

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Atividade de enzimas digestivas de *Lithobates catesbeianus*
durante o desenvolvimento larval

Luiz Flávio José dos Santos
Biólogo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Março de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Atividade de enzimas digestivas de *Lithobates catesbeianus*
durante o desenvolvimento larval

Luiz Flávio José dos Santos

Orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Verardino De Stefani

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Zootecnia.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Março de 2011

Santos, Luiz Flávio José dos
S237a Atividade enzimas digestivas de *Lithobates catesbeianus* durante o desenvolvimento larval / Luiz Flávio José dos Santos. – Jaboticabal, 2011
XII, 44 f.; 28cm

Dissertação de Mestrado em Zootecnia, realizado e apresentado junto ao Departamento de Tecnologia da FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal. 2011
Orientador: João Martins Pizauro Junior
Banca examinadora: Cyntia Peralta de Almeida Prado, Pietro Ciancaglini
Bibliografia

1. Enzimas Digestivas. 2. Girino. 3. Metamorfose. 4. *Lithobates catesbeianus*. I. Título. II Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 597.851.

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

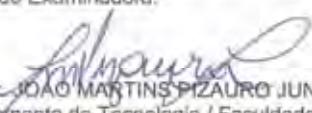
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

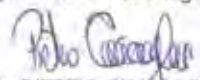
TÍTULO: ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE *Lithobates catesbeianus* DURANTE O DESENVOLVIMENTO LARVAL


AUTOR: LUIZ FLÁVIO JOSÉ DOS SANTOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAO MARTINS PIZAURO JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAO MARTINS PIZAURO JUNIOR
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. PIETRO CIANÇAGLINI
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP / Ribeirão Preto/SP


Profa. Dra. CYNTHIA PERALTA DE ALMEIDA PRADO
Departamento de Morfol e Fisiol Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 30 de março de 2011.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUIZ FLÁVIO JOSÉ DOS SANTOS – Natural de Terra Roxa (SP), nascido em 20 de novembro de 1985. Ingressou na Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal em março de 2004, onde obteve o título de Licenciado em Ciências Biológicas em Janeiro de 2008 e Bacharel em Ciências Biológicas em Dezembro de 2010.

“No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einsten

“Foi o tempo que perdi com a minha rosa que a fez tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

Ofereço

Humildemente a grandes nomes da ciência: Alfred Russel Wallace, Charles Robert Darwin, Francis Harry Compton Crick, James Watson, Maurice Wilkins, Sir. Isaac Newton, Albert Einstein, Albert Lester Lehninger, Leonor Michaelis, Maud Menten, dentre outros. Que servem de inspiração para infinitas gerações de cientistas, dentre as quais me incluo.

Dedico

A minha avó Aparecida por simplesmente ser quem ela é,
minha velha “Cida”, um porto seguro

Agradecimentos

Primeiro agradeço a meu pai, Luiz por todo amor e desprendimento dedicados a mim, pelo inicio de minha visão política e de mundo sem a qual eu não seria a pessoa que aqui se encontra.

Agradeço a meu orientador, o Professor Dr. João Martins Pizauro Junior, pelo tempo, dedicação e claro por me mostrar o “caminho das pedras” no mundo acadêmico. À Fátima Aparecida Ribeiro Harnich por ser mais que uma técnica de laboratório, ser uma verdadeira mãe jaboticabalense, um grande abraço. E a minha Co-orientadora Professora Dr^a. Marta Verardino De Stefani pela ajuda e atenção.

Aos meus irmãos, Fabiana, Fabiano e Jhenifer por além de dividir uma identidade genética, terem dividido comigo suas historias de vida. Aos meus sobrinhos, Raissa, Rhuam, Ramom e Polyana por trazerem a felicidade da continuidade da vida.

A todos os meus tios e primos por todas boas energias a mim desejados, em especial às tias Vera e Wilma por todos os conselhos e o carinho.

Aos meus melhores amigos terra-roxenses, André, Thiago Padovam, Thiago MJ, Rogério e Rakelli, por todos os momentos felizes ou tristes, pelos segredos e sonhos que dividimos desde quando éramos crianças.

Pelo companheirismo dos integrantes do L.E.A., agradeço à Rafael, Cecília, Gisele, Márcia Stech, Vanessa Sato, Gustavo, Andréia, Mariana, Patrícia, Carolina e em especial ao Adriano por ser meu irmão mais novo, me acompanhando nas empreitadas, dando conselhos e dividindo sorrisos.

Agradeço especialmente a minha família jaboticabalense, a “Republica Kilombo”: Silene, Argos, Douglas, Marcelo, Matheus, Néviton, Renato, e mais atualmente Guilherme e os Pedros, vocês moram em meu coração.

A “Bio/04”, e mais ainda à aqueles que tiveram a coragem de mostrar na pele o seu amor: Ana Luiza, Carla e Mônica, membros do Clã *lithographica*. Ao nosso paraninfo (padrinho), o professor Wagner Cotroni Valenti pelo exemplo ético e profissional.

Aos meus demais amigos das Republicas “Casa da Mãe Joana”, “Aroeira”, “Chernobio”, “DOUce Lar” e “Wonderland”; e claro aos companheiros de Centro Acadêmico.

Aos demais coordenadores do Cursinho ATIVO, em especial a Nayara, meu muito obrigado. Um grande abraço aos meus amados “aluninhos”, que tem me enchido de ânimo e felicidade principalmente nas horas mais conturbadas destes anos de UNESP Jaboticabal, em especial Carina, Gabriel, Guilherme, Leonardo, Lucas, Monique, Vitor e Wilson.

A Dr^a. Veronica Regina Lobato de Oliveira-Bahia e a Professora Dr^a. Laura Satiko Okada Nakaghi pela ajuda e todas as contribuições a este trabalho, sem as quais ele não teria a mesma qualidade.

Ao Márcio Roberto Reche pela ajuda com o manuseio e criação dos animais e ao Msc Alan Rodrigo Panosso pelo auxílio com as análises estatísticas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento desse projeto.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas participaram deste trabalho e de minha vida, muito obrigado.

Por ultimo e sim, mais importante, agradeço infinitamente à minha Mãe, Madalena, por ser minha mãe com todas as implicações, felicidades e dores que este papel trás. Pela abnegação, ternura, força e felicidade a mim dirigida desde o momento de minha concepção.

SUMÁRIO

Resumo	ii
Abstract	iii
Introdução	1
Revisão de Literatura	4
Características gerais dos girinos e da metamorfose	4
Perfil enzimático do trato gastroentérico dos girinos durante a metamorfose	8
Objetivos	11
Material e Métodos	12
Animais experimentais	12
Obtenção dos extratos enzimáticos	12
Determinação da atividade das proteases ácidas	13
Determinação da atividade da α -amilase pancreática	14
Determinação da atividade de tripsina pancreática	14
Determinação da atividade de lipase pancreática	15
Purificação parcial da colipase	15
Atividade da maltase intestinal	16
Dosagem de proteína	17
Análise estatística	17
Resultados e Discussão	18
Conclusões	25
Referências	26
Anexo	31

RESUMO - Todos os seres vivos necessitam de um suprimento energético, que deve ser obtido de fontes externas. As substâncias simples da dieta dos animais, como a água, os sais minerais e as vitaminas (exceto a vitamina B12), podem ser absorvidas ao longo do trato digestório sem sofrer transformações físicas ou químicas. Entretanto, macromoléculas tais como carboidratos, proteínas e lipídeos, têm de ser convertidas em moléculas pequenas e menos complexas para serem absorvidas. A digestão química dos nutrientes é realizada por hidrólise enzimática, que consiste na cisão de uma ligação química e inserção de uma molécula de água, sendo este processo catalisado pela ação das enzimas digestivas. O objetivo deste estudo foi o de se analisar a variação nas atividades de cinco hidrolases do sistema digestório de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante o desenvolvimento larval, para fornecer subsídios a nutrição animal. Os girinos foram mantidos em aquários, à 27°C e separados por estádios de desenvolvimento. Amostras de estômago, pâncreas e intestino foram retiradas de 100 animais de cada estágio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C para posterior homogeneização e determinação da atividade enzimática. A atividade das enzimas tripsina, α -amilase e lipase pancreáticas (44,30 U.mg⁻¹, 3,17 U.mg⁻¹, 2,99 U.mg⁻¹ respectivamente), e da maltase intestinal (26,99 U.mg⁻¹), foram detectadas desde o início da fase de alimentação (estádio 26) enquanto que a atividade de catepsina-E gástrica (13,82 U.mg⁻¹), foi estudada a partir do estágio 28, devido a dificuldade de se obter de estômagos antes deste estágio. Durante a pré-metamorfose a catepsina-E não apresentou grande variação em sua atividade, sendo observado aumento ao final do período da pré-metamorfose. A atividade das demais enzimas aumentaram significativamente nos períodos que antecedem a metamorfose, tendo as maiores atividades no estágio 38 (261,97 U.mg⁻¹ para tripsina, 28,19 U.mg⁻¹ para α -amilase e 81,62 U.mg⁻¹ para maltase) exceto a lipase que teve o valor de sua atividade diminuído. Durante o clímax da metamorfose as atividades das enzimas diminuíram, voltando a aumentar após a metamorfose, no estágio 45. Contrastando com o observado na lipase que teve aumento da atividade durante o clímax e diminuição no estágio seguinte. A variação das atividades enzimáticas relaciona-se com as necessidades energéticas do animal durante seu desenvolvimento e com a mudança do hábito alimentar de onívoro/herbívoro para carnívoro.

Palavras Chave: Enzimas digestivas; Metamorfose; Girino, *Anphibia*.

Digestive enzymes activities in *Lithobates catesbeianus* tadpoles digestive system during larval development

SUMMARY – All living beings require energy supply, which must be obtained from external sources. Simple substances in the diet of the animals, such as water, minerals and vitamins (except vitamin B12) can be absorbed along the digestive tract without undergoing chemical or physical changes. However, macromolecules such as carbohydrates, proteins and lipids, must be converted into smaller and less complex molecules to be absorbed. The chemical digestion of nutrients is accomplished through enzymatic hydrolysis, which means to break a chemical bond and insert a water molecule. This process is catalysed by the action of digestive enzymes. The aim of this study was to analyze the activity variation of five hydrolases of the bullfrog's (*Lithobates catesbeianus*) digestive system during larval development, to provide subsidies to animal nutrition. The tadpoles were kept in aquaria, at 27 °C and separated by stages of development. Samples of stomach, pancreas and intestine were taken from 100 animals of each stage, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for later homogenization and enzyme activity determination. The activity of trypsin, α -amylase and pancreatic lipase (44.30 U.mg⁻¹, 3.17 U.mg⁻¹, 2.99 U.mg⁻¹ respectively), and intestinal maltase (26.99 U.mg⁻¹) were detected since the start of feeding (stage 26) while the gastric cathepsin E (13.82 U.mg⁻¹) activity was studied since stage 28, due to difficulty in obtaining stomachs before this stage. During pre-metamorphosis cathepsin-E did not show great variation in its activity, but an increase was observed at the end of the period of pro-metamorphosis. The other enzymes activity increased significantly in periods that precede metamorphosis, with the highest activities in stage 38 (261.97 U.mg⁻¹ for trypsin, 28.19 U.mg⁻¹ for α -amylase and U.mg 81.62⁻¹ for maltase) except lipase that had an activity decrease. During the metamorphosis climax the enzyme activities decreased and increased again after metamorphosis, at stage 45. Contrasting with that observed in lipase activity that increased during the climax and decline in the next stage. The variation of enzymes activities is related to the animal's energy needs during its development and the feeding habits change from omnivore/carnivore to herbivore.

Key Words: Digestives enzymes, Tadpoles, Metamorphose, *Amphibia*.

INTRODUÇÃO

Em 2007 a produção de rãs no Brasil foi da ordem de 598 toneladas (IBAMA, 2007), mostrando-se uma atividade econômica viável. No Brasil, a ranicultura baseia-se no cultivo de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), espécie originária da América do Norte, que apresenta boa adaptação em climas subtropicais e tropicais (FEIX et al., 2006). A produção de rãs brasileiras teve início em 1935, importando-se alguns exemplares de *L. catesbeianus* do Canadá, e firmou-se como atividade econômica somente nos anos 80, atraindo o interesse em pesquisas sobre alimentação, manejo e sanidade da rã adulta (LIMA, 1999).

Apesar de ser um alimento com baixo teor de gordura e paladar agradável, o alto custo da carne de rã no mercado interno diminui a procura por este tipo de alimento, o que pode ser sanado pelo aumento nas pesquisas sobre *L. catesbeianus*, e no investimento em novas tecnologias para melhor produção, o que poderia inclusive vislumbrar a venda para o mercado externo (LIMA, 2005). Brasil e Taiwan foram identificados como maiores produtores mundiais de carne de rã, enquanto os Estados Unidos e a União Européia apresentam-se como principais importadores (FAO, 2011). Um diferencial da ranicultura brasileira, é que toda a produção é proveniente de criadouros, não sendo realizada a exploração das rãs dos ambientes naturais, o que tem se mostrado um problema ecológico nos países que realizam esta prática (LIMA, 2005).

O desenvolvimento de novos subprodutos da ranicultura apresenta-se como alternativa, tanto para melhoria nos ganhos da produção, como para aumentar a sustentabilidade desta atividade econômica. Análises realizadas no óleo de rã demonstraram que ele pode ser utilizado na produção de cosméticos, já o fígado na produção de patês e os ovários na produção de caviar (FEIX et al., 2006). A pele pode ser utilizada no tratamento de queimaduras, indústria farmacêutica, ou de vestuário (VELLY, 2001).

Quanto à pesquisa e desenvolvimento na ranicultura, o foco está na redução dos custos e melhoria da produtividade, atentando-se ao controle de temperatura, melhoramento genético e desenvolvimento de rações adequadas para a rã-touro

(FEIX et al., 2006). Porém, estudos com os animais ainda jovens, na fase de girinos, etapa exclusivamente aquática, são fundamentais para a diminuição de perdas de produção. Para melhorar a criação da rã-touro é necessário fornecer aos girinos e às rãs uma alimentação adequada às exigências nutricionais de cada fase, além de um correto manejo (DIAS et al., 2007).

De forma geral, a biologia da espécie é bem conhecida, entretanto, a compreensão de detalhes sobre a fisiologia, assim como dos eventos bioquímicos envolvidos com a digestão dos principais nutrientes pelos girinos, é de fundamental importância para a melhoria da criação de rãs (BRAGA et al., 2006). A maioria dos estudos enfocando as mudanças morfofisiológicas de girinos durante a metamorfose foi realizada, principalmente, com a espécie *Xenopus laevis* (LEONE et al., 1976; SHI; BROWN, 1990). Trabalhos com rã-touro que relacionam as variações na produção e atividade enzimáticas, com a ontogenia do sistema digestório e a nutrição do animal, são escassos na literatura (BRAGA et al., 2005).

Nesse sentido, estudos relacionados à enzimas que participam da digestão dos carboidratos, das proteínas e lipídeos nas diferentes fases de desenvolvimento desses animais são de grande importância para aumentar a produção de carne, além de fornecer subsídios para a elaboração de uma alimentação ideal, principalmente pelo fato de que as rações atualmente serem utilizadas constituídas, em média, por 40% de proteína bruta, pois são baseadas em rações desenvolvidas para peixes ou aves, animais que possuem exigências nutricionais diferentes dos girinos (DIAS et al., 2007).

O hábito alimentar das rãs e as exigências nutricionais são alterados em cada fase de seu desenvolvimento, assim, espera-se que determinados nutrientes sejam requeridos em maior quantidade, em complemento com as mudanças estruturais que ocorrem durante o desenvolvimento larval, evitando assim, deficiências nutricionais que muitas vezes acarretam um desenvolvimento anormal ou uma alta taxa de mortalidade dos girinos (BARBOSA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a variação nas atividades das proteases ácidas presentes no estômago, da α -amilase, lipase e tripsina pancreáticas, e maltase intestinal em cada estágio do desenvolvimento larval

de *L. catesbeianus*, fornecendo assim subsídios a melhora na elaboração de rações para a espécie.

REVISÃO DE LITERATURA

Características gerais dos girinos e da metamorfose

Na natureza pode ser observada uma grande variedade no desenvolvimento larval dos anuros, a qual está diretamente relacionada à quantidade de suas reservas energéticas (saco vitelínico), dieta e cuidado parental (WELLS, 2007; POUGH et al., 2008). A maioria das espécies é ovípara, mas algumas são vivíparas. Em alguns casos ocorre a supressão da fase larval, apresentando desenvolvimento direto. Quando existente, o cuidado parental pode variar muito. Alguns girinos ficam em ninhos vigiados pelos pais, outros podem ficar em bolsas no dorso das fêmeas, no saco vocal do macho ou até no estômago da fêmea (WELLS, 2007; POUGH et al., 2008).

Espécies de girinos que não se alimentam antes da metamorfose, obtêm sua energia exclusivamente das reservas de vitelo presentes no ovo e são chamados de endotróficos, enquanto que, girinos que se alimentam antes da metamorfose são chamados de exotróficos (McDIARMID; ALTIG, 1999).

Altig et al. (1975) estudando sete espécies de anuros, observaram que, à medida que os girinos cresceram, ocorreram mudanças mais abrangentes no comportamento alimentar, como consumo de material vegetal, animal e de microorganismos, podendo ainda haver consumo de carcaça de outros girinos, de ovos de peixes e de anfíbios, e das próprias fezes, dependendo da espécie. Estes mesmos autores observaram ainda que os girinos de rã-touro encontram-se no fundo da coluna d'água, sendo filtradores onívoros com tendência a herbívoros.

Veiga (1989) observou que os girinos de *L. catesbeianus* se alimentaram de proteína de origem vegetal e animal. A de origem vegetal promove um maior crescimento, mas retarda o processo de metamorfose. Em condições de cultivo favoráveis, os girinos de rã-touro se alimentam continuamente crescendo rapidamente, podendo atingir níveis de consumo diário entre 12 e 18% do seu peso corporal. Embora, em números absolutos, ocorra uma diminuição relativa no consumo de alimentos à medida que os girinos se desenvolvem (ALBINATI, 1999).

A maioria dos girinos, que obtém sua energia de fontes exógenas, nutre-se de alimentos aderidos ao substrato raspando-os com seus dentículos labiais e o bico córneo. As partículas de alimentos são posteriormente filtradas e concentradas em pregas mucosas anexas às brânquias. À medida que aspiram a água, ocorre a filtração, ingerindo assim as partículas (DUELLMAN; TRUEB, 1986).

Existe uma grande variabilidade de terminologias usadas para descrever o desenvolvimento larval dos anfíbios de anuros (GOSNER, 1960; ETKIN, 1968). A mais utilizada é a tabela de desenvolvimento de Gosner (1960). Esta tabela é baseada nas alterações morfológicas que ocorrem neste período. Gosner (1960) propõe uma classificação para os estádios de desenvolvimento que estão presentes na maioria das espécies de anuros, dividida em 46 estádios (Figuras 1 e 2). Nos estádios que vão do número 1 ao 25 ocorre o desenvolvimento embrionário. A partir do estágio 20 ocorre a eclosão da larva, sendo que esta se alimenta das suas reservas nutritivas. No estágio 25 (Figura 1) ocorre a absorção total do saco vitelínico, encapsulação das brânquias e a maturação de estruturas anatômicas utilizadas na captura do alimento. Nesta fase, em geral, os girinos passam a consumir alimento e movimentam-se livremente para forragear (DUELLMAN; TRUEB, 1986).

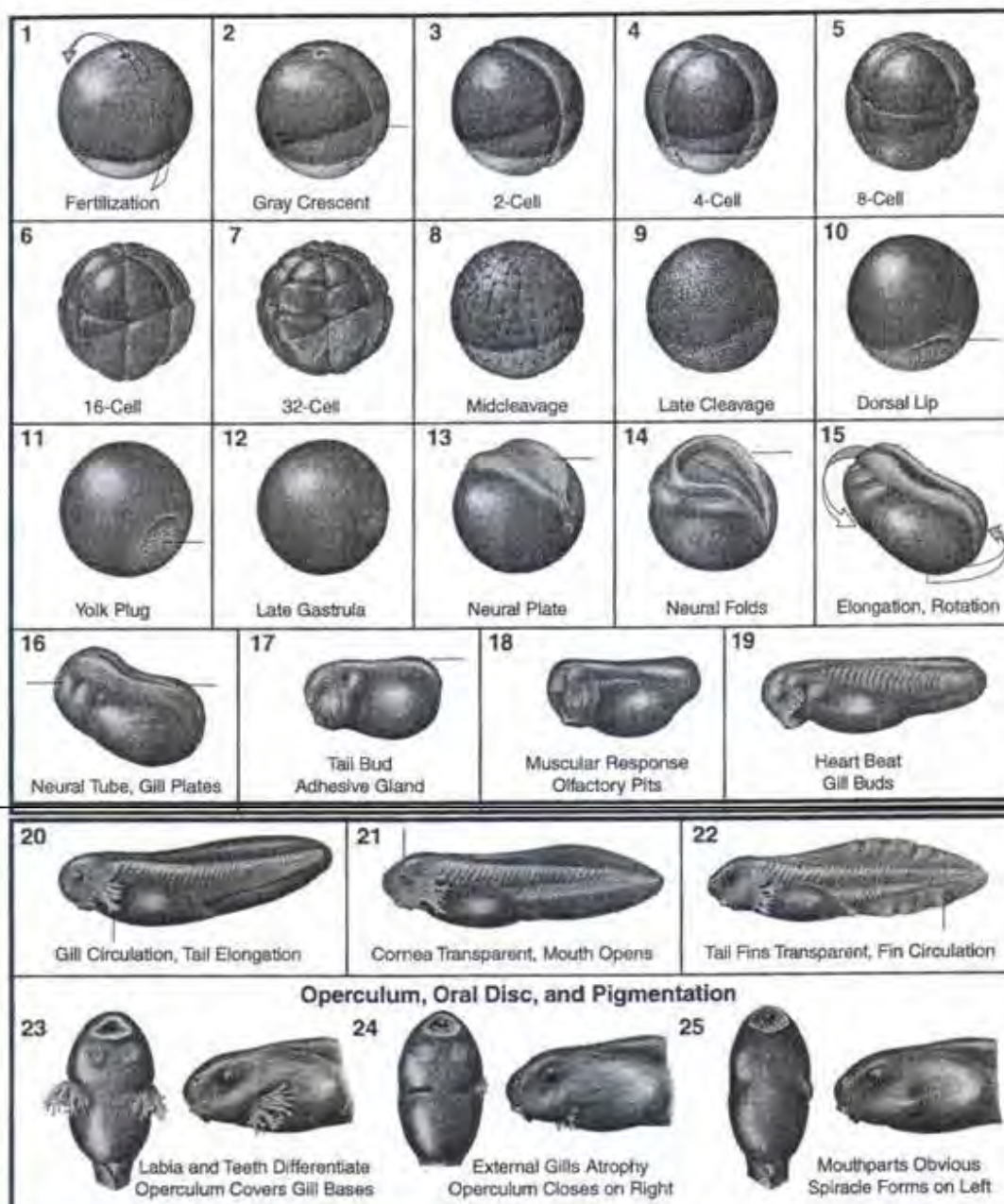


Figura 1: Tabela de Gosner (1960), utilizada para classificar os girinos em estádios de desenvolvimento de 1 a 25.

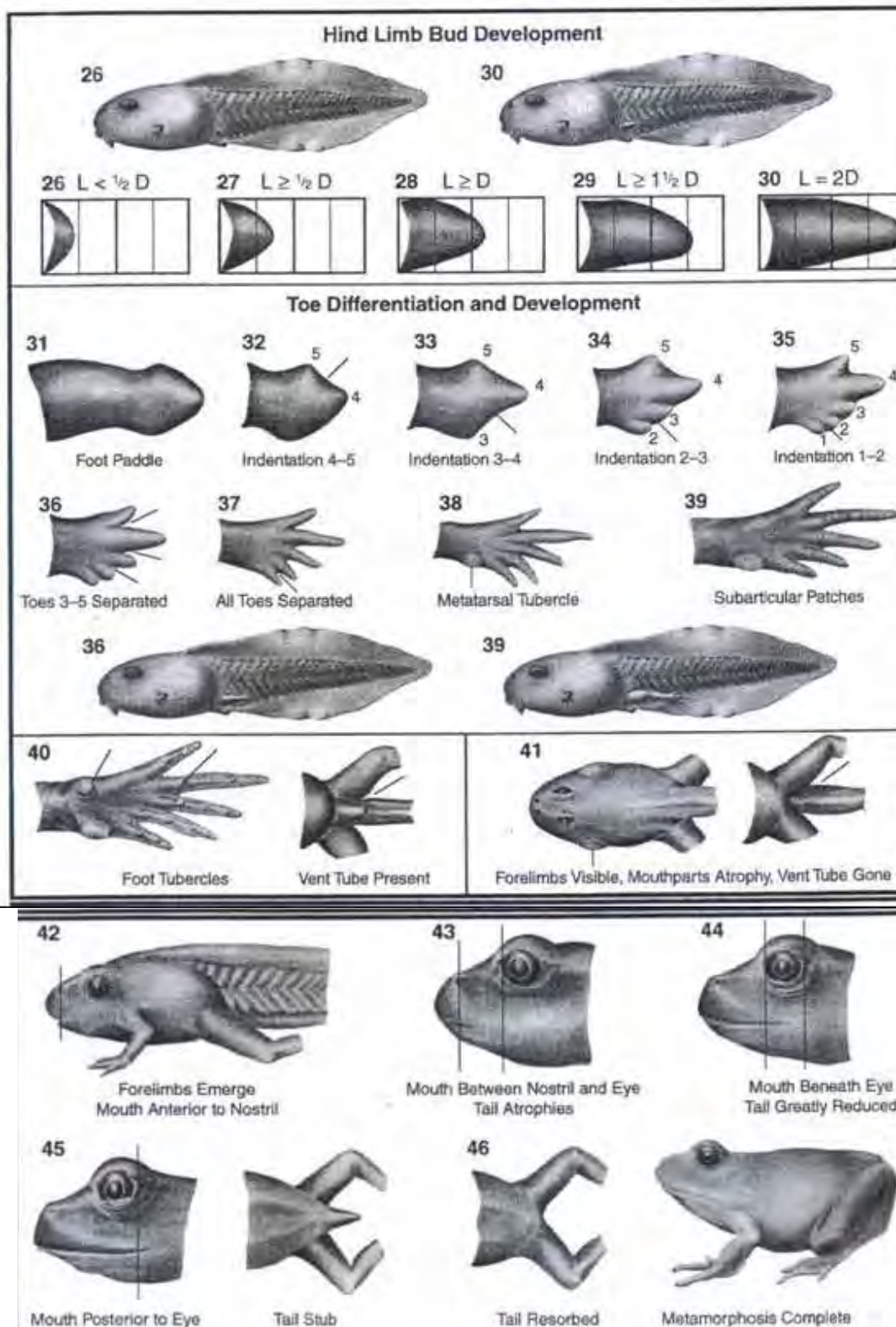


Figura 2: Tabela de Gosner (1960), utilizada para classificar os girinos em estádios de desenvolvimento de 26 a 45.

Nos estádios de 26 a 35 (Figura 2), ocorre o crescimento do corpo e o desenvolvimento dos membros posteriores do animal. Do estágio 36 ao 40 (Figura 2) o crescimento corpóreo se estabiliza e há maturação dos membros posteriores. Nos estádios 41 a 46 ocorre o desenvolvimento dos membros anteriores, reabsorção da cauda e reestruturação das maxilas, compreendendo a metamorfose propriamente dita (GOSNER, 1960).

Etkin (1968) classifica o desenvolvimento dos girinos em fases de crescimento dependentes dos hormônios tireoidianos, sendo elas: pré-metamorfose, pró-metamorfose e clímax, ou metamorfose propriamente dita. A pré-metamorfose corresponde aos estádios de 1 a 30 de Gosner (1960). Com o início do desenvolvimento dependente dos hormônios tireoidianos do estágio 31 até o estágio 41 de Gosner (1960), temos a pró-metamorfose. Para Etkin (1968) os estádios de 42 a 46 da tabela de Gosner (1960) são classificados como clímax metamórfico.

O trato gastroentérico dos girinos pode ser dividido em intestino anterior, médio e posterior. O intestino anterior tem a função de transportar o alimento da faringe até o intestino médio, onde ocorrerá o processo de digestão. O intestino médio é o responsável pelos processos digestivos enzimáticos e bacterianos, possuindo um extenso comprimento que pode ser muitas vezes maior que o comprimento corporal. O intestino posterior é usualmente diferenciado por um abrupto aumento em seu diâmetro e não participa ativamente da digestão enzimática. No entanto, o pH do meio (em torno de 8) permite a continuação do processo digestivo, iniciado no intestino médio (HOUDRY et al., 1996).

Perfil enzimático do trato gastroentérico dos girinos durante a metamorfose

A produção e secreção de enzimas e ácido clorídrico estão diretamente relacionadas às transformações morfológicas da região gastroentérica.

Durante a fase inicial do desenvolvimento dos girinos de *L. catesbeianus* e *X. laevis*, as principais enzimas secretadas na região gástrica são as proteinases, principalmente, as do grupo das catepsinas (catepsina-*E*) (KUJAT, 1981; INOKUCHI et al., 1991; MINETA et al., 1998). Durante a metamorfose, com o desenvolvimento

do estômago, e com o surgimento das células oxintopépticas o ácido clorídrico e o pepsinogênio começam a ser produzidos e secretados. Tem-se então um decréscimo da atividade da catepsina-*E* e um aumento contínuo da atividade de pepsina, que se mantém por toda a vida adulta (KUJAT, 1981; INOKUCHI et al., 1991; MINETA et al, 1998). A pepsina hidrolisa algumas das ligações peptídicas do grupo aminoterminal dos resíduos de aminoácidos aromáticos, tirosina, fenilalanina e triptofano (NELSON; COX, 2006). As quitinases também são secretadas pelo estômago, mas somente após a metamorfose é que sua atividade é detectada (HOUDRY et al., 1996).

As enzimas pancreáticas mais encontradas durante o desenvolvimento dos girinos de *X. laevis* são: tripsina, amilases e lipase. A tripsina está presente durante a metamorfose e por toda a fase adulta desta espécie (KUJAT, 1981; SHI; BROWN, 1990), Braga et al. (2004) observaram atividade catalítica da tripsina em quimo de juvenis de rã-touro logo após a metamorfose. A tripsina por ser uma enzima proteolítica é secretada na forma de um zimogênio (tripsinogênio, forma inativa) que ao chegar ao lúmen do intestino é convertido a sua forma ativa pela ação da enteroquinase, então a tripsina hidrolisa os polipeptídios atuando nas ligações peptídicas que envolvem os grupos carboxila da arginina e lisina.

Em *X. laevis* a α -amilase possui maior secreção durante a fase inicial do desenvolvimento, mas no final da metamorfose há decréscimo da mesma. Esse comportamento tem sido atribuído ao fato de que os girinos consomem quantidades significativas de carboidratos quando comparados aos adultos (LEONE et al., 1976). A α -amilase hidrolisa ligações glicosídicas α -1,4 do amido produzindo uma mistura de glicose, maltose e dextrinas limite. Braga et al. (2005) observaram que logo após a metamorfose a presença da amilase em quimo de girinos inicialmente é muito baixa, a seguir aumenta, mas a comparação entre a atividade amilolítica e o tamanho do animal mostra uma diminuição significativa com o decorrer do desenvolvimento da rã-touro.

A lipase hidrolisa os triacilgliceróis, que chegam ao intestino, em mono e diacilglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol, esses produtos se difundem para o interior das células epiteliais, onde são reconvertidos em triacilgliceróis (NELSON;

COX, 2006). Sua atividade tem sido detectada durante todo o desenvolvimento dos girinos e na fase adulta. Leone et al. (1976) e Braga et al. (2006) avaliaram a atividade da lipase durante a fase larval e em juvenis de *X. laevis* e *L. catesbeianus* e verificaram aumento na atividade enzimática no início da metamorfose, diminuição após a metamorfose seguido de um novo aumento na fase juvenis.

A maioria das hidrolases entéricas dos girinos está associada à digestão e absorção de nutrientes no lúmen e nas microvilosidades do intestino. Em homogeneizado de intestino de girinos de *L. catesbeianus*, foi observada a atividade da maltase, glicoamilase e γ -glutamil transferase (HOUDRY et al., 1979). Maltase e glicoamilase são enzimas que participam da hidrólise dos carboidratos da dieta e estão presentes na rã-touro adulta e nos girinos (HOUDRY et al., 1979). A maltose liberada na hidrólise do amido pela amilase é hidrolisada em unidades de glicose, através da ação da maltase, presentes nas microvilosidades intestinais. Ainda segundo Houdry et al. (1979), a γ -glutamil transferase, por estar relacionada à hidrólise de proteínas, tem maior atividade nos adultos do que nos girinos.

Os hormônios tireoidianos influenciam diretamente todas as mudanças ocorridas no trato gastroentérico, bem como a ativação ou inibição de genes causada por estes hormônios em tecidos alvo (DOMANSKI; HELBING, 2007). Os hormônios da tireóide, que estimulam o desenvolvimento do estômago, no intestino causam degeneração do epitélio primário e neoformação do epitélio definitivo (DODD; DODD, 1976). As secreções enzimáticas relacionam-se principalmente com a hidrocortisona, insulina, gastrina e prostaglandina. Estas atuam diferentemente nos diversos órgãos do sistema digestório o que gera maior ou menor produção e liberação das enzimas digestivas (HOUDRY et al., 1996).

Objetivos

Avaliar a atividade das enzimas catepsina-*E* gástrica, α -amilase, tripsina e lipase pancreáticas, e maltase intestinal em cada estágio de desenvolvimento larval dos girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), visando fornecer subsídios à nutrição.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no setor de Ranicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), e no Laboratório de Enzimologia Aplicada (LEA) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV / UNESP), Campus de Jaboticabal – São Paulo. O trabalho foi realizado entre Janeiro de 2009 e Dezembro de 2010.

Animais experimentais

Os girinos foram acondicionados em tanques com capacidade para 2000 litros, e a densidade utilizada foi de um girino para cada dois litros de água. A temperatura média da água dos tanques foi 27°C. A alimentação fornecida foi ração comercial para peixes, constituída por 40% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo e 6% de matéria fibrosa, fornecida três vezes ao dia até aparente saciação. Nos tanques também foi possível observar a presença de fitoplâncton que, inevitavelmente, fez parte da alimentação dos animais. Nos meses de janeiro, fevereiro, setembro e outubro de 2009 foram realizadas coletas semanais dos girinos, oriundos de pais diferentes e desovas diferentes. Estes foram separados por estádios de desenvolvimento, segundo a tabela de GOSNER (1960), dos estádios de 26 a 45.

Obtenção dos extratos enzimáticos

Para a obtenção dos extratos foram utilizados 100 animais de cada estágio de desenvolvimento, submetidos a um período de 24h sem fornecimento de ração. Os animais foram anestesiados em água com gelo a 4°C, decapitados e, em seguida, os estômagos e os pâncreas foram retirados congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C, separadamente.

Os 100 estômagos de cada estágio foram agrupados em “pools” e homogeneizados em homogeneizador OMNI GLH-2511, a proporção foi de um grama de tecido para 10 ml de água destilada. O homogeneizado foi centrifugado 2000xg durante 2 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi dividido em três alíquotas, congelado em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C. Posteriormente,

as mesmas foram utilizadas para a determinação das atividades das proteases ácidas e da quantidade de proteína presente no extrato.

Os 100 pâncreas de cada estágio foram agrupados em “pools” e homogeneizados em homogeneizador OMNI GLH-2511, em tampão Tris-HCl pH 7,5; contendo CaCl_2 50 mM, na proporção de 1 grama de tecido para 10 ml de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi dividido em três alíquotas, congelado em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C. Posteriormente, as mesmas foram utilizadas para a determinação das atividades da α -amilase, tripsina, lipase e a quantidade de proteína presente no extrato.

Os 100 intestinos de cada estágio foram homogeneizados em homogeneizador OMNI GLH-2511, em tampão Tris-HCl, pH 7,1 contendo manitol 50mM na proporção de 1 grama de tecido para 1 ml de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 xg por 30 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi dividido em três alíquotas, congelado em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C. Posteriormente, as mesmas foram utilizadas para a determinação das atividades da maltase e da quantidade de proteína presente no extrato.

Determinação da atividade das proteases ácidas

A atividade das proteases ácidas foi determinada pelo método descrito por Inokuchi et al. (1991), com adaptações realizadas em nosso laboratório.

A reação foi iniciada pela adição de enzima ao meio de reação contendo hemoglobina bovina acidificada a 2%, pH 2, incubada a 37°C durante 10 minutos e interrompida pela adição de ácido tricloroacético 3% (concentração final). A solução foi filtrada em papel Whatman nº42 e a absorbância foi determinada a 280nm. Em cada determinação foram incluídos controles sem adição de enzimas. Uma unidade de atividade enzimática (U.mg^{-1}) foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de tirosina por minuto por miligrama de proteína nas condições padrões do teste.

Determinação da atividade da α -amilase pancreática

A atividade da α -amilase foi determinada a 37°C, através da dosagem de maltose liberada a partir da hidrólise do amido pela enzima de acordo com Bernfeld (1955), com adaptações realizadas em nosso laboratório.

As condições padrão de ensaio foram: tampão fosfato (20 mM, pH 6,9) contendo NaCl 7 mM, extrato pancreático e amido solúvel a 1%, volume final de 1ml. A reação foi iniciada pela adição do amido ao meio de reação e interrompida com adição de 1ml de solução contendo 1% de ácido 3,5-dinitrosalisílico, 8% de NaOH e 30% de tartarato duplo de sódio e potássio. As amostras foram postas em banho-maria em ebulição por 6 minutos, então foram resfriadas e diluídas em 10ml de água destilada. A absorbância foi determinada a 530nm.

A reta padrão para determinação da maltose incluiu os padrões 0; 0,1; 0,4; 0,8; 1,6; 2,0 mg de maltose/ml de solução. Uma unidade de atividade enzimática ($U \cdot mg^{-1}$) da α -amilase foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de maltose por minuto por miligrama de proteína nas condições padrões do teste.

Determinação da atividade de tripsina pancreática

A atividade da tripsina foi determinada pelo método descrito por Kakade (1974), com adaptações realizadas em nosso laboratório.

Primeiramente, foi efetuada a ativação do zimogênio em tampão Tris-HCl 0,5M pH 8,0 contendo $CaCl_2$ (50mM). Cada dosagem de 0,4 mL do extrato pancreático foi incubada com 0,08 unidades de enteroquinase (SIGMA®) a 37°C por 5 minutos. A reação foi sempre iniciada pela adição de 1mL do substrato N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA, SIGMA®) ao meio de reação contendo o extrato ativado. Depois de 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido acético 30% (v/v). Após centrifugação em microcentrífuga SPIN I durante 2 minutos a 4°C, a absorbância foi determinada a 410nm. Em cada determinação foram incluídos controles sem adição de enzimas. Uma unidade de atividade enzimática ($U \cdot mg^{-1}$) foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 η mol de p-nitroanilida por minuto por miligrama de proteína nas condições padrões do teste.

Determinação da atividade de lipase pancreática

A atividade da lipase foi determinada continuamente, a 24°C, em meio de reação contendo concentrações finais de p-nitrofenilpalmitato 0,5 mM, CaCl₂ 4,4 mM, taurodeoxicolato de sódio 2 mM, Triton X-100 2,5 mg, goma arábica 0,63 mg e excesso de colipase de rã-touro, em um volume final de 1 mL.

A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação e a liberação do produto foi determinada continuamente através da formação do íon p-nitrofenolato, em 530nm, durante 80 segundos, em um espectrofotômetro Hitachi U-200, equipado com célula termostaticável com variação de ± 0,1°C. Em cada determinação foram incluídos controles sem a adição da enzima para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. As determinações foram realizadas em triplicatas sendo que as velocidades iniciais das reações consideradas constantes durante pelo menos 240 segundos, com menos de 5% do substrato sendo hidrolisado.

Uma unidade de atividade (U/mg) de lipase foi definida e expressa como a quantidade de enzima que produz 1 nmol de p-nitrofenolato por minuto por mg de proteína nas condições padrões do teste.

Purificação parcial da colipase

Para purificação parcial da colipase, foi utilizado o método descrito por Brockman (1981).

Primeiro foi realizado a delipidação de 60 gramas de pâncreas de rã os quais foram triturados por um minuto e lavados três vezes consecutivas em solução de Clorofórmio-n-Butanol (9:1, v/v) à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado duas vezes com Clorofórmio-n-Butanol (4:1, v/v) a 4°C e posteriormente com acetona a 4°C. Finalmente, o precipitado foi lavado com éter sulfúrico à temperatura ambiente, filtrado em funil de Büchner com papel filtro Whatman nº 1, seco sob filtração a vácuo a temperatura ambiente e armazenado a -20°C.

Para obtenção da colipase de rã parcialmente purificada, o pâncreas delipidado foram dissolvidos em 20 mL de H₂SO₄ 0,1 M e mantido sob agitação constante por

uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14.000xg por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante ajustado para pH 7,0 com NaOH 5 M e centrifugado novamente.

Após a centrifugação, foi adicionado lentamente ao sobrenadante a solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até se obter 55 % de saturação. A solução obtida foi mantida sob agitação por 30 minutos a 4°C. Em seguida, a solução foi recentrifugada a 2.000xg por 15 minutos. O precipitado foi dissolvido em tampão Tris-HCl 2 mM, pH 6,5, sendo adicionado lentamente sob agitação etanol a 4°C. Posteriormente, o precipitado foi centrifugado a 2.000xg e dissolvido em tampão Tris-HCl 2 mM, contendo 6 mM de taurodeoxicolato sódico, 0,15 M de NaCl, 1 mM de CaCl_2 e 0,3 mM de azida sódica, pH 6,5. Alíquotas de 200 μL foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C.

Atividade da maltase intestinal

A atividade da maltase foi determinada a 37°C, através da glicose liberada pela hidrólise da maltose de acordo com a metodologia descrita por Castillo (2004), com adaptações realizadas em nosso laboratório.

As condições padrões foram compostas por duas gotas de tolueno e tampão fosfato (0,25 M) contendo EDTA (6,25 nM) e maltose (0,125 M) pH 6,5, com volume final de aproximadamente 1ml. A reação foi iniciada com a adição do extrato enzimático e interrompida após 30 minutos, transferindo-se os tubos para banho-maria em ebulição, onde permaneceram por 2 minutos. Após o resfriamento, o material foi centrifugado a 2000xg durante 2 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de glicose no meio de reação, através do uso do kit (Glicose PAP liquiform) da Biodiagnóstica. Sendo que a absorbância utilizada foi de 505nm.

A reta padrão para determinação da glicose incluiu os padrões 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4mg de maltose por ml de solução. Uma unidade de atividade enzimática ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) da maltase foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto nas condições padrões do teste.

Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método descrito por HARTREE (1972), usando soroalbumina bovina fração V como padrão.

Análise estatística

Foram realizadas três repetições das atividades de cada estágio para obtenção dos valores médios. As médias de cada estádios foram analisadas pelo programa “SAS system” versão 9.0. Foram realizadas testes de homocedasticidade (Cramer-von Mises), de normalidade dos erros (Levene), análise de variância (ANOVA One-way) e teste de Tukey para comparação das médias das atividades de cada enzima a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os trabalhos relacionados à variação da produção e atividade das enzimas digestivas durante o desenvolvimento ontogênico em girinos são escassos na literatura. Altig et al. (1975), Houdry et al. (1979), Mineta et al. (1998) e Seixas-Filho et al. (2008) estudaram a presença das enzimas digestivas em *L. catesbeianus*, mas somente em alguns estádios específicos, Braga et al. (2004; 2005; 2006) avaliaram as atividades das enzimas em animais já metamorfoseados, e Leone et al. (1976) realizaram estudos com girinos durante a metamorfose, porém com espécies diferentes e, na maioria das vezes utilizando o conteúdo do lúmen intestinal ao invés do tecido alvo, o que dificulta a comparação dos dados.

A eclosão dos girinos ocorre a partir do estágio 20 da tabela de Gosner (1960), neste estágio, os girinos ainda não se movimentam por natação, alimentando-se de suas reservas nutritivas (vitelo). O consumo total das reservas energéticas ocorre no estágio 25 (GOSNER, 1960), simultaneamente ocorre à maturação de estruturas anatômicas utilizadas na captura do alimento. Então, os girinos exotróficos passam a movimentar-se livremente à procura de alimento (MCDIARMID; ALTIG, 1999; DUELLMAN; TRUEB, 1986).

Nas tabelas 1 e 2, observa-se que foi possível avaliar as atividades enzimática de α -amilase ($3,17 \text{ U.mg}^{-1}$), tripsina ($44,30 \text{ U.mg}^{-1}$), lipase ($2,99 \text{ U.mg}^{-1}$) pancreáticas e de maltase ($26,99 \text{ U.mg}^{-1}$) intestinal, em girinos de rã-touro a partir do estágio 26. Já a atividade das proteases gástricas, $13,82 \text{ U.mg}^{-1}$, só foi estudada a partir do estágio 28, pois não foi possível a obtenção de estômagos antes deste estágio, sendo estes os primeiros estádios em que o animal se alimenta. O que pode ser explicado pelo fato de que algumas são sintetizadas desde o início da alimentação enquanto outras têm sua expressão iniciada durante o desenvolvimento animal (HOUDRY et al., 1979; HOUDRY et al., 1996; LEONE et al., 1976; MINETA et al., 1998).

Tabela 1: Valores de F, coeficiente de variação, probabilidade, testes de normalidade e homocedasticidade e médias das atividades das proteases ácidas, α -amilase e lipase pancreática (em U/mg em $\mu\text{mol}/\text{mim}/\text{mg}$ de proteína) de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*), nos diversos estádios de desenvolvimento.

Estatística		Enzima		
F	Estádio	Proteases ácidas	α -amilase	Lipase
		15,98(p<0,001)	15,98(p<0,005)	11,48(p<0,0001)
			Média	
Pré-metamorfose	26	-----	3,17 ^{hij}	2,99 ^{efg}
	27	-----	1,95 ^{ij}	5,32 ^{abcd}
	28	13,82 ^{bcde}	3,81 ^{ghij}	4,29 ^{abcdef}
	29	16,63 ^{bcd}	7,99 ^{ef}	3,97 ^{bcdef}
	30	15,25 ^{bcde}	4,51 ^{efgh}	3,38 ^{defg}
Pró-metamorfose	31	15,24 ^{bcde}	7,60 ^{efg}	6,41 ^a
	32	13,61 ^{bcde}	5,96 ^{fgh}	4,60 ^{abcde}
	33	14,74 ^{bcde}	13,08 ^{cd}	3,61 ^{def}
	34	15,32 ^{bcde}	10,21 ^{de}	2,99 ^{efg}
	35	16,09 ^{bcde}	7,41 ^{efg}	3,81 ^{cdef}
	36	19,75 ^{abc}	15,11 ^c	4,04 ^{bcdef}
	37	20,82 ^{ab}	15,96 ^c	4,05 ^{abcdef}
	38	15,05 ^{bcde}	28,19 ^a	2,75 ^{fg}
	39	21,71 ^a	10,69 ^{de}	2,24 ^g
	40	12,38 ^{cdef}	20,35 ^b	4,92 ^{abcd}
	41	15,04 ^{bcde}	9,98 ^{de}	5,26 ^{abcd}
Clímax	42	9,60 ^{def}	2,79 ^{hij}	6,17 ^{ab}
	43	5,41 ^g	0,46 ^j	5,84 ^{abc}
	44	8,17 ^{ef}	0,19 ^j	6,03 ^{ab}
	45	10,48 ^{def}	0,38 ^j	4,38 ^{abcde}
Cramer-von Mises		0,29(p<0,005)	0,11(p=0,07)	0,10(p>0,09)
Coeficiente de variação		19,80	14,83	10,41

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2: Valores de F, coeficiente de variação, probabilidade, testes de normalidade e homocedasticidade e médias das atividades de tripsina pancreática e maltase intestinal (em U/mg= μ mol/mim/mg de proteína) de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*), nos diversos estádios de desenvolvimento.

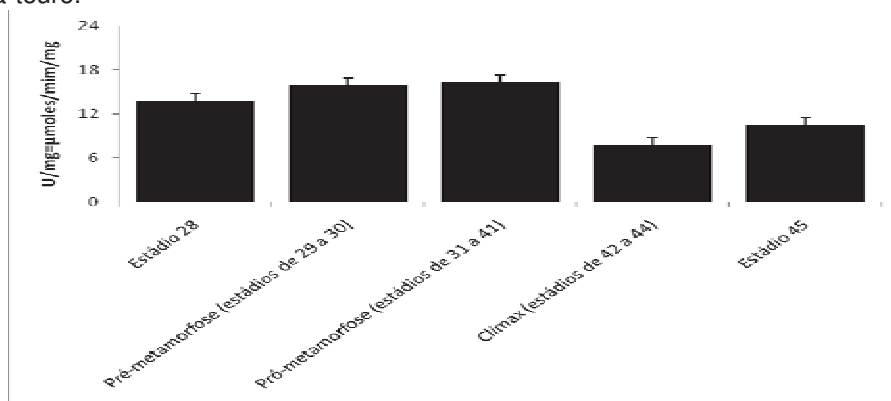
Estatística		Enzima	
F	Estádio	Tripsina	Maltase
		39,78(p<0,001)	17,22(p<0,005)
		Média	
Pré-metamorfose	26	44,30 ^{ghij}	26,99 ^{fg}
	27	30,73 ^{ij}	51,58 ^{bcdef}
	28	61,62 ^{efghi}	48,37 ^{cdef}
	29	109,00 ^{cdef}	32,56 ^{defg}
	30	56,55 ^{ghi}	27,84 ^{fg}
Pró-metamorfose	31	92,79 ^{cdefg}	29,03 ^{efg}
	32	59,18 ^{fghi}	31,29 ^{defg}
	33	128,62 ^{bcd}	58,25 ^{abcd}
	34	56,98 ^{ghi}	79,89 ^{ab}
	35	58,00 ^{fghi}	37,20 ^{cdefg}
	36	136,70 ^{bc}	77,46 ^{ab}
	37	111,58 ^{cde}	64,14 ^{abc}
	38	261,97 ^a	81,62 ^a
	39	141,63 ^{bc}	77,39 ^{ab}
	40	173,95 ^b	65,70 ^{abc}
	41	49,32 ^{ghi}	57,47 ^{abcde}
Clímax	42	38,19 ^{hi}	45,96 ^{cdef}
	43	13,37 ^{ij}	14,98 ^h
	44	5,85 ^j	14,19 ^h
	45	83,93 ^{defgh}	24,05 ^{fg}
Cramer-von Mises		0,11(p>0,06)	0,04(p<0,25)
Coeficiente de variação		19,60	19,56

*Médias seguidas de mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Durante os períodos de pré e pró-metamorfose houve aumento da atividade de proteases ácidas, mas em menor porcentagem em relação as demais enzimas (Figura 3), com valor máximo no estágio 39 (21,71 U.mg⁻¹). Já a tripsina apresenta uma tendência de aumento durante os períodos precedem a metamorfose (Figura 4),

e no estágio 38 a atividade ($261,97 \text{ U.mg}^{-1}$) é de cerca de cinco vezes maior que a observada no início do experimento.

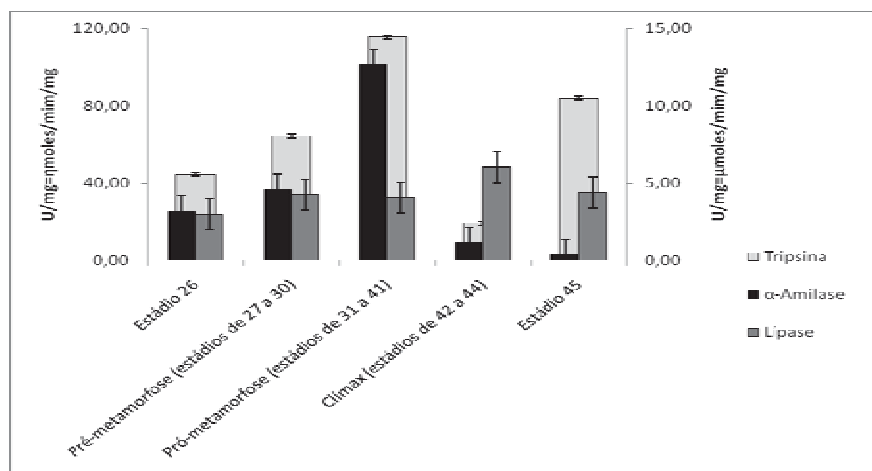
Figura 3: Médias das atividades das proteases ácidas durante os períodos de desenvolvimento de girinos de rã-touro.



A partir do estágio 31 (Figura 1) com início da pró-metamorfose, houve aumento significativo de cerca de nove vezes nas atividades da α -amilase e da tripsina (Figura 4) sendo o estágio 38 o que apresentou os maiores valores, $28,19 \text{ U.mg}^{-1}$ e $261,97 \text{ U.mg}^{-1}$, respectivamente.

Altig et al. (1975) observou aumento da atividade da lipase nos estádios 25 e 37, comportamento esse semelhante ao mostrado na tabela 1. Entretanto a comparação das médias entre as atividades da pré e a pró-metamorfose revelou pequena diminuição da atividade da referida enzima (Figura 4). Comportamento similar foi observado por Seixas-Filho et al. 2008 para a lipase extraída do lúmen (quimo) intestinal, sugerindo que não se trata de um comportamento tecido específico e sim da expressão da referida enzima nos estádios analisados. Assim sendo, ainda não temos uma explicação definitiva para esse comportamento.

Figura 4: Médias das atividades de α -amilase, tripsina e lipase pancreáticas durante os períodos de desenvolvimento de girinos de rã-touro.

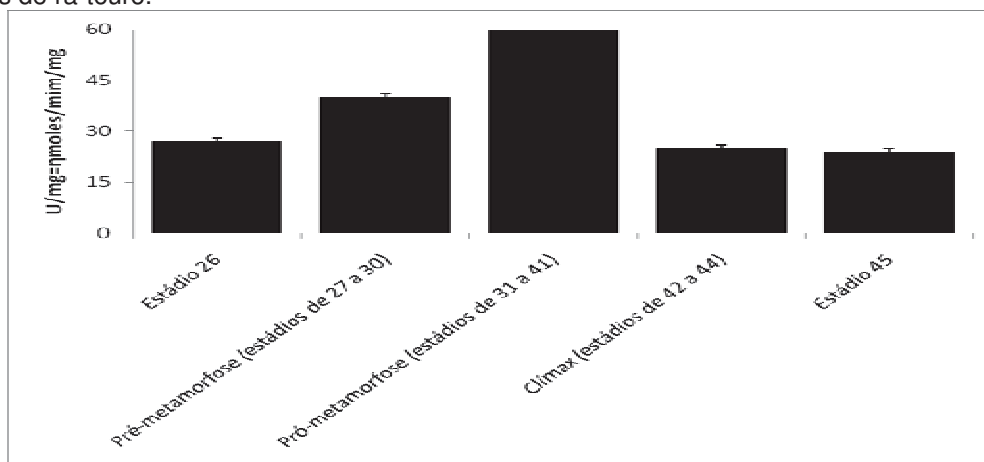


Durante a pró-metamorfose a maltase também teve sua atividade aumentada (Figura 5), sendo o estágio 38 onde a atividade apresentou maior valor 81,62 U.mg⁻¹.

Além da relação entre o início da alimentação e o aumento da atividade das enzimas, outra possibilidade que não deve ser descartada é que o perfil de atividade das enzimas dos girinos de rã-touro também pode estar associado com a maturidade das células do tecido exócrino do pâncreas e as alterações do tubo digestório. Segundo, Leone et al. (1976), somente a partir do estágio 29 é que ocorre o completo amadurecimento das estruturas responsáveis pela síntese e secreção das enzimas, o que ficou demonstrado neste trabalho, onde as enzimas estudadas, exceto a lipase, apresentaram maior atividade no período da pró-metamorfose (Figura 3, 4 e 5). Comportamento similar foi descrito por Seixa-Filho et al. (2008) ao estudar a atividade da tripsina em quimo de girinos de rã-touro, e aos na atividade de pepsina de *L. catesbeianus* nos estádios 25, 26 e 37 por Altig et al. (1975).

É importante salientar ainda que entre os estádios 31 e 41 ocorre maior crescimento corpóreo dos girinos e aumento no consumo de nutrientes (ETKIN, 1968), conseqüentemente faz se necessário um aporte maior de enzimas (Figura 3, 4 e 5). O aumento no consumo de alimento e no tamanho dos girinos tem por função gerar reservas energéticas a serem consumidas no clímax metamórfico, período em que o animal não se alimenta (DUELLMAN; TRUEB, 1986).

Figura 5: Médias das atividades de maltase intestinal durante os períodos de desenvolvimento de girinos de rã-touro.



Durante o clímax da metamorfose as atividades das proteases ácidas (5,41 U.mg⁻¹, estágio 43), tripsina (5,85 U.mg⁻¹, estágio 44), α -amilase (0,19 U.mg⁻¹, estágio 44) e da maltase intestinal (14,19 U.mg⁻¹, estágio 44) diminuiram significativamente, o que pode estar relacionado com a não ingestão de alimento pelos mesmos neste período, sugerindo que nesse período a cauda a possível fonte de combustível metabólico (GONÇALVES et al. 2010). De fato, Albinati (1999) concluiu que o consumo relativo do alimento pelos girinos diminuiu no decorrer da metamorfose. Isto devido principalmente aos processos de desestruturação e reestruturação que ocorrem no pâncreas e as alterações morfológicas no estômago. Nos girinos de *L. catesbeianus* observa-se uma redução no comprimento relativo do tubo digestório. Segundo Nakaghi et al. (2006), o encurtamento do tubo digestório é da ordem de 75% (BROWN; CAI, 2007). Estas transformações coincidem com a mudança de onívoro/herbívoro para carnívoro (VIERTTEL; RICHTER, 1999).

Diferentemente da lipase que teve sua atividade aumentada, 6,17 U.mg⁻¹. Comportamento similar foi observado por Seixas-Filho et al. 2008 para a lipase extraída do lúmen (quimo) intestinal, sugerindo que não se trata de um comportamento tecido específico e sim da expressão da referida enzima nos estádios analisados. Assim sendo, ainda não temos uma explicação definitiva para esse comportamento.

Com a modificação do hábito alimentar, as proteases deverão tornar-se mais importantes para os animais adultos do que as enzimas responsáveis pela digestão dos carboidratos (OLIVEIRA-BAHIA, 2008), assim como mostrado neste trabalho, ao final da metamorfose, estágio 45, as atividades voltam a aumentar (proteases ácidas $10,48 \text{ U.mg}^{-1}$, tripsina $83,93 \text{ U.mg}^{-1}$ e maltase $24,05 \text{ U.mg}^{-1}$) enquanto a da α -amilase, $0,38 \text{ U.mg}^{-1}$, não apresentou alteração significativa, estes comportamentos coincidem com os descritos por Houdry et al. (1979) e Braga et al. (2004; 2005).

A atividade da lipase, $4,38 \text{ U.mg}^{-1}$, voltou a diminuir, contudo foi observado por Braga et al. 2006 que após este período a atividade volta a aumentar aumenta novamente, o que deve estar relacionado a mudança do hábito alimentar, pois os juvenis ingerem alimentos com maior quantidade de lipídeos.

Serão necessários mais estudos sobre a influência da composição das rações sobre a produção enzimática e também estudos mais específicos sobre a variação da atividade da lipase para entender-se melhor seu comportamento.

CONCLUSÕES

- Os resultados mostram que as atividades das enzimas estudadas variam ao longo do desenvolvimento dos girinos, o que pode ter importantes implicações para a criação desses animais.
- O desenvolvimento do sistema digestório acarreta variação na atividade enzimática durante o período larval.
- O aumento da atividade das enzimas proteolíticas capacita o animal a digerir principalmente proteína devido a mudança no hábito alimentar de onívoro/herbívoro para carnívoro que ocorre no final da metamorfose.
- No período de pré e pró-metamorfose o girino é capaz de digerir doses crescentes de alimentos ricos em carboidratos, enquanto no clímax da metamorfose ocorre uma diminuição de sua capacidade de digerir alimentos dessa origem, provavelmente relacionado às mudanças do trato digestório.
- Diante dos resultados obtidos, faz-se necessária a formulação de rações adequadas aos girinos, como forma de aumentar o rendimento/eficiência da digestão desses animais.

REFERÊNCIAS

ALBINATI, R. C. B. Avanço na nutrição de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 1999, São Miguel do Iguaçu. **Alimentos e Alimentação**. São Miguel do Iguaçu: ABETRA, 1999, p.13–31.

ALTIG, R.; PADGETT K. J.; WELLS, M.; PHILLIPS, J. Digestive Enzymes of Seven Species of Anuran Tadpoles. **Herpetologica**, v.31, n.1, p.104-108, 1975.

BARBOSA J. M.; SILVEIRA, A. M.; GOMIDE C. A. Crescimento heterogêneo de girinos de rã-touro alimentados com diferentes rações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.10, p.1015-1019, 2005.

BERNFELD, P. Amylases α and β . In: COLOWICK, S.B.; KAPPLAN, N.O. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1955, v.1, p.149-153.

BRAGA, L. G. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; LIMA, W. C.; EUCLYDES, R. F. Atividade da Tripsina em Rã-Touro na Fase Pós-Metamórfica. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.4, p.821-827, 2004.

BRAGA, L. G. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; LIMA, W. C.; EUCLYDES, R. F. Atividade da amilase em rã-touro durante a fase pós-metamórfica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.10, p.947-951, 2005.

BRAGA, L. G. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; LIMA, W. C.; EUCLYDES, R. F. Enzymatic activity of lipase in post metamorphic phase bullfrogs. **Scientia Agricola**, Piracicaba, n.5, v.63, p.439-443, 2006.

BROCKMAN, H. L. **Methods in enzymology**, vol.71, p.619-627, 1981.

BROWN, D. D.; CAI, L. Amphibian metamorphosis. **Developmental Biology**, Bethesda, v.306, n.7, p.20–33, 2007.

CASTILLO, W.; KRONKA, R. N.; PIZAURO, J. M.; THOMAZ, M. C.; CARVALHO, L. E. Efeito da substituição do farelo de soja pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) desidratada como fonte protéica em dietas para leitões desmamados sobre peso de órgãos digestivos e atividade das enzimas pancreáticas. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v. 12, n. 1, p. 12-20, 2004.

DIAS, D. C.; FURLANETO, F. P. B.; AYROZA, L. M. S; FRANÇA, F. M.; STÉFANI, M. V. Estudo da viabilidade econômica do uso de probiótico na alimentação da rã-touro, *Rana catesbeina*. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.37, n.3, p. 8-13, 2007.

DODD, M. H. I.; DODD J. M. The biology of metamorphosis. In: **Physiology of the amphibian**, (Ed.). LOFTS, B. New York: Academic Press, p.467–599, 1976.

DOMANSKI, D.; HELBING, C. C. Analysis of the *Rana catesbeiana* tadpole tail fin proteome and phosphoproteome during T3-induced apoptosis: identification of a novel type I keratin. **BMC Developmental Biology**, 2007.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York: McGraw-Hill, 1986.

ETKIN, W. In: **Metamorphosis: a problem in development biology**. (Ed.). ETKIN, W. GILBERT L. T. New York: Appleton–Century–Crofts, 1968, p.313-348.

FEIX, R. D.; ABDALLAH, P. R.; FIGUEREDO, M. R. C. Resultado econômico da criação de rã em regiões de clima temperado, Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, n.3, p. 70-80, 2006.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, Lafayette, v.16, n.3, p.183-190, 1960.

HARTREE, E. F. Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, p.422-427, 1972.

HOUDRY, J.; CHABOT, J. G.; MENARD, D.; HOGON, J. S. Intestinal brush border enzyme activities in developing amphibian *Rana catesbeiana*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, New York, v.63, p.121–125. 1979.

HOUDRY, J.; L'HERMITE, A.; FERRAND, R. Changes in the digestive tract and feeding behavior of anuran amphibians during metamorphosis. **Physiological Zoology**, Chicago, v.69, n.2, p.219-251, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, IBAMA, **Estatística da pesca 2007 – Brasil**. Grandes estados da Federação, Brasília, Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/wp-content/files/estatistica_2007.pdf> Acesso em 4 de fevereiro de 2011.

INOKUCHI, T.; KOBAYASHI, K.; HORIUCHI, S. Acid proteinases of the fore-gut in metamorphosing tadpoles of *Rana catesbeiana*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**.Oxford, v.99b, n.3, p.653–662, 1991.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 376-382, 1974.

KUJAT, R. Pepsin and trypsin activity in the fore gut of metamorphosing *Xenopus laevis* larvae. **Folia Biológica**, Krakow, v.29, p.275–278, 1981.

LEONE, F.; LAMBERT-GARDINI S.; SARTORI, C.; SCAPIN, S. Ultrastructural analysis of some functional aspects of *Xenopus laevis* pancreas during development and metamorphosis. **Journal of Embriology Experimental Morphology**, London, v.36, n.3, p.711–724, 1976.

LIMA, S. L.; CRUZ, T. A.; MOURA, O. M. **Ranicultura**: análise da cadeia produtiva. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa Ltda, 1999.

LIMA, S., L. Situação Atual e Perspectivas da Ranicultura. **Panorama da Aquicultura**. v. 15, n. 89, p. 32-34, 2005.

McDIARMID R. W.; ALTIG R. **Tadpoles**: the biology of anuran larvae. Chicago: The University of Chicago Press, 1999.

MINETA, T.; INOKUCHI, T.; KOBAYASHI, K.; HORIUCHI, S. Distribution of cathepsin-*E* in the larval and adult organ of the bullfrog with special reference to the mature form in the larval fore-gut. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, New York, v.121, p.333-340, 1998.

NAKAGHI, L. S. O.; BUTLLER, L.; OLIVEIRA-BAHIA, V. L.; STÉFANI, M. V. Estudo anatômico e histológico do pâncreas dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante desenvolvimento e metamorfose. In: AQUACIÊNCIA 2006, Bento Gonçalves. **Resumos AquaCiência**, Bento Gonçalves: , 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202.

OLIVEIRA-BAHIA, BUTLLER, L.; V. L.; STÉFANI, M. V.; SANTOS, L. F. J.; NAKAGHI, L. S. O. Development of the gastroenteric region in *Rana catesbeiana* tadpoles during the metamorphosis process. **Brazilian Journal Morphological Sciences**, v.22, suppl, p.158-159, 2005.

OLIVEIRA, M. M.; PIMENTA, M. E. S. G.; CAMARGO, A. C. S.; PIMENTA, C. J.; LOGATO, P. V. R. Silagem ácida de resíduos de filetagem de tílapias para girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw,1802) digestibilidade e desempenho. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.32, n.2, p.618-625, 2008.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. Salamandras, anuros e cecílias. In: -----.
A vida dos vertebrados. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 9, p.221-269.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E A ALIMENTAÇÃO, FAO. **Aquaculture**. National Aquaculture Sector Overview. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/en>. Acesso em: 3 de fevereiro de 2011.

SEIXAS FILHO, J. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; MOURA, G. S.; GARCIA, S. L. R.; LANNA, E. T. A.; SILVA, L. N. Desempenho e atividades enzimáticas em girinos de rã-touro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.11, p.1617-1624, 2008

SHI, Y. B.; BROWN, D. D. Developmental and thyroid hormone – dependent regulation of pancreatic genes in *Xenopus Laevis*. **Genes & Development**, v.4, p.1107–1113. 1990.

VEIGA, N. Importância da alimentação e nutrição em ranicultura. In: MINI SIMPÓSIO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 1989, Botucatu. **Anais do Mini simpósio do Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, Botucatu: 1989, p.45–69.

VELLY, M. L. M. A pele animal e os comportamentos mercadológicos para o novo milênio. In: **CICLO DE PALESTRAS SOBRE RANICULTURA DO INSTITUTO DE PESCA**, 1., São Paulo. São Paulo: Instituto de Pesca, 2001. p. 34-36. (Boletim Técnico, 31).

VIERTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy: Viscera and Endocrines. In: McDIARMID R. W.; ALTIG R. **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. Chicago: The University of Chicago Press, 1999.

WELLS, K. D. **The ecology and behavior of amphibians** Chicago : The University of Chicago Press, 2007

ANEXO

Parecer da comissão de ética

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 022679/09 do trabalho de pesquisa intitulado "**Atividade de enzimas digestivas em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante o desenvolvimento larval**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de outubro de 2009.

Jaboticabal, 13 de outubro de 2009.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n - CEP 14884-000 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202-4275 - www.fca.vnpop.br