,054 <sup>a</sup>
Intestino anterior	-	0,12±0,036 <sup>c</sup>	0,16±0,053 <sup>c</sup>	0,4±0,068 <sup>b</sup>	0,5±0,11 <sup>a</sup>
Intestino posterior	-	0,096±0,022 <sup>c</sup>	0,15±0,029 <sup>b</sup>	0,21±0,052 <sup>a</sup>	0,098±0,026 <sup>c</sup>
<b>Tripsina</b>					
Estômago	-	-	-	-	-
Cecos pilóricos	0,34±0,052 <sup>c</sup>	0,32±0,086 <sup>c</sup>	0,36±0,069 <sup>bc</sup>	0,53±0,097 <sup>a</sup>	0,41±0,053 <sup>b</sup>
Intestino anterior	0,78±0,1 <sup>b</sup>	0,52±0,1 <sup>c</sup>	0,8±0,08 <sup>b</sup>	0,95±0,1 <sup>a</sup>	0,83±0,09 <sup>b</sup>
Intestino posterior	0,54±0,061 <sup>ad</sup>	0,41±0,035 <sup>b</sup>	0,61±0,055 <sup>a</sup>	0,46±0,084 <sup>bd</sup>	0,26±0,048 <sup>c</sup>
<b>Quimiotripsina</b>					
Estômago	-	-	-	-	-
Cecos pilóricos	0,96±0,09 <sup>a</sup>	0,71±0,09 <sup>b</sup>	0,53±0,07 <sup>d</sup>	0,62±0,06 <sup>c</sup>	0,4±0,06 <sup>e</sup>
Intestino anterior	1,2±0,14 <sup>bc</sup>	1,4±0,27 <sup>ab</sup>	1,44±0,3 <sup>a</sup>	1,42±0,15 <sup>a</sup>	1,14±0,11 <sup>c</sup>
Intestino posterior	1,16±0,13 <sup>ab</sup>	1,24±0,13 <sup>a</sup>	0,88±0,15 <sup>c</sup>	1,09±0,076 <sup>b</sup>	0,92±0,14 <sup>c</sup>
<b>Amilase</b>					
Estômago	0,49±0,09 <sup>d</sup>	5,03±2,42 <sup>a</sup>	3,82±0,96 <sup>a</sup>	2,53±0,69 <sup>b</sup>	1,72±0,29 <sup>c</sup>
Cecos pilóricos	4,62±1,06 <sup>c</sup>	17,85±2,73 <sup>a</sup>	17,94±1,41 <sup>a</sup>	17,31±2,73 <sup>ab</sup>	15,54±1,9 <sup>b</sup>
Intestino anterior	4,25±1,33 <sup>c</sup>	18,41±2,82 <sup>ab</sup>	17,53±1,9 <sup>b</sup>	16,97±0,9 <sup>ab</sup>	19,57±2,14 <sup>a</sup>
Intestino posterior	2,35±0,54 <sup>c</sup>	11,02±2,09 <sup>a</sup>	10,56±1,74 <sup>a</sup>	10,2±1,87 <sup>a</sup>	8,37±1,49 <sup>b</sup>

As médias (±DP) das atividades enzimáticas para n=9 estão expressas em U/mg de proteína. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas (p<0,05).

Tabela 5. Atividade das enzimas digestivas do quimo de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína

Enzima Seção	Proteína Bruta na dieta			
	20 %	26 %	32 %	38 %
<b>Protease inespecífica</b>				
Estômago	0,55±0,15 <sup>a</sup>	0,25±0,09 <sup>b</sup>	0,2±0,017 <sup>b</sup>	0,05±0,029 <sup>c</sup>
Cecos pilóricos	4,84±1,53 <sup>c</sup>	7,78±0,8 <sup>b</sup>	8,19±1,5 <sup>b</sup>	12,92±2,79 <sup>a</sup>
Intestino anterior	4,4±0,46 <sup>c</sup>	23,9±5,58 <sup>b</sup>	42,88±7,81 <sup>a</sup>	31,07±9,73 <sup>b</sup>
Intestino posterior	2,4±0,69 <sup>b</sup>	5,7±0,96 <sup>a</sup>	6,28±1,03 <sup>a</sup>	6,94±0,77 <sup>a</sup>
<b>Tripsina</b>				
Estômago	5,6±0,99 <sup>b</sup>	8,34±1,05 <sup>a</sup>	7,74±0,92 <sup>a</sup>	4,43±0,81 <sup>b</sup>
Cecos pilóricos	14,2±1,29 <sup>d</sup>	17,07±2,43 <sup>c</sup>	22,52±3,96 <sup>b</sup>	33,66±6,42 <sup>a</sup>
Intestino anterior	26,87±4,4 <sup>c</sup>	51,52±14,68 <sup>b</sup>	116,83±26,82 <sup>a</sup>	106,20±28,20 <sup>a</sup>
Intestino posterior	2,2±0,69 <sup>c</sup>	28,96±7,39 <sup>a</sup>	14,76±1,93 <sup>b</sup>	16,58±2,66 <sup>b</sup>
<b>Quimiotripsina</b>				
Estômago	-	-	-	-
Cecos pilóricos	8,89±1,67 <sup>b</sup>	9,77±2,07 <sup>b</sup>	14,0±2,98 <sup>a</sup>	14,95±2,00 <sup>a</sup>
Intestino anterior	23,5±4,95 <sup>c</sup>	24,28±6,11 <sup>c</sup>	47,72±6,53 <sup>a</sup>	37,27±3,86 <sup>b</sup>
Intestino posterior	2,28±0,75 <sup>c</sup>	13,03±2,13 <sup>a</sup>	8,81±1,28 <sup>b</sup>	9,42±2,17 <sup>b</sup>
<b>Amilase</b>				
Estômago	0,99±0,13 <sup>c</sup>	1,2±0,27 <sup>c</sup>	2,77±0,96 <sup>b</sup>	4,2±0,41 <sup>a</sup>
Cecos pilóricos	233,81±26,54 <sup>b</sup>	233,8±31,3 <sup>b</sup>	288,8±50,5 <sup>a</sup>	303,8±51,7 <sup>a</sup>
Intestino anterior	287,0±70,6 <sup>b</sup>	324,9±62,7 <sup>b</sup>	506,6±70,2 <sup>a</sup>	332,4±49,3 <sup>b</sup>
Intestino posterior	127,26±27,68 <sup>c</sup>	264,8±38,6 <sup>a</sup>	153,8±32,1 <sup>b</sup>	198,5±73,8 <sup>ab</sup>

As médias (±DP) das atividades enzimáticas para n=9 estão expressas em U/mL de quimo. Letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas (p<0,05).

As atividades de protease inespecífica foram mais altas nos níveis de 32 e 38 % de PB em todas as seções do trato digestório de *P. mesopotamicus*, com uma exceção no intestino posterior para 38 % de PB. Essas atividades foram significativamente menores em animais alimentados com 20 % de PB (Tabela 4). O perfil da atividade proteolítica inespecífica é mostrado na figura 5 e a correlação desta atividade no quimo com as atividades correspondentes das paredes do trato digestório apresentou-se positiva, exceção feita ao estômago.

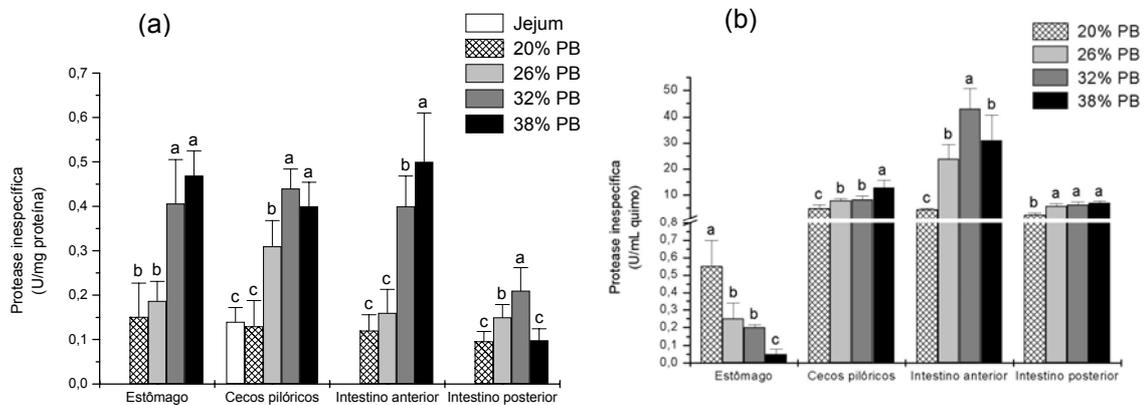


Figura 5. Perfil da atividade proteolítica inespecífica na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína bruta.

Não foi detectada atividade trípica na parede de estômago de *P. mesopotamicus*, entretanto o quimo desta porção apresentou esta atividade enzimática com valores máximos em 26 e 32 % de PB (Tabelas 4 e 5). Na parede dos cecos pilóricos, a maior atividade trípica foi observada em peixes alimentados com 32 % de PB. No quimo, essa atividade foi crescente até o nível 38 % PB. Na parede do intestino anterior a maior indução foi registrada em peixes alimentados com níveis de 32 % de PB e a menor em animais alimentados com 20 % de PB. No quimo, esta atividade foi crescente até 32 % de PB. Observou-se uma forte correlação positiva de 0,9, entre parede e quimo, nesta porção do trato. No intestino posterior a atividade da tripsina foi maior em peixes alimentados com 26 % de PB decrescendo aos menores valores em 38 % de PB. No quimo a maior atividade foi observada em animais alimentados com 26 % de PB e a menor atividade em 20 % de PB (Tabelas 4 e 5). A figura 6 mostra o perfil de atividade da tripsina nas diferentes seções do trato digestório.

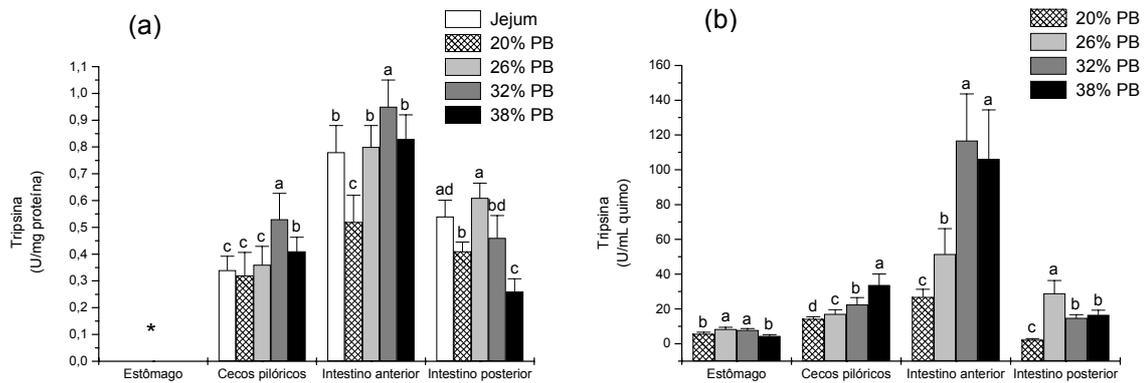


Figura 6. Perfil da atividade da tripsina na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína bruta. (\*) Atividade não detectada.

Assim como a tripsina, a quimiotripsina não foi observada na parede e, diferentemente da tripsina, essa enzima não foi observada no quimo do estômago de *P. mesopotamicus*. A atividade quimiotríptica da parede dos cecos pilórico foi maior nos peixes alimentados com 20 % de PB. Nestas condições, a atividade do quimo foi a menor (Figura 7). Na parede do intestino anterior a atividade de quimiotripsina foi constante em peixes alimentados com até 32 % de PB apresentando redução significativa em 38 %. No quimo a maior atividade de quimiotripsina foi observada em peixes alimentados com 32 % de PB. Na parede do intestino posterior a maior atividade de quimiotripsina foi observada em peixes alimentados com 20% de PB e as menores atividades foram observadas em 26 % e 38 %. No quimo do intestino posterior de *P. mesopotamicus* as maiores atividades da quimiotripsina foram observadas em peixes alimentados com 26 % de PB e as menores com 20 % (Tabelas 4 e 5). Todas as porções do trato apresentaram correlação negativa, entre parede e quimo, em relação a essa enzima.

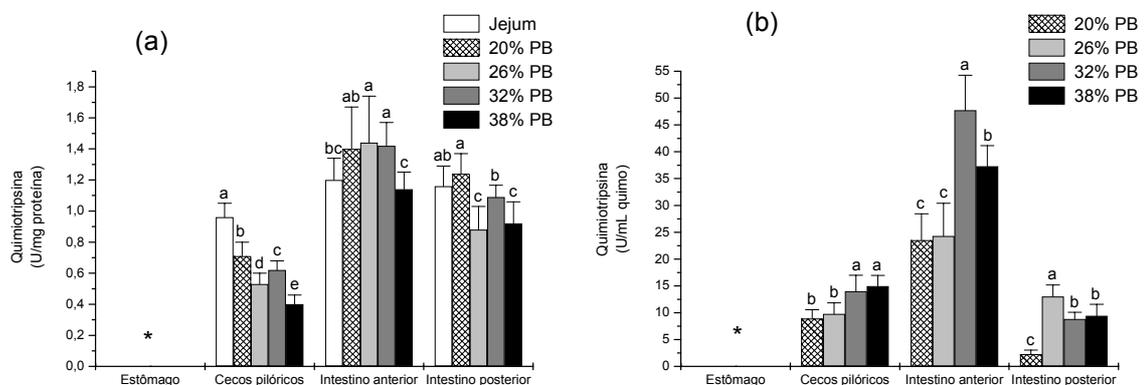


Figura 7. Perfil da atividade da quimiotripsina na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína bruta. (\*) Atividade não detectada.

No estômago de *P. mesopotamicus*, foram observadas as maiores atividades amilohidrolíticas nos animais alimentados com 20 % e 26 % de PB. No quimo desta porção do trato digestório, a maior atividade amilohidrolítica foi observada em 38 % PB. Os cecos pilóricos e o intestino anterior foram as porções do trato digestório mais relevantes na produção de amilase, sendo essa atividade constante desde os níveis de 20 % até 32 % PB. No

quimo dos cecos pilóricos a maior atividade da amilase foi detectada nos peixes alimentados com 32 % e 38 % de PB. A amilase da parede do intestino anterior não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos. No quimo desta porção, a maior atividade foi observada nos animais alimentados com níveis de 32 % de PB sem diferença significativa entre os outros níveis. A atividade da amilase da parede do intestino posterior não foi significativamente diferente entre os peixes alimentados com níveis de 20 %, 26 % e 32 % de PB, apresentando redução significativa apenas nos animais alimentados com 38 % de PB. No quimo desta seção, a maior atividade registrou-se no nível de 26 %. A figura 8 apresenta o perfil amilohidrolítico em cada seção do trato digestório. Todas as porções do trato apresentaram correlação negativa entre parede e quimo em relação à atividade da amilase. Porém, a intersecção das atividades da amilase da parede e do quimo de todas as porções do trato digestório de *P. mesopotamicus* apontam para um ótimo de aproximadamente 32 % de proteína bruta (Figura 9).

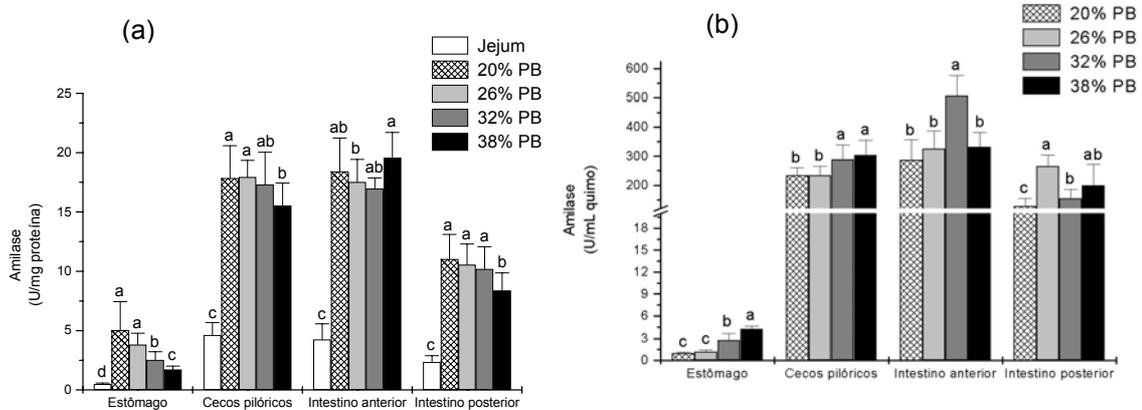


Figura 8. Perfil da atividade da amilase na parede (a) e no quimo (b) do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína bruta.

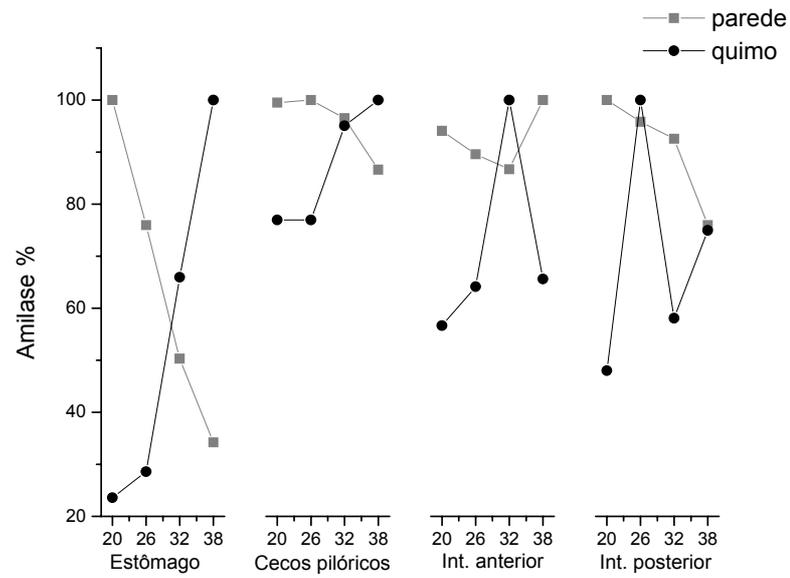


Figura 9. Intersecção das atividades da amilase da parede e do quimo do trato digestório de *P. mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína bruta.

## 5. Discussão

### 5.1. Experimento I

Vários estudos sobre o processo digestivo em peixes comparam a atividade das enzimas digestivas nas diferentes espécies (FISH, 1960; MUNILLA-MORÁN & SABORIDO-REY, 1996ab; FURNÉ et al., 2005; FURNÉ et al., 2008), com o hábito alimentar (JÓNÁS et al., 1983; SABAPATHY & TEO, 1993; CHAKRABARTI et al., 1995; HIDALGO et al., 1999; CHAN et al., 2004), a idade (KUZ'MINA, 1996; CHIU & PAN, 2002) e o estágio de desenvolvimento (ZAMBONINO-INFANTE & CAHU, 1994; CAHU et al., 2004; LO & WENG, 2006). Outros estudos estão voltados para a caracterização das enzimas digestivas em peixes (DÍAZ-LÓPEZ et al., 1998; CHONG et al., 2002; WANG et al., 2006; KUMAR et al., 2007; LIU et al., 2008). Porém em relação à atividade enzimática do conteúdo gastrintestinal, os dados são escassos em peixes. Em *P. mesopotamicus* pudemos observar que desde o período pós-prandial até 24 horas após alimentação existe atividade enzimática digestiva expressa tanto na parede do trato digestório quanto na luz, ou seja, nas secreções digestivas. Resultados semelhantes foram descritos para a parede e luz do trato digestório de *Salmo salar* (EINARSSON et al., 1996). *O. mykiss* apresenta atividade digestiva no conteúdo intestinal até 72 horas após a última alimentação (FAL'GE & SHPANNKHOF, 1976). Todavia esta atividade e secreção em *P. mesopotamicus* se dão de maneira diferenciada, quer para os diferentes tipos de enzimas, quer nas diferentes porções do trato.

No estômago de *P. mesopotamicus*, assim como observado em *Tilapia mossambica* (FISH, 1960), *S. aurata* (DEGUARA et al., 2003), *Symphysodon aequifasciata* (CHONG et al., 2002), *P. corruscans* (LUNDSTEDT et al., 2004) e *C. macropomum* (ALMEIDA et al., 2006; CORRÊA et al., 2007), as atividades proteolíticas estão basicamente restritas à protease ácida. Apesar da não especificidade do método de reação, esta atividade enzimática, quer devido ao local de origem quer ao pH de ação, deve-se em sua maior parte, provavelmente, à pepsina. Chong et al. (2002) também atribuem a atividade proteolítica ácida inespecífica em *S. aequifasciata* à pepsina.

No primeiro ensaio, visamos obter a dinâmica de secreção enzimática para a luz do órgão durante o período digestivo. Observou-se no estômago que, ao longo de 24 horas, ocorreu uma redução da atividade na luz enquanto que na parede pareceu ocorrer síntese da

enzima até 12 horas após a última alimentação. A partir desse ponto observou-se uma redução da ordem de 50 % no conteúdo enzimático da parede. Essa redução pode ser devido a uma diminuição da síntese enzimática devido à saída do alimento do estômago e/ou secreção mínima e constante da enzima para a luz. Essa redução provavelmente se acentuaria ao longo do tempo, a julgar pelos valores médios observados na condição de jejum.

A pergunta inicial pode ser parcialmente respondida frente a esse perfil de atividades. A presença de alimento protéico na luz do estômago não esgota seu conteúdo enzimático, mas, mais que isso, estimula a produção de protease ácida. Essa produção, entretanto, não deve ser devido à necessidade de maior conteúdo enzimático para os processos digestivos, visto que a atividade na luz diminui na medida em que o conteúdo de enzimas da parede aumenta. A partir de 12 horas após a alimentação o teor de protease da luz do estômago permanece pequeno e constante até as 24 horas. Este dado poderia explicar a redução no conteúdo de enzima observado na parede e sugere ainda uma secreção mínima e constante de enzimas para a luz. Uma hora após a alimentação a atividade péptica no conteúdo estomacal de *S. salar* também aumenta seguido de redução ao longo de 25 horas e o mesmo efeito é observado na parede do estômago (EINARSSON et al., 1996). Esses autores salientam que a ingestão do alimento estimula a síntese e secreção do pepsinogênio até uma hora após a alimentação o que causa aumento da atividade na parede e na luz do estômago. Na luz do estômago de *C. gariepinus*, observa-se secreção de pepsina até 2,5 horas após a alimentação, e após 4 horas a atividade decresce gradualmente aos níveis pré-alimentares até 10 horas (UYS et al., 1987). Para estes autores isto indica que pouca ou nenhuma enzima está sendo secretada no estômago e que as enzimas são parcialmente inativadas, possivelmente por desnaturação ou devido à ligação irreversível com o substrato.

O perfil do conteúdo de enzimas de atividade alcalina na parede dos cecos pilóricos de *P. mesopotamicus* é similar ao observado para as proteases ácidas do estômago. Fato também observado em *C. gariepinus* (UYS et al., 1987). Além disso, altas atividades foram observadas na parede dessa porção do trato. Essa alta atividade observada nos cecos pilóricos pode estar relacionada à presença do pâncreas difuso presente nesta região do intestino, sendo, portanto, muito importante no processo digestivo (CHESLEY, 1934). Essa atividade proteolítica observada em *P. mesopotamicus* deve-se, provavelmente, a um conjunto de enzimas cujos principais componentes devem ser tripsina e quimiotripsina. Essas enzimas foram observadas nos cecos pilóricos de outras espécies tais como *Siganus canaliculatus* e *L. calcarifer* (SABAPATHY & TEO, 1993), *B. amazonicus* (CAMILO, 2007) e *C. macropomum* (CORRÊA et al., 2007).

O intervalo de 12 horas pós-alimentação parece crítico para esse conjunto de enzimas. A partir desse ponto, a atividade enzimática da parede é reduzida em mais de 50 %, permanecendo, entretanto, em valores 80 % acima dos valores atingidos pelo estado de jejum (15 dias). Essa redução faz supor que ao longo dos períodos de jejum haja uma diminuição dos teores desse conjunto de enzimas, provavelmente por secreção constante, tal como suposto para as enzimas ácidas do estômago. Para *B. amazonicus* foi sugerido que a presença do alimento no intestino é importante para a secreção das enzimas, já que há uma redução da atividade enzimática digestiva nos peixes em jejum, quando comparada com a atividade de peixes alimentados (CAMILO, 2007). Einarsson et al. (1996) também observaram redução da atividade enzimática digestiva em *S. salar* em jejum.

A porção anterior e a posterior do intestino apresentaram atividades proteolíticas alcalinas menores que as observadas na porção pilórica do trato digestório. O jejum causou diminuição de, praticamente, toda a atividade das proteases alcalinas e este período já foi marcante 24 horas após a última alimentação. Tengjaroenkul et al. (2000) afirmam que as baixas atividades enzimáticas observadas no intestino posterior estão relacionadas à reabsorção nesta porção do trato, sugerindo aí um papel secundário na produção de enzimas.

Tal como relatado para *B. amazonicus* (VIEIRA, 2002), *B. orbignyanus* (VIEIRA, 2002) e *C. macropomum* (CORRÊA et al., 2007), não foi observada atividade trípica na parede do estômago de *P. mesopotamicus*. Porém em algumas espécies de peixes tem sido relatada a presença de tripsina e quimiotripsina na parede do estômago (CHAKRABARTI et al., 1995; LUNDSTEDT et al., 2004; MELO, 2004). Apesar de não ser observada atividade trípica na parede do estômago, a luz desta porção apresentou considerável atividade quando comparada às observadas na luz dos cecos pilóricos e intestino. Essas observações poderiam ser explicadas por um refluxo do conteúdo pilórico para a luz do estômago. Entretanto o significado efetivo desta atividade trípica dependeria dos valores de pH que possam ser registrados nesta porção, visto que a tripsina não apresentaria atividade em pHs ácidos, tal como esperado no estômago. Em *A. japonica*, por exemplo, não é observada atividade de tripsina e quimiotripsina em pH abaixo de 2 (CHIU & PAN, 2002).

O aumento da atividade trípica até 6 horas após a última alimentação, decaindo em 24 horas a valores próximos dos observados em jejum, na parede dos cecos pilóricos, é acompanhado pelo perfil observado na luz dos cecos. Este quadro corrobora a hipótese levantada anteriormente na análise do perfil de protease inespecífica alcalina, ou seja, a secreção enzimática para a luz deve ser constante ao longo do tempo. Entretanto o perfil trípico revela uma necessidade mais rigorosa de intermitência na alimentação. Enquanto a

avaliação do perfil proteolítico alcalino inespecífico sugere um período de realimentação de 12 horas, o perfil tríptico sugere um intervalo de 6 horas. Porém Murashita et al. (2005) observaram em *Seriola quinqueradiata* que o tempo de restauração da atividade tríptica para cecos pilóricos nesta espécie é de 48 horas, e ainda salientaram que a síntese da tripsina é acionada pela ingestão do alimento e secreção desta enzima. Em *A. japonica*, as atividades de tripsina e quimiotripsina atingiram um máximo 11 horas após a alimentação, tanto na parede quanto no conteúdo intestinal (CHIU & PAN, 2002). Entretanto *S. aurata* exibiu nível máximo de atividade proteolítica no conteúdo intestinal 5 horas após a alimentação (FOUNTOULAKI et al., 2005). Os resultados obtidos com a parede do intestino anterior em *P. mesopotamicus* não permitem conclusões, entretanto, a luz desta porção do trato apresentou altas atividades quando comparada às outras porções do trato. Seu perfil permite as mesmas conclusões anteriores sobre o intervalo de alimentação, ou seja, 6 horas. Os resultados obtidos no intestino posterior são pouco conclusivos a não ser que, em face da relevante atividade da luz dessa estrutura, sua participação na digestão de proteínas não pode ser desconsiderada.

A atividade quimiotríptica em *P. mesopotamicus*, assim como em *B. amazonicus* (VIEIRA, 2002), *B. orbignyianus* (VIEIRA, 2002) e *C. macropomum* (CORRÊA et al., 2007), não foi observada no estômago. Curiosamente essa atividade enzimática não foi detectada nem mesmo na luz desta porção, tal como verificado com a tripsina. Considerando-se que o refluxo deva ter sido o responsável pela presença da atividade tríptica observada no quimo do estômago, à primeira vista, a não detecção de quimiotripsina na luz deste órgão poderia ser devido à menor resistência da estrutura enzimática a condições adversas do estômago (pH), levando a uma rápida desnaturação da enzima.

A parede do trato digestório, exceto o estômago, sintetiza quimiotripsina igualmente em toda sua extensão, fato também observado em *C. macropomum* (CORRÊA et al. 2007) e *L. calcarifer* (SABAPATHY & TEO, 1993), o que nos faz pensar na importância desta enzima no processo digestivo de proteínas em *P. mesopotamicus*. Observou-se uma tendência crescente de síntese de quimiotripsina na parede até as primeiras duas horas pós-alimentação nas porções iniciais do intestino (cecos pilóricos). Entretanto nas porções anterior e posterior do intestino esse intervalo é mais prolongado; cerca de 6 a 12 horas. A correspondência observada entre os perfis da parede e os respectivos perfis da luz da porção, sugere, tal como discutido anteriormente, uma secreção enzimática constante. A não detecção da atividade quimiotríptica na luz da porção posterior do intestino pode ser devido a condições adversas do meio, como por exemplo, pH ou outros fatores advindos de ação da flora bacteriana normal, levando a uma desnaturação parcial e conseqüente perda da atividade enzimática ou a

processos de reabsorção enzimática como já sugerido por outros autores (HOFER & SCHIEMER, 1981; TENGJAROENKUL et al., 2000).

A julgar pelo momento de redução da síntese de quimiotripsina na parede dos cecos pilóricos, poderíamos sugerir que 6 horas seria o período máximo pós-alimentação a partir do qual os peixes deveriam ser realimentados. Entretanto é interessante observar que a redução da atividade quimiotríptica nos cecos pilóricos ocorre antes das porções posteriores do trato digestório. Esse fato nos faz pensar que a indução de síntese na parede do trato digestório seja devido à presença de fatores indutores, presentes no bolo alimentar, os quais se esgotariam mais rapidamente nas porções proximais do trato, permanecendo por períodos maiores nas porções terminais. Einarsson et al. (1996) observaram que o jejum ocasiona uma redução gradual da atividade de tripsina e quimiotripsina na luz intestinal de *S. salar*, argumentando que a secreção é altamente reduzida com a saída do alimento.

A atividade amilohidrolítica em *P. mesopotamicus* foi observada em todo o trato digestório, registrando-se as máximas atividades nos cecos pilóricos e as menores, no estômago, confirmando os dados encontrados por Moraes & Bidinotto (2000) para esta mesma espécie e corroborando os dados obtidos por Almeida et al. (2006) e Corrêa et al. (2007) para *C. macropomum*. Segundo Camilo (2007), a presença da amilase no intestino de *B. amazonicus* é um indicador positivo da habilidade do peixe na utilização de carboidratos. Entretanto deve ser considerado que as determinações das atividades desta enzima em *P. mesopotamicus* deram-se em um meio de reação em pH neutro. Assim, a atividade da amilase observada na parede do estômago deveria ser otimizada para verificação da possível presença de uma isozima com características e papel diferenciado nesta porção do trato digestório. Fish (1960) sugeriu que a presença da amilase no estômago de *T. mossambica* é resultante da adsorção da enzima intestinal na mucosa gástrica.

Com exceção dos dados obtidos na luz do estômago 6 horas após a alimentação, cujos valores não permitem qualquer conclusão, e dos valores pós-jejum que não puderam ser determinados em face da ausência de material na luz, poder-se-ia admitir que a síntese e a secreção de amilase no estômago parecem ser contínuas ao longo de 24 horas de período pós-prandial. É interessante observar que, diferentemente das atividades proteolíticas, a atividade da amilase na parede de todo o trato digestório não foi afetada por um jejum de 15 dias. *C. gariepinus* em jejum apresentou altas atividades de amilase no intestino, mostrando que altos níveis de atividade dessa enzima são mantidos apesar da ausência do alimento no intestino (UYS et al., 1987). Também diferentemente das atividades proteolíticas, a amilase da parede das porções do trato não apresentou o mesmo perfil observado na luz do trato. Isto sugere que

os processos de síntese e secreção de amilase não estão diretamente inter-relacionados. De fato, o perfil da parede do trato digestório não parece apresentar um padrão definido, sugerindo muito mais uma invariabilidade nos teores enzimáticos do que uma resposta a qualquer sinalização. Falam a favor disso os altos valores de amilase encontrados após jejum de 15 dias. Entretanto a luz dos cecos pilóricos e do intestino anterior mostraram um perfil de amilase aparentemente responsivo a alguma sinalização. O perfil da luz dos cecos pilóricos pareceu responder antes do intestino anterior, após meia hora, atingindo o máximo valor após 2 horas e permanecendo com valores altos até 12 horas. O intestino anterior iniciou sua resposta após 2 horas, atingindo o máximo após 6 horas e permanecendo assim até 12 horas. *S. aurata* atinge um nível máximo de atividade de amilase no conteúdo intestinal 5 horas depois da alimentação (FOUNTOULAKI et al., 2005). Considerando-se o caminho do bolo alimentar, é provável que seus produtos de digestão, particularmente de carboidratos, sejam os responsáveis pela sinalização de secreção da amilase em *P. mesopotamicus*.

## 5.2. Experimento II

Os estudos relacionados ao requerimento protéico de peixes são de grande importância para a aquicultura (DEBNATH et al., 2007), principalmente aqueles voltados às enzimas digestivas, os quais informam a capacidade de determinadas espécies de peixes em digerir e utilizar os componentes da dieta (HIDALGO et al., 1999). A partir do experimento I, estabelecemos que o melhor momento para se comparar as atividades da luz e da parede do trato digestório foi 6 horas após a última alimentação, pois a partir deste intervalo nem todas as porções do trato apresentavam conteúdo.

Apesar de iniciar a digestão química dos alimentos, a luz do estômago de *P. mesopotamicus* não apresentou atividades proteolíticas proporcionais aos teores de proteína da dieta, e um jejum de 24 dias esgotou a atividade proteolítica inespecífica nesta porção. Como foi observado, teores crescentes de proteína diminuíram a atividade proteolítica da luz do estômago. Paralelamente, aumentaram o conteúdo de protease da parede. O conteúdo crescente de protease da parede do estômago em paralelo ao teor de proteína da ração já havia sido previamente descrito para esta espécie (MORAES & BIDINOTTO, 2004). Esses dados permitem afirmar que, apesar de os teores crescentes de proteína da dieta provocarem um aumento do teor de protease na parede, a sua digestão no estômago pode estar limitada pela

redução sensível de sua secreção. O conjunto de dados atuais mostra a impossibilidade de se estimar um teor ótimo de proteínas da dieta a partir do perfil digestivo do estômago de *P. mesopotamicus*, visto que os perfis enzimáticos da luz e da parede são inversamente proporcionais. Entretanto os conteúdos de enzima na luz e na parede se igualam para um teor de proteína próximo a 28 % com cerca de 40 % de carboidratos.

A responsividade proteolítica da parede do estômago, em função da variação da proteína bruta da dieta, foi também observada em *C. macropomum* (ALMEIDA et al., 2006). Esses autores ainda supõem que o estômago deste peixe é essencialmente proteolítico devido a altas atividades enzimáticas desta porção quando comparada ao resto do trato. A atividade proteolítica ácida inespecífica da parede estomacal aumenta de forma linear em *R. quelen*, quando alimentados com níveis crescentes de proteína (MELO, 2004). Este autor salienta que esta resposta mostra um caráter indutivo desta enzima e, portanto, a possibilidade de ajuste de nutrientes para otimização das dietas. *P. corruscans*, alimentados com diferentes níveis de proteína bruta na dieta, não apresentam indução proteolítica no estômago, porém, observa-se uma alta atividade nesta porção (LUNDSTEDT et al., 2004).

O perfil proteolítico inespecífico alcalino da parede das porções intestinais de *P. mesopotamicus* é muito parecido com aquele observado no estômago. Apenas os cecos pilóricos dos peixes em jejum apresentaram atividade com valor de atividade próximo aos peixes alimentados com 20 % de proteína, sugerindo que esta porcentagem não é suficiente para uma alta indução. Notou-se que o aumento de proteína da dieta induziu o aumento do conteúdo de enzima da parede desta porção, fato já descrito anteriormente para esta espécie (MORAES & BIDINOTTO 2004). Porém diferentemente do estômago, a secreção de protease alcalina é proporcional à síntese enzimática. Hofer (1979), estudando protease em *Rutilus rutilus* e *Scardinius erythrophthalmus*, também encontrou relação entre o conteúdo protéico da dieta e a atividade de protease alcalina. Debnath et al. (2007), trabalhando com níveis crescentes de proteína bruta na dieta de *L. rohita* observaram responsividade das enzimas digestivas às mudanças da composição da dieta. Os níveis acima de 25 % de proteína induziram a produção de proteases. A atividade proteolítica total em *C. batrachus* aumenta com o aumento de proteína da dieta (MUKHOPADHYAY et al., 1978). Apesar das crescentes atividades enzimáticas na luz do trato de *P. mesopotamicus*, o aumento também observado nas atividades das paredes é um claro indício de que altos teores de proteína na dieta de *P. mesopotamicus* não foram capazes de causar um esgotamento do conteúdo enzimático da parede, sugerindo a capacidade de adaptação dessa espécie à dieta oferecida. A porção posterior do intestino de *P. mesopotamicus* apresentou atividade proteolítica alcalina,

porém, sua atividade é de duas a sete vezes menor quando comparada à atividade do intestino anterior. De acordo com Jun-sheng et al. (2006) o declínio da atividade proteolítica do intestino anterior ao posterior ocorre em função do deslocamento do conteúdo intestinal ao longo do intestino do híbrido *O. niloticus* x *O. aureus*. Segundo Hofer & Schiemer (1981), a atividade proteolítica no conteúdo intestinal geralmente diminui do intestino anterior para o posterior, considerando este fato um processo de reabsorção ativo das enzimas proteolíticas pela mucosa intestinal. Levando-se em consideração o traço adaptativo do *P. mesopotamicus*, e em resposta à pergunta do experimento II, podemos afirmar que essa espécie ajusta seu perfil digestivo proteolítico do intestino à fração protéica da dieta para uma melhor utilização deste macro-nutriente, dentro de um intervalo de 20 a 38 %.

Os padrões de tripsina seguem, com forte correlação positiva, os padrões de protease inespecífica alcalina dos cecos e do intestino anterior, o que sugere que os padrões observados para essa atividade proteolítica sejam em grande parte representados por aquela protease. Assim, as implicações e conclusões tiradas dos resultados observados com a atividade proteolítica inespecífica devem ser exatamente os mesmos, podendo-se agora atribuí-los a uma enzima específica, a tripsina. Em *B. amazonicus* foi observada semelhança entre o perfil da atividade da tripsina e da protease inespecífica nos cecos pilóricos, sendo sugerido pelo autor que esta enzima apresenta um papel chave na digestão da proteína nesta porção do trato (CAMILO, 2007). A indução da atividade da tripsina foi observada ao longo do trato intestinal de *R. quelen* (MELO, 2004). O aumento de proteína na dieta até 50 % induz a atividade trípica no intestino de *C. batrachus* (MUKHOPADHYAY et al., 1978), e os autores salientam que a variabilidade nas atividades proteolíticas pode indicar o requerimento protéico para a espécie.

A atividade trípica do estômago, neste segundo ensaio, confirma os dados do primeiro ensaio; a ausência da atividade na parede e presença na luz. Porém a atividade observada na luz do estômago não apresenta o mesmo perfil dos cecos. Uma vez admitida que a atividade trípica observada na luz do estômago seja devido a refluxo, essa atividade estaria mais diretamente ligada a um ritmo de movimentação do bolo alimentar do que aos teores enzimáticos da luz.

O intestino posterior apresentou um perfil de indução trípica na parede que é acompanhado pela luz. As atividades semelhantes de tripsina do intestino posterior e dos cecos pilóricos mostraram a relevância desta porção do trato intestinal no processo digestivo. Todavia o perfil desta porção exacerbou a tendência que se observa nas outras porções; um pico de máxima atividade com redução nos teores maiores de proteína dietética. Este padrão é

acompanhado pelas atividades da luz. Com os perfis observados para tripsina, pode-se precisar os teores de proteína dietética para um máximo de 32 %. A partir desses valores, observa-se uma tendência de redução dos conteúdos de tripsina da parede acompanhada pelos teores de enzima na luz, o que sugere o início de um declínio no aproveitamento das proteínas dietéticas. Fernandes et al. (2001), concluíram que um nível de 22 % de proteína bruta atende as exigências e proporciona bom desempenho para juvenis de *P. mesopotamicus* com peso inicial similar a este experimento, porém, somente parâmetros zootécnicos foram avaliados.

Os perfis enzimáticos da quimiotripsina não apresentaram qualquer correlação com as atividades de protease inespecífica alcalina. Curiosamente, a somatória das atividades relativas de quimiotripsina e tripsina não refletem a atividade relativa de protease inespecífica total, o que faz pensar em outras possibilidades para entender esse perfil enzimático. Por exemplo, poderíamos supor que, além das atividades de quimiotripsina e tripsina, outras enzimas de atividade alcalina estariam envolvidas no conjunto de proteases alcalinas inespecíficas. Outra possibilidade seria a de que o ensaio das diferentes enzimas em uma única condição de reação, a de protease inespecífica, não permita a realização dessa somatória de atividades que estariam sendo de fato realizadas em condições sub-ótimas para cada uma delas.

Seis horas após a alimentação, os teores de quimiotripsina da parede do trato digestório de *P. mesopotamicus* mostraram uma tendência geral de redução. Diferentemente do que se pode concluir para as atividades de tripsina ou de proteases inespecíficas, onde o aumento de proteína dietética resulta em aumento daquelas atividades na parede, esses dados não permitem admitir que a quimiotripsina seja responsiva ao aumento dos teores de proteína. Lundstedt et al. (2004) estudando *P. corruscans* encontraram resultado semelhante e argumentaram que essa resposta não permite assumir que esta enzima seja responsiva, sugerindo que seja constitutiva. Entretanto teores crescentes de proteína na dieta de *P. mesopotamicus* demandam um aumento da secreção de quimiotripsina para a luz. Esta demanda é, certamente, a responsável pela tendência de redução desta enzima, observada nas paredes do trato digestório. Este perfil enzimático sugere que as taxas de síntese de quimiotripsina em *P. mesopotamicus* não acompanham as taxas de secreção demandadas pelos níveis de proteína da dieta. Além disso, ao longo de toda essa faixa experimentada de teor protéico dietético, observa-se uma tendência de estabilização das atividades de quimiotripsina ao redor de 32 % de proteína na dieta. Este dado sugere que até seis horas de atividade pós-prandial esses teores de proteína, apesar de reduzirem o conteúdo enzimático da parede, não prejudicam a digestão das proteínas.

As atividades de amilase observadas nesse experimento corroboram aquelas do experimento anterior, ou seja, as menores atividades amilohidrolíticas foram observadas no estômago. A amilase da parede do estômago de *P. mesopotamicus* decresceu proporcionalmente à diminuição do teor de carboidratos da dieta. Em contrapartida, as menores atividades da amilase detectadas na luz desta porção do trato digestório foram observadas nos peixes que receberam a dieta contendo os maiores teores de carboidratos. Desta forma, quanto à pergunta inicial do experimento II, pode-se inferir que teores crescentes de carboidratos na dieta aumentam os teores de amilase da parede do estômago transferindo-a para a luz de forma inversamente proporcional ao conteúdo de carboidratos da dieta. As características indutivas da amilase em *P. mesopotamicus* já foram descritas anteriormente (MORAES & BIDINOTTO, 2000). Esses autores observaram alta atividade amilohidrolítica nos cecos e baixas atividades no estômago desta espécie, assim como neste estudo. A atividade da amilase do intestino de peixes parece estar diretamente associada ao nível de amido da dieta (CORRÊA et al., 1998; MORAES & BIDINOTTO, 2000; CORRÊA et al., 2007). A composição da dieta modula a atividade da amilase em *B. amazonicus* (CAMILO, 2007). A atividade amilohidrolítica do estômago de *P. corruscans* é responsiva aos níveis de amido da dieta, embora os maiores conteúdos de amido prejudiquem sua indução, provavelmente pela intolerância de espécies carnívoras ao amido (LUNDSTEDT et al., 2004). A diminuição da atividade da amilase no quimo em função do aumento do nível de amido na dieta foi observada em *O. mykiss* (SPANNHOF & PLANTIKOW, 1983), no qual os autores consideraram essa redução da atividade da amilase resultado de uma inibição da enzima depois da adsorção às moléculas de amido. O atual conjunto de dados não permite dizer qual concentração de carboidratos esgotaria o conteúdo de amilase da parede do estômago de *P. mesopotamicus*, ou mesmo se isso viria ou não a ocorrer. Todavia pode-se dizer que a intersecção das atividades de amilase da parede e da luz do estômago aponta para um ótimo aparente de aproximadamente 32 % de proteína e 38 % de ENN. Porém como já dito no primeiro experimento, as determinações da atividade desta enzima deram-se em um meio de reação em pH neutro. Assim, a atividade da amilase observada na parede do estômago deveria ser otimizada para verificação da possível presença de uma isozima com características e papel diferenciado nesta porção do trato digestório.

Diferentemente das proteases, cujas atividades no jejum foram próximas às atividades dos peixes alimentados com 20 % de proteína, a amilase apresentou valores de atividades relativamente menores no jejum quando comparado com os peixes alimentados. Isso sugere

que um jejum de 24 dias afeta a síntese de amilase em todas as porções do trato digestório de *P. mesopotamicus*.

Os cecos apresentaram um perfil de atividade amilohidrolítica muito semelhante ao observado no estômago, ou seja, atividade crescente na parede, diretamente proporcional ao conteúdo de carboidrato da dieta e atividade na luz inversamente proporcional ao conteúdo de carboidratos. Assim, para essa porção do trato digestório pode-se ter as mesmas inferências feitas no estômago inclusive quanto aos pontos de intersecção entre as atividades observadas na parede e na luz. Por outro lado, *B. melanopterus* exibe uma amilase induzida no conteúdo intestinal com o aumento de carboidrato na dieta. Essa resposta deve-se à correlação entre a atividade enzimática e a dieta (REIMER, 1982). Debnath et al. (2007) não encontraram mudanças significativas na atividade da amilase em *L. rohita* alimentados com níveis crescentes de proteína e decrescentes de carboidrato. O conteúdo de carboidrato da dieta não induziu ou reprimiu a atividade da amilase. Em *C. macropomum* os cecos pilóricos apresentam alta atividade amilohidrolítica além de uma característica indutiva frente às mudanças da composição da dieta (ALMEIDA et al., 2006; CORRÊA et al., 2007). *R. quelen* apresenta atividade decrescente da amilase com o aumento do conteúdo de proteína da dieta em todos os segmentos do trato digestório (MELO, 2004). Este autor explica este fato pela redução relativa dos teores de carboidrato nas dietas experimentais. A atividade da amilase diminui significativamente no intestino de *P. gonionotus* devido ao aumento de proteína e diminuição do carboidrato na dieta (MOHANTA et al., 2008).

Esse mesmo perfil não foi verificado, todavia, para as outras porções do trato digestório de *P. mesopotamicus*, a não ser pela atividade observada na parede do intestino posterior.

As porções anterior e posterior do intestino não apresentaram um padrão definido que permita uma clara interpretação. Entretanto considerando-se as variações percentuais dos teores de amilase da parede, pode-se afirmar que mesmo as maiores concentrações de carboidrato na ração não reduzem os teores de amilase na luz abaixo de 50 %. Tal como proposto anteriormente, essa manutenção dos teores enzimáticos da parede pode ser devido a uma constante síntese de amilase e a independência entre os processos de síntese e secreção. Além disso, em resposta à questão levantada para a realização do experimento II, é possível admitir que os teores de carboidrato da dieta não são capazes de esgotar o conteúdo de amilase da parede. Portanto ao longo do intestino, o aproveitamento dos carboidratos da dieta não estaria limitado pelo seu conteúdo.

## 6. Conclusões

### 6.1. Experimento I

- 1) A produção de protease ácida e alcalina é prejudicada por jejuns superiores a 12 horas;
- 2) O conteúdo de enzimas da parede do estômago, cecos e intestino não se esgota em função da alimentação;
- 3) Parece haver uma secreção residual de atividade enzimática para a luz do estômago, a qual justificaria a redução gradual do teor de protease ácida na parede;
- 4) O conteúdo de enzimas da parede dos cecos e intestino parece ser estimulado pela presença de alimento, durante o processo digestivo;
- 5) O teor de proteases alcalinas da luz dos cecos e intestinos é proporcional ao teor das paredes;
- 6) Parece haver uma secreção residual de atividade enzimática também para a luz dos cecos e intestinos, a qual justificaria a correlação entre paredes e a luz.

### 6.2. Experimento II

- 1) A protease ácida e alcalina foram responsivas aos teores de proteína da dieta;
- 2) A taxa de secreção da protease ácida não é proporcional à sua taxa de síntese, diferentemente da secreção alcalina;
- 3) Teores crescentes de proteína na dieta implicam em aumento do teor de tripsina na parede e na luz até um valor ótimo de 32 %;
- 4) Valores até 32 % de proteína dietética não prejudicam a digestão quimiotríptica de proteínas em pacu, até seis horas pós-alimentação;
- 5) O aumento do teor de proteína da ração sinaliza o aumento de secreção da quimiotripsina;
- 6) A taxa de síntese de quimiotripsina parece não acompanhar a de secreção até seis horas após a alimentação;

7) A digestão de carboidratos é mais efetiva no intestino, onde os teores de carboidrato da dieta não limitam a secreção da amilase pelo esgotamento de seu conteúdo na parede;

8) A digestão de carboidratos nos cecos e no estômago está limitada a um teor máximo de 38 % de ENN e 32 % de proteína.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Rev. Bras. Zootec.**, v. 5, p. 1001-1009, 2004.

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

ABMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J.; URBINATI, E.C. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 36-44, 2007.

ALMEIDA, L.C. **Perfil digestivo e metabólico de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818), alimentados com diferentes teores de proteínas.** 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

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

BECHARA, J.A.; et al. The effect of dietary protein level on pond water quality and feed utilization efficiency of pacú *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Aquaculture Research**, v. 36, p. 546-553, 2005.

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

BRADFORD, M.M.; MCRORIE, R.A.; WILLIAM, W.L. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAHU, C.; et al. Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. **Aquaculture**, v. 238, p. 295-308, 2004.

CAMILO, R.Y. **Efeitos da adição de aminoácidos essenciais livres à dieta e da ausência de nutrientes na atividade de enzimas digestivas e no metabolismo intermediário de**

**juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*).** 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

CARA, B.; et al. C. Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. **Journal of Fish Biology**, v. 70, p. 1798-1808, 2007.

CHAKRABARTI, I.; et al. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 112, p. 167-177, 1995.

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

CHESLEY, L.C. The concentrations of proteases, amylase and lipase in certain marine fishes. **Biol. Bull.**, v. 66, n. 2, p. 133-144, 1934.

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

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

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

CORRÊA, C.F.; et al. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. **Comp. Biochem. Physiol.**, Part A, v. 147, p. 857-862, 2007.

CORRÊA, C.F.; BIDINOTTO, P.M.; MORAES, G. Comparation of the amilohydrolytic activity in the gut of the neotropical teleost species Pacu *Piaractus mesopotamicus* and Tambacu hybrids (*Colossoma macropomum* Tambaqui X *P. mesopotamicus* Pacu), submitted to different contents of soluble carbohydrate. In: D.D. Mackinley and D. Houlihan, eds. INTERNATIONAL CONGRESSO ON THE BIOLOGY OF FISH. Fish Feeding Ecology and Digestion: "Gutshop'98" Symposium Proceedings, Baltimore Maryland. Disponível em: <<http://www-heb.pac.dfo-mpo.gc.ca/congress/1998/gutshop98.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2008.

CRESCÊNIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: BALDISSEROTTO, B; CARVALHO GOMES, L. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 23-33.

DEBNATH, D.; et al. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. **Comp. Bioch. Physiol.**, Part B, v. 146, p. 107-114, 2007.

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

DIAS-KOBERSTEIN, T.C.R.; CARNEIRO, D.J.; URBINATI, E.C. Tempo de trânsito gastrintestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo. **Acta Sci. Anim. Sci.**, v. 27, n. 3, p. 413-417, 2005.

DÍAZ-LÓPEZ, M.; et al. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. **Comp. Biochem. Physiol.**, Part B, v. 121, p. 369-377, 1998.

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

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

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

FAL'GE, R.; SHPANNKHOF, L. Amilase, esterase and protease activity in the gut contents of the rainbow trout *Salmo gairdneri* after feeding. **Journal of Ichthyology**, v. 16, p. 672-677, 1976.

FERNANDES, J.B.K.; CARNEIRO, D.J.; SAKOMURA, N.K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **R. Bras. Zootec.**, v. 29, n. 3, p. 646-653, 2000.

FERNANDES, J.B.K.; CARNEIRO, D.J.; SAKOMURA, N.K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **R. Bras. Zootec.**, v. 30, n. 3, p. 617-626, 2001.

FERNÁNDEZ, I.; et al. Characterization of  $\alpha$ -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, p. 1-12, 2001.

FISH, G.R. The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of Tilapia and Perch. **Hidrobiol.**, v. 15, p. 161-178, 1960.

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

FURNÉ, M.; et al. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. **Aquaculture**, v. 250, p. 391-398, 2005.

FURNÉ, M.; et al. Effect of refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol.**, Part A, v. 149, p. 420-425, 2008.

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

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

GUILLAUME, J. Introdução. In: GUILLAUME, J.; KAUSHIK, S.; BERGOT, P.; MÉTAILLER, R. **Nutrition and feeding of fish and crustaceans**. Chichester: Springer; Praxis Publishing, 2001. p. 3-7.

GUILLAUME, J.; CHOUBERT, G. Digestive physiology and nutrient digestibility in fishes. In: GUILLAUME, J.; KAUSHIK, S.; BERGOT, P.; MÉTAILLER, R. **Nutrition and feeding of fish and crustaceans**. Chichester: Springer; Praxis Publishing, 2001. p. 27-56.

HATLEN, B.; GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S.J. Growth, feed utilization and body composition in two size groups of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in protein and carbohydrate content. **Aquaculture**, v. 249, p. 401-408, 2005.

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

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

HOFER, R. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus* and rudd *Scardinius erythrophthalmus*; Proteases. **Journal of Fish Biology**, v. 15, p. 373-379, 1979.

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

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

HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 12, p. 1393-1399, 1959.

INOUE, L. A. K.; SANTOS NETO, C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33C, p. 943-947, 2003.

IZIEL, A.C.U.; et al. Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 179-184, 2004.

JOMORI, R.K.; et al. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, p. 277-287, 2003.

JOMORI, R.K.; et al. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v. 243, p. 175-183, 2005.

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

JUNG-SHENG, L.; JIAN-LIN, L.; TING-TING, W. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid Juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). **Fish Physiol Biochem.** v. 32, p. 295-303, 2006.

KIM, L.O.; LEE, S-M. Effects of the dietary protein and lipid levels on growth and body composition of bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*. **Aquaculture**, v. 243, p. 323-329, 2005.

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

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

KUMAR, S.; et al. Studies on digestibility and digestive enzyme activities in *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles: effect of microbial  $\alpha$ -amylase supplementation in non-gelatinized or gelatinized corn-based diet at two protein levels. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 32, p. 209-220, 2006.

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

KUZ'MINA, V.; et al. Amyolytic activity in fish intestinal mucosa: temperature effects. **Comp. Biochem. Physiol., Part B**, v. 134, p. 529-534, 1996.

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

LEE, S.-M.; et al. Optimum dietary protein for growth of juvenile starry flounder, *Platichthys stellatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 2, p. 200-203, 2006.

LIU, Z.-Y.; et al. Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). **Aquaculture Nutrition**, v. 14, p. 31-39, 2008.

LO, M.-J.; WENG, C.-F. Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. **Aquaculture**, v. 261, p. 1403-1412, 2006.

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.**, Part B, v. 137, p. 331-339, 2004.

MELO, J.F.B. **Digestão e metabolismo de jundiá *Rhamdia quelen* submetido a diferentes regimes alimentares**. 2004. 80 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

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

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

MORAES, G.; BIDINOTTO, P.M. Digestive proteases of Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed on distinct protein-starch diets. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 15, n. 3/4, p. 197-207, 2004.

MUKHOPADHYAY, P.K.; DEHADRAI, P.V.; BANERJEE, S.K. Studies on intestinal protease: isolation, purification and effect of dietary proteins on alkaline protease activity of the air-breathing fish, *Clarias batrachus* (Linn.). **Hydrobiologia**, v. 57, n. 1, p. 11-15, 1978.

MUNILLA-MORÁN, R. & SABORIDO-REY, F. Digestive enzymes in marine species. I. Protease activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). **Comp. Biochem. Physiol.** Part B, v. 113, n. 2, p. 395-402, 1996a.

MUNILLA-MORÁN, R.; SABORIDO-REY, F. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*). **Comp. Biochem. Physiol.** Part B, v. 113, n. 4, p. 827-834, 1996b.

MUÑOZ RAMÍREZ, A.P. **Utilização de carboidratos digestíveis em dietas para pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)**. 2005. 123 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MURASHITA, K.; et al. Trypsin restoration time in the pyloric ceca of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. **Fisheries Science**, v. 71, p. 1274- 1279, 2005.

NATALIA, Y.; HASHIM, R.; ALI, A.; CHONG, A. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). **Aquaculture**, v. 233, p. 305-320, 2004.

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

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: principles of biochemistry**. 4. ed. New York: W.H Freeman and Company, 2005.

PAPOUTSOGLU, E.S.; LYNDON, A.R. Digestive enzymes along the alimentary tract of the parrotfish *Sparisoma cretense*. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 130-140, 2006.

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

PEZZATO, L.E.; et al. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J.E.P.; et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 75-170.

PRIETO, M.J.; et al. Tipo de alimento, sobrevivência e desempenho inicial de pós-larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 1002-1007, 2006.

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

RESENDE, E.K. Apresentação. In: ROTTA, M.A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestório dos peixes relacionados à piscicultura**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. p.3.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELLE, J.L. et al. **Tabelas brasileiras de aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000.

SÀ, R.; POUSÃO-FERREIRA, P.; OLIVA-TELES, A. Dietary protein requirement of white sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, p. 309-317, 2008.

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

SCHUCHARDT, D.; et al. Effects of different dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, p. 1-9, 2008.

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

SILVA, A.J. Regime alimentar do pacu, *Colossoma mitrei* (Berg, 1985) no Pantanal de Mato Grosso em relação à flutuação do nível da água. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 5, 1985, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 1985. p. 179.

SOUZA, V.L.; et al. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 32, n. 1, p. 19-28, 2003.

SPANNHOF, L.; PLANTIKOW, H. Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 30, p. 95-108, 1983.

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

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

TACON, A.G.J. **Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados**: manual de capacitacion. Brasília: FAO, 1989. Doc 4.

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

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B; CARVALHO GOMES, L. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 225-246.

UYS, W.; HECHT, T.; WALTERS, M. Changes in digestive enzyme activities of *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae) after feeding. **Aquaculture**, v. 63, p. 243-250, 1987.

VIEIRA, V.L.P. **Estudo de processos digestivos em *Brycon cephalus* (matrinxã) e *Brycon orbignyanus* (piracanjuba) alimentados com diferentes teores de proteína: aspectos adaptativos e resposta metabólica.** 2002. 94 f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

WALSH, C. Acyl transfers to water: endopeptidases and exopeptidases. In: WALSH, C. **Enzymatic reaction mechanisms.** New York: Freeman, 1979. p. 53-107.

WALTER, H. E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: BERGMEYER, H. U. (Ed). **Methods of enzymatic analysis.** Weinheim: Verlag Chemie, 1984. v. 5, p. 270-277.

WANG, H.-Y; et al. Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 32, p. 179-188, 2006.

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

ZAMBONINO INFANTE, J.L.; CAHU, C.L. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Comp. Biochem. Physiol.**, Part A, v. 109, n. 2, p. 209-212, 1994.

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