

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE  
CARBONO NA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE TRÂNSITO  
GASTROINTESTINAL EM JUVENIS DE PACU**

**Lidiane Cristina Gonçalves de Sandre**

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Setembro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE  
CARBONO NA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE TRÂNSITO  
GASTROINTESTINAL EM JUVENIS DE PACU**

**Lidiane Cristina Gonçalves de Sandre**

Orientador: Prof. Dr. Dalton José Carneiro

Co-orientador: Dr. Eduardo Gianini Abimorad

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Setembro de 2011

S219a Sandre, Lidiane Cristina Gonçalves de  
Aplicação da técnica de isótopos estáveis de carbono na  
determinação do tempo de trânsito gastrointestinal em juvenis de  
pacu / Lidiane Cristina Gonçalves de Sandre. -- Jaboticabal, 2011  
viii, 60 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro  
de Aquicultura, 2011

Orientador: Dalton José Carneiro

Banca examinadora: Rosângela Kiyoko Jomori Bonichelli,  
Leonardo Susumu Takahashi

Bibliografia

1. *Piaractus mesopotamicus*. 2. Temperatura. 3. Isótopos. I.  
Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

*“Comece fazendo o que é necessário,  
depois o que é possível,  
e de repente você estará fazendo o impossível”.*

*São Francisco de Assis.*

*Dedico,*

*Aos meus queridos pais,*

*Ifydio de Sandre e Ana Vera de Sandre que me deram a vida e me ensinaram a viver com dignidade. Por acreditarem em mim, pelas orações, pelo incondicional amor, carinho e incentivo...*

*...Amo vocês!!!*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, pela proteção, sempre me abençoando e me guiando pelo melhor caminho.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Dalton José Carneiro, pela dedicação, apoio, paciência e por acreditar no meu trabalho.*

*Ao meu co-orientador Dr. Eduardo Gianini Abimorad, pelas inúmeras sugestões, por toda colaboração na realização deste trabalho e pela amizade.*

*Aos membros da banca examinadora de qualificação e da defesa: Profa. Dra. Marta Verardino de Stéfani, Dra. Rosângela Kiyoko Jomori, Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi. Muito obrigada pelas importantes contribuições e correções sugeridas para a melhoria da redação final do trabalho.*

*A FAPESP, pela bolsa de estudo e ao CNPq que me concedeu os primeiros meses de bolsa.*

*Aos professores Leonardo Susumu Takahashi, Juliano Fiorelli e Antônio Chaves de Assis Neto, por me conduzirem, me orientarem e me instruírem na pesquisa no início dessa jornada durante a graduação em Dracena, tornando possível que eu chegasse até aqui.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti, a todos os funcionários e alunos do Centro de Isótopos Estáveis da UNESP de Botucatu, que me receberam de braços abertos e tornaram possível a conclusão deste trabalho.*

*A todos da minha família pelo amor e carinho.*

*Ao Juan Carlos Ríos Alva, por sua incansável dedicação, companheirismo e carinho. Precioso, muito obrigada!!*

*Aos amigos do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos: Natália Leitão, Thiago (Nogento), Rodrigo (Tigrão), Olívia (Taxinha), Thiago (Strumi), Gustavo (Vurto), Lígia, Jesaias, Caio (Eterno), Rafael (Perdido), Camila, Larissa, Flávio (Pintado), Lucas (Marreta), João (Jonny Castro), Ana Carolina, Natália, Silvinha e em especial a Hellen, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. “Todas as grandezas desse mundo não valem um bom amigo” (Voltaire).*

*Ao amigo Felipe Cohen pela ajuda no inglês.*

*Ao amigo Marcelo (Japinha), pelas dicas e ajuda na extrusão das dietas.*

*Aos meus companheiros de lar: Juliana (Thomy's), Rodrigo Gimbo, Giséle, Michèle (Chelão), Aline Buda e a todos os agregados que passaram pela república e que em algum momento dividiram o mesmo teto comigo.*

*Aos amigos da III Turma de Zootecnia, pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos, pelas alegrias, ansiedades e emoções compartilhadas. "A amizade é uma espécie de amor que nunca morre" (Mário Quintana).*

*As eternas amigas Elane e Thays (Broa), minhas irmãs de coração, mesmo a distância nos separando, vocês sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida. "É tão forte quanto o vento quando sopra, tronco forte que não quebra, não entorta....Podês crer, podês crer...Eu estou falando de amizade!" (Cidade Negra).*

*Aos amigos Lucila, Fernando, Maria Heloisa (ainda na barriga da mamãe), e Laiquinha, que me acolheram em Botucatu durante a realização de disciplina, conviver esse período com vocês, foi maravilhosos!!*

*Aos amigos Priscila e Wesley, pela nossa amizade de tantos anos, por sempre estarem dispostos a me ouvir, pelas risadas que demos juntos, enfim por toda cumplicidade.*

*Ao Furão, Kim, Teddy (in memoriam), Shiro e Gauss pelas alegrias... "O cão é a virtude que, não podendo fazer-se homem, se fez animal" (Victor Hugo).*

*A piscicultura Poletini, pela doação dos animais.*

*Ao amigo Rodrigo Vaz, do Grupo MCASSAB, pela doação da metionina.*

*A Fri-ribe pela doação dos ingredientes: lisina e protenose.*

*Aos docentes do Departamento de Ciências Exatas: Prof. Nelson José Peruzzi, Prof. Euclides Braga Malheiros, Prof. João Ademir de Oliveira, Prof. Gener Tadeu Pereira e ao aluno Allan.*

*Ao funcionário Roberto e aos alunos do Laboratório de Carcinicultura do CAUNESP, que gentilmente colaboraram para pesagem de minhas amostras.*

*Aos funcionários Sr. Mauro e Valdecir, por me ajudarem a tentar entender o sistema de distribuição de águas de diferentes temperaturas do CAUNESP, e a todos os outros funcionários, alunos, pesquisadores e docentes.*

*Aos meus peixes ("meus filhos"), que se comportaram muito bem!!*

*E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.*

*Muito Obrigada!*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>CAPÍTULO 1 - Considerações gerais</b> .....	1
1. Situação e Perspectivas da Aquicultura .....	1
2. Importância da espécie .....	2
3. Tempo de trânsito gastrointestinal de alimentos em peixes .....	4
4. Isótopos estáveis .....	6
5. Utilização do método isotópico em estudos alimentares .....	12
6. Referências .....	15
<b>CAPÍTULO 2 - Aplicação da técnica de isótopos estáveis de carbono na determinação do tempo de trânsito gastrointestinal em juvenis de pacu</b> .....	24
<b>1. Introdução</b> .....	27
<b>2. Objetivo geral</b> .....	28
2.1 Objetivos específicos .....	28
<b>3. Material e métodos</b> .....	29
3.1 Material biológico .....	29
3.2 Instalações e condições experimentais .....	29
3.3 Dietas experimentais .....	30
3.4 Delineamento experimental .....	32
3.5 Parâmetros de desempenho produtivo .....	32
3.6 Determinação do tempo de trânsito gastrointestinal .....	33
3.7 Análises estatísticas .....	36
<b>4. Resultados e discussão</b> .....	36



4.1 Variáveis físico-químicas da água.....	36
4.2 Desempenho produtivo .....	38
4.3 Tempo de trânsito gastrointestinal .....	42
<b>5. Conclusões</b> .....	<b>53</b>
<b>6. Referências</b> .....	<b>54</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

	Página
TABELA 1. Abundância natural (%) e padrão aceito internacionalmente dos principais isótopos estáveis usados em estudos ecológicos (modificado de Ducatti, 2007).....	07

### CAPÍTULO 2 – Aplicação da técnica de isótopos estáveis de carbono na determinação do tempo de trânsito gastrointestinal em juvenis de pacu

TABELA 1. Fórmulas e composições isotópicas e nutricionais das dietas experimentais.....	31
TABELA 2. Valores médios diários dos parâmetros físico-químicos da água dos tanques experimentais a 25 e 29 °C.....	37
TABELA 3. Valores de F e médias para os parâmetros de desempenho de juvenis de pacu alimentados com dietas C <sub>3</sub> e C <sub>4</sub> em diferentes temperaturas de água.....	39
TABELA 4. Valores médios de peso final (g) de juvenis de pacu para o efeito de interação entre temperaturas da água e dietas, aos 40 dias de experimento.....	41
TABELA 5. Valores médios da taxa de crescimento específico (% / dia) de juvenis de pacu para efeito de interação entre temperaturas da água e dietas, durante 40 dias de experimento.....	41
TABELA 6. Valores médios do ganho em peso (g) dos juvenis de pacu para efeito de interação entre temperaturas da água e dietas, ao final de 40 dias de alimentação.....	42
TABELA 7. Valores do TTG de juvenis de pacu mantidos a 25 e 29 °C nas estratégias alimentares C <sub>3</sub> /C <sub>4</sub> e C <sub>4</sub> /C <sub>3</sub> em ambas as metodologias avaliadas.....	52

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

Página

FIGURA 1. Régua isotópica, com escala em  $\delta$  ‰, para o carbono-13 (Ducatti, 2007).....09

### CAPÍTULO 2 – Aplicação da técnica de isótopos estáveis de carbono na determinação do tempo de trânsito gastrointestinal em juvenis de pacu

FIGURA 1. Notas (média  $\pm$  erro padrão) segundo a observação visual da mudança de coloração das fezes de juvenis de pacu cultivados a 25 e 29 °C, após a troca da dieta C<sub>3</sub> pela C<sub>4</sub> e do marcador óxido de titânio pelo crômio, analisadas pelo modelo de Boltzmann.....43

FIGURA 2. Notas (média  $\pm$  erro padrão) segundo a observação visual da mudança de coloração das fezes de juvenis de pacu cultivados a 25 e 29 °C, após a troca da dieta C<sub>4</sub> pela C<sub>3</sub> e do marcador óxido de titânio pelo crômio, analisadas pelo modelo de Boltzmann.....45

FIGURA 3. Composição isotópica do carbono ( $\delta$ ‰<sup>13</sup>C – média  $\pm$  erro padrão) das fezes de juvenis de pacu cultivados a 25 e 29 °C, após a troca da dieta C<sub>3</sub> pela C<sub>4</sub>, analisada pelo modelo de Boltzmann.....47

FIGURA 4. Composição isotópica do carbono ( $\delta$ ‰<sup>13</sup>C – média  $\pm$  erro padrão) das fezes de juvenis de pacu cultivados a 25 e 29 °C, após a troca da dieta C<sub>4</sub> pela C<sub>3</sub>, analisada pelo modelo de Boltzmann.....59

## **CAPÍTULO 1 - Considerações gerais**

### **1. Situação e Perspectivas da Aquicultura**

O aumento da população mundial tem elevado a demanda por alimentos protéicos de origem animal; por conseguinte, há maior procura pelo pescado uma vez que se trata de um alimento saudável, rico em proteínas e sais minerais, além de possuir baixos teores de gordura e colesterol. Porém, a maioria das áreas de pesca de captura no planeta alcançou seu potencial máximo de extração e o fornecimento de pescado não poderá, por muito mais tempo, atender a demanda mundial (FAO, 2010). Considerando que as possibilidades reais de expansão da captura pesqueira estão praticamente esgotadas, a alternativa natural para o suprimento desse mercado passa a ser a aquicultura.

A exploração indiscriminada dos estoques pesqueiros naturais e a crescente diferença entre a quantidade de pescado capturado e a demanda de consumo tornaram a aquicultura uma das alternativas mais viáveis no mundo para produção de alimento de alto valor protéico para consumo humano (Camargo e Pouey, 2005). O vigoroso e gradual desenvolvimento da aquicultura compensará a diminuição da produção pesqueira que tem boa parte da sua atividade já explorada e esgotada (Sindirações, 2011).

A estimativa mundial de consumo per capita de peixe aumentou ao longo dos anos, de uma média de 9,9 kg, em 1960, até uma demanda aparente per capita de 17,2 kg, em 2009 (FAO, 2010). No Brasil, também houve um ligeiro aumento no consumo de 7,6 kg, em 1996, para aproximadamente 9,0 kg/ habitante/ ano, em 2009. O Ministério da Pesca e Aquicultura estabeleceu a meta de aumentar o consumo brasileiro para 12 kg/ per capita (Sindirações, 2011), quantidade recomendada pela Organização Mundial da Saúde (MPA, 2010).

O Brasil apresenta várias características que proporcionam um enorme potencial para a aquicultura, tais como, a disponibilidade de recursos hídricos e de grandes extensões de terra passíveis de serem destinadas ao cultivo, o clima favorável, a mão de obra abundante, a boa adaptabilidade das espécies destinadas à criação e a crescente demanda por pescado no mercado interno, aspectos que têm contribuído para impulsionar a atividade no país (Oliveira, 2009).

A produção aquícola nacional continental vem obtendo um crescimento bastante significativo nos últimos anos. Em 2009, o setor apresentou uma elevação

na produção de 19,6 %, quando comparada com a de 2008. Este incremento pode ser um reflexo das políticas públicas voltadas para o setor, que contribuíram para melhorar o acesso aos programas governamentais existentes, como a nova lei que criou o Ministério de Aquicultura e Pesca, em substituição da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca (SEAP), a fim de estruturar uma cadeia produtiva para garantir um desenvolvimento sustentável no setor pesqueiro e aquícola (MPA, 2010).

No Brasil, o aumento da produção de organismos aquáticos estimulou o avanço das indústrias de ração. A demanda por ração para peixes, em 2010, foi de 345 mil toneladas e crescimento de 15 % em relação ao ano de 2009. Em 2011, a estimativa de produção é de 489 mil toneladas de rações para peixes e camarões, um crescimento de 14 % (Sindirações, 2011). A produção brasileira pode alcançar dois milhões de toneladas, alavancada pelo clima favorável, disponibilidade de água doce, extensão litorânea e milhões de hectares de áreas alagadas e reservatórios (Sindirações, 2011). Contudo, a piscicultura ainda apresenta resultados modestos de desenvolvimento, devido aos processos de produção adotados e à falta de informações sobre as espécies nativas com potencial zootécnico (Beerli et al., 2004), uma vez que grande parte dos cultivos são com espécies exóticas, o que é de certa forma surpreendente, em vista da grande diversidade de espécies nativas (cerca de três mil espécies apenas na Bacia Amazônica). Uma das razões para que isso ocorra, provavelmente, está na falta de informações facilmente acessíveis sobre o cultivo de espécies nativas (Baldisserotto e Gomes, 2010).

## **2. Importância da espécie**

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), membro da família Characidae e subfamília Serrasalminae, possui ampla distribuição geográfica na América do Sul, sendo encontrado desde a Bacia dos Rios Paraguai - Uruguai até a Bacia do Rio Prata. Na natureza, o pacu é um peixe rústico que utiliza alimentos bastante diversificados, variando as fontes em função da sazonalidade (Abimorad e Carneiro, 2004). É considerada uma das espécies de grande valor comercial e de grande potencial para a piscicultura nacional e até internacional (Resende, 2003), já sendo cultivado em países como China, Myanmar, Tailândia e Vietnã (FAO, 2010).

É uma das espécies mais estudadas e produzidas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e ocupa, atualmente, posição de destaque na pesca

comercial e esportiva, sendo a quinta espécie continental mais produzida e a sexta espécie em captura no Brasil (MPA, 2010). Seus estoques têm diminuído nas últimas décadas, principalmente devido à sobrepesca e também às grandes alterações em seu habitat (Britski et al., 2007). A sobrepesca do pacu tem sido considerada fator significativo no impacto sobre os ecossistemas de água doce, uma vez que já se demonstrou que o pacu, bem como outros grandes peixes frugívoros, é um importante dispersor de sementes e colabora para a regeneração das florestas (Galetti et al., 2008).

É uma espécie onívora, mas que apresenta hábito alimentar especificamente frugívoro e herbívoro, do tipo podador, e de caráter oportunista (Silva, 1985), que se alimenta principalmente de folhas, caules, frutos e sementes. Havendo necessidade e oportunidade, pode ingerir insetos, aracnídeos, moluscos e pequenos peixes. Na estação chuvosa o pacu permanece nas áreas inundadas ingerindo vegetais com grande quantidade de carboidratos e, no período da seca, alimenta-se nos leitos dos rios, onde existe pouca disponibilidade de alimento (Silva, 1985).

Por alimentar-se basicamente de folhas e de frutos de árvores, acredita-se que tenha habilidade especial na digestão e na absorção de alimentos grosseiros, ricos em carboidratos. Além de possuir características de precocidade, rusticidade, carne saborosa e ótimo crescimento, trata-se de uma espécie que aceita muito bem o arraçoamento, o que propicia o sucesso da criação em sistemas de cultivos intensivos. Apesar de todas essas características, ainda há necessidade de informações a respeito dessa espécie (Dias-Koberstein et al., 2005).

Pela sua importância na aquicultura nacional, o pacu tem se destacado como uma das espécies nativas de peixes de águas interiores mais estudadas (Bicudo, 2008). Os primeiros estudos relacionados à nutrição com a espécie visaram determinar a exigência e a digestibilidade da proteína, utilizando dietas isoenergéticas ( $3000 \text{ kcal EM kg}^{-1}$ ) com 14, 18, 22 e 26 % de PB (Carneiro, Castagnolli, 1984; Carneiro et al., 1984). Nestes estudos, a dieta com 26 % de PB promoveu maior aproveitamento da proteína e maior ganho em peso dos peixes. Brenner (1988) determinou a exigência protéica de alevinos de pacu, usando seis dietas com  $3300 \text{ kcal EM kg}^{-1}$  e 12, 20, 28, 36, 44, e 52 % de PB. Este autor determinou a exigência de 36 % para peixes com peso inicial de 22 g. Abimorad (2008) a exigência em lisina para alevinos de pacu em 1,64 % de lisina digestível (5,57 % da proteína da dieta) usando dietas práticas balanceadas de modo a

simular o perfil de aminoácidos muscular da espécie, utilizando os valores de aminoácidos digestíveis dos ingredientes.

Além da exigência nutricional da espécie, a qualidade dos ingredientes utilizados nas dietas também é essencial na nutrição de peixes. Vidotti et al. (2002) encontraram coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) de 72,5 e 80 % da proteína oriunda da silagem de peixe ácida e fermentada, respectivamente, para juvenis de pacu. Abimorad e Carneiro (2004) avaliaram a digestibilidade da proteína de 13 ingredientes: farinha de penas, farinha de peixe, farinha de vísceras, farinha de sangue, farelo de soja, farinha de carne e ossos, soja tostada, farelo de algodão, soja crua, levedura, farelo de trigo, sorgo, farelo de arroz e milho para o pacu. Apenas a farinha de penas ( $75,73 \pm 11,33$  %), farinha de sangue ( $57,72 \pm 7,14$  %) e a levedura ( $68,86 \pm 14,68$  %) apresentaram coeficientes de digestibilidade aparente inferiores a 80 % para a PB. Abimorad et al. (2008) avaliaram a digestibilidade dos aminoácidos de seis ingredientes pelo pacu. Neste trabalho, todos os ingredientes apresentaram CDA elevados (maiores que 86 %) para os aminoácidos, sendo os maiores valores observados no farelo de glúten de milho (91,7 %), farelo de soja (91,5 %) e farinha de peixe (90,8 %).

Para melhorar e otimizar a alimentação do pacu, é fundamental que se conheça o nível de aproveitamento dos ingredientes da dieta (Abimorad e Carneiro, 2004), e uma ferramenta muito importante para auxiliar nestas pesquisas são os estudos sobre o tempo de trânsito gastrointestinal de dietas elaboradas com os principais produtos e subprodutos produzidos no Brasil, resultando em maior precisão no balanceamento de dietas para organismos aquáticos e portanto, intervindo diretamente nos aspectos nutricionais e econômicos.

### **3. Tempo de trânsito gastrointestinal de alimentos em peixes**

O tempo de trânsito gastrointestinal é importante para o estabelecimento da frequência de oferta do alimento em situações diversas, como no período de suspensão do arraçoamento antes de manejo profilático, biometria e transporte, evitando problemas aos peixes e redução da qualidade de água (Urbinati et al., 2010).

Ademais, as estratégias de alimentação em piscicultura devem visar a otimização dos índices de crescimento com consequente redução de dejetos no

ambiente (Schnaittacher et al., 2005). O desenvolvimento de estratégias bem sucedidas na produção de peixes pode garantir um bom desenvolvimento e máxima rentabilidade no cultivo; para que isso ocorra, é necessário um fornecimento adequado na quantidade e qualidade das rações, evitando-se a degradação das condições da água, através do excesso de nutrientes acumulados nos tanques de cultivo. A melhora da eficiência alimentar em peixes depende da integração de fatores como características fisiológicas, hábito alimentar e exigência nutricional da espécie, composição química e disponibilidade de nutrientes dos ingredientes selecionados para confecção da ração completa (Lanna et al., 2004).

O trato gastrointestinal realiza uma notável variedade de funções, como transporte do conteúdo luminal, secreção e absorção de íons, água e nutrientes, fluxo sanguíneo, defesa contra patógenos e eliminação de resíduos e/ou substâncias nocivas (Schemann, 2005). Os materiais ingeridos e produtos residuais são impulsionados ao longo de seu comprimento para absorção de nutrientes e eliminação de resíduos. Esse papel vital é realizado através de contrações reguladas e coordenadas. Direção, frequência e distância percorrida por contrações gastrointestinais influenciam a capacidade de impulsionar o conteúdo luminal distalmente através do intestino (Field et al., 2009). O tempo de contato entre as enzimas digestivas e seus substratos e duração de permanência dos nutrientes nos locais de absorção são dependentes da velocidade de trânsito (Fauconneau et al., 1983).

Um dos fatores que regulam a transformação dos alimentos e a absorção dos nutrientes dentro do tubo digestivo é a velocidade de trânsito dos alimentos. O tempo de retenção dos alimentos também ocorre em função da temperatura de aclimação dos peixes, influenciando igualmente na quantidade de alimento consumido espontaneamente (Possompes et al., 1973, citado por Dias-Kobertein et al., 2005).

Diversos estudos mostram que os fatores abióticos da água e as características físicas e químicas da ração podem influenciar o tempo de passagem do alimento pelo trato digestivo dos peixes (Fauconneau et al., 1983; Carneiro et al., 1994; Van der Meer et al., 1997; Sveier et al., 1999; Usmani e Jafri, 2002; Silva et al., 2003; Venou et al., 2003; Dias-Koberstein et al., 2005).

A temperatura é o principal fator abiótico que influencia na taxa do metabolismo em peixes, atingindo diretamente o consumo de alimento e o processo



digestivo (Silva e Araújo-Lima, 2003). Está correlacionada positivamente com a taxa de consumo diário de diferentes tamanhos de presas (Salam e Davies, 1994) e também afeta as taxas de alimentação, a atividade hidrolítica das enzimas digestivas e as taxas de absorção intestinal.

Inúmeras técnicas são utilizadas na determinação do tempo de passagem dos alimentos através do aparelho digestivo em peixes, a fim de determinar o tempo de trânsito gastrointestinal e/ou a taxa de evacuação gástrica. Entre eles podemos encontrar: coleta direta através de dissecação (Zarate e Lovell, 1999; Venou et al., 2003; Braga et al., 2007; Adamidou et al., 2009), uso de marcadores inertes na dieta (Fauconneau et al., 1983; Storebakken, 1985; Storebakken et al., 1999; Silva et al., 2003; Lanna et al., 2004; Dias-Koberstein et al., 2005), radiografias (Barbieri et al., 1998; Hossain et al., 1998, Field et al., 2009) e a utilização de isótopos radioativos (Peters e Hoss, 1974 citado por Barbieri et al., 1998; Storebakken et al., 1981).

O uso de animais “in vivo” em modelos de trânsito gastrointestinal é limitado devido às técnicas de trabalho frequentemente intensas e invasivas. Portanto, como é necessário que haja um órgão estrutural para realização destes estudos, um modelo prático de trânsito gastrointestinal não-invasivo, “in vivo”, é importante para a pesquisa científica básica (Field et al., 2009). Nesse caso, a análise de isótopos estáveis tem ainda como vantagem, o fato de indicar o que está sendo assimilado pelo organismo animal (Grey et al., 2004).

A fim de definir o período de coleta de excretas após a última alimentação em estudos de digestibilidade, torna-se fundamental o conhecimento prévio do tempo de passagem da digesta pelo tubo digestivo dos peixes. De forma geral, a utilização do método de isótopos estáveis dispensa o abate sucessivo dos peixes, possibilita traçar o fluxo do carbono da dieta (e até a sua deposição no tecido animal), além de dispensar a observação visual da mudança de coloração das fezes para determinar com exatidão o tempo de trânsito gastrointestinal de alimentos.

#### **4. Isótopos estáveis**

Os isótopos estáveis do carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S) ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera. O termo isótopo vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato de que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. Os isótopos

são átomos do mesmo elemento químico (mesmo número de prótons), mas que diferem em número de nêutrons, apresentando diferentes massas (Ducatti, 2007).

Os isótopos podem ser estáveis quando não emitem radiação, ou radioativos quando emitem algum tipo de radiação. Os isótopos estáveis, em relação aos radioativos, possuem a vantagem de não apresentarem riscos à saúde humana e contaminação ao ambiente (Boutton et al., 1988).

Considera-se que um átomo é composto de um núcleo cercado por elétrons, sendo o núcleo composto de prótons (Z) e nêutrons (N) que constituem a massa do átomo. A massa atômica de um elemento atômico, por sua vez, é a soma de Z + N no núcleo. Um núcleo, ou átomo específico-isótopo, é uma “espécie” de elemento que pode ser estável ou radioativo, definido pelo seu único número de prótons (Z) e nêutrons (N) (Dawson e Brooks, 2001). Cada elemento químico apresenta um isótopo estável *leve*, dominante: carbono-12 ( $^{12}\text{C}$ ), hidrogênio-1 ( $^1\text{H}$ ), oxigênio-16 ( $^{16}\text{O}$ ), nitrogênio-14 ( $^{14}\text{N}$ ) e enxofre-32 ( $^{32}\text{S}$ ), e um ou dois isótopos *pesados*: carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ), hidrogênio-2 ( $^2\text{H}$ ), oxigênio-17 ( $^{17}\text{O}$ ), oxigênio-18 ( $^{18}\text{O}$ ), nitrogênio-15 ( $^{15}\text{N}$ ) e enxofre-34 ( $^{34}\text{S}$ ), com abundância ou concentração natural expressa em átomos (%) (Tabela 1) (Ducatti, 2007).

**Tabela 1.** Abundância natural (%) e padrão aceito internacionalmente dos principais isótopos estáveis usados em estudos ecológicos (modificado de Ducatti, 2007).

Isótopo leve	Abundância (%)	Isótopo pesado	Abundância (%)	Padrão
$^{12}\text{C}$	98,892	$^{13}\text{C}$	1,108	PDB <sup>a</sup>
$^1\text{H}$	99,985	$^2\text{H}$	0,015	SMOW <sup>b</sup>
$^{16}\text{O}$	99,759	$^{17}\text{O}$	0,037	SMOW e PDB
		$^{18}\text{O}$	0,203	
$^{14}\text{N}$	99,633	$^{15}\text{N}$	0,366	$\text{N}_2$ atm <sup>c</sup>
$^{32}\text{S}$	95,020	$^{34}\text{S}$	4,220	

<sup>a</sup>Rocha do fóssil *Belemnitella americana* da formação PeeDee (PDB) da Carolina do Sul, EUA; <sup>b</sup>“Standard Mean Water” (SMOW); <sup>c</sup>Gás N atmosférico; <sup>d</sup>Mineral Troilito da cratera do meteorito do “Canyon Diablo” (CDT), Arizona, EUA.

Nas últimas três décadas, constata-se um crescente uso de isótopos estáveis nos mais diferentes campos da ciência. Os primeiros estudos envolvendo a aplicação dos isótopos estáveis foram realizados no início da década de 50 por geoquímicos e paleo-ocenógrafos que desenvolveram uma rigorosa base teórica e empírica para a integração dos isótopos aos estudos dos ciclos globais dos elementos, analisando, inicialmente, as condições climáticas do passado, os

sistemas de expansão hidrotérmicos e a origem das formações rochosas (Lajtha e Michener, 1994). Porém, apenas recentemente, nos anos 80, os ecólogos têm aplicado essa técnica. As razões para isso podem ser atribuídas, não apenas a falta de conhecimento em química e geoquímica, o que permitiria compreender as variações naturais na composição dos isótopos estáveis em organismos animais e vegetais, como também, ao fato de que as determinações das razões isotópicas requererem equipamentos, normalmente não disponíveis aos ecólogos (Peterson e Fry, 1987).

O uso dos isótopos estáveis em estudos ecológicos foi intensificado nas décadas de 80 e 90, sendo utilizados principalmente os isótopos de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) (Kennedy e Krouse, 1990), baseando-se na determinação da relação  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  no material em estudo. Na natureza, aproximadamente 98,89 % de todo o carbono são  $^{12}\text{C}$ , e 1,11 % são  $^{13}\text{C}$ , sendo que a taxa desses dois isótopos pode variar como resultado do fracionamento durante processos físicos, químicos e biológicos (Boutton, 1991). Sua utilização como marcador de carbono (C) ao longo da cadeia alimentar baseia-se na suposição de que o consumidor reflete isotopicamente a sua dieta (Martinelli et al., 1988), havendo enriquecimento em  $^{13}\text{C}$  com aumento do nível trófico em cerca de 1 ‰ (Forsberg et al., 1993) a 2 ‰ (France e Peters, 1997) em relação à dieta.

Os valores do enriquecimento relativo do carbono-13 são expressos na terminologia dos isótopos estáveis, em delta per mil (‰) da razão isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  da amostra em relação ao padrão internacional, *PeeDee Belemnite* (PDB).

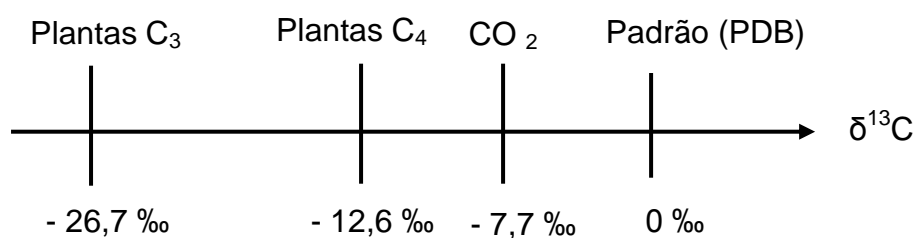
A terminologia empregada no estudo da variabilidade isotópica dos elementos químicos é resultante da expressão:

$$\delta X_{(\text{amostra, padrão})} = [(R_{\text{amostra}} / R_{\text{padrão}}) - 1] * 10^3$$

A simbologia adimensional empregada na equação significa que:  $\delta X_{(\text{amostra, padrão})}$  é o enriquecimento da razão isotópica do elemento químico em questão, de uma dada amostra em relação ao seu respectivo padrão internacional, em partes per mil (‰) e R significa razão isotópica do isótopo *pesado* em relação ao *leve* (exemplo:  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) da amostra e do padrão, respectivamente (Ducatti, 2007). Assim, um aumento nos valores de R denota incremento do montante de isótopos pesados

(Peterson e Fry, 1987). As mensurações dos valores isotópicos  $\delta^{13}\text{C}$  são efetuadas no espectrômetro de massa de razões isotópicas ou “Isotope Ratio Mass Spectrometers” (IRMS), com erro analítico da ordem de 0,2 ‰. No IRMS, as amostras são submetidas à alta temperatura em tubo de combustão, e em presença de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e óxido de cobre ( $\text{CuO}$ ), são transformadas em compostos de carbono e nitrogênio, como o  $\text{CO}_2$  e  $\text{N}_2$ , na presença de cobre. Os materiais contendo enxofre são convertidos em sulfatos e transformados quantitativamente em  $\text{SO}_2$ . Esses gases puros são então separados em uma coluna cromatográfica gasosa e analisados no espectrômetro de massa e a composição isotópica da amostra é comparada com um padrão conhecido (Peterson e Fry, 1987). Valores isotópicos negativos significam que a amostra apresenta, relativamente, menos isótopo pesado que o padrão internacional (Ducatti, 2007).

A fonte primária do carbono para as plantas terrestres é o  $\text{CO}_2$  atmosférico, o qual possui valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de aproximadamente - 7,7 ‰. De acordo com seu ciclo fotossintético, as plantas podem ser classificadas, na sua maioria, em dois grupos principais:  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , onde o primeiro composto orgânico a ser sintetizado é o ácido carboxílico, com três e quatro átomos de carbono, respectivamente. A via fotossintética  $\text{C}_3$  inclui a maioria das árvores, arbustos, soja, arroz, trigo, cevada, entre outros, e a via fotossintética  $\text{C}_4$  é encontrada no milho, sorgo, cana-de-açúcar e outras gramíneas tropicais (Figura 1). Produtos e subprodutos de origem animal também podem pertencer a um desses dois grupos fotossintéticos; isto vai depender da fonte de alimentação disponível inicialmente para este animal. As diferenças naturais no enriquecimento relativo do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) entre espécies de plantas oferecem a possibilidade de utilizá-las como marcadores em animais, sem a necessidade de sintetizar compostos especificamente marcados, além de evitar os problemas de saúde e segurança associados ao uso de isótopos radioativos (Ducatti, 2007).



**Figura 1.** Régua isotópica, com escala em  $\delta$  ‰, para o carbono-13 (Ducatti, 2007).

As plantas dos ciclos fotossintéticos  $C_3$  e  $C_4$  e seus derivados, ou os seus subprodutos, apresentam valores isotópicos distintos. A diferença isotópica entre elas, da ordem de 14 ‰, permite realizar experimentos biológicos com alimentação, utilizando-se a técnica de diluição isotópica de somente duas fontes de alimentação de cada vez (Fry e Sherr, 1984).

A alternância da fonte isotópica, após determinado intervalo de tempo, gera resultados de enriquecimento isotópico relativo, ou delta per mil ( $\delta$  ‰) versus tempo em dias, com perfil aproximado de uma onda quadrática, específica para cada tecido ou subproduto analisado (Jones et al., 1979 citado por Ducatti et al., 2002). Normalmente, a continuidade dos valores isotópicos obtidos nos subprodutos, entre os patamares isotópicos gerados pela Fonte A e posteriormente pela Fonte B, é uma função exponencial do tempo. A exploração desta função exponencial abre perspectivas de novas interpretações nestes experimentos, visando o estudo da síntese e degradação de metabólitos sob regime de dieta à base de produtos ou subprodutos originários do ciclo fotossintético  $C_3$  ou  $C_4$ , ou misturas isotópicas, com valores de  $\delta$  ‰ distintos (Ducatti et al., 2002).

No entanto, muitos aspectos devem ser considerados antes da aplicação de isótopos estáveis como marcadores do metabolismo intermediário. É geralmente aceito que os valores  $\delta^{13}C$  ( $^{13}C/^{12}C$ ) de um animal são semelhantes aos de sua dieta, com variação aproximada de 1 ‰ a 2 ‰ (Fry e Sherr, 1984), valores que podem ser maiores ou menores que o da dieta. No entanto, os valores  $\delta^{15}N$  ( $^{15}N/^{14}N$ ) são maiores que o da dieta (aumento de 3 - 4 ‰); isto é conhecido como fracionamento isotópico (Minagawa e Wada, 1984). Muitos autores usam  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$  como marcadores naturais no pressuposto de que estes índices são homoganeamente distribuídos em todos os tecidos de um organismo (Beltrán et al., 2009). No entanto, algumas fontes potenciais de variação da composição isotópica dos animais têm sido encontrados recentemente. Em muitas espécies, os valores de  $\delta^{13}C$  ou  $\delta^{15}N$  de um animal variam com o tipo de alimento, o nível trófico ou as relações produtor-consumidor (Vanderklift e Ponsard, 2003). Os valores também variam entre os órgãos e componentes do tecido de um organismo (Gannes et al., 1998). Nos peixes, a abundância natural de isótopos estáveis depende da proporção dos principais componentes do tecido (Pinnegar e Polunin, 1999; em truta arco-íris) e das fontes de nutrientes (Gaston e Suthers, 2004; em peixes de recifes

rochosos). Todas as variações devem-se ao fracionamento de isótopos que ocorre durante os processos metabólicos e de desaminação e descarboxilação.

Cada tecido ou fração bioquímica pode apresentar memória isotópica própria em função do conteúdo isotópico da alimentação e da taxa de renovação bioquímica. Entende-se *turnover* isotópico como sendo a renovação contínua dos elementos químicos e, conseqüentemente, de seus isótopos que compõem o tecido corporal ou o organismo como um todo. O *turnover* pode ocorrer por meio de renovação tecidual resultante do processo de síntese e degradação em tecidos adultos e/ou pelo próprio crescimento nos tecidos em formação (diluição isotópica) (Ducatti, 2007).

As investigações científicas demonstraram que as composições isotópicas dos tecidos de animais dependem principalmente da alimentação, da água ingerida e dos gases inalados, assim como, dos processos metabólicos (Kennedy e Krouse, 1990).

O período em que a concentração isotópica tecidual reflete a assinatura isotópica de uma dieta em particular depende, em parte, da taxa de *turnover* no tecido, síntese e catabolismo de cada componente tecidual. Tecidos com *turnover* rápido refletirão dietas mais recentes, enquanto aqueles com taxas de *turnover* mais lento refletirão dietas de períodos mais remotos. De modo geral, os tecidos metabolicamente ativos (fígado, pâncreas e tecido gorduroso) apresentam taxas de *turnover* mais rápidas que os tecidos menos ativos metabolicamente, como o colágeno dos ossos (Ducatti, 2007).

Análises da variação natural da abundância de isótopos estáveis apresentam-se como uma ferramenta potencialmente poderosa para as pesquisas em fisiologia, uma vez que a razão isotópica dos elementos do corpo dos consumidores geralmente assemelha-se a suas dietas (Ducatti, 2007).

Assim, avanços nessa tecnologia têm aberto novas possibilidades para análises de materiais biológicos em estudos ambientais. A nova instrumentação também tem facilitado as interpretações ecológicas, muitas vezes, resultando numa considerável economia de esforços e recursos financeiros exigidos anteriormente nas atividades de campo (Unkovich et al., 2001).

## 5. Utilização do método isotópico em estudos alimentares

A aplicação dos isótopos estáveis como traçadores naturais, em pesquisas na área de nutrição animal, vem aumentando nas últimas décadas. Esta técnica é indicada em situações que fontes dietéticas, isotopicamente distintas, estão disponíveis para os animais, uma vez que a composição isotópica dos tecidos e fluídos corporais depende principalmente de sua alimentação. Assim, dietas com assinaturas isotópicas distintas podem ser usadas para medir taxas de turnover, em todos os tecidos corporais do animal (Caldara et al., 2007).

Isótopos estáveis de carbono, nitrogênio, enxofre, hidrogênio e oxigênio são considerados, atualmente, ferramentas úteis aos fisiologistas, ecólogos e a outros pesquisadores que estudam os ciclos de matéria e energia no ambiente. Nos últimos vinte anos, essa técnica vem sendo aplicada em ambientes aquáticos e tem-se mostrado muito eficiente e promissora. Os isótopos estáveis de H e O são utilizados na determinação da composição da água utilizada pelos vegetais, já os isótopos de C, N e S são utilizados para elucidar vias fotossintéticas, processos fisiológicos nos vegetais ou na determinação das fontes de alimento para consumidores em cadeias alimentares aquáticas ou terrestres. Os isótopos estáveis estão presentes nos ecossistemas e sua distribuição natural reflete, de forma integrada, a história dos processos físicos e metabólicos do ambiente (Pereira e Benedito, 2007).

A influência da inundação anual do lago Coqueiro, no Pantanal Matogrossense, na disponibilidade de alimentos e na composição isotópica dos peixes foi estudada por Wantzen et al. (2002), que utilizaram análises isotópicas e de conteúdo estomacal. A cadeia alimentar do ambiente estudado foi baseada principalmente em carbono de origem C<sub>3</sub>. Entretanto, peixes capazes de alimentar-se de invertebrados terrestres, como o *Brycon microlepis*, apresentaram de 13 a 30 % do carbono de plantas C<sub>4</sub>, durante o período da cheia. Os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  apresentaram mudanças sazonais altamente significativas para alguns grupos alimentares e indicaram uma cadeia alimentar com três a quatro níveis tróficos. As mudanças isotópicas dos peixes entre os períodos hidrológicos foram mais acentuadas nas espécies onívoras. As espécies herbívoras e detritívoras foram mais influenciadas pelas mudanças na razão isotópica de carbono na dieta, afetada pelos processos biogeoquímicos, como respiração e metanogênese. Mudanças

isotópicas dos peixes, neste estudo, representaram um gradiente sazonal, associado com mudanças de habitat, devido à inundação periódica (Wantzen et al., 2002).

Durante dois anos, foi realizado um estudo da disponibilidade de alimentos e do crescimento de carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e cabeça grande (*Aristichthys nobilis*) utilizando isótopos estáveis e análise do conteúdo intestinal, na Baía Meiliang do lago Taihu, na China. Tanto a carpa prateada como a cabeça grande apresentaram-se mais ricas em  $\delta^{13}\text{C}$  no ano de 2005 do que em 2004, o que foi atribuído a dois fatores: diferenças entre composições isotópicas na base da cadeia alimentar e diferenças entre as composições dos itens predados. As diferenças nos padrões de crescimento das carpas prateada e cabeça grande em dois anos consecutivos de estudo podem ser atribuídas à deficiência no percentual de zooplâncton nos seus intestinos, em 2005, comparados com os de 2004. Com base em dois pressupostos possíveis, a diferença nas espécies de presas e na qualidade alimentar, possivelmente induziu uma variação interespecífica no nível trófico anual de carpa prateada e cabeça grande (Zhou et al., 2009).

A estimativa das fontes de energia, para larvas de oito espécies de peixes da várzea amazônica no estudo de Leite et al. (2002), indicou que muitas larvas em alguns estágios são herbívoras ou carnívoras primárias e que a energia fixada pelas plantas é passada quase diretamente para as larvas dos peixes, sem completar o ciclo alimentar microbial da cadeia. A principal fonte de energia das larvas foram as plantas  $\text{C}_3$ , embora a contribuição das gramíneas  $\text{C}_4$  seja importante para algumas espécies. Algas microscópicas, planctônicas ou epífitas, são provavelmente as principais plantas  $\text{C}_3$  que suportam a produção larval dos peixes.

A fim de investigar o potencial do método isotópico como um instrumento viável para estudos de digestibilidade aparente (CDA) em peixes, Oliveira et al. (2008) avaliaram os valores de CDA das dietas experimentais baseadas em ingredientes  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , através da comparação do método tradicional utilizando óxido crômico como marcador externo com o método dos isótopos estáveis de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Os autores observaram que a utilização do método isotópico para estimar o CDA pode reduzir o erro e requer menos esforço na coleta do material. No entanto, é importante levar em consideração que este método é limitado a determinação dos valores de CDA para os ingredientes ou dietas com diferentes assinaturas de  $\delta^{13}\text{C}$ .



Com o intuito de avaliar a contribuição dos isótopos estáveis do carbono e nitrogênio como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Jomori et al. (2008) administraram náuplios de *Artemia* e/ou dietas secas e observaram que as larvas até 12 dias após o início da alimentação exógena consumiram preferencialmente náuplios de *Artemia*. Entretanto, com a ingestão de dieta seca (três, seis e 12 dias após receberem *Artemia*) as larvas mostraram sinais de aproveitamento desse alimento, através da incorporação do carbono e nitrogênio da dieta em seus tecidos. A técnica dos isótopos estáveis foi bastante eficaz na indicação das fontes energéticas aproveitadas e metabolizadas pelas larvas, contribuindo para o aprimoramento das pesquisas que visam à possibilidade de substituir o alimento vivo precocemente na larvicultura de peixes, por dietas secas adequadas, sem prejuízos ao desempenho dos animais.

Para determinar a importância quantitativa e a qualitativa das principais fontes de energia do tambaqui do lago Camaleão, Amazônia Central, durante um ciclo hidrológico, Oliveira (2003) utilizou o método de análise de conteúdo estomacal e de composição isotópica investigando a dinâmica de incorporação de carbono e nitrogênio nos tecidos dos peixes. O grau de repleção estomacal e a importância relativa dos itens alimentares variaram com o nível de água, enquanto os isótopos estáveis de C e N mostraram a importância das plantas de via fotossintética C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>, e da macro e microfauna acompanhante na dieta do tambaqui e do zooplâncton, principal provedor de N para a espécie. O padrão de incorporação de C e N alimentar em tambaqui foi diferente para as dietas C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>. Diferenças nos valores nutricionais entre as dietas e a taxa de crescimento influenciaram a dinâmica de incorporação de C e N. A velocidade de reposição do C e N foi relacionada diretamente com a qualidade da fonte e funcionalidade do tecido. O tempo mínimo para a substituição de 99 % do sinal isotópico da dieta C<sub>3</sub> no músculo dos alevinos foi 85 dias. A combinação dos dois métodos mostrou a complexidade do hábito alimentar do tambaqui e sua dependência do pulso de inundação.

Além da aplicabilidade dos isótopos estáveis em estudos ecológicos, também são importantes e necessárias mais pesquisas acerca da dinâmica de incorporação de C e de N nos peixes, a partir dos estudos laboratoriais de nutrição e alimentação. Elas poderão possibilitar a determinação de contribuições relativas de determinada

fonte na composição dos peixes, e até mesmo dos seus diferentes tecidos, relacionando fontes, suas qualidades e suas quantidades (Oliveira, 2003).

## 6. Referências

ABIMORAD, E.G. **Digestibilidade e exigência de aminoácidos para juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 2008. 83 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2008.

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). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 5, p.1101-1109, 2004.

ABIMORAD, E. G.; SQUASSONI, G. H.; CARNEIRO, D.J. Apparent digestibility of protein, energy and amino acids in some selected feed ingredients for pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, p. 374-380, 2008.

ADAMIDOU, S.; NENGAS, I.; ALEXIS, M.; FOUNDOULAKI, E.; NIKOLOPOULOU, D.; CAMPBELL, P.; KARACOSTAS, I.; RIGOS, G.; BELL, J. G.; JAUNCEY, K. Apparent nutrient digestibility and gastrointestinal evacuation time in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing different levels of legumes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 289, p.106-112, 2009.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2010. 606p.

BARBIERI, R. L.; LEITE, R. G.; STERMAN, F. A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Food passage time through the alimentary tract of a brazilian teleost fish, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) using radiography. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 35, n. 1, p.32-36, 1998.

BEERLI, E. L.; LOGATO, P. V. R.; FREITAS, R. T. F. Alimentação e comportamento de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p.149-155, 2004.

BELTRÁN, M.; FERNÁNDEZ-BORRÁS, J.; MÉDALE, F.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J.; KAUSHIK, S.; BLASCO, J. Natural abundance of  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  in fish tissues and the use of stable isotopes as dietary protein tracers in rainbow trout and gilthead sea bream. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, p.9-18, 2009.

BICUDO, A. J. A. **Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos**. 2008. 123f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BOUTTON, T. W.; TYRRELL, H. F.; PATTERSON, B. W.; VARGA, G. A.; KLEIN, P. D. Carbon kinetics of milk formation in holstein cows in late lactation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, p. 2336-2645, 1988.

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of natural materials: I. Sample preparation and mass spectrometric analysis. In: COLEMAN, D. C.; FRY, B. **Carbon isotope techniques**. London: Academic Press, 1991.

BRAGA, L. G. T.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K.; CYRINO, J. E. P. Trânsito gastrointestinal de dieta seca em *Salminus brasiliensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p.131-134, 2007.

BRENNER, M. **Determinação da exigência de proteína do pacu (*Colossoma mitrei* Berg, 1895)**. 1988. 87 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal: Manual de Identificação**. Brasília: Serviço de Produção de Informação, 2007. 227p.

CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A.; DENADAI, J. C.; ANDRADE, G. A.; GIOSO, M. M. Glutamina e turnover do carbono no tecido adiposo de leitões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p.1601-1607, 2007.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. Aquicultura, um mercado em expansão. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 4, p.393-396, 2005.

CARNEIRO, D. J.; CASTAGNOLLI, N. Nutrição do pacu, *Colossoma mitrei* (Berg, 1895), Pisces, Characidae. II Digestibilidade aparente da proteína em dietas isocalóricas. In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 1983. São Carlos. **Anais...** São Carlos: ABRAQ, 1984. p.125-131.

CARNEIRO, D. J.; CASTAGNOLLI, N.; MACHADO, C. R.; VERARDINO, M. Nutrição do pacu, *Colossoma mitrei* (Berg, 1895), Pisces, Characidae. I Níveis de proteína dietária. In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 1983. São Carlos. **Anais...** São Carlos: ABRAQ, 1984. p.105-119.

CARNEIRO, D. J.; RANTIN, F. T.; DIAS, T. C. R. MALHEIROS, E. B. Interaction between temperature and dietary levels of protein and energy in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). I. The effects on growth and body composition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 124 p.127-131, 1994.

DAWSON, T. E.; BROOKS, P. D. Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. In: UNKOVICH M. et al. (Ed.). **Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001. cap. I, p.1-18.

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

DUCATTI, C. Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p.01-10, 2007. Suplemento especial.

DUCATTI, C.; CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C.; MANCERA, P. F. A. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p.29-33, 2002.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations - Fisheries and Aquaculture Department. **The State of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2010. 197p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf>>. Acesso em: mar. 2011.

FAUCONNEAU, B.; CHOUBERT, G.; BLANC, D.; BREQUE, J.; LUQUET P. Influence of environmental temperature on flow rate of foodstuffs through the gastrointestinal tract of rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 34, p.27-39, 1983.

FIELD, H. A.; KELLEY, K. A.; MARTELL, L.; GOLDSTEIN, A. M.; SERLUCA, F. C. Analysis of gastrointestinal physiology using a novel intestinal transit assay in zebrafish. **Neurogastroenterology and Motility**, Malden, v. 21, p.304-312, 2009.

FORSBERG, B. R.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; MARTINELLI, L. A.; VICTORIA, R. L.; BONASSI, J. A. Autotrophic carbon sources for fish of the central Amazon. **Ecology**, Durham, v. 74, n. 3, p. 643-652, 1993.

FRANCE, R. L.; PETERS, R. H. Ecosystem differences in the trophic enrichment of  $^{13}\text{C}$  in aquatic food webs. **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 54, p.1255-1258, 1997.

FRY, B.; SHERR, E. B.  $\delta^{13}\text{C}$  measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. **Contributions in Marine Science**, Port Aransas, v. 27, p.13-47, 1984.

GALETTI, M.; DONATTI, C. I.; PIZO, M. A.; GIACOMINI, H. C. Big fish are the best: Seed Dispersal of *Bactris glaucescens* by the pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in the Pantanal, Brazil. **Biotropica**, Washington, v. 40, n. 3, p.386-389, 2008.

GANNES, L. Z., DEL RIO, C. M.; KOCH, P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 119A, n. 3, p.725-737, 1998.

GASTON, T. F.; SUTHERS, L. M. Spatial variation in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of liver, muscle and bone in a rocky reef planktivorous fish: the relative contribution of sewage. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 304, p.17-33, 2004.

GREY, J.; WALDRON, S.; HUTCHINSON, R. The utility of carbon and nitrogen isotope analyses to trace contributions from fish farms to the receiving communities of freshwater lakes: a pilot study in Esthwaite Water, UK. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 524, p.253-262, 2004.

HOSSAIN, M. A. R.; HAYLOR, G. S.; BEVERIDGE, M. C. M. An evaluation of radiography in studies of gastric evacuation in African catfish fingerlings. **Aquaculture International**, London, v. 6, p.379-385, 1998.

JOMORI, R. K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Stable carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, p.370-381, 2008.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fraction by plants and animal: implications for nutrition research. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 68, p.960-972, 1990.

LAJTHA, K.; MICHENER, R. H. **Stable isotopes in ecology and environmental science**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. 316p.

LANNA, E. A. T.; PEZZATO, L. E.; CECON, P. R.; FURUYA, W. M.; BOMFIM, M. A. D. Digestibilidade aparente e trânsito gastrointestinal em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em função da fibra bruta da dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, p.2186-2192, 2004.

LEITE, R. G.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; VICTÓRIA, R.; MARTINELLI, L. A. Stables isotope analysis of energy sources for larvae of eighth fish species from the Amazon floodplain. **Ecology of Freshwater Fish**, Copenhagen, v.11, p.56-63, 2002.

MARTINELLI, L. A.; VICTÓRIA, R. L.; MATSUI, E.; FORSBERG, B. R.; MOZETO, A. A. Utilização das variações naturais de  $\delta^{13}\text{C}$  no estudo de cadeias alimentares em ambientes aquáticos: princípios e perspectivas. **Acta Limnologica Brasiliensia**, Rio Claro, v. 11, p.859-882, 1988.

MINAGAWA, M.; WADA, E. Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food-chains-further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, London, v. 48, p.1135-1140, 1984.

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura Brasil 2008 – 2009**. Brasília, 2010. 99p. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/docs/anu%20da%20pesca%20completo2.pdf>>. Acesso em: mar. 2011.

OLIVEIRA, A. C. B. **Isótopos estáveis de C e de N como indicadores qualitativo e quantitativo da dieta do tambaqui (*Colossoma macropomum*) da Amazônia Central**. 2003. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

OLIVEIRA, A. C. B.; MARTINELLI, L. A.; MOREIRA, M. Z.; CYRINO, J. E. P. Determination of apparent digestibility coefficient in fish by stable carbon isotopes. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, p.10-13, 2008.

OLIVEIRA, R. C. O. Panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 2, n. 1, p.71-89, 2009.

PEREIRA, A. L.; BENEDITO, E. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 1-2, p.16-27, 2007.

PETERSON, B. J.; FRY, B. Stable isotopes in ecosystem studies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, New York, v. 18, p.293-320, 1987.

PINNEGAR, J. K.; POLUNIN, N. V. C. Differential fractionation of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. **Functional Ecology**, London, v. 13, p.225-231, 1999.

RESENDE, E. K. Migratory fishes of the Paraguay - Paraná Basin Excluding the Upper Paraná River. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAERS A. (Ed.). **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation states**, Victoria: World Bank, 2003. p. 99-155.

SALAM, A.; DAVIES, P. M. C. Effect of body weight and temperature on the maximum daily food consumption of *Esox lucius*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 44, p.165-167, 1994.

SCHEMANN, M. Control of Gastrointestinal Motility by the “Gut Brain” — The Enteric Nervous System. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 41, p.4-6, 2005.

SCHNAITTACHER, G.; KING, V. W.; BERLINSKY, D. L. The effects of feeding frequency on growth of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, p.370-377, 2005.

SILVA, A. J. **Aspectos da alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (BERG, 1895) (Pisces, Characidae), no Pantanal de Mato Grosso**. 1985. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/ Zoologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1985.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), incorporados em rações: digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p.1815-1824, 2003.

SILVA, E. C. S.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Influência do tipo de alimento e da temperatura na evacuação gástrica da Piranha caju (*Pygocentrus nattereri*) em condições experimentais. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 33, n. 1, p.145-156, 2003.

SINDIRAÇÕES - Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Setor de alimentação animal. **Boletim Informativo do Setor**. Março 2011. Disponível em: <<http://www.sindiracoes.org.br/images/stories/noticias/boletim%20mar%20E7o%20%202011%20final.pdf>>. Acesso em: maio 2011.



STOREBAKKEN, T.; AUSTRENG, E.; STEINBERG, K. A method for determination of feed intake in salmonids using radioactive isotopes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p.133-42, 1981.

STOREBAKKEN, T. Binders in fish feeds. I. Effect of alginate and guar gum on growth, digestibility, feed intake and passage through the gastrointestinal tract of rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 47, p.11-28, 1985.

STOREBAKKEN, T.; KVIEN, I. S.; SHEARER, K. D.; GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S. J. Estimation of gastrointestinal evacuation rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using inert markers and collection of faeces by sieving: evacuation of diets with fish meal, soybean meal or bacterial meal. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, p.291-299, 1999.

SVEIER, H.; WATHNE, E.; LIED, E. Growth, feed and nutrient utilisation and gastrointestinal evacuation time in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): the effect of dietary fish meal particle size and protein concentration. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 180, p.265-282, 1999.

UNKOVICH, M.; PATE, J.; McNEILL, A.; GIBBS, D. J. **Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001. 289p.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2010, p. 205-244.

USMANI, N.; JAFRI, A. K. Effect of fish size and temperature on the utilization of different protein sources in two catfish species. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, p.959-967, 2002.

VAN DER MEER, M. B.; HERWAARDEN, H.; VERDEGEM, M. C. J. Effect of number of meals and frequency of feeding on voluntary feed intake of *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 28, p.419-432, 1997.

VANDERKLIFT, M. A.; PONSARD, S. Sources of variation in consumer-diet  $\delta^{15}\text{N}$  enrichment: a meta-analysis. **Oecologia**, Berlin, v. 136, p.169-182, 2003.

VENOU, B.; ALEXIS, M. N.; FOUNTOULAKI, E.; NENGAS, I.; APOSTOLOPOULOU, M.; CASTRITSI-CATHARIOU, I. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 225, p.207-223, 2003.

VIDOTTI, R. M.; CARNEIRO, D. J.; VIEGAS, E. M. M. Acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 33, n. 1, p. 58-62, 2002.

WANTZEN, K. M.; MACHADO, F. A.; VOSS, M.; BORISS, H.; JUNK, J. W. Seasonal isotopic shifts of the Pantanal wetland, Brazil. **Aquatic Sciences**, Dübendorf, v. 64, p.239-251, 2002.

ZARATE, D. D.; LOVELL, R. T. Effects of feeding frequency and rate of stomach evacuation on utilization of dietary free and protein-bound lysine for growth by channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 5, p.17-22, 1999.

ZHOU, Q.; XIE, P.; XU, J.; KE, Z.; GUO, L. Growth and food availability of silver and bighead carps: evidence from stable isotope and gut content analysis. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, p.1616-1625, 2009.

## **CAPÍTULO 2 - Aplicação da técnica de isótopos estáveis de carbono na determinação do tempo de trânsito gastrointestinal em juvenis de pacu**

**Resumo** – Este estudo avaliou a metodologia dos isótopos estáveis de carbono como um método alternativo e mais apurado para determinar o tempo de trânsito gastrointestinal (TTG) em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), em comparação ao método convencional com a adição de marcadores de contraste na dieta. Foram utilizados 320 juvenis estocados em 32 tanques, que receberam duas dietas, uma baseada em ingredientes do ciclo fotossintético C<sub>3</sub> e outra baseada em ingredientes de origem C<sub>4</sub>, ambas contendo marcador inerte óxido de titânio (para tornar as fezes esbranquiçadas) e cultivados em duas temperaturas de água, 25 e 29 °C. Após 40 dias, as dietas foram trocadas: os animais que recebiam a dieta C<sub>3</sub> passaram a receber a dieta C<sub>4</sub> (C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>) e vice-versa (C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub>). As novas dietas continham marcador inerte óxido de cromo, para determinar o TTG através das duas metodologias: a convencional que utiliza marcadores de contraste e outra, sugerida neste estudo, por meio dos isótopos estáveis de carbono. As fezes foram coletadas por extrusão manual durante um período de 30 horas após a troca das dietas. Na metodologia dos marcadores inertes, as fezes receberam notas de 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 de acordo com a intensidade da mudança de coloração de branco para verde escuro. Na metodologia dos isótopos estáveis, as fezes foram analisadas para determinação da mudança da razão isotópica de carbono-13. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito réplicas. Os dados obtidos de desempenho produtivo foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), quando detectadas diferenças significativas. Os dados de TTG obtidos em ambas as metodologias avaliadas foram analisados segundo o modelo sigmoidal de regressão de Boltzmann. As médias de temperatura da água foram de  $25,10 \pm 0,07$  °C para água proveniente de mina, e de  $29,65 \pm 0,32$  °C para água de poço artesianos. O desempenho produtivo dos animais foi influenciado pelas temperaturas e dietas avaliadas, com obtenção de maior ganho em peso ( $72,17 \pm 5,95$  g) na temperatura de 29 °C e dieta C<sub>3</sub>. Para ambas as metodologias, o TTG foi considerado mais rápido (cerca de 6 horas) quando os animais foram mantidos a 29 °C e alimentados com a estratégia C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub>, e mais lento a 25 °C quando foi ofertado a

estratégia alimentar C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> (15 e 18 horas para a metodologia dos marcadores inertes e dos isótopos estáveis, respectivamente). A metodologia dos isótopos estáveis pode ser utilizada para determinar o TTG em juvenis de pacu.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, óxido de cromo, óxido de titânio, temperatura.

### **Application of stable carbon isotopes technique of determination of gastrointestinal transit time in juvenile of pacu**

**Abstract** – This study evaluated the stable carbon isotopes as an alternative and more accurate methodology to determine the gastrointestinal transit time (GTT) in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) compared with the conventional method with addition contrast markers in the diet. 320 juveniles were equally distributed in 32 tanks. These tanks were divided in two feedings groups containing titanium oxide as inert marker in their diets (to induce white feces). One group was fed with diets based on C<sub>3</sub> photosynthetic cycle plants, while the other group was fed with diets based on C<sub>4</sub> plants. Both feeding treatments were subdivided in two water temperatures cultures, 25 and 29 °C. After 40 days we changed the diets: animals that had been fed with C<sub>3</sub> diets were then fed with C<sub>4</sub> diets (C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>) and vice versa (C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub>). The new diets had chromium oxide as inert marker to determine the GTT through both methodologies: the conventional one which uses contrast markers, and other, suggested in this study, using stable carbon isotopes. Feces were collected by manual extrusion during 30 hours period after diet change. For the inert markers methodology the feces were graded in 0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 accordingly to the intensity of the color pattern that ranges from white to dark green. For the stable isotopes methodology the feces were analyzed to determine the change in the isotopic ratio of carbon-13. We conducted a completely randomized experimental design with four treatments and eight replicates. Data obtained from performance were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ), when significant differences were detected. GTT data, of both methodologies, were analyzed accordingly to the Boltzmann sigmoidal regression model. The average of water temperatures were  $25.10 \pm 0.07$  °C for mine water, and  $29.65 \pm 0.32$  °C for artesian well water. The animals performance was influenced by the

temperatures and diets evaluated, achieving greater weight gain ( $72.17 \pm 5.95$  g) at a temperature of 29 °C with diets based on C<sub>3</sub> plants. For both methodologies, the GTT was faster (for about 6 hours) when animals were kept in 29 °C and fed with C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub> diet strategy, and was slower in 25 °C when C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> diet strategy was offered (15 and 18 hours for inert markers and stable isotopes methodology, respectively). The stable isotopes methodology can be used to determine the GTT in pacu juvenile.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, chromium oxide, titanium oxide, temperature.

## 1. Introdução

O crescimento populacional acelerado dos últimos anos demanda desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que incrementem a produção animal. A piscicultura destaca-se como um setor com grande potencial, ainda pouco aproveitado na produção de alimentos (Ostrensky et al., 2008). Pesquisas visando maior conhecimento sobre peixes nativos são muito importantes no cenário da aquicultura brasileira, pois há várias espécies excelentes para produção; com um déficit de conhecimento para o sucesso da cadeia produtiva (Baldisserotto e Gomes, 2005).

Em estudos de nutrição, é importante conhecer os níveis de aproveitamento do alimento pela espécie, para que se possa subsidiar com informações mais precisas a elaboração de dietas que, efetivamente, o animal tenha o máximo aproveitamento (Silva et al., 2003). Uma das ferramentas que auxiliam nestas pesquisas, é a determinação do tempo de trânsito gastrointestinal. Dentre os métodos empregados para esta avaliação, pode-se citar a adição de meios de contraste na dieta, o uso de radiografias, que evidenciam o deslocamento da digesta no tubo digestivo (Talbot e Higgins, 1983), a dissecação do trato gastrointestinal para observação sequencial da presença de fezes ao longo do tempo (Meurer et al., 2002) e a utilização de isótopos radioativos (Storebakken et al., 1981).

Isótopos estáveis como ferramenta em estudos de nutrição animal vem sendo melhor utilizados na identificação de alimentos naturais que compõe a dieta de um determinado animal (Gamboa-Delgado e Le Vay, 2009), na determinação da digestibilidade de alimentos (Oliveira et al., 2008), em estudos de metabolismo em diferentes tecidos por meio do turnover dos isótopos de carbono e nitrogênio (Jomori et al., 2008) e de rastreabilidade de alimentos, de uso controlado ou não permitidos na alimentação animal (Carrijo et al., 2006). Esta técnica é indicada em situações em que fontes dietéticas, isotopicamente distintas, estão disponíveis para os animais, uma vez que a composição isotópica dos tecidos e fluídos corporais depende principalmente de sua alimentação (Caldara et al., 2007).

## 2. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo a avaliação da metodologia de isótopos estáveis de carbono para determinação do tempo de trânsito gastrointestinal em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), em comparação a metodologia de adição de marcadores de contraste (óxido de titânio e óxido de cromo) nas dietas, a fim de propor um método alternativo e mais apurado para tal análise.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a metodologia dos isótopos estáveis de carbono na determinação do tempo de trânsito gastrointestinal em juvenis de pacu, utilizando dietas baseadas em ingredientes do ciclo fotossintético C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>.
- Comparar o tempo de trânsito gastrointestinal de dietas para juvenis de pacu, em duas temperaturas de cultivo (25 e 29 °C), por meio da metodologia dos isótopos estáveis de carbono e da adição de marcadores de contraste (óxido de cromo e óxido de titânio) na dieta.
- Analisar o desempenho produtivo de juvenis de pacu cultivados em duas temperaturas de água (25 e 29 °C) e alimentados com dietas à base de ingredientes originários do ciclo fotossintético C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>.

### 3. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Centro de Aquicultura da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos no período de setembro a dezembro de 2010.

#### 3.1 Material biológico

Foram utilizados 320 juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com peso médio inicial de  $51,62 \pm 0,52$  g e comprimento total de  $13,95 \pm 0,11$  cm, procedentes da Piscicultura Poletini, localizada no município de Mogi Mirim – SP. Anteriormente ao presente experimento, os juvenis com peso médio aproximado de 20 g foram alimentados com ração comercial durante um período de dois meses (setembro e outubro) até atingirem cerca de 50 g, a fim de garantir a coleta da quantidade suficiente de fezes para as análises experimentais.

#### 3.2 Instalações e condições experimentais

Os peixes foram estocados em 32 tanques de fibrocimento com volume útil de 150 litros em uma densidade de 10 peixes por tanque. Os tanques eram abastecidos com água em sistema de fluxo contínuo; 16 tanques recebiam água proveniente de poço artesiano com temperatura em cerca de 29 °C; e os demais tanques eram abastecidos com água de mina com temperatura em torno de 25 °C. Em ambos os casos, a taxa de renovação foi de aproximadamente 80 L/ hora e todos os tanques eram dotados de aeração contínua e escoamento de água pelo fundo.

Durante o experimento, foram avaliadas diariamente, no período da manhã e da tarde (9 e 17 h), as variáveis físicas e químicas da água: temperatura (°C) e oxigênio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), usando um oxímetro digital YSI (*Yellow Spring Instruments*), modelo 550A. Semanalmente, foram avaliadas as variáveis químicas: pH, através do uso de um peagômetro de bolso da marca pH-TEK, modelo pH 100 e a condutividade elétrica ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ), através de um condutivímetro da marca pH-TEK. Ao final do experimento, também foram coletadas amostras de água para determinação da concentração de amônia (Koroleff, 1976), nitrato, nitrito (Mackereth et al., 1978), e alcalinidade total (Golterman et al., 1978). Uma vez a cada três dias,



foi realizada a sifonagem dos tanques experimentais, para retirada dos resíduos de alimentos e fezes, e a lavagem das pedras porosas, evitando-se entupimento e queda na oxigenação da água.

As dietas contendo óxido de titânio foram oferecidas até a saciedade aparente, na frequência de duas vezes ao dia (às 8 e 16 horas) durante o período experimental de 40 dias. A quantidade de dieta consumida em cada parcela foi calculada semanalmente, através da pesagem dos recipientes de armazenagem das rações, antes e após o consumo.

### **3.3 Dietas experimentais**

As análises dos ingredientes e das dietas foram realizadas no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) - Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos e no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Foram elaboradas duas dietas experimentais básicas contendo 1 % de inclusão do marcador inerte óxido de titânio, sendo uma dieta com base em ingredientes originários do ciclo fotossintético C<sub>3</sub> e outra com base em ingredientes do ciclo fotossintético C<sub>4</sub>, a fim de obter diferentes assinaturas isotópicas. Outras duas dietas possuíam formulação idêntica às duas anteriores, diferindo apenas em relação à inclusão de 1 % de óxido de crômio em substituição ao óxido de titânio, usado na metodologia de Storebakken (1985) (Tabela 1).

Os ingredientes das dietas foram finamente moídos em moinho martelo com peneira de porosidade padrão de 0,50 mm de diâmetro e misturados manualmente, sendo acrescentados de água, de modo a formar uma massa consistente apropriada para ser extrusada. As duas dietas foram processadas em extrusora e secas em estufa com circulação de ar a 55 °C, durante 24 horas. Depois de secas e, para melhor conservação do produto, as dietas foram colocadas em sacos plásticos etiquetados e armazenados em freezer.

**Tabela 1.** Fórmulas e composições isotópicas e nutricionais das dietas experimentais.

<b>Ingredientes (%)</b>	<b>Dieta C<sub>3</sub></b>	<b>Dieta C<sub>4</sub></b>
Farinha de salmão (63 % PB)	14,54	–
Farinha de vísceras de frango (58 % PB)	–	23,00
Farelo de soja	27,90	–
Glutenose de milho 60	–	12,00
Levedura de álcool	–	4,60
Farelo de trigo	18,80	–
Quirera de arroz	32,70	–
Milho	–	25,00
Sorgo	–	28,75
Óleo de soja	3,60	–
Óleo de milho	–	2,37
Suplemento vitamínico e mineral <sup>1</sup>	0,50	0,50
Caulim	0,50	0,50
Fosfato bicálcico	–	0,37
Calcáreo	–	0,70
L-Lis	0,41	1,05
DL-Met	0,05	0,04
L-Treo	–	0,12
Óxido de crômio ou titânio	1,00	1,00
Total	100,00	100,00
<b>Composição isotópica: <math>\delta_{\text{‰}}^{13}\text{C}</math> analisado</b>	<b>-26,56</b>	<b>-13,98</b>
<b>Composição nutricional analisada:</b>		
Matéria seca (%)	95,09	94,02
Proteína bruta (%)	29,62	29,6
Extrato etéreo (%)	4,69	7,05
Energia bruta (kcal/kg)	4446,02	4461,90
Fibra bruta (%)	2,83	1,58
Matéria mineral (%)	7,20	7,78
Extrato não nitrogenado <sup>2</sup> (%)	50,75	48,01

<sup>1</sup> Suplemento vitamínico e mineral: Vitamina A - 3000 UI/kg; Vitamina D<sub>3</sub> - 3000 UI/kg; Vitamina E - 200 mg/kg; Vitamina K - 6 mg/kg; Vitamina C - 350 mg/kg; Vitamina B<sub>12</sub> - 20 mcg/kg; Vitamina B<sub>1</sub> - 6 mg/kg; Vitamina B<sub>2</sub> - 8 mg/kg; Vitamina B<sub>6</sub> - 3 mg/kg; Biotina - 0,10 mg/kg; Ácido fólico - 1 mg/kg; Ácido pantotêmico - 20 mg/kg; antioxidante BHT - 125 mg/kg; Colina - 150 mg/kg; Niacina - 100 mg/kg; Ferro 100 mg/kg; Cobre - 10 mg/kg; Manganês - 70 mg/kg; Iodo - 5 mg/kg; Selênio - 0,15 mg/kg e Zinco - 150 mg/kg.

<sup>2</sup> ENN = MS – (PB + EE + MM + FB).

### 3.4 Delineamento experimental

Para a avaliação do desempenho produtivo, foi realizado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com quatro tratamentos em esquema fatorial 2 x 2, com oito repetições. O primeiro fator correspondia a duas temperaturas de cultivo (25 e 29 °C), o segundo fator, às duas dietas utilizadas, sendo uma baseada em produtos originários do ciclo fotossintético C<sub>3</sub> e outra do ciclo C<sub>4</sub>.

Na determinação do tempo de trânsito gastrointestinal, realizou-se um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com quatro tratamentos, sendo duas estratégias alimentares (C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> e C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub>) e duas temperaturas de cultivo (25 e 29 °C) com dez repetições. Neste caso, cada peixe de um tanque experimental foi considerado uma réplica. Foram retiradas as fezes dos dez peixes de um tanque experimental por tratamento a cada tempo de coleta de fezes (3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 e 30 horas após a primeira alimentação) utilizadas para determinação do tempo de trânsito gastrointestinal nas duas metodologias avaliadas (adição de marcadores inertes na dieta e utilização de isótopos estáveis de carbono).

### 3.5 Parâmetros de desempenho produtivo

O desempenho produtivo dos animais foi avaliado para verificar se realmente estavam ingerindo as dietas ofertadas e assim, garantir que no momento da coleta de fezes, haveria amostra suficiente em todos os tratamentos para as análises posteriores. Para analisar os parâmetros de desempenho, todos os peixes de cada tanque foram coletados no início e final do experimento. O desempenho produtivo foi analisado através da taxa de sobrevivência, ganho em peso médio, conversão alimentar aparente, consumo médio diário de dieta, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência protéica, de acordo com as seguintes fórmulas:

- Sobrevivência (%) =  $(n^{\circ} \text{ inicial peixes} - n^{\circ} \text{ final peixes} / n^{\circ} \text{ inicial peixes}) \times 100$ ;
- Ganho em peso médio (g) = peso médio final – peso médio inicial;

- Conversão alimentar aparente = consumo de alimento / ganho em peso;
- Consumo diário de dieta por peixe (g) = consumo de dieta por peixe / tempo (dias);
- Taxa de crescimento específico (% / dia) =  $[(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) \times 100 / \text{tempo}]$ ;
- Taxa de eficiência protéica = ganho em peso médio / proteína bruta consumida.

### 3.6 Determinação do tempo de trânsito gastrointestinal

Na avaliação do tempo de trânsito gastrointestinal das dietas experimentais, foram utilizadas duas dietas de mesma constituição básica (Tabela 1), elaboradas com assinaturas isotópicas próximas aos de produtos originários do ciclo fotossintético C<sub>3</sub>, sendo que uma delas continha 1 % de óxido de titânio, marcador inerte que provoca coloração esbranquiçada as fezes, de forma a acentuar o início do efeito do óxido de crômio, marcador que confere coloração verde e posteriormente, foi utilizado na segunda dieta. As outras duas dietas, também eram de mesma constituição básica e foram elaboradas com assinaturas isotópicas próximas aos de produtos originários do ciclo fotossintético C<sub>4</sub>, sendo que uma continha 1 % de óxido de titânio e a outra 1 % de óxido de crômio.

Durante 40 dias, os peixes foram alimentados com a primeira dieta que continha 1 % de óxido de titânio, tanto para a dieta C<sub>3</sub> quanto para C<sub>4</sub>. Posteriormente a esse período, dois peixes de cada tanque experimental foram anestesiados em benzocaína (concentração de 0,1 g/L) para realização da coleta de fezes, que constituiu o tempo 0h, ou seja, os animais ainda expressavam o sinal isotópico da primeira dieta ofertada. Este procedimento foi realizado a fim de verificar, durante 40 dias, se os animais realmente já expressavam, nas fezes, o sinal isotópico de carbono da dieta que estavam recebendo.

Após 40 dias, houve a troca das dietas: os animais passaram a receber as dietas com 1 % de óxido de crômio e nova composição isotópica, ou seja, os peixes que recebiam dieta C<sub>3</sub> passaram a receber dieta C<sub>4</sub> (C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>), e os peixes que

recebiam dieta C<sub>4</sub> passaram a receber dieta C<sub>3</sub> (C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub>). Nesse mesmo dia, os peixes foram alimentados à vontade, às 8 e 16 horas, e as fezes dos peixes de cada tanque experimental, foram examinadas a cada período de tempo. A primeira amostragem foi realizada após três horas da primeira alimentação, sendo coletadas as fezes de todos os dez peixes de uma réplica de cada tratamento, constituindo uma somatória de 40 peixes por horário de coleta. As amostragens subsequentes foram realizadas em intervalos de três horas, até completar 30 horas de coleta; dessa forma os tempos analisados foram: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 e 30 horas após a primeira alimentação.

Em cada horário de observação, as fezes foram coletadas por extrusão manual, quando cada peixe, depois de anestesiado em benzocaína (concentração de 0,1 g/L), foi submetido a compressão na região abdominal, no sentido das nadadeiras ventrais em direção ao ânus, para averiguação da coloração das fezes de todos os juvenis de uma réplica de cada tratamento. Na avaliação do tempo de trânsito gastrointestinal (TTG) segundo o método descrito por Storebakken (1985), as fezes passavam da cor esbranquiçada para verde-escura e as amostras receberam notas de 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00, de acordo com a intensidade da cor (verde) em cada horário de observação.

Na avaliação do tempo de trânsito gastrointestinal através da metodologia dos isótopos estáveis de carbono, as fezes foram depositadas em tubos tipo Eppendorf de 1 mL e secas em estufa com circulação de ar a 55 °C, durante 24 horas, para posterior análise isotópica. Após a secagem, devido à pequena quantidade retirada dos animais, as fezes foram trituradas até obtenção de partículas menores com aspecto de pó, dentro do tubo tipo Eppendorf com auxílio de um pistilo de metal, para evitar perdas. As amostras de ração foram moídas em nitrogênio líquido (-196 °C) com o auxílio de almofariz e pistilo, até redução mínima da granulometria para obtenção de amostras bem homogêneas. Posteriormente, uma alíquota de amostra de aproximadamente 60 µg, foi colocada em cápsulas de estanho (6 x 4 mm) para as análises no espectrômetro de massa. Em todo o procedimento para preparação das amostras, o uso de luvas cirúrgicas descartáveis e o cuidado com a lavagem das mãos e dos materiais (pinças, almofariz, pistilo, etc.) entre a manipulação das amostras foram práticas indispensáveis para evitar contaminação.

As amostras de fezes e das rações foram analisadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em Ciências da Vida do Departamento de Física e Biofísica da UNESP de Botucatu. A composição isotópica em carbono das amostras foi determinada através da combustão das cápsulas de estanho contendo as amostras sob fluxo contínuo de hélio, em um analisador elementar (Carlo Erba, CHN 1110) acoplado a um espectrômetro de massa Thermo Finnigan Delta Plus. O gás CO<sub>2</sub> resultante da combustão das amostras foi analisado com erro analítico de 0,2 ‰. A razão isotópica é expressa pela notação delta (δ), em partes por mil (‰), e comparada com um padrão conhecido. Para o carbono, o padrão internacional utilizado é o PDB (fóssil de *Belemnitella americana* da formação Peedee da Carolina do Sul / EUA). A razão isotópica foi calculada por meio da expressão:

$$\delta X_{(amostra, padrão)} = [(R_{amostra} / R_{padrão}) - 1] * 10^3$$

Onde: R é a razão isotópica, <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, da amostra e do padrão, respectivamente.

Desta forma, todos os valores da composição isotópica de carbono de uma matriz passam a ser relacionadas, ou relativas, ao padrão PDB, cujo valor passa a ser o zero e as amostras terão sempre valores abaixo do zero do padrão, ou seja, serão negativas.

A fim de padronizar a análise do TTG para as duas metodologias avaliadas, as notas e os dados isotópicos obtidos foram compilados em curva padrão, e os resultados foram analisados pelo modelo sigmoidal de regressão de Boltzmann. O Modelo de Boltzmann tem por equação geral, a expressão:

$$y = [A_1 - A_2 / (1 + e^{(x-x_0)/dx})] + A_2,$$

Onde:

$x_0$ : ponto de inflexão da sigmóide;

$dx$ : constante de tempo;

$A_1$ : valor inicial do eixo Y  $\rightarrow$   $y(-\infty)$ ;

$A_2$ : valor final do eixo Y  $\rightarrow$   $y(+\infty)$ .

O valor de Y, em  $x_0$ , é a metade da distância entre os dois valores limites  $A_1$  e  $A_2$ :  $y(x_0) = (A_1 + A_2) / 2$ . O valor de Y muda drasticamente, conforme variações de X.

A magnitude destas variações é aproximadamente dx. Nas duas metodologias avaliadas, o tempo de trânsito gastrointestinal dos peixes de um tratamento experimental foi considerado completo quando observado o primeiro valor a atingir o patamar de equilíbrio da curva padrão, ou seja, quando não houve mais alteração significativa na nota máxima atribuída as fezes, e o sinal isotópico já estava próximo ao sinal da nova dieta ofertada permanecendo praticamente constante.

### **3.7 Análises estatísticas**

Nas análises estatísticas dos resultados de desempenho produtivo, a normalidade dos dados e a homogeneidade da variância foram testadas antes da aplicação da Análise de Variância (ANOVA). Quando encontradas diferenças estatísticas entre as variáveis analisadas, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de significância. Os dados foram analisados pelo programa SAS (Statistical Analyses System), versão 9.0.

Na avaliação do tempo de trânsito gastrointestinal, padronizou-se o modelo sigmoidal de regressão de Boltzmann para analisar os resultados das duas metodologias de determinação do TTG avaliadas (utilização de marcadores inertes e isótopos estáveis de carbono), com auxílio do programa Origin 6.0 Professional (Microcal Software Original 6.0 Professional, 1999).

## **4. Resultados e discussão**

### **4.1 Variáveis físico-químicas da água**

As médias diárias observadas para as variáveis físicas e químicas das águas de diferentes origens e temperaturas que abasteciam o sistema de cultivo durante o período experimental são apresentadas na Tabela 2.

As médias de temperatura da água foram de  $25,10 \pm 0,07$  °C para água proveniente de mina, e de  $29,65 \pm 0,32$  °C para água de poço artesiano, a fim de avaliar o tempo de trânsito gastrointestinal nestas diferentes temperaturas de cultivo. Para realizar o manejo alimentar adequado de uma espécie, devem ser estudados os fatores que influenciam a ingestão dos alimentos, e a temperatura da água é um fator importante no cultivo de peixes, pois influencia diretamente a quantidade de alimento a ser fornecido, horário de arraçoamento, frequência e ritmo de alimentação, nos diferentes sistemas de criação (Frasca-Scorvo et al., 2001).

**Tabela 2.** Valores médios diários dos parâmetros físico-químicos da água dos tanques experimentais a 25 e 29 °C.

<b>Parâmetros avaliados</b>	<b>Temperatura de 25 °C<sup>1</sup></b>	<b>Temperatura de 29 °C<sup>2</sup></b>
Temperatura (°C)	25,10 ± 0,07	29,65 ± 0,32
Oxigênio dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	5,25 ± 0,18	4,61 ± 0,14
pH	6,37 ± 0,19	7,55 ± 0,13
Alcalinidade total (mg.L <sup>-1</sup> )	17,88 ± 0,63	100,13 ± 0,85
Condutividade elétrica (µS.cm <sup>-1</sup> )	41,13 ± 0,75	190,54 ± 2,30
Amônia total (µg.L <sup>-1</sup> )	324,61 ± 36,75	193,32 ± 38,81
Nitrato (µg.L <sup>-1</sup> )	993,57 ± 11,49	257,23 ± 28,45
Nitrito (µg.L <sup>-1</sup> )	5,02 ± 2,41	67,60 ± 18,43

<sup>1</sup> Água proveniente de mina.

<sup>2</sup> Água proveniente de poço artesiano.

Segundo Boyd (1982), a concentração de oxigênio da água é dependente da temperatura, estando os valores médios encontrados dentro dos limites aceitáveis para as espécies de peixes tropicais. O abastecimento contínuo dos aquários experimentais, com alta taxa de renovação de água, propiciou a estabilidade desses valores e a manutenção dos teores de oxigênio dissolvido.

Os valores médios de pH (potencial hidrogeniônico) da água observados no experimento com juvenis podem ser considerados satisfatórios para um bom desenvolvimento dos peixes. Segundo Boyd (1981) os níveis de pH desejáveis para criação de peixes de águas quentes estão entre 6,5 e 9,0.

Os níveis de alcalinidade total (teor de bases tituláveis na água) para a água a 29 °C, apresentaram valores dentro do limite preconizado por Sipaúba-Tavares (1995), que recomenda para cultivo de peixes valores acima de 20 mg de CaCO<sub>3</sub>/L de água. Nos tanques com água a 25 °C, os valores ficaram ligeiramente abaixo do recomendado, entretanto este fato não foi um fator limitante no desempenho e sobrevivência dos pacus.

Por outro lado, os níveis de condutividade elétrica da água dos tanques experimentais à 29 °C apresentaram valores elevados, acima dos observados por Sipaúba-Tavares (1995), que encontrou variação entre 23 a 71 µS/cm em viveiros



de cultivo de peixes. Os valores mais elevados constatados no presente trabalho devem-se, a presença de íons de cálcio na água de poço artesiano que abastecia os aquários experimentais à 29 °C; entretanto este fato não comprometeu a sobrevivência, nem o crescimento dos animais, pois não houve mortalidade e os peixes não apresentaram nenhum sinal patológico.

Segundo Proença e Bittencourt (1994), o teor de amônia entre 400 a 2.500 µg/L é subletal, sendo que a concentração abaixo de 50 µg/L é considerada ideal para o desenvolvimento de peixes. Os valores encontrados neste estudo estão um pouco elevados, entretanto não comprometendo a sobrevivência dos animais.

Os níveis de nitrato estão dentro dos recomendados por Boyd (1990), abaixo de 5.000 µg/L. O valor máximo de concentração de nitrito aceitável em um cultivo é de 1,0 mg/L (Pádua, 1993 citado por Salvador et al., 2003), portanto os níveis encontrados neste trabalho estão dentro do limite preconizado.

#### **4.2 Desempenho produtivo**

Não foram observados sinais patológicos na superfície externa e mortalidade dos juvenis de pacu durante o experimento. Os resultados da análise de variância e dos testes de comparação de médias das variáveis de desempenho produtivo são apresentados na Tabela 3. Não houve diferença estatística significativa para o peso médio inicial dos juvenis ( $P > 0,05$ ), evidenciando uma homogeneidade inicial no lote.

O consumo diário de dieta por peixe foi influenciado pela temperatura ( $P < 0,05$ ), e foi maior na temperatura de 29 °C (2,66 g) que na de 25 °C (1,50 g), em 40 dias de cultivo. Segundo Alanärä (1994), a temperatura é um fator primário que controla o metabolismo, as necessidades nutricionais e o esvaziamento gástrico, e com isso, a atividade de alimentação dos peixes. Dias-Koberstein et al. (2004) trabalharam com duas temperaturas de cultivo para avaliar os efeitos na ingestão de alimentos pelo pacu (*Piaractus mesopotamicus*), também verificaram que os peixes ingeriram mais alimento na temperatura mais elevada de 27 °C (11,86 g), em relação a temperatura de 23 °C (9,14 g).

**Tabela 3.** Valores de F e médias para os parâmetros de desempenho de juvenis de pacu alimentados com dietas C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> em diferentes temperaturas de água.

<b>Estatísticas</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Ganho em peso (g)</b>	<b>Taxa de crescimento específico (% / dia)</b>	<b>Consumo diário de dieta / peixe (g)</b>	<b>Conversão alimentar aparente</b>	<b>Taxa de eficiência proteica</b>
<b>Médias p/ efeito de temperaturas:</b>							
• 29 °C	51,53 ± 0,54	113,62 ± 14,21	62,08 ± 14,23	2,61 ± 0,43	2,66 ± 0,20 a	1,35 ± 0,34	2,67 ± 0,51
• 25 °C	51,72 ± 0,50	84,49 ± 5,03	32,77 ± 4,76	1,63 ± 0,18	1,50 ± 0,23 b	1,39 ± 0,20	2,52 ± 0,34
<b>Médias p/ efeito de dietas:</b>							
• C3	51,60 ± 0,57	104,85 ± 20,20	53,25 ± 20,31	2,30 ± 0,66	2,01 ± 0,68	1,21 ± 0,10 a	2,85 ± 0,22 a
• C4	51,65 ± 0,48	93,26 ± 14,15	41,61 ± 14,10	1,94 ± 0,48	2,07 ± 0,57	1,53 ± 0,31 b	2,33 ± 0,44 b
<b>Valores de F (ANOVA) para:</b>							
Efeito da temperatura da água (T)	0,98 <sup>NS</sup>	107,25*	112,27*	120,94*	226,15 *	0,25 <sup>NS</sup>	1,5 <sup>NS</sup>
Efeito da dieta (D)	0,09 <sup>NS</sup>	16,96*	17,70*	17,12*	0,22 <sup>NS</sup>	14,93 *	19,22 *
Efeito da interação T x D	0,35 <sup>NS</sup>	8,96*	9,51*	7,89*	2,80 <sup>NS</sup>	1,55 <sup>NS</sup>	2,41 <sup>NS</sup>
<i>Coefficiente de Variação (%)</i>	1,04	8,03	16,50	11,87	10,39	16,93	13,04

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey.

<sup>NS</sup> não significativo.

\* significativo ao nível de 5 % de probabilidade.

Frasca-Scorvo et al. (2001) estudaram o comportamento alimentar do matrinxã, *Brycon cephalus* em tanques de cultivo, no período do ano em que as temperaturas estão mais baixas e também observaram que o consumo de ração foi maior quando a alimentação ocorreu ao meio do dia e à tarde, horários em que a água apresentou maiores valores de temperatura e também quando a dieta foi ofertada duas vezes ao dia. Carneiro et al. (1994) obtiveram baixo consumo de ração, com menores temperaturas da água (24 °C), em uma pesquisa na qual averiguaram a influência da temperatura sobre o aproveitamento da proteína e da energia das dietas por alevinos de pacu.

Angelini et al. (1992), determinaram as taxas de consumo de ração pelo pacu, com diferentes tamanhos (70, 370 e 500 g) e sob distintas temperaturas (20, 22, 24, 26, 28 e 30 °C) e observaram que a menor classe de tamanho de animais com peso aproximado de 70 g, apresentou maior peso final (cerca de 93 g) nas temperaturas de 28 e 30 °C.

Ferraz de Lima et al. (1988) sugeriram que a temperatura da água, provavelmente, tem um efeito maior nos peixes, do que qualquer outro fator. De outra forma, os peixes alimentam-se prioritariamente para suprir suas necessidades de energia, considerando que a ingestão voluntária do alimento é limitada nas dietas contendo alto teor energético (Boujard e Médale, 1994). Para as dietas estudadas, C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>, não houve efeito significativo ( $P > 0,05$ ) no consumo diário de alimento pelos peixes, pois a quantidade de energia bruta de ambas foi muito semelhante, 4446,02 e 4461,90 kcal/kg, respectivamente.

Para a conversão alimentar aparente e taxa de eficiência protéica, não ocorreram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre as médias obtidas para os peixes mantidos nas diferentes temperaturas da água estudadas, mas foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) com relação aos efeitos das dietas. A conversão alimentar aparente e a taxa de eficiência protéica apresentaram melhores resultados para a dieta baseada em ingredientes do ciclo fotossintético C<sub>3</sub>, durante o período experimental de 40 dias.

Em relação aos demais parâmetros de desempenho produtivo avaliados (peso final, taxa de crescimento específico e ganho em peso), houve efeito da interação entre temperatura da água e dieta. Os valores médios do peso final dos juvenis para a interação estão apresentados na Tabela 4, mostrando que os animais

que receberam dieta C<sub>3</sub> na temperatura de 29 °C apresentaram a maior média de peso final (123,62 ± 5,60 g).

**Tabela 4.** Valores médios de peso final (g) de juvenis de pacu para o efeito de interação entre temperaturas da água e dietas, aos 40 dias de experimento.

Temperaturas da água	Dietas	
	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
29 °C	123,62 ± 5,60 Aa	103,62 ± 13,00 Ba
25 °C	86,07 ± 5,74 Ab	82,91 ± 3,92 Ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical).

Resultados semelhantes também foram observados para a taxa de crescimento específico (Tabela 5) e ganho em peso (Tabela 6) que apresentaram sempre as maiores médias na temperatura de 29 °C, quando os animais foram alimentados com a dieta baseada em ingredientes do ciclo fotossintético C<sub>3</sub> (valores de 2,91 ± 0,16 % / dia e 72,17 ± 5,95 g, respectivamente).

**Tabela 5.** Valores médios da taxa de crescimento específico (% / dia) de juvenis de pacu para efeito de interação entre temperaturas da água e dietas, durante 40 dias de experimento.

Temperaturas da água	Dietas	
	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
29 °C	2,91 ± 0,16 Aa	2,30 ± 0,40 Ba
25 °C	1,68 ± 0,20 Ab	1,57 ± 0,14 Ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical).

Segundo Cuenco et al. (1985), em um modelo de crescimento de peixes, as variáveis mais influentes são o tipo de alimentação e as mudanças de temperatura que as espécies são submetidas devido às características do ambiente em que vivem. Trabalhos realizados com pacu nas regiões Sul (Borghetti e Canzi, 1993), Sudeste (Bernardino e Ferrari, 1989; Ferrari et al., 1990; Angelini et al., 1992) e Centro-Oeste (Chabalin e Ferraz de Lima, 1988; Ferraz de Lima et al., 1988; Souza et al., 2002) do Brasil evidenciaram uma relação entre crescimento e temperatura, com desaceleração no ritmo de crescimento, durante as estações de outono e inverno.

**Tabela 6.** Valores médios do ganho em peso (g) dos juvenis de pacu para efeito de interação entre temperaturas da água e dietas, ao final de 40 dias de alimentação.

Temperaturas da água	Dietas	
	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
29 °C	72,17 ± 5,95 Aa	52,00 ± 13,00 Ba
25 °C	34,32 ± 5,50 Ab	31,22 ± 3,60 Ab

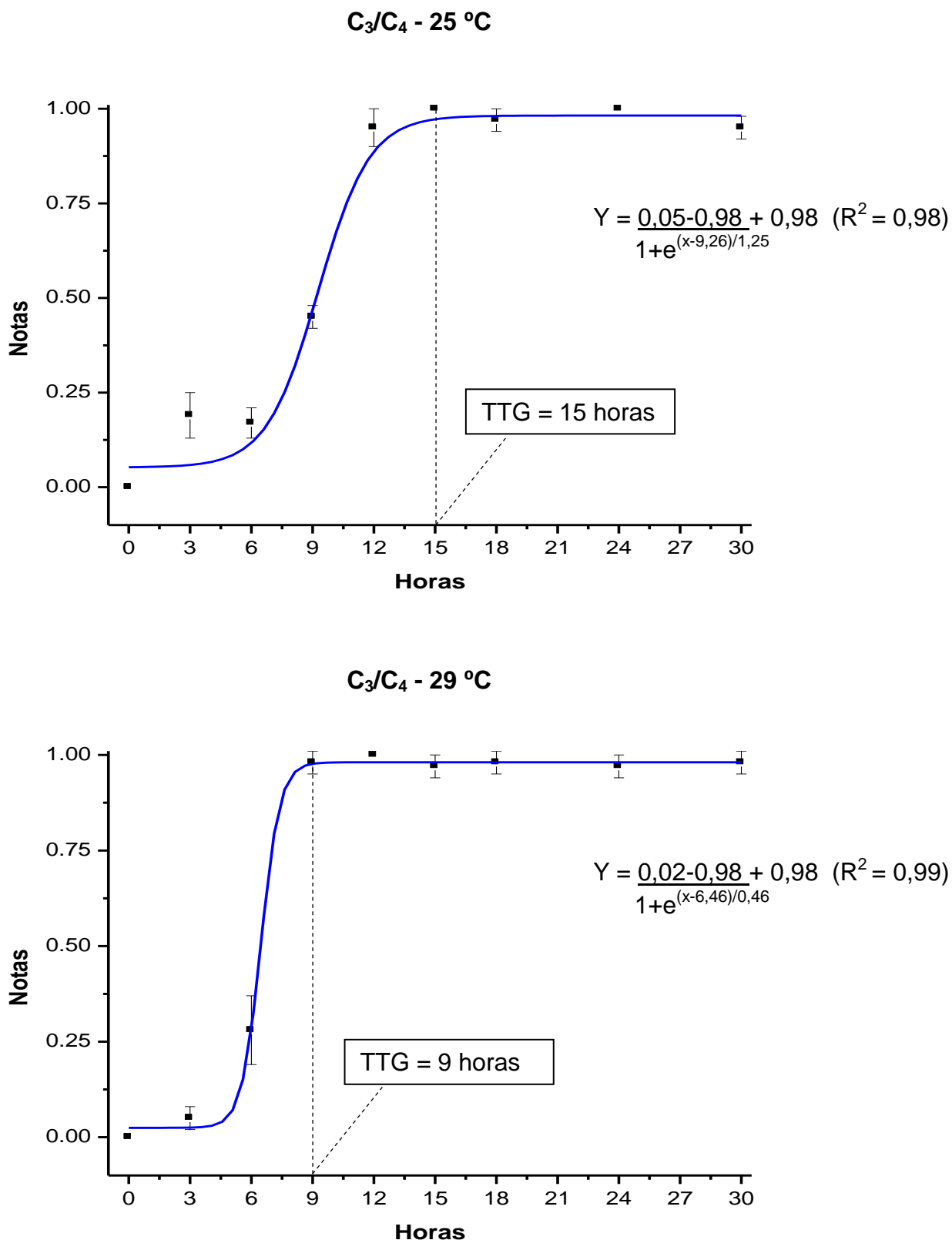
Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical).

O papel da temperatura na regulação da alimentação e crescimento é bastante descrito em peixes, sabe-se que o consumo é maior (Paul et al., 1995) e as taxas de crescimento tendem a ser mais altas (Dobson e Holmes, 1984), na primavera e verão. De acordo com Borghetti e Canzi (1993), a influência da temperatura da água e taxa de alimentação no crescimento de juvenis de pacu, em tanques-rede de 3,6 m<sup>3</sup>, durante 249 dias (de Julho de 1990 a Março de 1991), promoveram diferenças significativas no ganho em peso e conversão alimentar. Os melhores resultados foram observados para as maiores temperaturas e taxas de alimentação avaliadas (de 27 a 30 °C e 5 % do peso vivo, respectivamente).

No presente estudo as maiores médias de peso final, ganho em peso e taxa de crescimento específico dos juvenis de pacu também foram observadas na temperatura mais elevada (29 °C), sobretudo nos animais que receberam, durante 40 dias, a dieta C<sub>3</sub>. Apesar das dietas apresentarem composição bromatológica semelhante, isso pode ter ocorrido devido à diferença na qualidade das dietas, como por exemplo, o perfil de aminoácidos, uma vez que foram utilizadas diferentes fontes protéicas. Porém, este efeito nutricional somente foi observado a 29 °C, ou seja, mesmo uma dieta de melhor qualidade quando ofertada em baixas temperaturas não resultou em maior desempenho produtivo.

#### 4.3 Tempo de trânsito gastrointestinal

A curva padrão de distribuição das notas, segundo a coloração das fezes dos juvenis de pacu cultivados a 25 e 29 °C, em intervalos decorridos da alimentação com marcadores, são apresentados na Figura 1. A análise dos resultados pelo modelo de Boltzmann evidencia a troca da cor branca (presença de óxido de titânio) pela cor verde (presença de óxido de crômio), durante 30 horas de coleta após a troca da dieta C<sub>3</sub> pela C<sub>4</sub>.



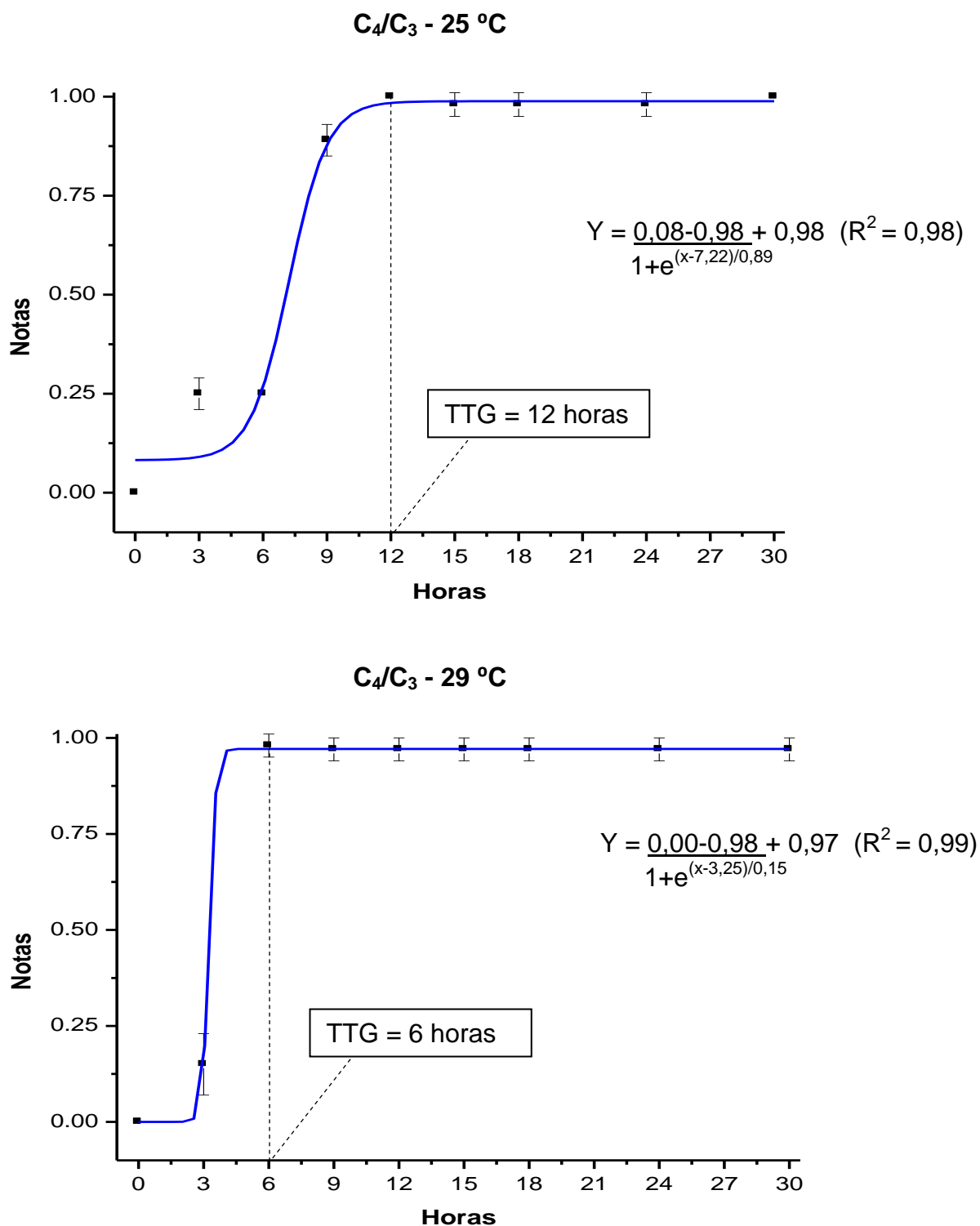
**Figura 1.** Notas (média  $\pm$  erro padrão) segundo a observação visual da mudança de coloração das fezes de juvenis de pacu cultivados a 25 e 29 °C, após a troca da dieta C<sub>3</sub> pela C<sub>4</sub> e do marcador óxido de titânio pelo crômio, analisadas pelo modelo de Boltzmann.

Na metodologia convencional utilizando adição de marcadores inertes na dieta, baseada em Storebakken (1985), foi possível ajustar as médias observadas com o modelo de regressão de Boltzmann. O primeiro valor do patamar de equilíbrio da curva padrão, para os juvenis de pacus que inicialmente receberam dieta C<sub>3</sub> e posteriormente C<sub>4</sub> (C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>) na temperatura de 25 °C, foi de 15h00min e para temperatura de 29 °C foi de 9h00min, ou seja, na temperatura mais elevada o TTG foi completado seis horas antes que na temperatura mais baixa.

Como os peixes são animais ectotérmicos, a variação da temperatura afeta seu metabolismo como um todo. Tem sido observado que o aumento da temperatura, dentro de uma faixa adequada para o desenvolvimento da espécie resultou num aumento dos coeficientes de digestibilidade aparente dos alimentos (Azevedo et al., 1998; Vidal Junior, 2000). Segundo Vidal Junior (2000), isto pode ser atribuído a elevação da atividade enzimática no lúmen intestinal, apesar de ser observado também uma redução do TTG e do tempo de esvaziamento do tubo digestivo (TETD) com a elevação da temperatura. O autor ainda enfatiza que os maiores valores de TTG e TETD observados nas temperaturas abaixo da temperatura ótima para a espécie podem ser um reflexo da diminuição no metabolismo dos animais ectotérmicos com a diminuição da temperatura ambiente.

Carneiro (1990) observou que somente a temperatura teve influência no tempo de trânsito gastrointestinal das dietas dos juvenis de pacu, determinando à 24°C, valores três vezes maiores que a 28 e 32 °C. O autor concluiu que o tempo de trânsito observado na temperatura mais baixa deve ter limitado a ingestão de alimentos e, certamente, o metabolismo dos peixes, justificando resultados sempre ruins para os parâmetros de desempenho produtivo obtidos nesta temperatura.

Na Figura 2, foi apresentada a análise dos resultados pelo modelo de Boltzmann, das notas atribuídas às fezes dos juvenis de pacu cultivados a 25 e 29°C, após a troca da dieta C<sub>4</sub> pela C<sub>3</sub>, ao longo de 30 horas de coleta. Através da curva padrão de distribuição das médias das notas, observa-se que para os animais que inicialmente receberam dieta C<sub>4</sub> e posteriormente C<sub>3</sub> (C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub>) na temperatura de 25 °C, o TTG foi de 12h00min e para temperatura de 29 °C o TTG foi de 6h00min, logo, para essa estratégia alimentar, utilizando a mesma metodologia de inclusão de marcadores inertes na dieta, pode-se visualizar comportamento semelhante no TTG que também foi completado seis horas antes na temperatura mais alta.



**Figura 2.** Notas (média  $\pm$  erro padrão) segundo a observação visual da mudança de coloração das fezes de juvenis de pacu cultivados a 25 e 29 °C, após a troca da dieta C<sub>4</sub> pela C<sub>3</sub> e do marcador óxido de titânio pelo crômio, analisadas pelo modelo de Boltzmann.



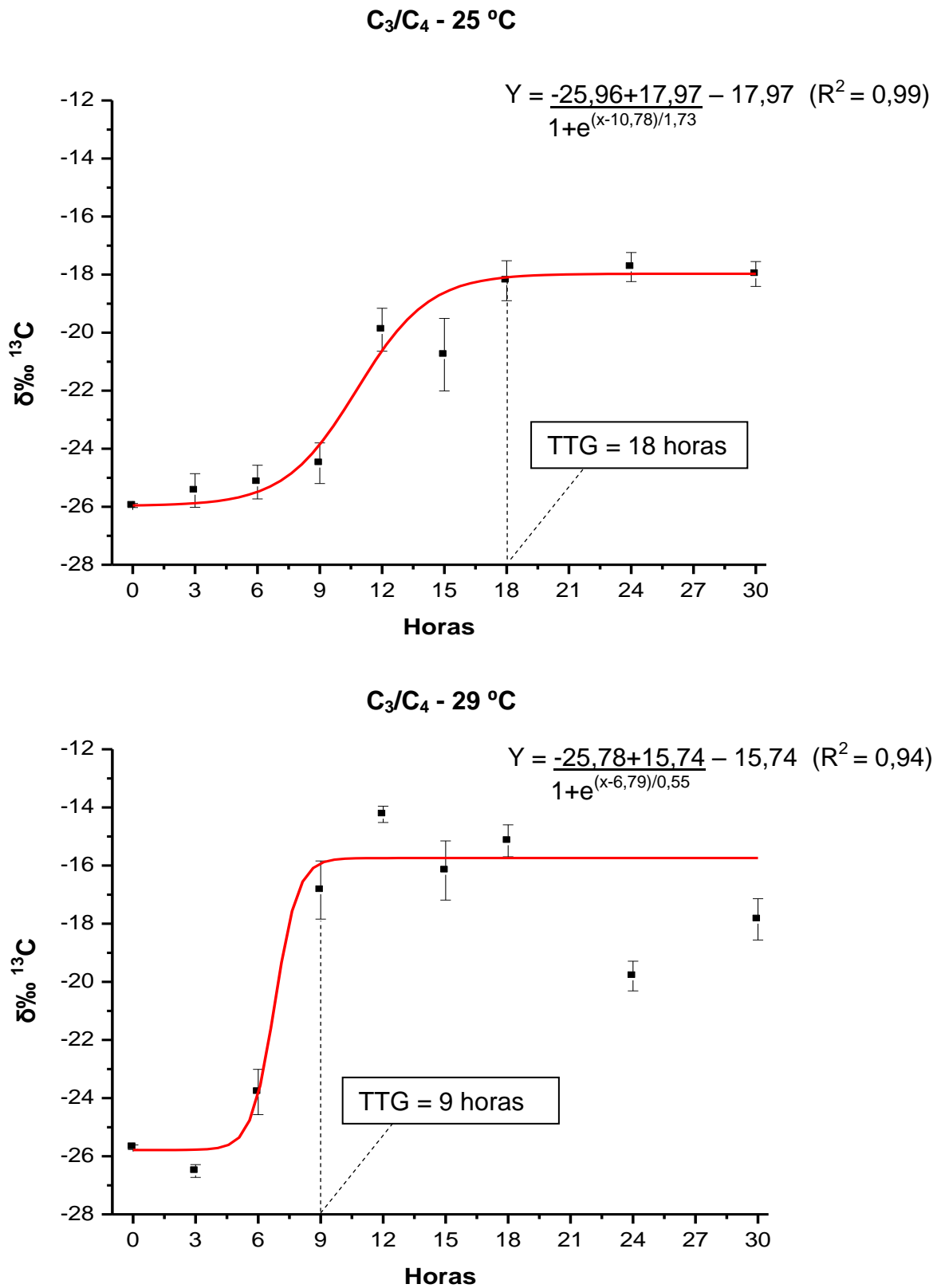
Carneiro et al. (1994) determinaram a influência da temperatura e a digestibilidade da proteína no tempo de trânsito do alimento pelo trato gastrointestinal de alevinos de pacu, utilizando dietas contendo 20 ou 30 % de proteína e 3600 ou 4000 kcal/kg de energia bruta. Contrários aos resultados observados neste trabalho, a composição da dieta não influenciou significativamente o tempo de trânsito. Entretanto, a temperatura influenciou significativamente o tempo de trânsito, sendo de 34h33min à 24 °C; diminuindo drasticamente para 11h42min à 28 °C e aumentando para 13h39min à 32 °C. Resultados correlacionando o aumento da temperatura com a diminuição do tempo de permanência do alimento no trato gastrointestinal dos peixes também foram encontrados por Edwards (1971) para o linguado (*Pleuronectes platessa* L.); por Fauconneau et al. (1983) para truta arco íris (*Salmo gairdneri*); e por Hernández et al. (1994) para carpa comum (*Cyprinus carpio*).

Fauconneau et al. (1983) observaram o tempo de trânsito do alimento no trato gastrointestinal da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), cultivada em duas temperaturas (9-10 e 18 °C). Assim como no presente trabalho, na temperatura mais baixa (9 °C), o tempo de trânsito foi completado posteriormente, após 34 horas, enquanto na temperatura mais alta foi em 26h30min.

Fredizzi (2005) avaliou a utilização de quatro ingredientes energéticos (milho, farelo de trigo, quirera de arroz e sorgo) e três tipos de processamento (“in natura”, peletizado e extrusado) para determinação do TTG em juvenis de pacu cultivados a 29 °C. Observou que, além do processamento, o tipo de alimento na dieta também interfere a velocidade de passagem, obtendo médias de 14 horas para alimentos “in natura” e 16 horas para alimentos peletizados, exceto para o farelo de trigo que foi de 12 e 14 horas, respectivamente. E para alimentos extrusados, a média de TTG foi de 14 horas para todos os ingredientes avaliados.

na temperatura mais alta.

A curva padrão de distribuição dos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  das fezes dos juvenis de pacu cultivados em água a 25 e 29 °C, ao longo do tempo (Figura 3), e a análise dos resultados pelo modelo de Boltzmann evidenciam a mudança isotópica do carbono, durante 30 horas de coleta após a troca da dieta C<sub>3</sub> pela C<sub>4</sub>.

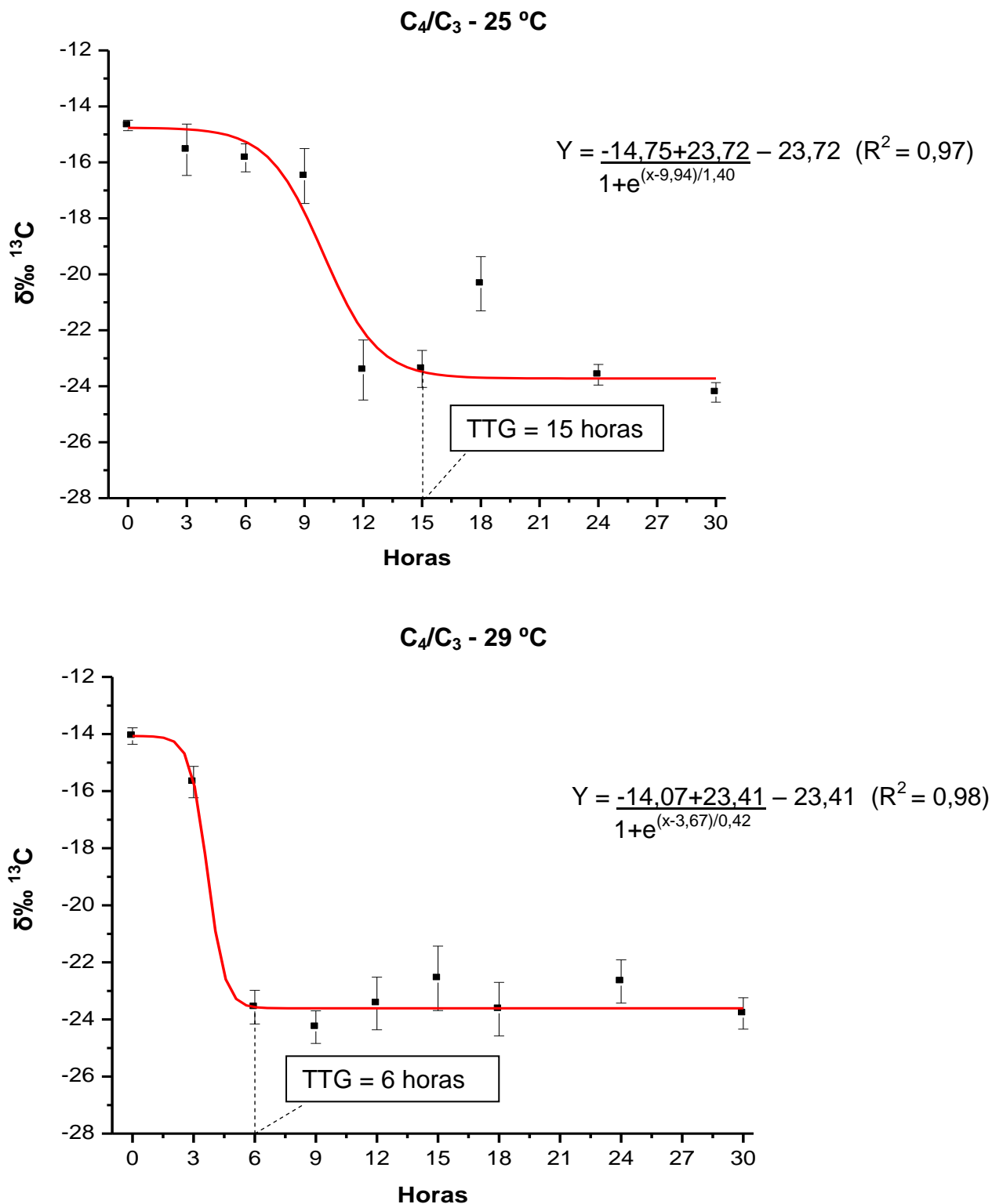


**Figura 3.** Composição isotópica do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$  – média  $\pm$  erro padrão) das fezes de juvenis de pacu cultivados a 25 e 29 °C, após a troca da dieta C<sub>3</sub> pela C<sub>4</sub>, analisada pelo modelo de Boltzmann.

O modelo sigmoidal de regressão de Boltzmann foi o que melhor explicou o comportamento dos resultados isotópicos. Atribuindo-se terminologia isotópica à equação geral do modelo, estimou-se o tempo de trânsito gastrointestinal (TTG) dos animais. Para os juvenis de pacu que inicialmente receberam dieta C<sub>3</sub>, e posteriormente C<sub>4</sub> (C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>) na temperatura de 25 °C, o TTG foi de 18h00min. Neste momento, as fezes apresentavam uma composição isotópica média de  $-18,21 \pm 2,18\text{‰}$ . Considerando que o valor final no patamar de equilíbrio é de  $-17,98 \pm 1,36\text{‰}$  pela equação, observa-se uma diferença de aproximadamente  $-0,23\text{‰}$  entre o início da formação do patamar e o valor final. Na temperatura de 29 °C, o primeiro ponto mais próximo ao início da formação do patamar de equilíbrio isotópico indicou um TTG em 9h00min, com as fezes apresentando sinal isotópico de  $-16,84 \pm 3,17\text{‰}$ , ou seja, diferindo em cerca de  $1,01\text{‰}$  do valor isotópico final que pela equação foi de  $-17,85 \pm 2,24\text{‰}$ .

Estes efeitos da temperatura também foram obtidos por Dias-Koberstein et al. (2005), que observaram valores médios de trânsito gastrointestinal de 36 horas e 14 horas para as temperaturas de 23 e 27 °C, respectivamente. Silva e Araújo-Lima (2003) relataram que a variação da temperatura de 27 a 31 °C influenciou na taxa de evacuação gástrica em piranha caju (*Pygocentrus nattereri*), acelerando o tempo de passagem dos itens alimentares testados, que foram músculo, nadadeira e gafanhoto. Em comparação com os dados obtidos por Braga et al. (2007), o tempo de trânsito gastrointestinal dos juvenis de pacu foi inferior ao verificado para o dourado (*Salminus brasiliensis*) a 25 °C, pois os autores afirmam que a visualização das primeiras fezes com o marcador foi realizada cinco horas após a alimentação. A curta extensão do tubo digestivo em relação ao comprimento-padrão do dourado ( $0,8 \pm 0,1$  vezes) poderia explicar o aparecimento de excretas em apenas cinco horas depois do arraçoamento.

Na Figura 4, observa-se a curva padrão de distribuição dos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  das fezes dos inicialmente a dieta C<sub>4</sub> e posteriormente a C<sub>3</sub> (C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub>). Ao longo de 30 horas de coleta, evidencia-se a mudança isotópica do carbono pela troca da dieta, nos peixes cultivados nas temperaturas de 25 e 29 °C. Segundo, a análise dos resultados pelo modelo de Boltzmann, ao longo do tempo, para esta estratégia alimentar, o TTG também foi considerado completo mais rapidamente na temperatura de 29 °C, as 6h00min, e a 25 °C, as 15h00min.



**Figura 4.** Composição isotópica do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$  – média  $\pm$  erro padrão) das fezes de juvenis de pacu cultivados a 25 e 29 °C, após a troca da dieta C<sub>4</sub> pela C<sub>3</sub>, analisada pelo modelo de Boltzmann.

Uma consideração importante que foi constatada na metodologia dos isótopos estáveis para a determinação do TTG, foi o alto valor para o erro-padrão observado em grande parte das amostras analisadas. Caldara et al. (2007) observaram que alguns animais refletem mais rapidamente o sinal isotópico da nova dieta em seus tecidos do que outros. Estas variações podem ser explicadas, em parte, pelas diferenças isotópicas obtidas entre animais do mesmo tratamento, seja pela variação individual do animal ou pelo fato de que nem todos os animais do mesmo tratamento ingeriram a nova dieta ofertada no primeiro horário de alimentação, logo após a troca das mesmas, pois os animais foram alimentados às 8h e 16h com a nova dieta. Assim, alguns peixes podem ter se alimentado somente no segundo horário e, por consequência, a mudança do sinal isotópico das fezes ocorreu mais tardiamente, diferindo daqueles que já haviam ingerido alimento no primeiro horário.

Além disso, a análise isotópica é uma metodologia de grande sensibilidade, e a possível presença de outras substâncias nas fezes, como por exemplo, o sangue, devido às compreensões abdominais necessárias para a retirada das fezes; o muco e a urina, também podem causar certa variabilidade nos resultados. Outro aspecto que a ser considerado é o preparo das amostras para as análises isotópicas. Como são utilizados apenas 60  $\mu\text{g}$ , para representar um todo do material, a amostra devem estar finamente moída e homogeneizada, caso contrário pode haver interferências indesejáveis nos resultados.

A avaliação do TTG através da análise isotópica do carbono das fezes pela troca das dietas de  $\text{C}_3$  para  $\text{C}_4$  mostrou que foi necessário mais tempo para considerar completo o TTG do que pela troca das dietas de  $\text{C}_4$  para  $\text{C}_3$ . Entretanto, em ambos os casos, o TTG foi mais rápido na temperatura de 29 °C. Essa variação entre o TTG das dietas avaliadas pode ter ocorrido devido à pequena diferença na composição bromatológica. As dietas foram elaboradas praticamente com os principais ingredientes utilizados para a espécie, diferindo-se na formulação para que fosse possível constituir uma dieta com sinal característico de produtos originários do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  e outra dieta  $\text{C}_4$ , garantindo que houvesse grande diferença isotópica entre elas e, portanto, sendo possível analisar os resultados com clareza.

A influência da temperatura sobre a digestão vem sendo estudada em peixes há 40 anos (Elliot, 1972; Persson, 1979; Bromley, 1994; Nelson e Ross, 1995). A temperatura age controlando o metabolismo dos peixes, interferindo no processo digestivo e tendo também importante efeito na entrada e saída de alimento (Pandian e Vivekanandan, 1985). De uma forma geral, o aumento na temperatura leva a um aumento na digestão. Outros estudos relacionaram o efeito da temperatura sobre os diferentes tipos de alimentos, concluindo que ambos são importantes parâmetros que afetam a digestão e a velocidade de evacuação (Jones, 1974; Tseitlin, 1980; Marques et al., 1993; Bromley, 1994; Temming e Herrmann, 2001; Koed, 2001; Silva e Araujo-Lima, 2003).

A retenção do bolo alimentar pelo trato digestivo do animal é responsável pelo tempo que o alimento fica exposto aos processos digestivos e absorptivos do organismo influenciando a sua eficiência (NRC, 1993). Geralmente, observa-se que a celulose diminui o tempo de esvaziamento do trato gastrointestinal, ao contrário do que ocorre com polissacarídeos não-amiláceos solúveis (Wenk, 2001). Uma dieta que promova baixa retenção do bolo alimentar pode resultar em menor aproveitamento do alimento, uma vez que o mesmo permanece um tempo insuficiente no trato digestivo para sofrer os processos de digestão e absorção. Entretanto, tempo excessivo de permanência do alimento no trato digestivo levaria a menor desempenho do animal, pelo fato de a parte indigestível ou digerida e não absorvida de um alimento ocupar o espaço que poderia estar sendo ocupado por um novo alimento (Meurer et al., 2002).

Através dos resultados, é possível observar que o TTG nos tratamentos  $C_3/C_4$  e  $C_4/C_3$  à 29 °C foi considerado completo no mesmo momento em ambas as metodologias avaliadas, ou seja às 9 horas e 6 horas, respectivamente (Tabela 7). Nos tratamentos  $C_3/C_4$  e  $C_4/C_3$  à 25 °C, apesar do TTG ter sido considerado completo em horários distintos, essa diferença foi em cerca de três horas em ambos os casos. Isto pode ter ocorrido devido às possíveis interferências no caso da metodologia isotópica, já citadas anteriormente, como a presença de sangue, muco e urina nas fezes retiradas, ou ainda, ao fato de alguns animais não terem ingerido a nova dieta no primeiro horário de alimentação. Além disso, devido à maior sensibilidade desta metodologia, o preparo das amostras para as análises deve ser

feito com cautela para que todas fiquem muito bem moídas e homogeneizadas, pois devido à alta precisão pode ser detectado qualquer tipo de alteração.

**Tabela 7.** Valores do TTG de juvenis de pacu mantidos à 25 e 29 °C nas estratégias alimentares C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> e C<sub>4</sub>/C<sub>3</sub> em ambas as metodologias avaliadas.

Estratégias alimentares	Metodologia marcadores inertes		Metodologia isotópica	
	25 °C	29 °C	25 °C	29 °C
C <sub>3</sub> /C <sub>4</sub>	15 horas	9 horas	18 horas	9 horas
C <sub>4</sub> /C <sub>3</sub>	12 horas	6 horas	15 horas	6 horas

Ambas as metodologias avaliadas podem ser utilizadas para determinar o TTG em juvenis de pacu mantidos a 29 °C. Apesar da discrepância do valor do TTG na temperatura de 25 °C, e considerando os entraves da metodologia isotópica, é possível afirmar que a quantidade de carbono-13 presente nas fezes dos juvenis de pacu foi compatível com a interpretação dada pelas notas atribuídas no patamar de equilíbrio da curva padrão sigmoidal de regressão.

Esta diferença de três horas no TTG dos juvenis mantidos a 25 °C em ambas as metodologias avaliadas, pode ser devido ao fato de que baixas temperaturas limitam a ingestão de alimentos e interferem no metabolismo dos peixes, sendo assim, isto pode explicar a assimilação do carbono-13 da dieta nas fezes ter sido mais lenta (no caso da metodologia isotópica) que a incorporação do marcador de contraste (metodologia convencional), uma vez que as fezes coletadas já poderiam apresentar coloração verde escura (com a nota máxima 1,00); entretanto neste mesmo horário, pode ser que o carbono-13 ainda não havia sido assimilado nestas mesmas amostras. Assim, para determinar o TTG pela metodologia isotópica em estudos que utilizem baixas temperaturas de água para a espécie em questão, recomenda-se que haja um refinamento da metodologia através da utilização de menores intervalos de tempo entre as coletas de fezes e, portanto mais horários de coleta, e desta forma ajustando-se novos protocolos experimentais com base nos resultados do presente trabalho, para averiguar a viabilidade do uso da técnica de isótopos estáveis de carbono em temperaturas mais amenas.

Além disso, deve-se levar em consideração as vantagens e desvantagens das metodologias estudadas. A análise isotópica é uma técnica que reflete a composição das fezes em carbono oriundo dos nutrientes da dieta; contudo, exige

mais tempo para obtenção dos resultados, pois as amostras devem ser secas, moídas, pesadas e analisadas em espectrômetro de massa; o custo das análises é maior, pois há necessidade de gastos com kit de reagentes, e só pode ser utilizada quando as dietas possuírem diferentes assinaturas isotópicas. Já na metodologia que utiliza marcadores inertes, os resultados são obtidos imediatamente após a retirada das fezes e sem limitações em relação à composição da dieta, além de ser analiticamente menos onerosa. Por outro lado, esta metodologia depende da interpretação visual do avaliador, que define os critérios para o estabelecimento das notas, e amostras de fezes quando em pequena quantidade pode interferir na análise visual e conseqüentemente no valor atribuído a nota.

## 5. Conclusões

Nas condições de realização do presente trabalho, os resultados observados para o pacu permitiram as seguintes conclusões:

1. A metodologia dos isótopos estáveis de carbono mostrou-se eficiente para a determinação do tempo de trânsito gastrointestinal em juvenis de pacu cultivados na temperatura média de 29 °C e alimentados com ambas as estratégias alimentares (C<sub>3</sub>/ C<sub>4</sub> e C<sub>4</sub>/ C<sub>3</sub>);
2. Na temperatura de 29 °C, para ambas as metodologias avaliadas, o tempo de trânsito gastrointestinal foi considerado completo no mesmo momento, e em menor tempo;
3. O desempenho produtivo dos animais foi influenciado pelas temperaturas e dietas avaliadas, com obtenção de maior ganho em peso na temperatura de 29 °C e dieta C<sub>3</sub> durante 40 dias de cultivo.



## 6. Referências

ALANÄRÄ, A. The effect of temperature, dietary energy content and reward level on the demand feeding activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 126, p.349-359, 1994.

ANGELINI, R.; CANTELMO, O. A.; PETRERE JR, M. Determinação da taxa de consumo de ração pelo pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, com diferentes tamanhos e sob distintas temperaturas. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 5, p. 11-22, 1992.

AZEVEDO, P. A.; CHO, C. I.; LEESON, S.; BUREAU, D. P. Effects of feeding level and water temperature on growth, nutrient and energy utilization and waste outputs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Living Resources**, Montrouge, v. 11, n. 4, p.227-238, 1998.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. Criação de matrinxã. In: GOMES, L. C.; URBINATI, E. C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005, v.1, p.149-174.

BERNARDINO, G.; FERRARI, V. A. Efeitos do uso da ração comercial no desempenho do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 em cativeiro. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 2, p.19-33, 1989.

BORGHETTI, J. R.; CANZI, C. The effect of water temperature and feeding rate on the growth rate of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) raised in cages. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 114, p.93-101, 1993.

BOUJARD, T.; MÉDALE, F. Regulation of voluntary feed intake in juvenile rainbow trout fed by hand or by self-feeders with diets containing two different protein/energy ratios. **Aquatic Living Resources**, Montrouge, v. 7, p.211-215, 1994.

BOYD, C. E. **Water quality in warm water fish culture**. Auburn: Auburn University, 1981. 359p.

BOYD, C. E. **Water quality management for pond fish culture**. Amsterdam: Elsevier, 1982. 318p.

BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Auburn: Auburn University Press/Birmingham, 1990. 482p.

BRAGA, L. G. T.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K.; CYRINO, J. E. P. Trânsito gastrointestinal de dieta seca em *Salminus brasiliensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p.131-134, 2007.

BROMLEY, P. J. The role of gastric evacuation experiments in quantifying the feeding rates of predatory fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 4, p.36-66, 1994.

CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A.; DENADAI, J. C.; ANDRADE, G. A.; GIOSO, M. M. Glutamina e turnover do carbono no tecido adiposo de leitões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p.1601-1607, 2007.

CARNEIRO, D. J. **Efeito da temperatura na exigência de proteína e energia em dietas para alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)**. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1990.

CARNEIRO, D. J.; RANTIN, F. T.; DIAS, T. C. R. MALHEIROS, E. B. Interaction between temperature and dietary levels of protein and energy in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). I. The effects on growth and body composition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 124 p.127-131, 1994.

CARRIJO, A. S.; PEZZATO, A. C.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; TRINCA, L.; SILVA E. T. Traceability of bovine meat and bone meal in poultry by stable isotope analysis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 8, n. 1, p.63-68, 2006.

CHABALIN, E.; FERRAZ DE LIMA, J. A. Análise econômica de um cultivo intensivo de pacu (*Colossoma mitrei*) no Centro-Oeste do Brasil. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 1, p.1-68, 1988.

CUENCO, M. L.; STICKNEY, R. R.; GRANT, W. E. Fish bioenergetics and growth in aquaculture ponds. I. Effects of temperature. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 28, p.73-95, 1985.

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. Comportamento alimentar de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) por meio das observações do tempo de retorno do apetite e do tempo de saciação dos peixes em duas temperaturas de cultivo. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 3, p.339-344, 2004.

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

DOBSON, S. H.; HOLMES, R. M. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, London, v. 25, p.649-656, 1984.

EDWARDS, D. J. Effect of temperature on rate of passage of food through the alimentary canal of the plaice *Pleuronectes platessa* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 3, p.433-439, 1971.

ELLIOTT, J. M. Rates of gastric evacuation in brown trout, *Salmo trutta* L. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 2, p.1-18, 1972.

FAUCONNEAU, B.; CHOUBERT, G.; BLANC, D.; BREQUE, J.; LUQUET P. Influence of environmental temperature on flow rate of foodstuffs through the gastrointestinal tract of rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 34, p.27-39, 1983.

FERRARI, V. A.; LUCAS, A. F. B.; GASPAR, L. A. Monocultura de pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, em condições de viveiro estufa. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 3, p.33-42, 1990.

FERRAZ DE LIMA, J. A. F.; FERRARI, V. A.; COLARES DE MELO, J. S.; GASPAR, L. A.; CHABALIN, E.; SANTOS, E. P. Comportamento do pacu, *Colossoma mitrei* em um cultivo experimental, no Centro-Oeste do Brasil. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 1, n. 1, p.15-28, 1988.

FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B. Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p.1 - 5, 2001.

FREDIZZI, L. F. B. **Efeito do processamento de alimentos energéticos sobre o tempo de trânsito gastrintestinal e a digestibilidade de nutrientes e energia em juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

GAMBOA-DELGADO, J.; LE VAY, L. Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 29, p.115-123, 2009.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of freshwater**. London: IBP, Blackwell Sci. Pub., 1978. 213p.

HERNÁNDEZ, M. TAKEUCHI, T. WATANABE, T. Effect of gelatinized corn meal as a carbohydrate source on growth performance, intestinal evacuation, and starch digestion in common carp. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 60, n. 5, p.579-582, 1994.

JONES, R. The rate of elimination of food from the stomachs of haddock *Melanogrammus aeglefinus*, cod *Gadus morhua*, and whiting *Merlangius merlangus*. **Journal du Conseil - Conseil international pour l'exploration de la mer**, Copenhagen, v. 35, p.225-243, 1974.

JOMORI, R. K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Stable carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, p.370-381, 2008.

KOED, A. The effects of meal size, body size and temperature on gastric evacuation in pikeperch. **Journal of Fish Biology**, London, v. 58, p. 281-290, 2001.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSHOFFK (Ed.). **Methods of seawater analysis**. Verlag Chemie Weinheim, p.117-181, 1976.

MACKERETH, F. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. F. **Water Analyses**. London: Freshwater Biological Association, 1978. 120p.

MARQUES, E. E.; AGOSTINHO, A. A.; SAMPAIO, A. A.; AGOSTINHO, S. C. Alimentação, Evacuação gástrica e Cronologia da digestão de jovens de Pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes, Pimelodidae) e suas relações com a temperatura ambiente. **Revista Unimar**, Marília, v. 14, p.207-221, 1993.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SOARES, C. M. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 2, p.566-573, 2002.

MICROCAL SOFTWARE ORIGIN 6.0 PROFESSIONAL. **Origin Data Analysis and Technical Graphics**. USA: Microcal Software, 1999.

NELSON, G. A.; ROSS, M. R. Gastric evacuation in little skate. **Journal of Fish Biology**, London, v. 46, p.977-986, 1995.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of warm water, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestic animals**. Washington, 1993, 114p.

OLIVEIRA, A. C. B.; MARTINELLI, L. A.; MOREIRA, M. Z.; CYRINO, J. E. P. Determination of apparent digestibility coefficient in fish by stable carbon isotopes. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, p.10-13, 2008.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (Ed.). **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: FAO, 2008. 276p.

PANDIAN, T. J.; VIVEKANANDAN, E. Energetics of feeding and digestion. In TYTLER, P.; CALOW, P. (Ed.). **Fish energetics: new perspectives**. London: Croom Helm, 1985. p.99-124.

PAUL, A. J.; PAUL, J. M.; SMITH, R. L. Compensatory growth in Alaska yellowfin sole, *Pleuronectes asper*, following food deprivation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 46, p.442-448, 1995.

PERSSON, L. The effects of temperature and different food organisms on the rate of gastric evacuation in perch (*Perca fluviatilis*). **Freshwater Biology**, Oxford, v. 9, p.99-104, 1979.

PROENÇA, C. E. M.; BITTENCOURT, P. R. L. Recursos hídricos. In: **Manual de piscicultura tropical**. Brasília: IBAMA/DIREN/DEPAQ/DIPEA, 1994, p. 52-76.

SALVADOR, R.; MULLER, E. E.; LEONHARDT, J. H.; GIORDANO-PRETTO, L. G.; DIAS, J. A.; FREITAS, J. C.; MORENO, A. M. Isolamento de *Streptococcus* spp de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, Teresina, v. 24, n. 1, p.35-42, 2003.

SILVA, E. C. S.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Influência do tipo de alimento e da temperatura na evacuação gástrica da Piranha caju (*Pygocentrus nattereri*) em condições experimentais. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 33, n. 1, p.145-156, 2003.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), incorporados em rações: digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p.1815-1824, 2003.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 70p.

SOUZA, V. L.; URBINATI, E. C.; GONÇALVES, D. C.; SILVA, P. C. Composição corporal e índices biométricos do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p.533-540, 2002.

STOREBAKKEN, T.; AUSTRENG, E.; STEINBERG, K. A method for determination of feed intake in salmonids using radioactive isotopes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p.133-42, 1981.

STOREBAKKEN, T. Binders in fish feeds. I. Effect of alginate and guar gum on growth, digestibility, feed intake and passage through the gastrointestinal tract of rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v.47, p.11-26, 1985.

TALBOT, C.; HIGGINS, P.J. A radiographic method for feeding studies using metallic iron powder as a marker. **Journal of Fish Biology**, London, v.23, p.211-220, 1983.

TEMMING, A.; HERRMANN, J. P. Gastric evacuation of horse mackerel. II. The effects of different prey types on the evacuation model. **Journal of Fish Biology**, London, v. 58, p. 1246- 1256, 2001.

TSEITLIN, V. B. Duration of gastric digestion in fishes. **Marine Ecology Progress Series**, Amelinghausen, v. 2, n. 4, p.277-280, 1980.

VIDAL JUNIOR, M. V. **Técnicas de determinação de digestibilidade e determinação da digestibilidade de nutrientes de alimentos para tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2000. 96 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

WENK, C. The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 90, p.21-33, 2001.