



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DO PACU
(*Piaractus mesopotamicus*) A CARBOIDRATOS

ANA PAULA BALDAN
ZOOTECNISTA

Jaboticabal
São Paulo - Brasil
- 2008 -



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DO PACU
(*Piaractus mesopotamicus*) A CARBOIDRATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura da UNESP,
Campus de Jaboticabal, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutor em Aqüicultura.

ANA PAULA BALDAN
Doutoranda

Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI
Orientadora

- Fevereiro/2008 -
Jaboticabal/SP

Dedicatória

Ao meu amor, Fabiano

*Sua presença ao meu lado, com todo seu carinho, companheirismo,
apoio e compreensão foram importantes para me dar forças em todos os
momentos deste caminho que não foi fácil...
Mas de grande importância para nossas vidas.*

Muito obrigada Fa!

Agradecimentos

Agradeço à Deus por iluminar meu caminho e dar forças para eu sempre seguir em frente.

À Professora Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pela orientação, ensinamentos e seu carinho desde o momento que cheguei em Jaboticabal. Por me acolher e ser esta pessoa maravilhosa. Beth sempre terei você como um exemplo a seguir!

Aos Professores Dr. João Batista Kochenborger Fernandes, Dr. Luis Henrique Montezor, Dra. Monica Yumi Tsuzuki, Dr. Osmar Ângelo Cantelmo, pelas valiosas sugestões ao trabalho.

As professoras Patricia Monteiro Seraphin e Juliet Kiyoko Sugai pelo apoio constante, colaboração e principalmente pelo apreço demonstrado.

Ao professor Dr. Leonardo Takahashi pelas sugestões ao trabalho e amizade desde o momento que cheguei em Jaboticabal.

A Damares Perecin Roviero pela ajuda e amizade e em todos os momentos. Seu apoio foi muito importante para mim.

Aos meus “irmãos urbinets”: Luciana, Janessa, Leonardo, Jaqueline, Márcio, Sumô, Mônica, Carla, Michele e Rafael Sabione, Rafael Previde, Mariana, Aline, Spinha e Camilo Prieto (nosso irmão adotivo) pela ajuda, amizade e pelos bons momentos que passamos no Laboratório.

As minhas amigas e companheiras Monyka, Jaque e Luciana pelas conversas e momentos de alegria que passamos juntas.

Aos amigos Casé e Mari pela amizade.

À Fernanda Yumoto da Silva pelo auxílio nas análises e sua amizade.

Aos meus pais, Antonio e Marlene, e toda minha família Tati, Sandro, João Paulo, Thais, Reinaldo, Sandra, Beto, Ju, Marcelo, Giulia, Tatiana e Junior, pela compreensão da nossa ausência em tantos momentos, pelo apoio e carinho.

À tia Lu e tio Benê pelo apoio, carinho e amizade em tantos momentos.

Ao amigo Paulo Carneiro, que nos guiou para este caminho da pós-graduação e a Simone e Gabriela pela amizade e carinho.

Aos amigos Luis Fernando e Gisele, pelo companheirismo e amizade durante nossas exaustivas análises de amido.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e do Centro de Aqüicultura da UNESP, pela ajuda em todas os momentos.

Aos professores, colegas e amigos do curso de Pós-Graduação em Aqüicultura da UNESP pelos ensinamentos, pela amizade e pela colaboração nesta jornada.

À empresa CORN PRODUCTS BRASIL Ingredientes Industriais Ltda (Mogi Guaçu, Brasil) pelo fornecimento do amido de milho pré-gelatinizado utilizado neste estudo.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo auxiliando na realização deste trabalho.

À todos, o meu muito obrigada!!

ÍNDICE

Capítulo 1. Considerações Gerais

Carboidratos na nutrição de peixes.....	02
O amido.....	04
A utilização de amido pelos peixes.....	05
Utilização de carboidratos por espécies nativas.....	06
Jejum e realimentação.....	06
Referências.....	09

Capítulo 2. Uso de amido de milho pré-gelatinizado em dietas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*): crescimento e desempenho produtivo e metabolismo energético

Resumo.....	16
Abstract.....	17
Introdução.....	18
Material e métodos.....	20
Resultados.....	23
Discussão.....	27
Referências.....	33

Capítulo 3. Respostas metabólicas pós-prandiais de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, alimentado com diferentes níveis de carboidrato: alimentação crônica e aguda

Resumo.....	40
Abstract.....	41
Introdução.....	42
Material e Métodos.....	44
Resultados.....	46
Discussão.....	60
Referências.....	65

Capítulo 4. Respostas metabólicas pós-prandiais de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, ao jejum e realimentação após adaptação a dietas com diferentes níveis de carboidratos

Resumo.....	
Abstract.....	72
Introdução.....	73
Material e Métodos.....	74
Resultados.....	76
Discussão.....	88
Referências.....	93

Capítulo 5. Identificação de proteína transportadora de glicose GLUT4 em músculo esquelético de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Estudos preliminares

Resumo.....	97
Abstract.....	98
Introdução.....	99
Material e Métodos.....	100
Resultados e Discussão	101
Referências.....	103

Capítulo 6. Considerações Finais.....106

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 2.

Tabela 1 - Fórmula e composição proximal das dietas experimentais.....	1
Tabela 2 - Parâmetros de desempenho produtivo de pacu alimentado com baixo amido, alto e um nível intermediário após 60 dias de alimentação.....	24
Tabela 3 - Glicose e ácidos graxos livres plasmáticos, proteína total, triglicerídeos e colesterol séricos de pacu alimentado por 60 dias com níveis baixo, intermediário e alto amido na dieta, 24 horas após alimentação.....	26
Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos (glicogênio hepático, lipídio hepático e lipídio muscular) e índices biométricos (índice hepatossomático e índice gorduro-viscerossomático) de pacu alimentado por 60 dias com níveis baixo, intermediário e alto amido na dieta, 24 horas após alimentação.....	27

Capítulo 3.

Tabela 1 - Fórmula e composição proximal das dietas experimentais.....	44
--	----

Capítulo 4.

Tabela 1 - Fórmula e composição proximal das dietas experimentais.....	74
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2.

- Figura 1 - Índice estomaco-somático de pacu alimentado por 60 dias com baixo, intermediário e alto amido na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....25
- Figura 2. Índice intestino-somático de pacu alimentado por 60 dias com baixo, intermediário e alto amido na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....25

Capítulo 3.

- Figura 1. Glicose plasmática de pacu alimentado por 60 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....47
- Figura 2. Ácidos graxos livres no plasma de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....47
- Figura 3. Triglicerídios sérico de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....48
- Figura 4. Colesterol sérico de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....48
- Figura 5. Proteína total sérica de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....49
- Figura 6. Glicogênio hepático de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....50
- Figura 7. Lipídio hepático de pacu alimentado por 60 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....50
- Figura 8. Lipídio muscular de pacu alimentado com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta por 60 dias.....51

Figura 9. Índice hepato-somático de pacu alimentado por 60 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	52
Figura 10. Índice estomaco-somático de pacu alimentado por 60 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	53
Figura 11. Índice intestino-somático de pacu alimentado por 60 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	54
Figura 12. Glicose plasmática de pacu alimentado por 3 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	55
Figura 13. Ácidos graxos livres no plasma de pacu alimentado por 3 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	55
Figura 14. Triglicerídeos sérico de pacu alimentado por 3 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	56
Figura 15. Colesterol sérico de pacu alimentado com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta por 3 dias.....	56
Figura 16. Lipídio hepático de pacu alimentado por 3 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	57
Figura 17. Lipídio muscular de pacu alimentado por 3 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	58
Figura 18. Índice hepato-somático de pacu alimentado por 3 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	58
Figura 19. Índice estomaco-somático de pacu alimentado por 3 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	59

Figura 20. Índice intestino-somático de pacu alimentado por 3 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	60
--	----

Capítulo 4.

Figura 1. Glicose plasmática de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias.....	77
---	----

Figura 2. Ácidos graxos livres no plasma de pacu alimentado com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato) por 60 dias, após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias.....	77
---	----

Figura 3. Triglicerídeos séricos de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias.	78
--	----

Figura 4. Colesterol sérico de pacu, após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias, depois de alimentados por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	78
--	----

Figura 5. Proteína total sérica de pacu alimentado com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato) por 60 dias, após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias.....	79
---	----

Figura 6. Lipídio hepático de pacu alimentado com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato) por 60 dias, após jejum de 7 dias e realimentação por 3 dias.....	80
---	----

Figura 7. Índice hepato-somático de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias.....	81
---	----

Figura 8. Índice estomaco-somático de pacu alimentado com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato) por 60 dias, após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias.....	81
--	----

Figura 9. Índice intestino-somático de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias.....	82
Figura 10. Glicose plasmática de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	83
Figura 11. Ácidos graxos livres de pacu, após jejum de 7 dias e realimentação por 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	83
Figura 12. Ácidos graxos livres no plasma de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	84
Figura 13. Triglicerídeos séricos de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	84
Figura 14. Glicogênio hepático de pacu após jejum de 7 dias e realimentação por 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	85
Figura 15. Lipídio hepático de pacu após jejum de 7 dias e realimentação por três dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	86
Figura 16. Lipídio muscular de pacu após jejum de 7 dias e realimentação por 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	86
Figura 17. Índice hepato-somático de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	87
Figura 18. Índice estomaco-somático de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato).....	87
Figura 19. Índice intestino-somático de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas).....	88

Capítulo 5.

Figura 1 - Detecção em músculo esquelético de rato e pacu, por Western blotting. Amostra de fracionamento de membrana total na concentração de 30µg em rato e 100µg em pacu.....102

Capítulo 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Carboidratos na nutrição de peixes

A aqüicultura tem crescido satisfatoriamente nos últimos anos e se destaca dentre as atividades zootécnicas como produtora de proteína de origem animal. Com isto, a crescente investigação na área de nutrição e alimentação de peixes se faz indispensável para contribuir com o sucesso da atividade.

A adição de carboidratos como fonte de energia tem sido bastante usada na dieta de animais domésticos. Apesar de não existirem exigências de carboidratos em dietas para peixes, sua inclusão em níveis adequados pode assegurar uma melhor eficiência na utilização de outros nutrientes (Wilson, 1994).

Sua utilização pode reduzir o catabolismo de proteínas para síntese de glicose (Suarez e Mommsen, 1987). Secundariamente, pode melhorar a eficiência de retenção protéica e diminuir as perdas metabólicas de nitrogênio no ambiente (Cowey e Walton, 1989; Wilson, 1994). A melhora no crescimento e o efeito poupador de proteína podem estar relacionados ao fato da glicose ser um importante combustível metabólico para os tecidos glicose-dependentes, tais como células vermelhas, tecidos nervosos, entre outros. Desta forma, carboidratos presentes na dieta de peixes podem reduzir a atividade gliconeogênica, assim afastando aminoácidos da via oxidativa (Cowey et al., 1977b).

Segundo Hilton et al. (1987), um nível tolerável de carboidrato em dietas para peixes é aquele que não compromete o crescimento ou resulta em aumento da mortalidade, enquanto que um nível ótimo de carboidrato em dietas para peixes é o que permite que a glicose seja totalmente oxidada para produzir energia, e assim poupar proteína.

Ainda que o carboidrato seja bastante usado como fonte de energia na dieta de animais domésticos, alguns peixes parecem ter menor habilidade em utilizá-la (Christiansen e Klungsoyr, 1987). Várias possibilidades têm sido discutidas para explicar o mecanismo da intolerância dos peixes aos carboidratos.

A redução do grau de utilização de glicose poderia ser resultado de deficiência de insulina (Palmer e Ryman, 1972; Thorpe e Ince, 1974), porém, através de radio-imunoensaio, encontrou-se concentrações de insulina plasmática em peixes similares ou muitas vezes superiores àquelas observada em mamíferos (Thorpe e Ince, 1976; Hertz et al., 1989; Plisetskaya, 1990; Mommsen e Plisetskaya, 1991). A intolerância à glicose foi atribuída também a uma menor atividade de receptores da insulina (Gutierrez et al., 1991; Mommsen e Plisetskaya, 1991), embora mais recentemente tenha-se verificado alta atividade de tais receptores (Maestro et al., 1997). Outra possibilidade seria a ineficiência da proteína

transportadora de glicose GLUT4 nos mecanismos de absorção e utilização da glicose (Wright et al., 1998). Na maioria dos animais, a glicose entra nas células por difusão facilitada mediada por uma família de proteínas transportadoras de glicose, os GLUTs. Em mamíferos, 13 diferentes isoformas de GLUT já foram identificadas (GLUT1-4), cada uma produto de um gene separado e com diferente distribuição e função. Estas diferentes isoformas pertencem a uma família de glicoproteínas estruturalmente relacionadas (Pessin e Bell, 1992) que facilitam a captação de glicose e que são igualmente expressas em células de mamíferos de maneira tecido-específica (Mueckler, 1994).

O metabolismo de glicose dos peixes tem sido bastante estudado em relação, principalmente, aos mamíferos, visto que os tecidos periféricos destes animais (músculo, por exemplo, que representa 50 % do peso corporal) têm menor capacidade na utilização da glicose (Cowey e Walton, 1989). Independente da baixa taxa de absorção nos tecidos de peixes (Cowey e Walton, 1989; Blasco et al., 1996), há evidências indiretas sugerindo a entrada de glicose nas células possa ser mediada por transportadores da família GLUT. Em um estudo com tilápia, um peixe onívoro, anti-corpos contra GLUT-1 de mamíferos reagiram com uma proteína presente no coração e cérebro dos peixes (Wright et al., 1998). Em outro estudo, embriões transgênicos de truta que expressaram a GLUT-1 humana mostraram aumento da absorção de glicose e do metabolismo (Krasnov et al., 1999). Adicionalmente, Planas et al. (2000) identificaram, na truta, uma molécula de GLUT com alta homologia do GLUT-4 de mamíferos, que se expressou no músculo esquelético, rim e brânquias, tecidos com alta utilização de glicose.

Uma outra possível causa da baixa utilização da glicose da dieta pelos peixes seria uma disfunção da regulação nutricional envolvendo duas grandes vias metabólicas no fígado: a baixa capacidade para armazenar excesso de glicose na fase pós-prandial (síntese de glicogênio ou lipogênese) (Cowey e Walton, 1989; Wilson, 1994) e/ou a alta atividade persistente de produção de glicose hepática quando carboidratos são fornecidos na dieta (Panserat et al., 2000; Panserat et al., 2001).

Em vertebrados, a glicoquinase, ou hexoquinase IV, do fígado, atua na taxa de utilização de glicose para controle de sua homeostase, através da fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato. Pesquisas em teleósteos com diferentes capacidades de utilização de carboidrato mostraram variações qualitativas e quantitativas da glicoquinase, sugerindo que esta pode ser uma explicação para a tolerância/intolerância ao carboidrato (Panserat et al., 2000). É importante ressaltar que a maioria dos estudos citados se refere a peixes carnívoros.

Sugere-se, ainda, que peixes onívoros são capazes de utilizar níveis mais altos de carboidratos na dieta que os carnívoros, devido a maior atividade da amilase no trato

digestório (Hidalgo et al.,1999). Desta forma, a habilidade em utilizar diferentes formas de carboidrato varia entre as espécies.

O amido

Os carboidratos são a principal fonte de energia na dieta dos animais e incluem uma grande variedade de compostos orgânicos. Os monossacarídeos são os carboidratos mais simples, representados pela glicose e frutose, os oligossacarídeos correspondem aos carboidratos de cadeia curta, cujo principal representante é a sacarose e a celobiose, e os polissacarídeos incluem carboidratos com cadeias superiores representados pelo amido e pelos polissacarídeos não amiláceos (PNA) (Evers et al., 1999).

O amido é formado basicamente por dois polímeros: a amilose e a amilopectina (Leninger et al., 1993). Suas proporções variam de acordo com a espécie vegetal, idade e cultivares. A maior parte dos amidos é composta por 70-80% de amilopectina e 20-30% de amilose (Gallant et al., 1992), mas existem outras classes de amidos com proporções amilopectina/amilose alteradas por processos químicos e físicos ou pelo cultivo de variedades (ex. amido ceroso ou “waxy”).

O amido não processado é insolúvel em temperatura ambiente (Van Soest, 1994) e quando é aquecido em água a uma temperatura mínima de 60°C ocorre uma alteração irreversível. Os grânulos de amido expandem com a entrada da água, a amilose se solubiliza e as cadeias de amilopectina se quebram facilmente (Van Soest, 1994), promovendo a ruptura da estrutura granular, hidratação e solubilização do amido. A esse processo dá-se o nome de gelatinização (Biliaderis, 1991). Se a temperatura não for suficiente para promover a gelatinização total do amido, durante o resfriamento pode ocorrer uma reassociação das ligações, conhecida como retrogradação, que pode levar à formação de amidos resistentes à degradação por amilases. A amilose é especialmente sensível a retrogradação, já a amilopectina, por conter uma cadeia mais complexa, apresenta limitada capacidade de reassociação de sua estrutura química (Van Soest, 1994).

Normalmente, amidos provenientes de leguminosas apresentam maior quantidade de amilose e, conseqüentemente, são mais sensíveis à formação de amidos resistentes, o que pode ocasionar menor digestão e absorção em relação aos amidos de cereais (Lee et al., 1985).

A utilização de amido pelos peixes

Estudos têm mostrado que a forma física do alimento tem grande importância na digestibilidade. Hemre et al. (2002) concluíram que o efeito poupador de proteína, mensurado pelo aumento de retenção protéica, em espécies como enguia europeia (*Anguilla anguilla* L.), tilápia (*Oreochromis niloticus*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) e bagre do canal (*Heteropneustes fossilis*) é encontrado quando o carboidrato é oferecido na forma gelatinizada, e melhores resultados são obtidos com carboidratos complexos em relação a açúcares simples. Da mesma forma, amidos crus geralmente apresentam baixa digestibilidade (Wilson, 1994).

Kaushik et al. (1989) observaram que a inclusão de cereais extrusados (milho ou trigo) ou amidos extrusados, (amido de milho ou de trigo) na dieta de trutas, melhora a disponibilidade de energia comparado ao amido cru, enquanto, Pfeffer et al. (1991) encontraram melhor desempenho em trutas alimentadas com amido de milho “waxy” comparado ao amido de milho normal. Similarmente, Enes et al. (2006) encontraram alta digestibilidade de amido de milho “waxy” comparado ao amido de milho normal para robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*).

A utilização de diferentes fontes de amido foi comparada em “yellowfin seabream” (*Sparus latus*). Melhores resultados de ganho de peso e taxa de crescimento específico foram observados nos peixes alimentados com amido cru, quando comparado ao amido pré-gelatinizado. Segundo os mesmos autores, isto pode ser explicado pela diminuição do consumo das dietas com amido processado (Wu et al., 2007). Da mesma forma, outros estudos mostraram que, em muitas espécies de peixes, o amido pré-gelatinizado ou gelatinizado incorporado às dietas pode reduzir sua ingestão (Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Peres e Oliva-Teles, 2002; Venou et al, 2003). Segundo Peres e Oliva-Teles (2002), a troca total ou parcial do amido cru pelo gelatinizado, em juvenis de robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), melhorou significativamente a eficiência alimentar. No entanto, a troca total pelo amido gelatinizado reduziu o crescimento dos peixes.

Brauge et al. (1994) observaram em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) que a ingestão de carboidrato altamente digestível, resultou em hiperglicemia, permanecendo por muitas horas, devido a esta limitada habilidade que alguns peixes apresentam em metabolizar glicose.

Utilização de carboidratos por espécies nativas

Alguns estudos abordam a utilização de carboidratos por peixes nativos. Melhores resultados de desempenho na produção de alevinos de tambacu (*Colossoma macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*) foram encontrados ao se utilizar uma dieta com alto nível de carboidrato de 45% e 3900 kcal kg⁻¹ energia bruta (Fraguito, 1991). Carneiro et al. (1994) testaram, no mesmo peixe, dietas isoprotéicas, com 2 níveis de energia e vários níveis de carboidrato, e também observaram melhor desempenho de produção com 45% de carboidrato e 3900 kcal.

Estudo de Hernandez et al. (1995) mostrou que os carboidratos parecem ser tão eficazes quanto lipídios como fontes de energia para alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*), enquanto Figueiredo-Garutti (1996), que alimentou pacus com dietas contendo 35 e 50% de amido de cereais, observou melhor crescimento com o nível mais alto e melhor utilização do carboidrato em relação a lipídios. Similarmente, Günther (1996) concluiu que tambaqui pode utilizar eficientemente carboidrato dietário, e dieta contendo 38% carboidratos e 11% lipídios promoveu melhor crescimento e utilização de proteínas na espécie.

Mais recentemente, Muñoz Ramírez (2005) testou diferentes fontes de carboidrato para pacu (amido de milho regular, amido de milho ceroso, amido de milho regular pré-gelatinizado e modificado, fécula de mandioca modificada e pré-gelatinizada, malto-dextrina e glicose-dextrose) em dois níveis de inclusão (20 e 40%) e verificou melhor coeficiente de digestibilidade dos nutrientes e energia bruta com a utilização de 40% de carboidratos digestíveis com diferentes graus de complexidade. O melhor desempenho foi obtido com as dietas contendo fécula pré-gelatinizada e o amido pré-gelatinizado e modificado.

Jejum e realimentação

Os peixes em seu ambiente natural alternam períodos de alimentação e jejum, em resposta a vários fatores (ex. temperatura, reprodução, disponibilidade de alimento). O jejum envolve uma complexidade de alterações para promover o ajuste biológico do animal e suas conseqüências finais são altamente dependentes da espécie considerada, da idade do peixe e das condições experimentais, tais como temperatura da água, fotoperíodo, dieta pré-jejum, e

duração do período de jejum (Love, 1980; Weatherley e Gill, 1987; Blasco et al., 1991, Souza et al., 2000).

Hsieh e Shiau (2000) alimentaram tilápias, com dietas contendo 40% de amido ou 40% de glicose por oito semanas, seguido de jejum por 1, 2 e 3 semanas. Os peixes previamente alimentados com dieta contendo glicose perderam peso em comparação com os peixes alimentados com dieta contendo amido. Maior concentração de glicogênio hepático foi observada em peixes alimentados com a dieta contendo amido, sugerindo que as respostas fisiológicas da tilápia durante o jejum são afetadas pelas dietas pré-jejum contendo diferentes carboidratos.

A depleção de energia que ocorre durante o período de jejum indica que os vários constituintes do corpo podem ser mobilizados em diferentes taxas e que, estes substratos, apesar de semelhantes, podem ser utilizados de forma diferente nos diversos tecidos do corpo. Alguns peixes como *Carassius auratus*, truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) e bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) preservam os estoques de glicogênio, enquanto são mobilizadas significativas quantidades de lipídios. Em outras espécies, como a tilápia (*Tilapia mossambica*) e *Notopterus notopterus*, os estoques de glicogênio são conservados, enquanto significativa quantidade de proteína é mobilizada (Sheridan e Mommsen, 1991). A capacidade do peixe em mobilizar glicogênio hepático é diretamente relacionada a manutenção das concentrações glicêmicas durante período de restrição alimentar, no mínimo durante a fase inicial de jejum, e também depende da ativação posterior da gliconeogênese hepática (Higuera e Cardenas, 1984).

Souza et al. (2000) verificaram, em juvenis de pacu, submetidos à restrição alimentar por 60 dias e realimentados por 30 dias, redução da concentração de glicogênio hepático no início da restrição, sugerindo que esta é uma reserva prontamente disponível para favorecer a homeostase glicêmica, sendo mantida ou restabelecida pela mobilização de outras fontes de energia como os lipídios e as proteínas. Estes autores observaram, ainda, que, em períodos curtos de restrição alimentar, a concentração de lipídio no fígado e outros tecidos diminuiu, ao mesmo tempo em que o de ácidos graxos livres no plasma aumentou. O aumento dos ácidos graxos livres pode inibir competitivamente a utilização da glicose pelos tecidos periféricos e a liberação de glicose pelo fígado. A maior absorção de ácidos graxos pelo fígado favorece o metabolismo lipídico, a homeostase glicêmica e a gliconeogênese a partir de lipídios.

Segundo Figueiredo-Garutti et al. (2002), o matrinxã (*Brycon cephalus*), na ausência de glicose proveniente da alimentação, altera rapidamente seu metabolismo para manter a

homeostase. Doze horas após a alimentação foram observados valores elevados de glicose circulante e glicogênio hepático, caracterizando o período de absorção. Setenta e duas horas após ingestão de alimento houve uma redução significativa nos valores de glicose plasmática e glicogênio hepático, indicando a mudança para a condição de jejum. A manutenção de altos níveis de ácidos graxos livres durante o período de jejum e o aumento observado 14 dias após a última refeição sugerem contribuição significativa do tecido adiposo em fornecer energia ao peixe.

Metón et al. (2003) estudaram as adaptações metabólicas durante o período de jejum e realimentação de pargo europeu (*Sparus aurata*). Observaram que as concentrações de glicogênio hepático variaram dependendo do estado nutricional. Após 8 dias de jejum houve uma redução significativa no conteúdo deste metabólito no fígado e a realimentação restabeleceu os valores rapidamente. Oito horas após a realimentação foi observado um acúmulo de glicogênio e dois dias depois os valores de glicogênio estavam próximos aos dos animais alimentados.

Muitos estudos têm demonstrado que a realimentação resulta em uma recuperação a níveis normais do glicogênio hepático e muscular, glicose sangüínea, aminoácidos, lipídio hepático, ácidos graxos livres plasmáticos, proteína total plasmática, como também da composição corporal (Kamra, 1966; Ince e Thorpe, 1976; Love, 1980; Black e Love, 1986; Shimeno et al., 1990; Blasco et al., 1991; Böhm et al., 1994; Souza, 1994; Collins e Anderson, 1995; Hung et al., 1997; Souza et al., 2000).

O objetivo deste estudo foi verificar o crescimento, desempenho produtivo e as respostas metabólicas do pacu alimentado com níveis variáveis de carboidrato na dieta, além de utilizar a estratégia de restrição alimentar como ferramenta para o estudo das alterações bioquímicas e metabólicas.

REFERÊNCIAS

- BILIADERIS, C.J. 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 60-78.
- BLACK, D., LOVE, R.M. 1986. The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *J. Comp. Physiol.* 156, 469-479.
- BLASCO, J., FERNÁNDEZ, J., GUTIÉRREZ, J. 1991. The effects of starvation and refeeding on plasma amino acid levels, *Cyprinus carpio* L., 1758. *J. Fish Biol.* 38, 587-598.
- BLASCO, J., FERNÁNDEZ-BORRÁS, J., MARIMON, I., REQUENA, A. 1996. Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: effect of an intravascular glucose load. *J. Comp. Physiol. [B]* 165, 534-541.
- BÖHM, R., HANKE, W., SEGNER, H. 1994. The sequential restoration of plasma metabolite levels, liver composition and liver structure in refeed carp, *Cyprinus carpio*. *J. Comp. Physiol.* 164B, 32-41.
- BRAUGE, C., MÉDALE, F., CORRAZE, G. 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* 123, 109-120.
- CARNEIRO, D.J., FRAGNITO, P.S., MALHEIROS, E.B. 1994. Influence of carbohydrate and energy level on growth and body composition of tambacu, a hybrid of tambaqui (*Colossoma macropomum*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 124, 129-130.
- CHRISTIANSEN, D.C., KLUNGSOYR, L. 1987. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B, 701-711.
- COLLINS, A.L., ANDERSON, T.A. 1995. The regulation of endogenous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *J. Fish Biol.* 47, 1004-1015.
- COWEY, C., DE LA HIGUERA, M., ADRON, J.W. 1977b. The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 38, 385-395.

COWEY, C., WALTON, M.J. 1989. Intermediary metabolism. In: Fish Nutrition (Halver, J.E. ed.). Academic Press, San Diego, CA. pp 259-329.

ENES, P., PANSEERAT, S., KAUSHIK, S., OLIVA-TELES, A. 2006. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol. A* 143, 89–96.

EVERS, A.D., BLAKENEY, A.B., O'BRIEN, L. 1999. Cereal structure and composition. *Aust. J. Agric. Res.* 50, 629-650.

FIGUEIREDO-GARUTTI, M.L. Carboidrato como fonte de energia, o efeito do cromo trivalente na dieta e ação da insulina em juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 1996, 65p.

FIGUEIREDO-GARUTTI, M.L., NAVARRO, I., CAPILLA, E., SOUZA, R.H.S., MORAES, G., GUTIÉRREZ, J., VICENTINI-PAULINO, M.L.M. 2002. Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. *Comp. Biochem. Physiol. A* 132, 467-476.

FRAGNITO, P.S. Efeito de diferentes níveis de carboidratos e energia bruta sobre o desempenho de produção de alevinos de tambacu, *Colossoma macropomum*, e machos de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Trabalho de Graduação em Zootecnia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1991, 67p.

GALLANT, D.J., BOUCHET, B., BUELON, A., PEREZ, S. 1992. Physical characteristics of starch granules and susceptible to enzymatic degradation. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46 (2), 3-16.

GÜNTHER, J. 1996. Growth of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles at different carbohydrate/lipid ratios. *J. Aquac. Trop.* 11, 105-112.

GUTIERREZ, J., ASGARD, T.; FABBRI, E., PLISETSKAYA, E. M. 1991. Insulin-receptor binding in skeletal muscle of trout. *Fish. Physiol. Biochem.* 9, 351-360.

HEMRE, G.I., MOMMSEN, T.P., KROGDAHL, A. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac. Nutr.* 8, 175-194.

- HERNANDEZ, M., TAKEUCHI, T., WATANABE, T. 1995. Effects of dietary energy sources on the utilization of protein by *Colossoma macropomum* fingerlings. *Fish. Sci.* 61, 507-511.
- HERTZ, Y., EPSTEIN, N., ABRAHAM, M., MADAR, Z., HEPHER, B., GERTLER, A. 1989. Effects of metformin on plasma insulin, glucose metabolism, and protein synthesis in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 76, 255-267.
- HIDALGO, M.C., UREA, E., SANZ, A. 1999 Comparative study of digestive enzymes in fish with nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267-283.
- HIGUERA, M., CARDENAS, P. 1984. Influence of dietary composition on gluconeogenesis from L-(U-¹⁴C) glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 81A, 391-395.
- HILTON, J.W., PLISETSKAYA, E.M., LEATHERLAND, J.F. 1987. Does oral 3,5,3'-triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Physiol. Biochem.* 4, 113-120.
- HSIEH, S.L., SHIAU, S.Y. 2000. Effects of diets containing different carbohydrates on starved condition in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Fisheries Science* 66 (1), 32-37.
- HUNG, S.S.O., LIU, W., LI, H., STOREBAKKEN, T., CUI, Y. 1997. Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture* 151, 357-363.
- INCE, B.W., THORPE, A. 1976. The effects of starvation and force-feeding on the metabolism of the northern pike, *Esox lucius* L. *J. Fish Biol.* 8, 79-88.
- KAMRA, S.K. 1966. Effect of starvation and refeeding on some liver and blood constituents of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *J. Fish. Res. B. Can.* 23, 975-982.
- KAUSHIK, S.J., MÉDALE, F., FAUCONNEAU, B., BLANC, D. 1989. Effect of digestible carbohydrates on protein / energy utilization and on glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) *Aquaculture*. 79, 63-74.

KAUSHIK, S.J., OLIVA-TELES, 1985. A. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture* 50, 89-101.

KRASNOV, A., PITKÄNEN, T.I., REINISALO, M., MÖLSÄ, H. 1999. Expression of human glucose transporter type 1 and rat hexokinase type II complementary DNAs in rainbow trout embryos: effects on glucose metabolism. *Mar. Biotechnol.* 1, 25-32.

LEE, P.C., BROOKS, S.P., KIM, O. 1985. Digestible of native and modified starches: in vitro studies with human and rabbit pancreatic amylases and vivo studies in rabbits. *J. Nutr.* 115, 93-103.

LENINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. Carbohydrates. In: LENINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Principles of biochemistry*. 2. ed. New York: Worth, 1993. 298-323.

LOVE, R.M. *The chemical biology of fishes*. Vol. 2. London: Academic Press, 1980. p. 133-229.

MAESTRO, M.A., PLANAS J.V., MORIYAMA, S., GUTIÉRREZ, J., PLANAS, J., SWANSON, P. 1997. Ovarian receptors for insulin and insulin-like growth factors and effects of IGF-1 on steroid production by isolated follicular layers of the preovulatory coho salmon ovarian follicle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 189- 201.

METÓN, I., FERNÁNDEZ, F., BAANANTE, I.V. 2003. Short-and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 225, 99– 107.

MOMMSEN, T.P., PLISETSKAYA, E.M. 1991. Insulin in fishes and agnathans: history, structure and metabolic regulation. *Rev. Aquac. Sci.* 4, 225-259.

MUECKLER, M. 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219,713-25.

MUÑOZ-RAMÍREZ, A.P. Utilização de carboidratos digestíveis em dietas para pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, 2005, 123p.

PALMER, T.N., RYMAN, B.E. 1972. Studies of oral glucose intolerance in fish. *J. Fish. Biol.* 4, 311-319.

PANSERAT, S., BLIN, C., MÉDALE, F., PLAGNES-JUAN, E., BRÉQUE, J., KRISHNAMOORTHY, J., KAUSHIK, S. 2000. Molecular cloning tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNA from seabream, trout and common carp. *Bioch. Bioph. Acta* 1474, 61-69.

PANSERAT, S., PLAGNES-JUAN, E., KAUSHIK, S., 2001. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204, 2351–2360.

PERES, H., OLIVA-TELES. 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 205, 287-299.

PESSIN, J.E., BELL, G.I. 1992. Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 911–930.

PFEFFER, E., BECKMANN-TOUSSAINT, J., HENRICHFREISE, B., JANSEN, H.D. 1991. Effect of extrusion on efficiency of utilization of maize starch by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 96, 293-303.

PLANAS, J., ENCARNATION, C., GUTIERREZ, J. 2000. Molecular identification of a glucose transporter fish muscle. *FEBS Letters* 481, 266-270.

PLISETSKAYA, E. M. 1990. Recent studies on fish pancreatic hormones: Selected topics. *Zool. Sci.* 7, 335-353.

SHERIDAN, M.A., MOMMSEN, T.P. 1991. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81, 473-483.

SHIMENO, S., KHEYALI, D., TAKEDA, M. 1990. Metabolic adaptation to prolonged starvation in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56, 1, 35-41.

SOUZA, V.L. Efeitos da restrição alimentar e da realimentação no metabolismo de pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus*). Jaboticabal: Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, 1994. 163 p.

- SOUZA, V.L., OLIVEIRA, E.G., URBINATI, E.C. 2000. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). J. Aquac. Trop. 15, 371-379.
- SUAREZ, R.K., MOMMSEN, T.P. 1987. Gluconeogenesis in teleost fishes. Can. J. Zool. 65, 1869-1882.
- THORPE, A., INCE, B.W. 1974. The effects of pancreatic hormones, catecholamines and glucose loading on blood metabolites in the northern pike (*Esox lucius* L.). Gen. Comp. Endocrinol. 23, 29-44.
- THORPE, A., INCE, B.W. 1976. Plasma insulin levels in teleosts determined by a charcoal separation radioimmunoassay technique. Gen. Comp. Endocrinol. 30, 332-339.
- VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of ruminant: ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fiber. Ithaca: Cornell University Press, 1994.
- VENOU, B., ALÉXIS, M. N., FOUNTOULAKI, E., NENGAS, I., APOSTOLOPOULOU, M., CASTRITSI-CATHARIOU, I. 2003. 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 225, 207-223.
- WEATHERLEY, A.H., GILL, H.S. The biology of fish growth. London: Academic Press, 1987. 443p.
- WILSON, R. P. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. Aquaculture 124, 67-80.
- WRIGHT, J.R. JR., O'HALLI, W., YANG, H., BONEN, A. 1998. GLUT-4 deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. Gen. Comp. Endocrinol. 111, 20-27.
- WU, X.Y., LIU, Y. J., TIAN, L.X., MAI, K.S., YANG, H. J. 2007. Utilization of different raw and pre-gelatinized starch sources by juvenile yellowfin seabream *Sparus latus*. Aquac. Nutr. 13, 389-396.

Capítulo 2

Uso de amido de milho pré-gelatinizado em dietas de pacu
(*Piaractus mesopotamicus*): crescimento, desempenho produtivo e
metabolismo energético

RESUMO

Juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com peso inicial de $27,6 \pm 1,44$ g foram alimentados com três dietas isoprotéicas e isoenergéticas com inclusão de carboidrato. A principal fonte de carboidrato utilizado foi o amido de milho pré-gelatinizado com três níveis de inclusão: baixo (16,6%), alto (38,8%) e controle (22,4%) por 60 dias. O estudo avaliou parâmetros de crescimento, desempenho produtivo e metabolismo energético do pacu. Ao término de 60 dias de alimentação, os peixes foram amostrados 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após a oferta da 1^o alimentação do dia para cálculo dos índices estomaco-somático e intestino-somático cheio. Na coleta de 24 horas após a alimentação, o sangue dos animais foi retirado para análise de glicemia, ácidos graxos livres, triglicerídeos, colesterol e proteína total. Nos tecidos foram determinados a concentração de glicogênio e lipídio total no fígado e lipídio total no músculo. Fígado e gordura visceral foram pesados para cálculo dos índices: hepato-somático e índice gorduro-viscero-somático. Para avaliação da digestibilidade das dietas, foi realizado um segundo experimento com 225 pacus (peso médio de $40 \pm 5,0$ g). Os peixes foram alimentados por 5 dias com as dietas experimentais acrescidas de 1% de óxido de cromo como marcador inerte. Os níveis de amido da dieta não afetaram o ganho em peso e taxa de crescimento específico dos animais. Os peixes alimentados com a dieta de maior nível de amido apresentaram melhor conversão alimentar ($1,14 \pm 0,02$), taxa de eficiência protéica ($3,31 \pm 0,05$), alta digestibilidade da proteína ($93,3 \pm 0,8\%$) e amido da dieta ($>99\%$). O tempo de trânsito do alimento diferiu ($p < 0,05$) somente 9 horas após alimentação, quando os peixes alimentados com a dieta de maior nível de amido tinham maior conteúdo de alimento no estômago. Os parâmetros sanguíneos (glicose, ácidos graxos livres, triglicerídeos, colesterol e proteína total) e teciduais (glicogênio hepático e lipídio muscular) não diferiram por influência das dietas. No entanto, foi observado aumento da atividade lipogênica no fígado, com aumento do índice hepato-somático e acúmulo de gordura visceral nos peixes alimentados com as dietas de níveis intermediário e alto de amido.

Palavras-Chave: carboidrato, amido gelatinizado, desempenho produtivo, metabolismo, pacu

ABSTRACT

Juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) weighing 27.6 ± 1.44 g were fed with three isoproteic and isoenergetic diets containing different levels of carbohydrates. The main source of carbohydrate (CHO) was pre-gelatinized starch in three levels of inclusion in diet: low (16.6%), high (38.8%) and control (22.4%), offered during 60 days. The study evaluated the growth performance and energetic metabolism of pacu. At the end of the experimental period, fish were sampled at 1, 3, 6, 9, 12 e 24 h after the first feeding of to day to calculate the full stomach-somatic and intestine-somatic indexes. Twenty-four h after feeding, blood was drawn for glucose, free fat acids, triglycerids, cholesterol and total protein determination. Hepatic glycogen and lipids and muscle lipid were determined. Liver and visceral fat were weighed for hepatic-somatic and fat indexes calculation. A second experiment using 225 pacu (40 ± 5.0 g) was carried out to evaluate the diets digestibility. Fish were fed during 5 days with the experimental diets with chromium oxide 1% as marker. Starch dietary levels did not influence the weight gain and growth rater of fish. Fish fed with the 38.8% CHO presented better feed conversion (1.14 ± 0.02), protein efficiency rate (3.31 ± 0.05), high digestibility of protein ($93.3 \pm 0.8\%$) and starch digestibility ($>99\%$). The food transit time differed ($p < 0.05$) only at 9 hours after feeding, when fish fed with 38.8% CHO diet had more food in the stomach. Blood (glucose, free fat acids, triglycerids, cholesterol and total protein) and tissue (hepatic glycogen and muscle lipid) indicators were not influenced by diets but there was an increase of the lipogenic activity of liver, increasing the hepatic somatic index, and visceral fat accumulation in fish fed 16.6% and 22.4% CHO diets.

Key-words: carbohydrate, gelatinized starch, growth performance, metabolism, pacu

INTRODUÇÃO

A adição de carboidratos como fonte de energia tem sido bastante usada na dieta de animais domésticos. Sua utilização pode reduzir o catabolismo de proteínas para síntese de glicose (Suarez e Mommsen, 1987) e, secundariamente, pode melhorar a eficiência de retenção protéica e diminuir as perdas metabólicas de nitrogênio no ambiente (Cowey e Walton, 1989; Wilson, 1994).

A eficiência de utilização de carboidratos pelos peixes varia entre as espécies. A fonte de carboidrato, sua complexidade, o estado físico, o nível de inclusão na dieta e as condições de cultivo são algumas características que podem afetar a utilização do carboidrato pelas espécies.

Estudos têm mostrado que a forma física do alimento tem grande importância na digestibilidade. Hemre et al. (2002) concluíram que o efeito poupador de proteína, mensurado pelo aumento de retenção protéica, em espécies como enguia européia (*Anguilla anguilla* L.), tilápia (*Oreochromis niloticus*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) e bagre do canal (*Heteropneustes fossilis*) ocorre quando o carboidrato é oferecido na forma gelatinizada, e melhores resultados são obtidos com carboidratos complexos em relação a açúcares simples.

Por outro lado, Wu et al. (2007) observaram melhores resultados de ganho de peso e taxa de crescimento específico quando os peixes foram alimentados com amido cru comparado ao amido pré-gelatinizado, em um estudo com “yellowfin seabream” (*Sparus latus*) comparando a utilização de diferentes fontes de amido. Segundo os mesmos autores, isto pode ser explicado pela diminuição do consumo das dietas com amido processado. Da mesma forma, outros estudos mostraram que em muitas espécies de peixes o amido pré-gelatinizado ou gelatinizado incorporado às dietas pode reduzir sua ingestão (Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Peres e Oliva-Teles, 2002; Venou et al, 2003). Segundo Peres e Oliva-Teles (2002), a troca total ou parcial do amido cru pelo gelatinizado melhorou significativamente a eficiência alimentar de juvenis de robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*). No entanto, a troca total pelo amido gelatinizado reduziu o crescimento dos peixes.

O amido é um polissacarídeo formado basicamente por dois polímeros: a amilose e a amilopectina (Leninger et al., 1993). Suas proporções variam de acordo com a espécie vegetal, idade e cultivares. O amido não processado é insolúvel em temperatura ambiente e quando é aquecido em água a uma temperatura mínima de 60°C ocorre uma alteração irreversível. Os grânulos de amido se expandem com a entrada da água, a amilose se solubiliza e as cadeias de amilopectina se quebram facilmente (Van Soest, 1994),

promovendo a ruptura da estrutura granular, hidratação e solubilização do amido. A esse processo dá-se o nome de gelatinização (Biliaderis, 1991).

Se a temperatura não for suficiente para promover a gelatinização total do amido, durante o resfriamento pode ocorrer uma reassociação das ligações, conhecida como retrogradação, que pode levar à formação de amidos resistentes à degradação por amilases. A amilose é especialmente sensível a retrogradação, já a amilopectina, por conter uma cadeia mais complexa, apresenta limitada capacidade de reassociação de sua estrutura química (Van Soest, 1994). Normalmente, amidos provenientes de leguminosas apresentam maior quantidade de amilose e, conseqüentemente, são mais sensíveis à formação de amidos resistentes, o que pode ocasionar menor digestão e absorção em relação aos amidos de cereais (Lee et al., 1985). Amidos de cereais, como milho e trigo, são extensivamente usados como ingredientes na alimentação de peixes.

Espécies de peixes tropicais ou de água quente apresentam maior habilidade para utilizar carboidrato na dieta que peixes de água fria ou marinhos (Wilson, 1994). Pesquisas ainda mostram que peixes onívoros apresentam o efeito poupador de proteína e melhor aproveitamento de altos níveis de carboidrato quando comparado a espécies carnívoras (Hemre et al., 1993, 1995; Deng et al., 2000).

Carneiro et al. (1994) testaram dietas isoprotéicas, com 2 níveis de energia e vários níveis de carboidrato, e observaram, em tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*), melhor desempenho de produção com 45% de carboidrato e 3900 kcal. Figueiredo-Garutti (1996) alimentou pacus com dietas contendo 35 e 50% de amido de cereais e observou melhor crescimento com o nível mais alto e melhor utilização do carboidrato em relação a lipídios. Hernandez et al. (1995) constataram que carboidratos parecem ser tão eficazes quanto os lipídios como fonte de energia para alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Similarmente, Günther (1996) concluiu que o tambaqui pode utilizar eficientemente carboidratos na dieta e que dieta contendo 38% carboidratos e 11% lipídios promoveu melhor crescimento e utilização de proteínas na espécie. Mais recentemente, Muñoz Ramírez (2005), testando diferentes fontes de carboidrato para pacu, verificou melhores resultados de desempenho com o uso de dietas com amido de milho e fécula de mandioca gelatinizado.

Considerando o hábito alimentar frugívoro-onívoro do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), espécie que tem lugar de destaque na piscicultura nacional, o objetivo deste estudo foi avaliar, em dietas isoprotéicas e isocalóricas, o efeito de diferentes níveis de amido

de milho pré-gelatinizado, como principal fonte de carboidrato, no crescimento, desempenho produtivo e metabolismo energético da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Dietas experimentais

As dietas experimentais (isoprotéicas e isoenergéticas) foram formuladas para conter 3 níveis de amido: baixo, alto e um nível intermediário que constituiu a dieta controle. Os ingredientes e a composição proximal das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Fórmula e composição proximal das dietas experimentais.

<i>Ingredientes</i>	<i>Dietas (níveis de carboidrato)</i>		
	<i>baixo</i>	<i>controle</i>	<i>alto</i>
Farinha de peixe	27,00	27,00	28,50
Farelo de soja	8,75	14,75	16,50
Amido milho pré gelatinizado ¹	5,00	26,00	45,00
Farelo de trigo	14,75	7,50	1,75
Farelo de arroz	19,50	8,25	1,25
Óleo de soja	5,50	3,75	1,00
Óleo de peixe	1,00	1,00	1,00
Minerais e vitaminas ²	0,75	0,75	0,75
Casca de arroz	9,00	6,00	3,75
Caulin	8,75	5,00	0,50
Total	100,00	100,00	100,00
<i>Composição analisada (%)</i>			
Matéria seca	93,8	93,8	94,1
Proteína bruta	26,0	26,6	26,4
Extrato etéreo	13,4	11,6	6,8
Fibra bruta	9,3	7,0	3,7
Matéria mineral	17,0	13,3	9,2
Carboidratos ³	28,18	35,25	48,00
Amido total	16,6	22,4	38,8
Amilopectina / Amilose	97,7 / 2,30	96,37 / 3,63	91,82/ 8,18
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4.107	4.128	4.097

Farinha de peixe (PB= 63%).

¹ Corn Products Brasil®

² Premix Peixe Inicial Fri ribe®. Ac. fólico (1,5 mg); Ác. pantotênico (30 mg); colina (225 mg); cobre (15 mg); ferro (150 mg); iodo (7,5 mg); manganês (105 mg); selênio (0,225 mg); zinco (225 mg); niacina (150 mg); biotina (0,150mg); Vit. A (4500 UI); Vit. B1 (9 mg); Vit. B12 (30 mcg); Vit. B2 (12 mg); Vit. B6 (4,5 mg); Vit. C (300 mg); Vit. D3 (4500 UI); Vit. E (90 UI); Vit. K (9 mg) e antioxidante (187,50 mg).

³Carboidrato estimado= Matéria seca – Proteína bruta – Extrato etéreo – Fibra bruta – Matéria mineral.

As rações foram processadas e analisadas segundo a metodologia da AOAC (1984), a energia bruta por bomba calorimétrica (Parr 1281 Calorimeter), o amido pelo método de amilase (Hendrix, 1993) e glicose-oxidase (Karkalas, 1985), e os constituintes do amido (amilose e amilopectina) analisados segundo ISO 6647 (International Organization for Standardization, 1987).

Para o preparo das dietas, os ingredientes foram peneirados, misturados e peletizados. As rações foram estocadas a -20°C até o fornecimento aos peixes e análise da composição.

Animais e Protocolo Experimental

Juvenis de pacu, adquiridos na Piscicultura Águas Claras (Mococa, SP), foram distribuídos em 12 caixas de polietileno de 100 L (12 peixes caixa⁻¹), com renovação contínua de água e aeração. Durante 15 dias de adaptação às condições laboratoriais, os peixes receberam a ração controle (nível intermediário de amido) (Tabela 1), duas vezes ao dia, até a saciedade aparente.

Após a adaptação às condições laboratoriais, os peixes (peso inicial de $27,6 \pm 1,44$ g) foram alimentados com as dietas experimentais [baixo amido (16,6%), alto amido (38,8%) e controle (22,4%)] (Tabela 1) por 60 dias. Cada dieta experimental foi oferecida a peixes de 4 caixas (12 peixes por caixa), duas vezes ao dia (09h:00 e 17h:00) até a saciedade aparente.

Ao término dos 60 dias de alimentação, os peixes foram amostrados 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após a oferta da 1^o alimentação do dia, sendo capturados 2 peixes por caixa (oito animais por repetição). Os peixes foram anestesiados (benzocaína, 50 mg L⁻¹), pesados e sacrificados para retirada estômago e intestino para cálculo dos índices estômago-somático cheio [IESc= (peso do estômago cheio/ peso corporal) x 100] e intestino-somático cheio [IISc= (peso do intestino cheio/ peso corporal) x 100] para determinação do tempo de esvaziamento gástrico.

Na coleta das 24 horas após a alimentação, o sangue dos peixes amostrados foi retirado por punção caudal, sendo uma alíquota separada para análise de glicemia (kit Labtest) e concentração de ácidos graxos livres (kit Wako, EUA), utilizando EDTA fluoretado para extração do plasma, e o restante do sangue centrifugado a 3000 rpm, durante 10 min, para separação do soro que foi estocado a -20°C até determinação da concentração de triglicérides (Kit Labtest), colesterol (kit Labtest) e proteína total (Kit Labtest). Em seguida, os peixes foram pesados, sacrificados e após a abertura do abdômen, o fígado foi retirado e estocado a -20°C para análise da concentração de glicogênio (Moon et al., 1989) e lipídio total (Bligh & Dyer, 1959). No músculo branco, a partir de fragmento retirado da região caudal, foi

analisada a concentração de lipídio total. Fígado e gordura visceral foram pesados para cálculo dos índices: hepato-somático [IHS (%)] = (peso do tecido hepático / peso corporal) x 100] e índice gorduro-viscero-somático [IGVS (%)] = (peso da gordura visceral / peso corporal) x 100].

As variáveis químicas e físicas da água apresentaram valores recomendados para a espécie (Urbinati e Gonçalves, 2005) durante todo o experimento. O oxigênio dissolvido se manteve acima de 5,0 mg L⁻¹, a temperatura da água foi mantida a 28,4 ± 0,31 °C, pH variou de 7,5 e 8,0 e a concentração de amônia total oscilou de 0,008 a 0,025 mg L⁻¹. O fluxo de água foi contínuo, com troca total aproximadamente de 20 vezes ao dia. O fotoperíodo utilizado foi de 12 horas luz: 12 horas escuro.

O desempenho produtivo dos peixes foi analisado por meio do ganho em peso diário (GP), taxa de crescimento específico (TCE), conversão alimentar (CA), consumo diário de alimento (CDA), índice de consumo (IC) e eficiência protéica (TEP).

Para o cálculo dos parâmetros de desempenho produtivo foram utilizadas as seguintes fórmulas:

Ganho em peso diário (g dia⁻¹) = (peso final – peso inicial) / tempo

Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) = (ln peso final - ln peso inicial) x 100 / tempo

Conversão alimentar = consumo de alimento / ganho em peso total

Consumo diário (g dia⁻¹) = consumo de alimento / tempo

Índice de consumo (% peso vivo dia⁻¹) = cons. médio dia x 100 / peso vivo médio período.

Taxa de eficiência protéica = ganho em peso vivo / proteína bruta consumida

Digestibilidade dos nutrientes (proteína e amido) das dietas

Para avaliação da digestibilidade das dietas, 225 pacus, com peso médio de 40 ± 5,0 g, foram distribuídos em 15 caixas de 120 L, em uma densidade de 15 indivíduos por caixa. A coleta das fezes foi realizada utilizando coletores, segundo o sistema de Guelph modificado (Cho et al., 1982; Cho et al., 1985).

Após adaptação de sete dias às condições experimentais, recebendo a dieta controle (nível intermediário de amido), os peixes foram alimentados com as dietas experimentais (Tabela 1) acrescidas de 1% de óxido de cromo como marcador inerte, por cinco dias, e em seguida transferidos para os aquários de coleta. As fezes foram coletadas em intervalos de 30 minutos, para evitar perda por lixiviação, até completar quantidade suficiente para análise. As amostras foram congeladas e, ao término da coleta de todas as amostras, as fezes foram secas em estufa a 55 °C até obtenção de peso constante, para posterior análise.

A concentração de óxido de cromo usado como indicador foi determinada pelo método de digestão com ácido nítrico e perclórico (Furukawa e Tsukahara, 1976), a concentração de proteína bruta pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1984) e o amido usando amilase (Hendrix, 1993) e glicose-oxidase (Karkalas, 1985). Os coeficientes de digestibilidade aparente das dietas foram estimados pela equação:

$$D = 100 - 100 \left[\left(\frac{\% \text{ indicador alimento}}{\% \text{ indicador das fezes}} \right) \times \left(\frac{\% \text{ nutriente fezes}}{\% \text{ nutriente do alimento}} \right) \right]$$

Análise Estatística

Para verificar o efeito dos tratamentos (dietas) o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constituído por três tratamentos, com quatro repetições.

Para verificar o efeito dos tratamentos (dietas) no tempo de amostragem (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação) para os índices estomaco e intestino-somático o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, constituído por três tratamentos e seis tempos de coleta. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), no programa estatístico SAS, versão 8.

RESULTADOS

Desempenho produtivo

Em todos os tratamentos, a taxa de sobrevivência foi de 100%. Os resultados de crescimento e desempenho produtivo são apresentados na Tabela 2. Não houve diferença ($p > 0,05$) no ganho em peso e taxa de crescimento específico, nos peixes alimentados com as diferentes dietas.

Com relação ao consumo alimentar, houve tendência a menor consumo relacionado com o aumento do nível de inclusão de amido, mas sem diferenças entre as dietas ($p > 0,05$). No entanto, esse comportamento fica mais claro quando se analisa o índice de consumo, representado pelo consumo da dieta em relação à biomassa ($\% \text{ peso vivo dia}^{-1}$), que mostrou diferença ($p < 0,05$), sendo o menor valor encontrado no grupo de peixes alimentado com os níveis mais altos de amido.

A conversão alimentar melhorou a medida que o nível de carboidrato na dieta aumentou ($p < 0,05$). Da mesma forma, o incremento no nível de amido na dieta melhorou a eficiência de utilização da proteína, evidenciado pelo aumento da taxa de eficiência protéica ($p < 0,05$).

Tabela 2. Parâmetros de desempenho produtivo de pacu alimentado com baixo amido, alto e um nível intermediário após 60 dias de alimentação.

<i>Desempenho Produtivo</i>	<i>Dietas (Níveis de amido)</i>		
	<i>Baixo</i>	<i>Intermediário</i>	<i>Alto</i>
Peso médio inicial (g)	27,47 ± 0,24	27,80 ± 0,26	27,81 ± 0,37
Peso médio final (g)	145,71 ± 4,04	148,78 ± 16,21	151,92 ± 5,15
Ganho em peso diário (<i>g dia⁻¹</i>)	1,97 ± 0,06	2,02 ± 0,27	2,07 ± 0,09
Taxa de crescimento específico (<i>% dia</i>)	2,78 ± 0,04	2,79 ± 0,17	2,83 ± 0,07
Consumo diário (<i>g dia⁻¹</i>)	2,69 ± 0,15	2,50 ± 0,32	2,37 ± 0,12
Índice de consumo (<i>% PV dia⁻¹</i>)	3,10 ± 0,12 A	2,82 ± 0,12 B	2,63 ± 0,07 B
Conversão alimentar	1,36 ± 0,05 A	1,24 ± 0,03 B	1,14 ± 0,02 C
Taxa de eficiência protéica	2,82 ± 0,10 C	3,03 ± 0,09 B	3,31 ± 0,05 A

Médias seguidas de diferentes letras na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tempo de trânsito (índices estomaco-somático cheio - IESc e intestino-somático cheio - IISc)

O índice estomaco-somático cheio (IESc) dos 3 grupos de peixes mostrou uma diminuição gradativa ao longo do período pós-prandial e 24 horas após alimentação ocorreu praticamente todo o esvaziamento gástrico. Diferença significativa (p<0,05) foi observada entre tratamentos apenas às 9 horas após alimentação quando os peixes que receberam o nível mais elevado de amido tinham maior índice (4,6%) comparado com os que receberam menor quantidade de amido (3,2%) (Figura 1).

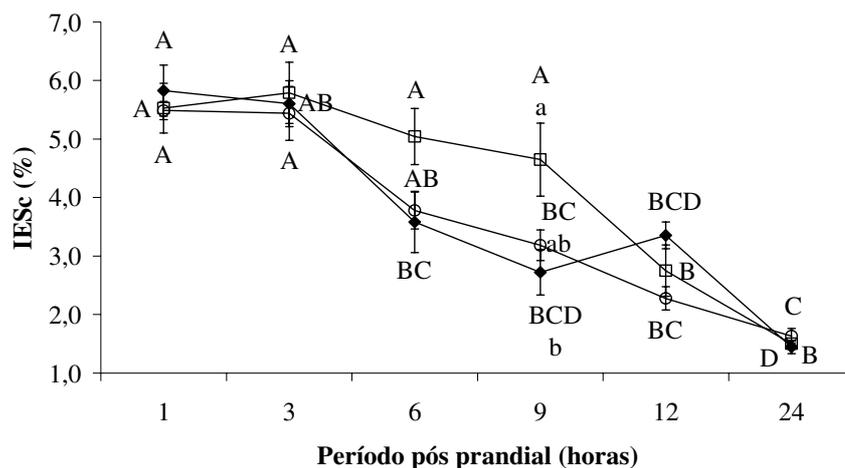


Figura 1. Índice estomaco-somático de pacu alimentado por 60 dias com baixo (○), intermediário (◆) e alto (□) amido na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas entre cada tratamento nos diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

O índice intestino-somático cheio (IISc) apresentou o mesmo perfil para os 3 grupos, não sendo observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre tratamentos nos tempos de amostragem, embora os valores registrados nos peixes alimentados com maior quantidade de amido na dieta fossem numericamente mais baixos até 12 horas após a alimentação. Observou-se aumento gradual deste índice em todos os grupos até 12 horas e redução às 24 horas (Figura 2).

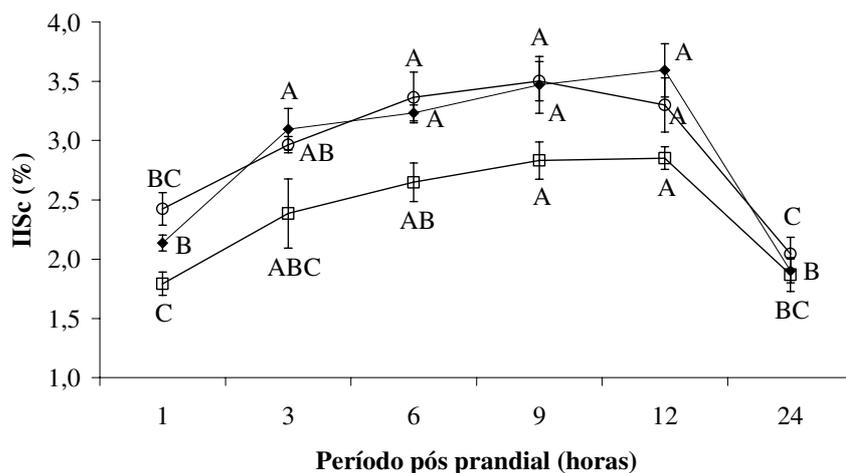


Figura 2. Índice intestino-somático de pacu alimentado por 60 dias com baixo (○), intermediário (◆) e alto (□) amido na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta em cada tratamento ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Digestibilidade dos nutrientes (proteína e amido) das dietas

A digestibilidade da proteína melhorou com o aumento dos níveis de carboidrato nas dietas. As dietas com nível mais elevado de carboidrato apresentaram maior coeficiente de digestibilidade ($93,3 \pm 0,8\%$) comparado aos que receberam menor quantidade de carboidrato ($88,6 \pm 3,4\%$). A dieta controle, com 35% de inclusão de carboidrato, não diferiu ($p>0,05$) entre as dietas de 28 e 48% e apresentou coeficiente de digestibilidade da proteína de 91,5 ($\pm 1,0\%$). A digestibilidade do amido foi superior a 99%, independente da dieta oferecida.

Metabolismo energético

A concentração de glicose plasmática dos peixes não diferiu entre os tratamentos ($p>0,05$), embora peixes alimentados com maior inclusão de amido na dieta apresentassem valores mais elevados deste metabólito (Tabela 3).

Os peixes alimentados com a dieta controle apresentaram valores mais baixos de ácidos graxos livres plasmáticos e triglicerídeo sérico, porém, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos. Também não foram registradas alterações significativas ($p>0,05$) nas concentrações séricas de colesterol e proteína total entre peixes alimentados com as diferentes dietas (Tabela 3).

Tabela 3. Glicose e ácidos graxos livres plasmáticos, proteína total, triglicerídeos e colesterol séricos de pacu alimentado por 60 dias com níveis baixo, intermediário e alto amido na dieta, 24 horas após alimentação.

Metabolismo energético	Dietas (Níveis de amido)		
	Baixo	Intermediário	Alto
<i>Parâmetros sanguíneos</i>			
Glicose plasmática (mg dL ⁻¹)	71,83 ± 9,9	72,74 ± 12,6	81,47 ± 4,0
Ácidos graxos livres plasmáticos (mEq L ⁻¹)	0,667 ± 0,071	0,589 ± 0,175	0,645 ± 0,185
Triglicerídeos séricos (mg dL ⁻¹)	257,85 ± 61,4	203,54 ± 38,6	263,22 ± 46,1
Colesterol sérico (mg dL ⁻¹)	247,80 ± 41,0	287,88 ± 34,2	265,79 ± 38,2
Proteína sérica (g dL ⁻¹)	3,94 ± 0,16	4,01 ± 0,31	3,80 ± 0,27

Médias (\pm desvio padrão) seguidas de diferentes letras na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Os valores médios do índice hepato-somático foram menores nos peixes da dieta com menor nível de amido ($p<0,05$). Em relação ao índice gorduro-víscerosomático, foi

observado maior acúmulo de gordura visceral nos peixes que receberam níveis mais altos de amido ($p < 0,05$) comparado à dieta de menor inclusão (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos (glicogênio hepático, lipídio hepático e lipídio muscular) e índices biométricos (índice hepatossomático e índice gorduro-viscerossomático) de pacu alimentado por 60 dias com níveis baixo, intermediário e alto amido na dieta, 24 horas após alimentação.

Metabolismo energético	Diets (Níveis de amido)		
	<i>Baixo</i>	<i>Intermediário</i>	<i>Alto</i>
<i>Parâmetros bioquímicos</i>			
Glicogênio hepático (%)	12,83 ± 2,19	12,88 ± 1,30	12,72 ± 1,02
Lipídio hepático (%)	2,53 ± 0,79 B	4,73 ± 0,98 A	4,87 ± 1,10 A
Lipídio muscular (%)	1,23 ± 0,27	1,87 ± 0,61	1,50 ± 0,81
<i>Índices biométricos</i>			
Índice hepato-somático (%)	1,50 ± 0,10 B	2,10 ± 0,21 A	2,40 ± 0,22 A
Índice gorduro-viscerossomático (%)	2,98 ± 0,69 B	3,47 ± 0,76 A	3,52 ± 0,80 A

Médias (\pm desvio padrão) seguidas de diferentes letras na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que com o aumento dos níveis de amido pré-gelatinizado na dieta os peixes apresentaram melhor conversão alimentar e aumento na taxa de eficiência protéica, embora não tenham afetado significativamente o ganho em peso diário e a taxa de crescimento específico.

Além disso, verificou-se diminuição do índice de consumo das dietas de nível intermediário e alto de amido. Da mesma forma, foi relatado em outros trabalhos, com várias espécies de peixes, que o amido gelatinizado incorporado em dietas pode reduzir a ingestão alimentar (Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Hemre et al., 1989; Gouveia et al., 1995; Peres e Oliva-Teles, 2002). Segundo Arnesen, (1993) e Venou et al. (2003), a utilização de amido gelatinizado pode aumentar o tempo de esvaziamento gástrico, ou ainda aumentar a energia disponível devido a melhor digestibilidade após a gelatinização, ocasionando uma redução na ingestão alimentar.

Os resultados de desempenho produtivo obtidos neste estudo foram melhores que os observados em outros trabalhos com juvenis de pacu (Fernandes et al., 2001; Souza et al., 2003; Baldan et al., 2008; Bechara et al., 2005; Takahashi et al., 2006; Muñoz Ramírez, 2005)

Fernandes et al. (2000) avaliaram dietas isocalóricas contendo três diferentes níveis protéicos com substituição da farinha de peixe por farelo de soja, em alevinos de pacu (22, 26 e 30% PB) e observaram que a farinha de peixe pode ser substituída parcial ou totalmente pelo farelo de soja, sem influir no ganho de peso, na conversão alimentar, na taxa de crescimento específico e na taxa de eficiência protéica dos alevinos. Os resultados indicaram, ainda, que o nível de 26% PB foi o mais adequado para o bom desempenho dos alevinos. Souza et al. (2003) avaliaram os efeitos da utilização de ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação no crescimento do pacu, durante o período de engorda. Os peixes foram submetidos a diferentes manejos alimentares: alimentado *ad libitum*, restrição alimentar de 4 semanas, realimentado por 9 semanas e 6 semanas de restrição alimentar, realimentado por 7 semanas. Os resultados mostraram que 6 semanas de restrição alimentar e realimentação por 7 semanas é o tratamento mais indicado para outono/inverno, promovendo maior crescimento, menor custo com ração, baixa conversão alimentar e maior receita líquida parcial. Entretanto, durante as estações mais quentes do ano (primavera/verão), outros programas de alimentação devem ser testados, utilizando-se períodos mais curtos de restrição alimentar.

Baldan et al. (2008) avaliaram em dietas isoprotéicas (26%), isoenergéticas (4.200 kcal kg⁻¹) suplementadas com seis níveis de óxido de cromo (Cr₂O₃) (0, 10, 50, 100, 300 e 1000 mg kg⁻¹) o metabolismo energético e desempenho produtivo de alevinos de pacu. As dietas continham 48% de carboidrato, tendo o milho cru como principal fonte de amido. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros analisados, sugerindo que o cromo, na forma do óxido utilizado, não interferiu na utilização de carboidrato pela espécie. Bechara et al. (2005) avaliaram o efeito de diferentes níveis de proteína bruta (25%, 35%, e 45%) na qualidade da água e eficiência de utilização alimentar do pacu em um sistema semi-intensivo. Os peixes foram estocados em uma densidade de um indivíduo por m², por 299 dias, e alimentados com rações isoenergéticas contendo farelo de soja, milho e farinha de sangue e farinha de ossos. Os resultados indicaram que menor nível de proteína para o pacu apresentou taxas de crescimento e composição da carcaça semelhantes aos outros tratamentos experimentais, com uma melhora significativa na qualidade da água e eficiência de utilização alimentar.

Takahashi et al. (2006) estudaram, em alevinos de pacu, durante 60 dias, o efeito do metavanadato de amônio (0, 10, 50, 100, 300 e 1000 mg $\text{H}_4\text{NO}_3\text{V kg}^{-1}$ dieta) incluído em dietas isoprotéicas e isoenergéticas contendo cerca de 47% de carboidrato. Os níveis crescentes de metavanadato de amônio não melhoraram o crescimento e o maior nível de inclusão (1000 mg kg^{-1}) reduziu o desempenho. Muñoz Ramírez (2005), testando diferentes fontes de carboidrato para pacu, com nível de inclusão de 40%, verificou na dieta composta de amido de milho gelatinizado, como única fonte de amido, os valores de desempenho produtivo de 1,01, 1,47 e 2,61 g dia^{-1} para ganho em peso diário, conversão alimentar e taxa de eficiência protéica, respectivamente.

A utilização do amido gelatinizado afetou positivamente os parâmetros de desempenho dos peixes, indicando melhor utilização da fonte de energia disponível. O processo de gelatinização ocorre pelo aquecimento do amido em meio aquoso alterando sua estrutura. Durante o processo de gelatinização pode ocorrer a recristalização ou retrogradação, quando as cadeias de amilose agregam-se formando duplas hélices cristalinas estabilizadas por pontes de hidrogênio, levando a formação de amidos resistentes à degradação por amilases. A amilose é especialmente sensível a retrogradação, já que a amilopectina, por conter uma cadeia mais complexa, apresenta limitada capacidade de reassociação de sua estrutura química (Van Soest, 1994). A maior parte dos amidos é composta por 70-80% de amilopectina e 20-30% de amilose (Gallant et al., 1992), mas existem outras classes de amidos com proporções amilopectina/amilose alteradas por processos químicos e físicos ou pelo cultivo de variedades (ex. amido ceroso ou “waxy”). Pfeffer et al. (1991) observaram melhor desempenho em trutas alimentadas com amido de milho “waxy” comparado ao amido de milho normal. Os baixos valores de amilose encontrado nas dietas no presente estudo são outro indicativo da eficiente utilização do amido pelo peixes.

Estudos têm demonstrado que a utilização de amido gelatinizado tem efeitos benéficos no crescimento e na eficiência alimentar (Jeong et al., 1992, Kaushik e Medale, 1994). Por outro lado, de acordo com Peres e Oliva-Teles (2002), o desempenho do robalo europeu foi melhor com uma mistura de 12,5% de amido cru + 12,5% de amido gelatinizado, que 25% de amido gelatinizado ou 25% de amido cru.

Segundo Peres e Oliva-Teles (2002), um aspecto que se deve levar em consideração com relação à eficiência de utilização do amido é a rápida utilização dos carboidratos digestíveis, pois o excesso de glicose absorvido pode ser eliminado do sangue antes da utilização eficiente pelas células. Bureau (1998) observou que a excreção da glicose urinária atingiu cerca de 30% da ingestão em trutas alimentadas com altos níveis de carboidrato

digestíveis na dieta. No presente estudo, além da inclusão do amido pré-gelatinizado às dietas, outras fontes de amido cru foram utilizadas na sua formulação, como farelo de soja, farelo de trigo e farelo de arroz, o que poderia ter auxiliado na sua utilização. Com o fornecimento de amido gelatinizado, a glicose é disponibilizada mais facilmente para absorção, enquanto que, com a utilização do amido cru, há necessidade de maior hidrólise enzimática para disponibilizar a glicose, ocasionando uma absorção mais lenta. A utilização das duas fontes de amido poderia beneficiar a utilização da glicose pelo organismo, evitando uma sobrecarga no início do processo absorptivo, que poderia levar a uma utilização pouco eficiente.

O coeficiente de digestibilidade da proteína das dietas melhorou com o aumento dos níveis de inclusão de amido e a digestibilidade do amido foi superior a 99% independente da dieta. Abimorad (2004) observou que os níveis de carboidrato dietário não interferiram na digestibilidade da proteína para pacu, no entanto a digestibilidade da energia melhorou proporcionalmente ao aumento dos níveis de carboidrato. Muñoz Ramírez (2005) encontrou valores de coeficiente de digestibilidade de extrativo não nitrogenado satisfatórios para polissacarídeos crus testados em pacu, sendo 93,35% para amido de milho regular e 90,86% para amido de milho ceroso com 40% de inclusão na dieta, sugerindo que a espécie tem alta capacidade de adaptar-se a diferentes fontes de carboidratos nas dietas. Possivelmente esta capacidade de utilização do carboidrato está relacionada ao seu hábito alimentar. O pacu é uma espécie herbívora, com preferência frugívora, e sua dieta na natureza é constituída principalmente de folhas, frutos e resíduos vegetais, alimento naturalmente ricos em carboidrato (Silva, 1985; Menton, 1989). Além disso, peixes de água doce e quente apresentam maior habilidade para utilizar carboidratos que espécies marinhas ou de água fria e esta diferença pode estar relacionada a maior atividade da amilase no sistema digestório das várias espécies (Wilson, 1994). Corrêa et al. (2007) observaram aumento da atividade de amilase e maltase em dietas para tambaqui, espécie onívora com tendência frugívora, com o aumento nos níveis de amido de milho na dieta de 40 para 50 %.

Segundo De Silva e Anderson (1995), a concentração energética, assim como o nível dos nutrientes na dieta, é um dos principais fatores que afetam a digestibilidade, agindo diretamente no tempo de trânsito gastrointestinal, na atividade enzimática e na absorção dos nutrientes.

Vários modelos vêm sendo utilizados para estimar as taxas de evacuação gástrica. Segundo Windell (1968), a taxa de evacuação gástrica representa o tempo necessário para o peixe esvaziar completamente seu estômago de alimento. No presente estudo avaliou-se o tempo de trânsito pelos índices estômago e intestino somático durante as 24 horas após

alimentação. Observou-se diferença significativa às 9 horas pós prandial, quando os peixes que receberam a dieta com maior nível de amido tinham maior volume de alimento comparado à dieta de menor nível de amido. Já, de 12 a 24 horas, não foram observadas diferenças em relação às dietas testadas. No caso do índice intestino-somático, o mesmo não foi afetado pelas dietas, apesar dos peixes alimentados com a dieta de maior nível de amido apresentarem valores mais baixos durante o período de 24 horas pós-prandial. Figueiredo-Garutti et al. (2002) observaram em *B. cephalus*, durante o período pós-prandial até o jejum de 336 horas após alimentação, uma diminuição progressiva no índice estômago somático, sugerindo que é necessário um período de 12-24 horas para o completo esvaziamento gástrico. Já o tempo de trânsito pelo intestino, estimado pelo índice intestino somático se prolongou até 48-72 horas.

Os indicadores metabólicos reforçam os dados anteriores indicativos de alta tolerância e utilização do carboidrato presente nas dietas pelo pacu.

Apesar de vários autores relatarem que os peixes apresentam menor habilidade em utilizar glicose e a alta ingestão de carboidratos digestíveis resultar em uma hiperglicemia pós-prandial por muitas horas (Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Brauge et al., 1994), os níveis de glicose plasmática do pacu no presente estudo se mantiveram semelhantes nas diferentes dietas 24 horas após alimentação em faixas de valores já descritas para a espécie (Souza et al., 2000).

Os níveis de ácidos graxos livres plasmáticos, triglicerídeos, colesterol sérico e lipídio muscular não foram influenciados pelas dietas, embora tenha ocorrido um aumento do índice gorduro-viscerossomático nas dietas de nível intermediário e alto de amido, indicando reserva de energia na forma de gordura visceral. Entretanto, não houve depósito de energia na forma de glicogênio hepático, por influência do carboidrato incorporado às dietas. O aumento no índice hepato-somático foi ocasionado pelo aumento do estoque de lipídio no fígado, que seguiu o mesmo comportamento da gordura visceral. O mesmo foi observado por Hemre et al. (1989) em dietas para bacalhau (*Gadus morhua*) com amido de batata pré-cozido. Outros estudos comparando a utilização de carboidratos complexos e simples na alimentação de tilápias (Shiau e Chen, 1993; Shiau e Lin, 1993; Shiau e Peng, 1993, Shiau e Liang, 1995), bagre do canal (Robinson e Li, 1995), esturjão (Hung et., 1989; Deng et al., 2000) e salmão do Atlântico (Arnesen et al., 1995) mostraram também alta atividade lipogênica no fígado e melhor crescimento com amido gelatinizado comparado com glicose ou outros monossacarídeos (Hemre et al., 2002). Mesmo ocorrendo aumento de depósito de gordura nas vísceras e fígado dos pacus alimentados com 35 e 48% de carboidrato dietário, os valores

encontrados não indicam alterações patológicas. Os valores encontrados são relatados em condições consideradas fisiológicas em outros estudos com pacu (Souza et al., 2000; Baldan et al., 2008; Takahashi et al., 2006)

Os resultados confirmam a habilidade do pacu em utilizar eficientemente altos níveis de carboidrato, como demonstrado pela melhora na conversão alimentar, taxa de eficiência protéica, alta digestibilidade da proteína e do amido das dietas, além de evidente homeostase energética.

REFERÊNCIAS

- ABIMORAD, E. G. 2004 Relações entre níveis de proteína e energia digestíveis em dietas com diferentes proporções de lipídios e carboidratos para o crescimento do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. 2004. 107 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura), Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.
- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 1984. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 14 ed. Arilington. 937p.
- ARNESEN, P., KROGDAHL, A., 1993. Crude and pre-extruded products of wheat as nutrient sources in extruded diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) grown in sea water. *Aquaculture* 118, 105–117.
- ARNESEN, P. KROGDAHL, A., SUNDBY, A. 1995. Nutrient digestibilities, weight gain and plasma and liver levels of carbohydrate in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) fed diets containing oats and maize. *Aquac. Nutr.* 1, 151-158.
- BALDAN, A.P., TAKAHASHI, L.S., URBINATI, E.C. 2008. Dietary chromic oxide, metabolism and growth of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *J. Applied Ichthyology* (in press).
- BECHARA J.A., ROUX J.P., DIAZ F.J.R., QUINTANA C.I.F., MEABE C.A.L. 2005. The effect of dietary protein level on pond water quality and feed utilization efficiency of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Aquac. Res.* 36, 546-553.
- BILIADERIS, C.J. 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69,. 60-78.
- BLIGH, E.G., DYER, W.J., 1959. Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- BRAUGE, C., MÉDALE, F., CORRAZE, G. 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater *Aquaculture* 123, 109-120.
- BUREAU, D., 1998. The partitioning of energy from digestible carbohydrates by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Diss. Abstr. Int., B. Sci. Eng.* 58 (7), 3379.

CARNEIRO, D.J., FRAGNITO, P.S., MALHEIROS, E.B. 1994. Influence of carbohydrate and energy level on growth and body composition of tambacu, a hybrid of tambaqui (*Colossoma macropomum*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 124, 129-130.

CHO, C.Y., SLINGER, S.J., BAYLEY, H.S. Bioenergetics of salmonid fishes: Energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 73B, 25–41, 1982.

CHO, C.Y., COWEY, C.B., WATANABE, T. *Finfish Nutrition in Asia*. IDRC, Ottawa, Ontario, Canada, 1985.

CORRÊA, C.F., AGUIAR, L.H., LUNDSTEDT, L.M., MORAES, G. 2007. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. *Comp. Biochem. Physiol. A* 147, 857-862.

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

DE SILVA, S.S., ANDERSON, T.A. 1995. *Fish Nutrition in Aquaculture*. Chapman & Hall Aquaculture Series 1, London, UK.

DENG, D.F., REFSTIE, S., HEMRE, G.I., CROCKER, C.E., CHEN, H., CECH, JR., J.J., HUNG, S.S.O. 2000. A new technique of feeding, repeated sampling of blood and continuous collection of urine in white sturgeon. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 191-197.

FERNANDES, J.B.K, CARNEIRO, D.J., SAKOMURA, N.K.2001. Fontes e Níveis de Proteína Bruta em Dietas para Juvenis de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa-MG, 30 (3), p. 617-626.

FIGUEIREDO-GARUTTI, M.L. Carboidrato como fonte de energia, o efeito do cromo trivalente na dieta e ação da insulina em juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 1996, 65p.

FIGUEIREDO-GARUTTI, M.L., NAVARRO, I., CAPILLA, E., SOUZA, R.H.S., MORAES,G., GUTIÉRREZ, J., VICENTINI-PAULINO, M.L.M. 2002. Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. *Comp. Biochem. Physiol. A* 132, 467-476.

FURUKAWA, A., TSUKAHARA, H. 1976. On the acid digestion method for the determination of chromic oxyde as an index substance in the study of digestibility of fish feed. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 32, 502-506.

GALLANT, D.J., BOUCHET, B., BUELON, A., PEREZ, S. 1992. Physical characteristics of starch granules and susceptible to enzymatic degradation. Eur. J. Clin. Nutr. 46 (2), 3-16.

GOUVEIA, A., OLIVA-TELES, A., GOMES, E., PERES, M.H. 1995. The effect of two dietary levels of raw and gelatinized starch on growth and food utilization by the European sea bass. In: Castelló, I., Orvay, F., Calderer, I., Reig, A. (Eds.), Proc. Of the Fifth National Congress on Aquaculture, Uni. Barcelona, Spain, pp. 516-521.

GÜNTHER, J. 1996. Growth of tambaqui (*Colossoma macropomum*) juveniles at different carbohydrate/lipid ratios. J. Aquac. Trop. 11, 105-112.

HEMRE, G.I., LIE, O., LIED, E., LAMBERTSEN, G. 1989. Starch as an energy source in feed for cod (*Gadus morhua*): Digestibility and retention. Aquaculture 80, 261-270.

HEMRE, G.I., KARLSEN, O., LEHMANNG., HOLM, J.C., LIE, O. 1993. Utilization of protein, fat and glycogen in cod (*Gadus morhua*) during starvation. Fisk Dir Skr Series Ern cering 6, 1-9.

HEMRE, G.I., SANDNES, K., LIE, O., TORRISSEN, O., WAAGBO, R. 1995. Carbohydrate nutrition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., growth and feed utilization. Aquac. Nutr. 26, 149-154.

HEMRE, G.I., MOMMSEN, T.P., KROGDAHL, A. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. Aquac. Nutr. 8, 175-194.

HENDRIX, D.L. 1993. Rapid extration and analysis of nonstrutuctural carbohydrates in plant tissues. Crop Sci. 25,1306-1311.

HERNANDEZ, M., TAKEUCHI, T., WATANABE, T. 1995. Effects of dietary energy sources on the utilization of protein by *Colossoma macropomum* fingerlings. Fish. Sci. 61, 507-511.

HUNG, S.S.O., FYNN-AIKINS, K., LUTES, P.B., XU, R. 1989. Ability of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different carbohydrates sources. J. Nutr. 119, 727-733.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Norme Internationale: riz détermination de la teneur en amylose. Suisse, 1987. 5 p. (ISO 6647).

JEONG, K.S., TAKEUCHI, T., OKAMOTO, N., WATANABE, T. 1992. The effects of dietary gelatinized ratios at different dietary energy on growth and characteristic of blood in rainbow trout fingerlings. Nippon Suisan Gakkaishi 58, 937-944.

KARKALAS, J.J. 1985. An improved enzymatic method for the determination of native and modified starch. J. Sci. Food Agric. 36, 1016.

KAUSHIK, S.J., OLIVA-TELES, 1985. A. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. Aquaculture 50, 89-101.

KAUSHIK, S. J., MÉDALE, F. 1994. Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. Aquaculture 124, 81-97.

LEE, P.C., BROOKS, S.P., KIM, O. 1985. Digestible of native and modified starches: in vitro studies with human and rabbit pancreatic amylases and vivo studies in rabbits. J. Nutr. 115,

LENINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. Carbohydrates. In: Leninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. Principles of biochemistry. 2. ed. New York: Worth, 1993. 298-323.

MENTON, D.J. Research considerations into the nutrition of *Colossoma* and *Piaractus* in relation to culture conditions. In: Hernandez R, Editor. Cultivo de *Colossoma*, Guadalupe, Colombia, 1989: 75-84.

MOON, T.W., FOSTER, G.D., PLISETSKAYA E.M., 1989. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food 6 weeks. Can. J. Zool. 67, 2189-2193.

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

- PERES, H., OLIVA-TELES. 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 205, 287-299.
- PFEFFER, E., BECKMANN-TOUSSAINT, J., HENRICHFREISE, B., JANSEN, H.D., 1991. Effect of extrusion on efficiency of utilization of maize starch by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 96, 293 - 303.
- ROBINSON, E.H., LI, H.M. 1995. Catfish nutrition. Part. I. Nutrients and feeds. *Aquaculture Magazine*, may/jun, 44-53.
- SILVA, A.J. Aspectos de alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (Berg, 1985) (Pisces, Characidae), no Pantanal de Mato Grosso. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1985. 92p.
- SHIAU, S.Y., CHEN, M.J. 1993. Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) as influenced by different chromium sources. *J. Nutr.* 123, 1747-1753.
- SHIAU, S.Y., LIANG, H.S. 1995. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. *Journal Nutrition* 125, 976-982.
- SHIAU, S., LIN, S. 1993. Effect of supplemental dietary chromium and vanadium on the utilization of different carbohydrates in tilapia, *O. niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture* 110, 321-330.
- SHIAU, S. Y., PENG, C.Y. 1993. Protein-sparing effect by carbohydrates in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture*. 117 (3-4), 327- 334.
- SOUZA, V.L., OLIVEIRA, E.G., URBINATI, E.C. 2000. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). *J. Aquac. Trop.* 15, 371-379.
- SOUZA, V.L., URBINATI, E.C., MARTINS, M.I.E.G., SILVA, P.C. 2003. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetidos a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. *Rev. Brás. Zoot.* 32, 19-28.

SUAREZ, R.K., MOMMSEN, T.P. 1987. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Can. J. Zool.* 65, 1869-1882.

TAKAHASHI, L.S., BALDAN, A.P., URBINATI, E.C. 2006. Growth performance and energetic metabolism of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed diets supplemented with ammonium metavanadate. *Aquac. Res.* 37, 1372-1377.

URBINATI, E. C., GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora UFSM, 2005, v. Único, p. 225-246.

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of ruminant: ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fiber. Ithaca: Cornell University Press, 1994.

VENOU, B., ALÉXIS, M.N., FOUNTOULAKI, E., NENGAS, I., APOSTOLOPOULOU, M., CASTRITSI-CATHARIOU, I. 2003. 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* 225, 207-223.

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

WINDELL, J.T. 1968. Food analysis and rate of digestion. Em Ricker WE (Ed.) *Methods for assessment of fish production in fresh waters*. Blackwell. Oxford. pp. 197-203

WU, X.Y., LIU, Y.J., TIAN, L.X., MAI, K.S., YANG, H.J., LIANG, G.Y. 2007. Effects of raw corn starch levels on growth, feed utilization, plasma chemical indices and enzyme activities in juvenile yellowfin seabream *Sparus latus* Houttuyn. *Aquac. Res.* 38, 1330-1338.

WU, X.Y., LIU, Y.J., TIAN, L.X., MAI, K.S., YANG, H.J. 2007. Utilization of different raw and pre-gelatinized starch sources by juvenile yellowfin seabream *Sparus latus*. *Aquac. Nutr.* 13, 389-396.

CAPÍTULO 3

Respostas metabólicas pós-prandiais de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, alimentado com diferentes níveis de carboidrato: alimentação crônica e aguda

RESUMO

As respostas metabólicas pós-prandiais do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), durante 24 horas, foram avaliadas em dois experimentos: alimentação crônica e alimentação aguda, utilizando-se três dietas isoprotéicas e isoenergéticas com três níveis de carboidrato (CHO): baixo (28%), alto (48%) e controle/intermediário (35%). Os peixes receberam a ração controle por 15 dias para adaptação às condições laboratoriais e realização dos experimentos. *Experimento 1 - Alimentação crônica:* pacus (peso inicial de $27,6 \pm 1,44$ g) foram alimentados com as três dietas por 60 dias. Ao término deste período, os peixes (peso final de $148,80 \pm 8,47$ g) foram amostrados. *Experimento 2 - Alimentação aguda:* após adaptação às condições laboratoriais, pacus (peso inicial de $57,5 \pm 6,45$ g) foram alimentados com as três dietas por 3 dias. Ao término deste período, os peixes foram amostrados. As amostragens nos dois experimentos foram realizadas 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após a oferta da 1^o alimentação do dia. Após anestesia, o sangue dos peixes foi retirado para análise de glicemia, ácidos graxos livres, triglicerídios, colesterol e proteína total. Nos tecidos foram determinados: concentração de glicogênio e lipídio total no fígado e lipídio total no músculo. Fígado, estômago e intestino foram pesados para cálculo dos índices hepato-somático, estomaco-somático cheio, intestino-somático cheio. A maior concentração de glicose sanguínea foi observada 3 horas após alimentação e após 6 horas não havia diferença nos níveis glicêmicos nas diferentes dietas. As concentrações de ácidos graxos livres plasmáticos, triglicerídios e proteína total séricos não sofreram influência do carboidrato dietário. Foi observado aumento do índice hepato-somático com aumento do carboidrato na dieta, relacionado à deposição de lipídio no fígado independente da adaptação (crônica e aguda) dos peixes às dietas. As concentrações de glicogênio não se alteraram por efeito do carboidrato dietário. Os peixes que foram alimentados por 60 dias com as dietas experimentais apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no índice estômago-somático 9 horas após alimentação, sendo que os animais que receberam nível mais alto de carboidrato apresentaram maior índice. Não foi observada diferença significativa no índice intestino-somático. As respostas do metabolismo pós-prandial, do pacu alimentado com diferentes níveis de carboidrato, demonstram que a espécie se adapta bem a altos níveis de carboidrato.

Palavras-Chave: carboidrato, metabolismo pós-prandial, pacu

ABSTRACT

The metabolic postprandial (24h) responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) were evaluated in two experiments: short-term and long-term feeding using three isoproteic and isoenergetic diets containing varying levels of carbohydrates (CHO): low (28%), high (48%) and intermediary/control (35%). Fish were adapted to the experimental conditions for 15 days receiving the control diet. Experiment 1 – long-term feeding: fish (initial weight 27.6 ± 1.44 g) were fed with the experimental diets for 60 days. At the end of the feeding time, fish (final weight 148.8 ± 8.4 g) were sampled. Experiment 2 – short-term feeding: after adaptation the experimental conditions, fish (initial weight 57.5 ± 6.4 g) were fed with the experimental diets for three days and sampled. Samplings were carried out at 1, 3, 6, 9, 12 e 24 h after the first feeding in both experiments. After anesthesia, fish blood was drawn for glucose, free fat acids, triglycerids, cholesterol and total protein determination. Liver glycogen and total lipid and muscle lipid were determined. Liver, stomach and intestines were weighed for hepatic, full stomach-somatic and intestine-somatic indexes calculation. The highest concentration of blood glucose was observed three h after feeding and 6 h after glycemia was similar in all diets fish. Free fat acids, triglycerids, cholesterol and total protein concentrations were not influenced by dietary CHO levels. Increase in hepatic-somatic index followed the increase of dietary CHO increase, related to liver lipid deposition regardless the time of feeding adaptation (short or long-term). Glycogen concentration was not affected by diets. Fish previously adapted to the diets presented difference ($p < 0.05$) in full stomach-somatic index 9 h after feeding and fish that received 48% CHO had the highest index. No changes were seen in intestine-somatic index. The metabolic postprandial (24h) responses of pacu fed with varying levels of carbohydrates suggest that the species can adapt to high levels of this nutrient.

Key-words: carbohydrates, postprandial metabolism, pacu

INTRODUÇÃO

Apesar de não existirem exigências de carboidratos em dietas para peixes sua inclusão em níveis adequados pode assegurar uma melhor eficiência na utilização de outros nutrientes (Wilson, 1994). A ausência de carboidrato na dieta faz com que proteínas sejam catabolizadas para a síntese de glicose (Suarez e Mommsen, 1987).

Segundo Hilton et al. (1987), um nível tolerável de carboidrato em dietas para peixes é aquele que não comprometa o crescimento ou resulte em aumento da mortalidade, enquanto que um nível ótimo de carboidrato em dietas para peixes é quando a glicose for totalmente oxidada para produzir energia, e assim poupar proteína.

A melhora no crescimento e o efeito poupador de proteína podem estar relacionados ao fato da glicose ser um importante combustível metabólico para os tecidos glicose-dependentes, tais como células vermelhas, tecidos nervosos, entre outros. Desta forma, carboidratos presentes na dieta de peixes podem reduzir a atividade gliconeogênica, assim afastando aminoácidos da via oxidativa (Cowey et al., 1977b).

Entretanto, alguns peixes parecem ter menor habilidade em utilizar carboidratos como fonte de energia. A ingestão de carboidrato altamente digestível, por trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), resultou em hiperglicemia, que permaneceu por muitas horas, devido a esta limitada habilidade que alguns peixes apresentam em metabolizar glicose (Brauge et al., 1994). Várias possibilidades têm sido discutidas para explicar o mecanismo da intolerância dos peixes aos carboidratos. Segundo Wilson (1994), peixes de águas tropicais utilizam níveis mais altos de carboidrato dietário que peixes de água fria e os marinhos. Sugere-se, ainda, que peixes onívoros são capazes de utilizar níveis mais altos de carboidratos dietários que os carnívoros, devido a maior atividade da amilase no trato digestório (Hidalgo et al., 1999).

No entanto, poucos estudos têm explorado a habilidade do pacu, espécie herbívora com preferência frugívora, de utilizar carboidrato. Este peixe, que tem lugar de destaque na piscicultura brasileira, se apresenta como um interessante modelo para o estudo do metabolismo do carboidrato, visto que sua dieta natural inclui sementes e frutos, naturalmente ricos neste nutriente (Silva, 1985; Menton, 1989).

Fraguito (1991) observou melhores resultados de desempenho na produção de alevinos de tambacu (*Colossoma macropomum x Piaractus mesopotamicus*) utilizando uma dieta com nível de carboidrato de 45% e 3900 kcal kg⁻¹ de energia bruta. Figueiredo-Garutti (1996) alimentou pacus com dietas contendo 35 e 50% de amido de cereais e observou melhor crescimento com o nível mais alto e melhor utilização do carboidrato em relação a lipídios.

Considerando o hábito alimentar herbívoro-frugívoro do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o objetivo deste estudo foi avaliar, em dietas isoprotéicas e isocalóricas, as respostas metabólicas pós-prandial, durante o período de 24 horas, após alimentação crônica ou aguda a dietas com diferentes níveis de carboidrato.

MATERIAL E MÉTODOS

Dietas experimentais

Três dietas isoprotéicas e isoenergéticas com suplementação mineral e vitamínica foram formuladas para conter baixo nível de carboidrato (28%), alto nível de carboidrato (48%) e um nível intermediário (35%) que compôs a dieta controle. Os ingredientes e a composição proximal das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Fórmula e composição proximal das dietas experimentais.

<i>Ingredientes</i>	<i>Dietas (níveis de carboidrato)</i>		
	<i>Baixo</i>	<i>controle</i>	<i>alto</i>
Farinha de peixe	27,00	27,00	28,50
Farelo de soja	8,75	14,75	16,50
Amido milho pré gelatinizado ¹	5,00	26,00	45,00
Farelo de trigo	14,75	7,50	1,75
Farelo de arroz	19,50	8,25	1,25
Óleo de soja	5,50	3,75	1,00
Óleo de peixe	1,00	1,00	1,00
Minerais e vitaminas ²	0,75	0,75	0,75
Casca de arroz	9,00	6,00	3,75
Caulin	8,75	5,00	0,50
Total	100,00	100,00	100,00
<i>Composição analisada (%)</i>			
Matéria seca	93,8	93,8	94,1
Proteína bruta	26,0	26,6	26,4
Proteína digestível	23,0	24,3	24,6
Extrato etéreo	13,4	11,6	6,8
Fibra bruta	9,3	7,0	3,7
Matéria mineral	17,0	13,3	9,2
Carboidratos ³	28,18	35,25	48,00
Amido total	16,6	22,4	38,8
Amilopectina / Amilose	97,7 / 2,30	96,37 / 3,63	91,82/ 8,18
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4.107	4.128	4.097

Farinha de peixe (PB= 63%).

¹ Corn Products Brasil®

² Premix Peixe Inicial Fri ribe®. Ac. Fólico (1,5 mg); Ác. Pantotênico (30 mg); Colina (225 mg); Cobre (15 mg); Ferro (150 mg); Iodo (7,5 mg); Manganês (105 mg); Selênio (0,225 mg); Zinco (225 mg); Niacina 150 mg); Biotina (0,150mg); Vit. A (4500 UI); Vit. B1 (9 mg); Vit. B12 (30 mcg); Vit. B2 (12 mg); Vit. B6 (4,5 mg); Vit. C (300 mg); Vit. D3 (4500 UI); Vit. E (90 UI); Vit. K (9 mg) e Antioxidante (187,50).

³Carboidrato estimado= Matéria seca – Proteína bruta – Extrato etéreo – Fibra bruta – Matéria mineral. A digestibilidade do amido, das dietas experimentais, foi superior a 99%, independente da dieta oferecida (como verificado no Capítulo 2, protocolo experimental).

Após o processamento, as rações foram analisadas segundo metodologia da AOAC (1984), a energia bruta por bomba calorimétrica (Parr 1281 Calorimeter), o amido pelo método de amilase e glicose-oxidase, segundo Hendrix (1993) e Karkalas (1985), e os constituintes do amido (amilose e amilopectina), segundo ISO 6647 (International Organization for Standardization, 1987).

Para o preparo das dietas, os ingredientes foram peneirados, misturados e peletizados. As rações foram estocadas a -20°C até o fornecimento aos peixes e análise da composição.

Animais e Condições Gerais de Manutenção

Para a realização dos experimentos, os peixes foram adquiridos na Piscicultura Águas Claras (Mococa, SP). Em cada experimento, os peixes foram distribuídos em 12 caixas de polietileno de 100 L (12 peixes caixa⁻¹), com renovação contínua de água e aeração. Durante 15 dias de adaptação às condições laboratoriais, os peixes receberam a ração controle, com 35% de carboidrato (Tabela 1), duas vezes ao dia, até a saciedade aparente.

Protocolo Alimentar e Análises

Alimentação Crônica: Após a adaptação às condições laboratoriais, os juvenis de pacu (peso inicial de $27,6 \pm 1,44$ g) foram alimentados com as dietas experimentais [baixo carboidrato (28%), alto carboidrato (48%) e controle (35%)] por 60 dias (Tabela 1). Ao término deste período, os peixes (peso final de $148,80 \pm 8,47$ g) foram amostrados após a 1^a alimentação do dia.

Alimentação Aguda: Após a adaptação às condições laboratoriais, os juvenis de pacu (peso inicial de $57,5 \pm 6,45$ g) foram alimentados com as dietas experimentais [baixo carboidrato (28%), alto carboidrato (48%) e controle (35%)] por 3 dias (Tabela 1). Ao término deste período, os peixes foram amostrados após a 1^a alimentação do dia.

Cada dieta experimental foi oferecida a peixes de 4 caixas (12 peixes por caixa), duas vezes ao dia (09h:00 e 17h:00) até a saciedade aparente. Ao término de cada período de alimentação, os peixes foram amostrados 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após a 1^a alimentação do dia, sendo capturados 2 peixes por caixa (oito animais para cada tempo de amostragem e para cada dieta).

Após anestesia (benzocaína, 50 mg L^{-1}), o sangue dos peixes amostrados foi retirado por punção da veia caudal, sendo uma alíquota separada para a análise de glicemia (kit Labtest) e concentração de ácidos graxos livres (kit Wako, EUA), utilizando EDTA fluoretado para extração do plasma, e o restante do sangue centrifugado a 3000 rpm, durante

10 min, para separação do soro que foi estocado a -20°C até determinação da concentração de triglicerídios (Kit Labtest), colesterol (kit Labtest) e proteína total (Kit Labtest). Em seguida, os peixes foram pesados, sacrificados e após a abertura do abdômen, o fígado foi retirado e estocado a -20°C para análise da concentração de glicogênio (Moon et al., 1989) e lipídio total (Bligh e Dyer, 1959). No músculo branco, a partir de fragmento retirado da região caudal, foi analisada a concentração de lipídio total. O fígado, estômago e intestino foram pesados para cálculo dos índices: hepato-somático [IHS (%) = (peso do tecido hepático/ peso corporal) x 100], estomaco-somático cheio [IESc = (peso do estômago cheio/ peso corporal) x 100], intestino-somático cheio [IISc = (peso do intestino cheio/ peso corporal) x 100].

As variáveis químicas e físicas da água apresentaram valores recomendados para a espécie (Urbinati e Gonçalves, 2005) durante todo o experimento. O oxigênio dissolvido se manteve acima de 5,2 mg L⁻¹, a temperatura da água foi mantida a 29,5 ± 0,72 °C, pH variou entre 7,5 a 8,0 e a concentração de amônia total foi de 0,020 a 0,062 mg L⁻¹. O fluxo de água foi contínuo, com troca total aproximadamente 20 vezes ao dia. O fotoperíodo utilizado foi 12 horas luz: 12 horas escuro.

Análise estatística

Para verificar o efeito do tratamento (dietas) no tempo de amostragem (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após a alimentação) nos parâmetros analisados, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 6 [três dietas x seis tempos de coleta com 4 repetições (caixas)]. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), no programa estatístico SAS, versão 8.

RESULTADOS

Alimentação crônica

Parâmetros sanguíneos

Uma hora após a alimentação, a concentração de glicose plasmática foi semelhante em todos os tratamentos. Após 3 horas, houve um aumento, especialmente nos peixes alimentados com 48% de carboidrato, sendo os valores médios deste período de 126,0; 134,0 e 167,7 mg dL⁻¹ para 28, 35 e 48% de carboidrato, respectivamente. Após este período, houve diminuição gradual dos valores glicêmicos até 24 horas (Figura 1).

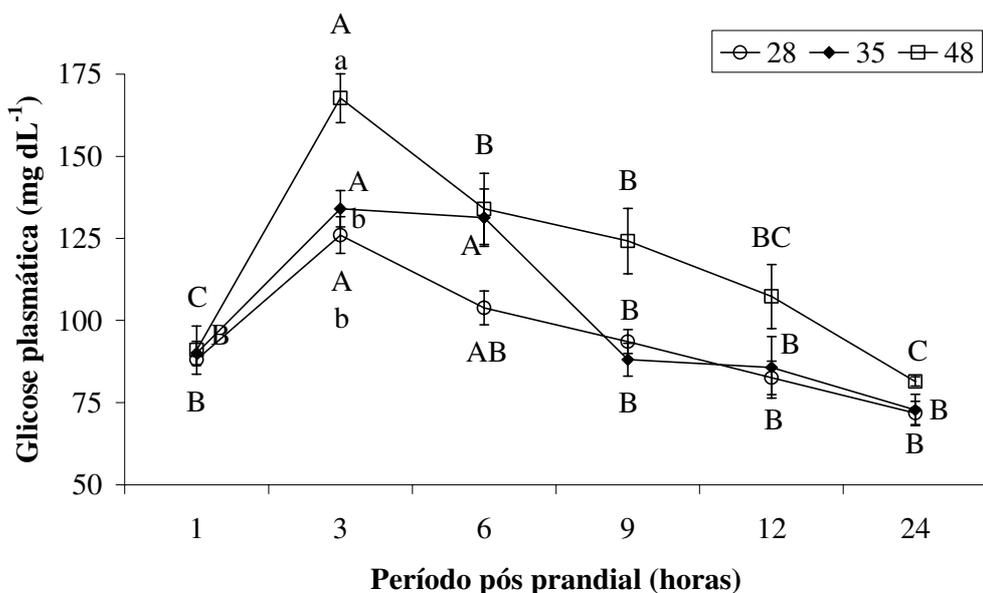


Figura 1. Glicose plasmática de pacu alimentado por 60 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas em cada tratamento nos diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Os níveis de carboidratos da dieta não afetaram os valores de ácidos graxos livres no plasma após 60 dias recebendo as dietas experimentais, mas no período pós-prandial, 12 horas após alimentação, foram encontrados maiores valores deste metabólito ($1,70 \text{ mEq L}^{-1}$) (Figura 2).

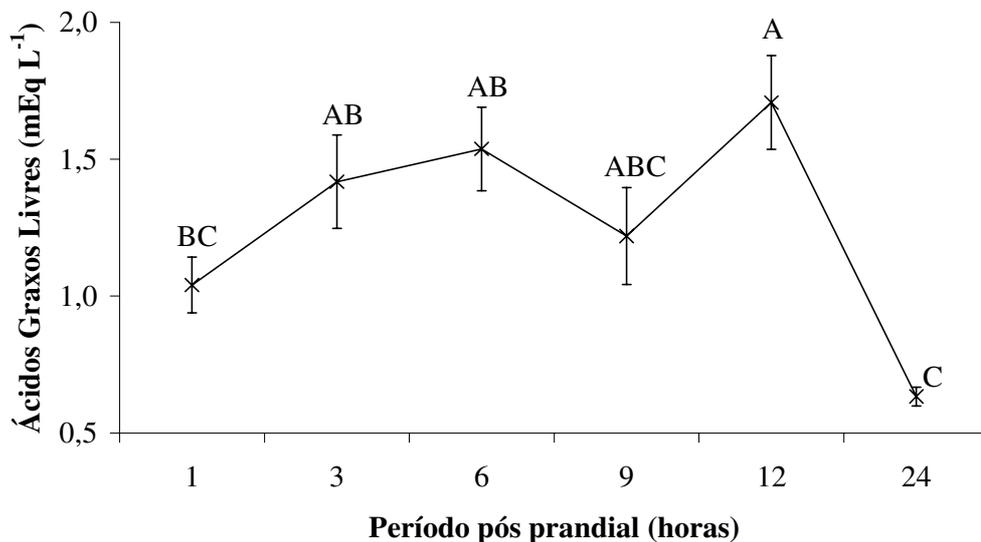


Figura 2. Ácidos graxos livres no plasma de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Os níveis de carboidratos da dieta não alteraram as concentrações séricas de triglicerídios e colesterol ($p>0,05$) (Figuras 3 e 4). A concentração de triglicerídios aumentou gradualmente até 12 horas após alimentação ($1227,38 \text{ mg dL}^{-1}$), enquanto os valores de colesterol atingiram os valores mais altos 9 horas após alimentação ($278,57 \text{ mg dL}^{-1}$).

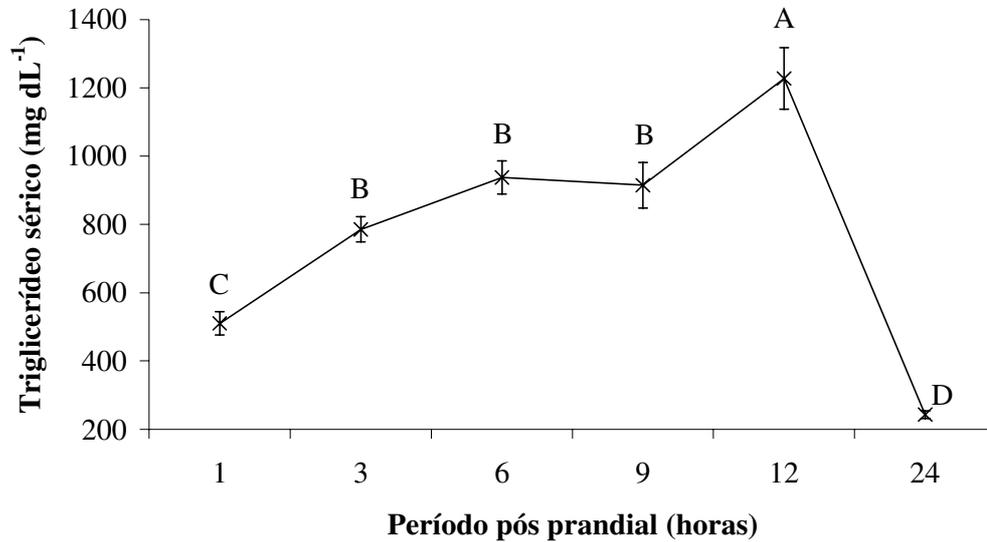


Figura 3. Triglicerídios sérico de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

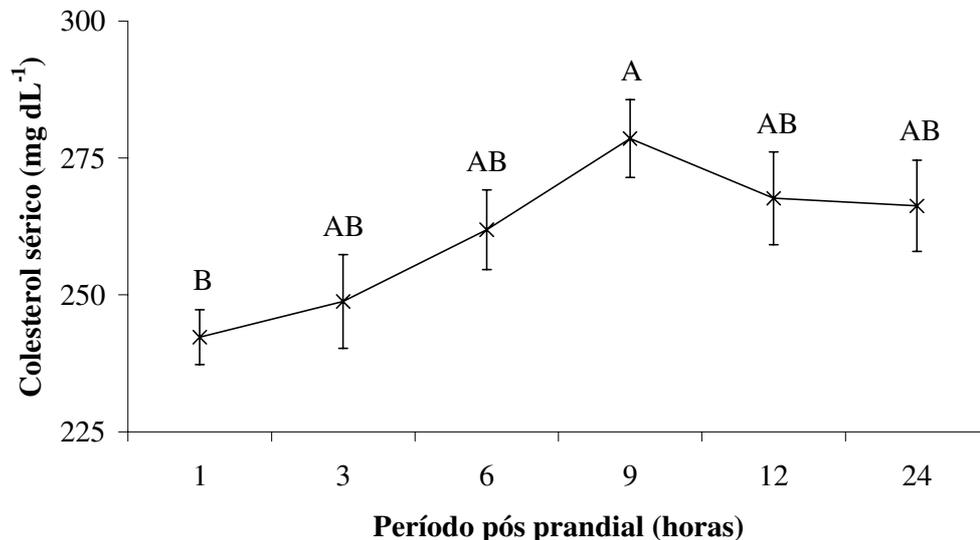


Figura 4. Colesterol sérico de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

As concentrações de proteína total sérica não diferiram significativamente entre os tratamentos, porém houve um aumento gradual até 9 horas após a alimentação (de 3,70 g dL⁻¹ a 4,21 g dL⁻¹), sendo que apenas os valores registrados às 6 e 9 horas foram diferentes (p<0,05) dos valores da 1 hora após alimentação, com redução às 12 e 24 horas em todos os grupos.

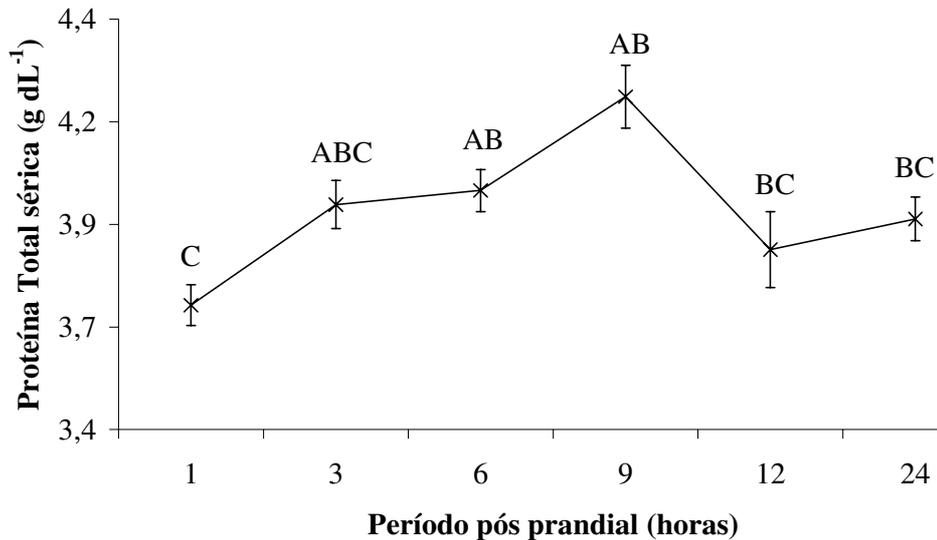


Figura 5. Proteína total sérica de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média (n=8).

Parâmetros teciduais

A concentração de glicogênio hepático não diferiu entre os tratamentos (p>0,05). No entanto, houve um aumento na deposição deste carboidrato a partir das 6 horas após a alimentação (12,9%), que se manteve até 24 horas depois (12,8%), independente do tratamento (Figura 6).

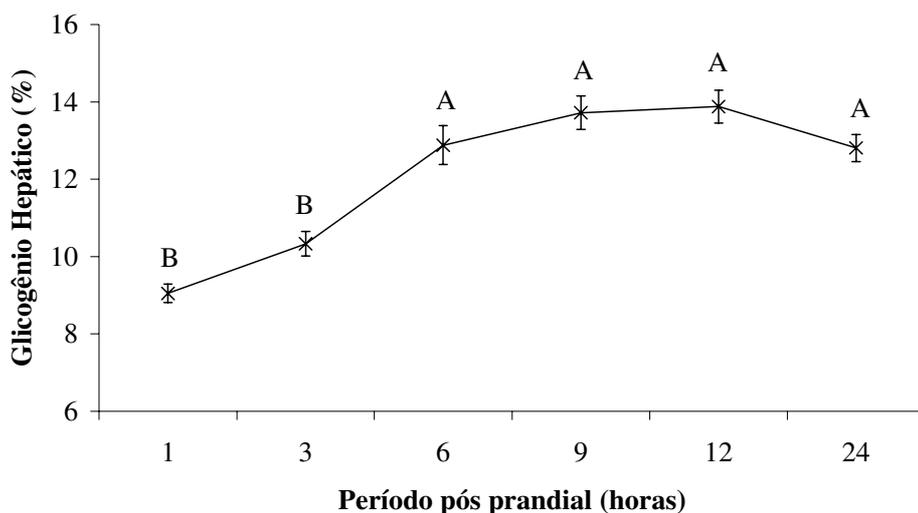


Figura 6. Glicôgênio hepático de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a médias de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Com relação ao lipídio hepático, não houve diferença significativa entre as amostragens ($p > 0,05$). Nos grupos alimentados com 35 e 48 % de carboidrato houve tendência a aumento de valores a partir de 9 horas que se tornaram significativamente diferentes dos valores registrados nos peixes alimentados com 28% de carboidrato 12 e 24 horas após a alimentação (Figura 7).

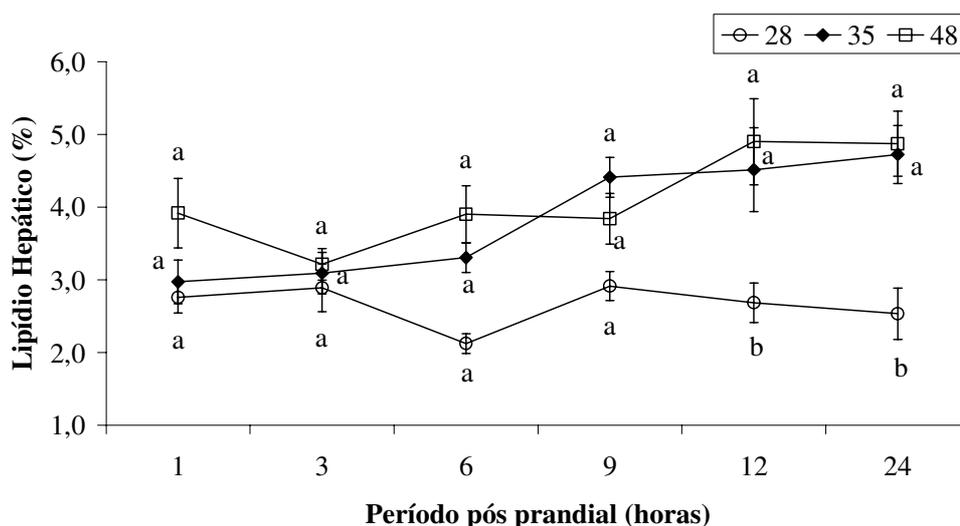


Figura 7. Lipídio hepático de pacu alimentado por 60 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos no mesmo tempo de coleta. Não houve diferença significativa entre tempos de amostragem no mesmo tratamento. Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Com relação ao lipídio muscular, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os peixes alimentados com as diferentes dietas e durante o período pós-prandial, embora se observe uma tendência de aumento da deposição de lipídio nos músculos de peixes que receberam as dietas com 35 e 48% de carboidrato. Os valores médios foram 1,2; 1,6 e 1,6% para 28, 35 e 48% de carboidrato, respectivamente. (Figura 8).

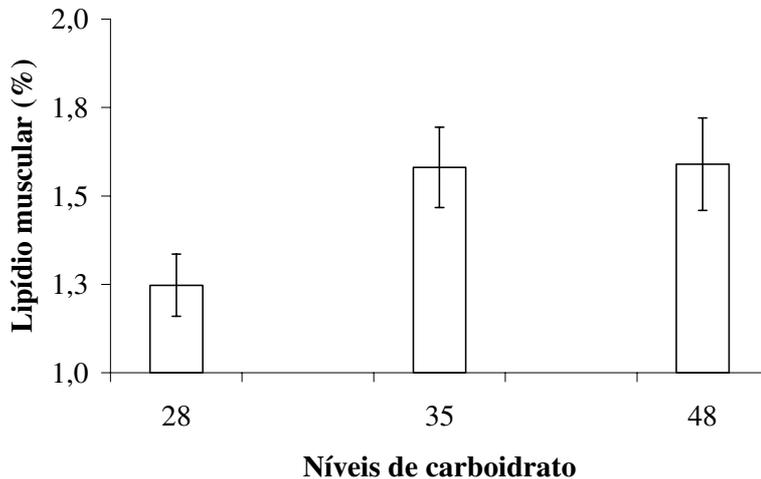


Figura 8. Lipídio muscular de pacu alimentado com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta por 60 dias. Cada barra representa a média dos tempos de amostragem. Não houve diferença significativa entre tempos de amostragem e tratamentos ($p>0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Índices biométricos

O índice hepato-somático (IHS) foi menor nos peixes alimentados com a dieta de 28% de carboidrato em todo o período pós-prandial, comparado com os grupos que receberam níveis mais altos de inclusão de carboidrato. Estes grupos (35 e 48%) foram semelhantes entre si, exceto 9 e 12 horas após alimentação, quando os valores do IHS foram maiores no grupo de 48% de carboidrato. Os valores médios deste período (9 e 12 horas) foram de 2,5 e 2,5% respectivamente, para a dieta de 35% de carboidrato e de 3,0 e 3,1% para a dieta de 48% de carboidrato).

Com relação a cada tratamento nos tempos de amostragem, o perfil foi semelhante nos 3 grupos de peixes, mas as alterações foram significativas ($p<0,05$) apenas nos tratamentos de 28 e 48 % de carboidrato. Houve um aumento do IHS entre 9 e 12 horas após alimentação e redução às 24 horas (Figura 9).

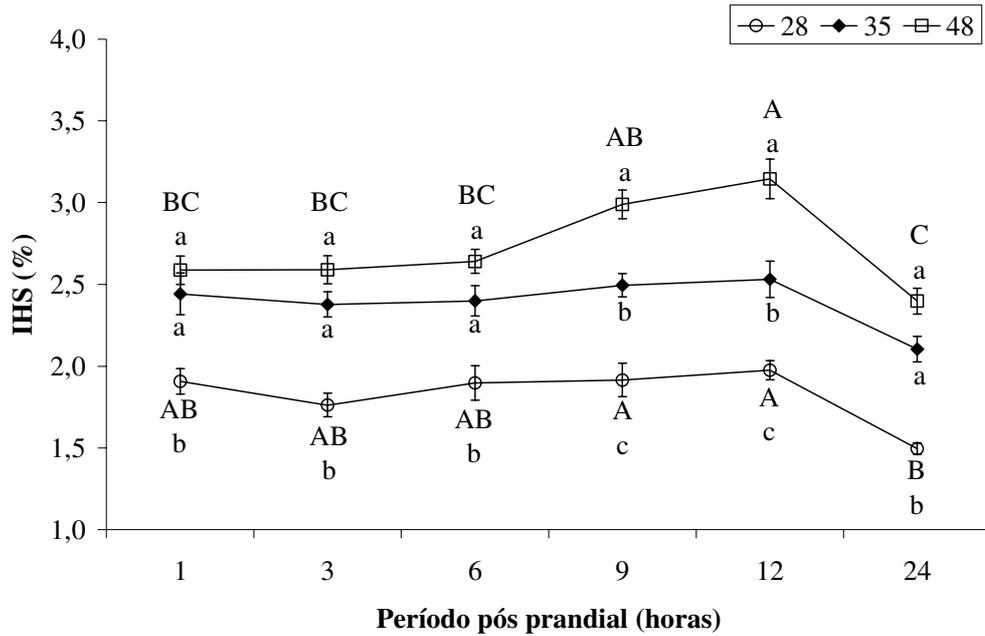


Figura 9. Índice hepato-somático de pacu alimentado por 60 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas em cada tratamento nos diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

O índice estomaco-somático cheio (IESc) dos 3 grupos de peixes diminuiu gradativamente ao longo do período pós-prandial. Diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada entre tratamentos apenas às 9 horas após alimentação quando os peixes que receberam o nível mais elevado de carboidrato tinham maior índice (4,6%) comparado com os que receberam menor quantidade de carboidrato (3,2%) (Figura 10).

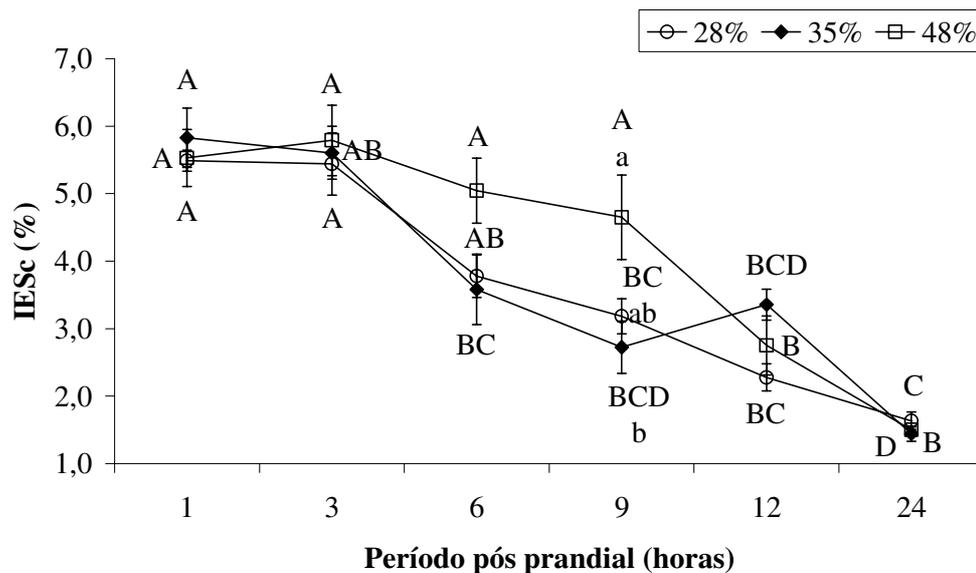


Figura 10. Índice estomaco-somático de pacu alimentado por 60 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas em cada tratamento nos diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

O índice intestino-somático cheio (IISc) apresentou o mesmo perfil para os 3 grupos, não sendo observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre tratamentos nos tempos de amostragem, embora os valores registrados nos peixes alimentados com 48% de carboidrato fossem numericamente mais baixos até 12 horas após a alimentação. Observou-se aumento gradual deste índice em todos os grupos até 12 horas e redução às 24 horas (Figura 11).

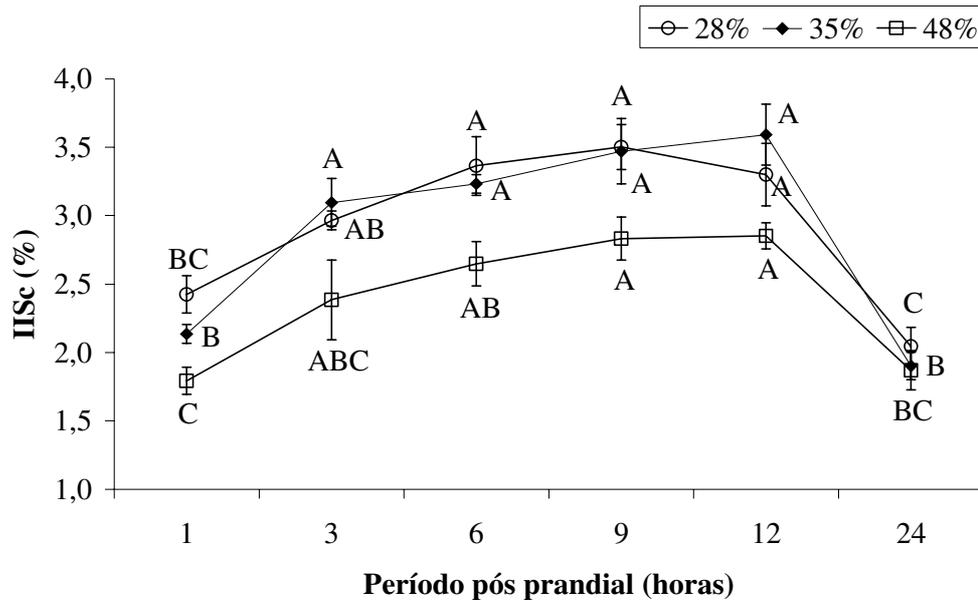


Figura 11. Índice intestino-somático de pacu alimentado por 60 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta em cada tratamento. Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Alimentação aguda

Parâmetros sanguíneos

As concentrações de glicose plasmática foram afetadas ($p < 0,05$) pelas dietas apenas 3 horas após alimentação, sendo os valores mais elevados os dos tratamentos de alta inclusão de carboidrato na dieta ($163,87 \text{ mg dL}^{-1}$) e de nível intermediário ($123,54 \text{ mg dL}^{-1}$), respectivamente. Os peixes alimentados com baixo teor de carboidrato na dieta não apresentaram diferenças significativas durante o período de amostragem. Nos outros grupos (35% e 48%), houve redução significativa já a partir das 6 horas após alimentação (Figura 12).

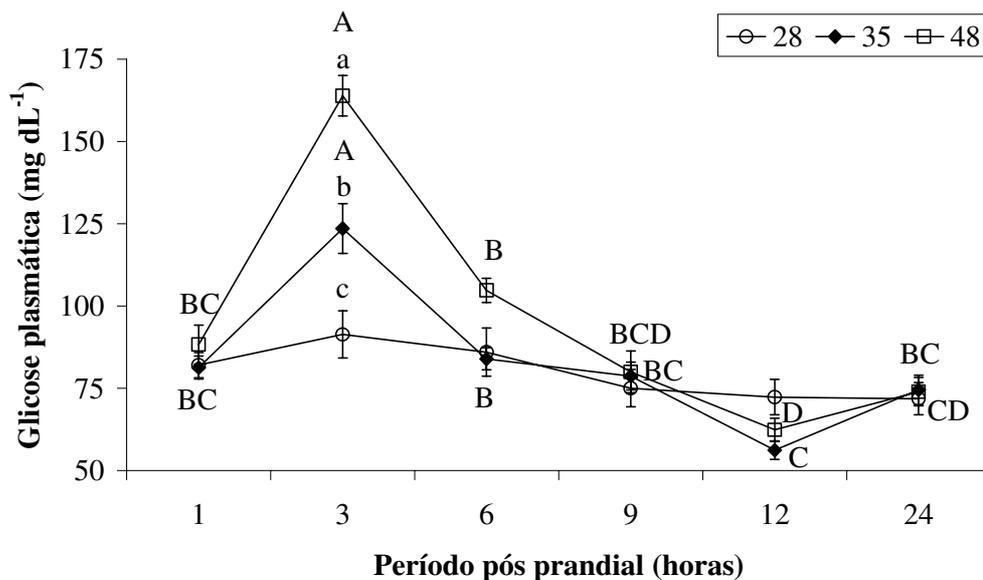


Figura 12. Glicose plasmática de pacu alimentado por 3 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas em cada tratamento nos diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Não foram detectadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nas concentrações de ácidos graxos por efeito das dietas. Uma elevação deste metabólito ocorreu 12 horas após a alimentação ($1,76 \text{ mEq L}^{-1}$), independente da dieta oferecida aos peixes (Figura 13).

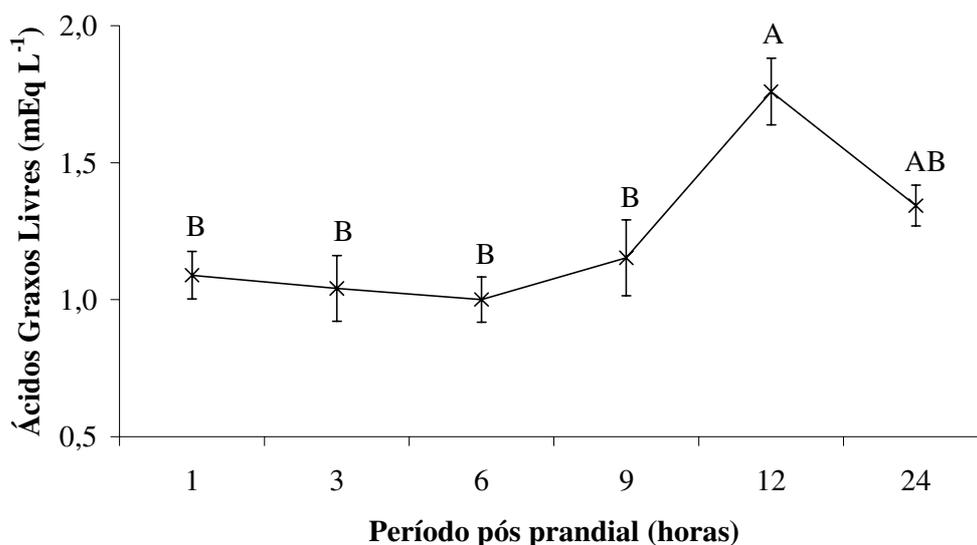


Figura 13. Ácidos graxos livres no plasma de pacu alimentado por 3 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

As concentrações séricas de triglicerídeos não diferiram entre peixes dos diferentes tratamentos ($p>0,05$). Durante o período pós-prandial, houve aumento gradual até 12 horas ($643,6 \text{ mg dL}^{-1}$) após a alimentação e redução às 24 horas ($239,3 \text{ mg dL}^{-1}$) (Figura 14).

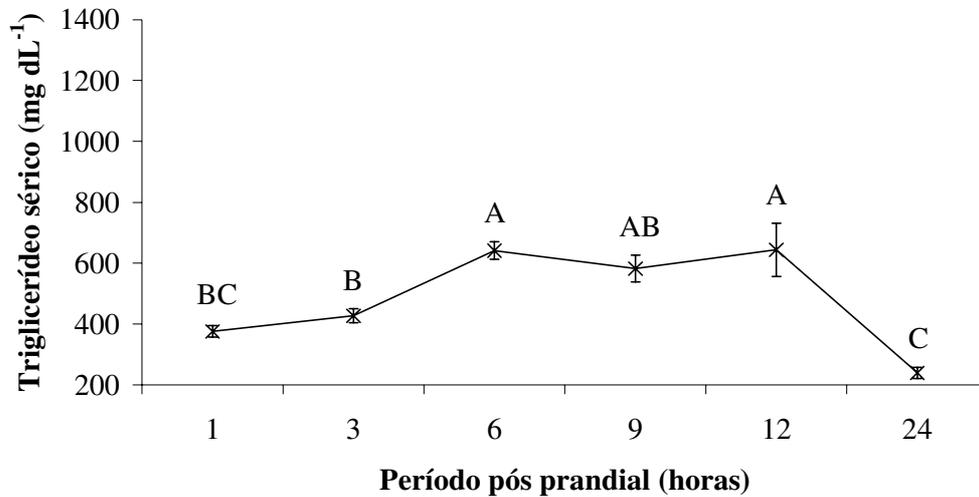


Figura 14. Triglicerídeos sérico de pacu alimentado por 3 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

As concentrações de colesterol sérico não se alteraram significativamente durante o período pós-prandial ($p>0,05$). Entretanto, os peixes alimentados com a dieta com 35% de carboidrato apresentaram maiores valores de colesterol comparado aos grupos alimentados com as outras dietas (Figura 15).

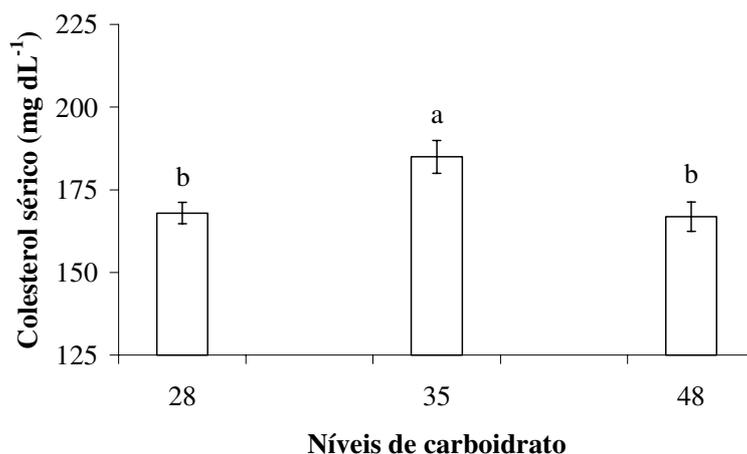


Figura 15. Colesterol sérico de pacu alimentado com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta por 3 dias. Cada barra representa a média dos tempos de amostragem, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre tratamentos. Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Em relação à concentração de proteína total sérica, não houve efeito das dietas ou do período pós-prandial ($p>0,05$), estando os valores encontrados entre 3,5 e 3,7 g dL⁻¹.

Parâmetros teciduais

As concentrações de glicogênio hepático não diferiram entre os peixes alimentados com as diferentes dietas durante o período pós-prandial. Os valores encontrados oscilaram de 13,5 a 15,7%.

Em relação ao lipídio hepático não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) ao longo do período pós-prandial. Entretanto, no grupo alimentado com 48% de carboidrato ocorreu elevação dos valores às 6 e 9 horas após alimentação, mas com diferença estatística somente às 9 horas (3,9% de lipídio hepático), comparado aos grupos alimentados com 35% e 48% de carboidrato (2,5% e 2,7% de lipídio hepático respectivamente as dietas de 35 e 48%) (Figura 16).

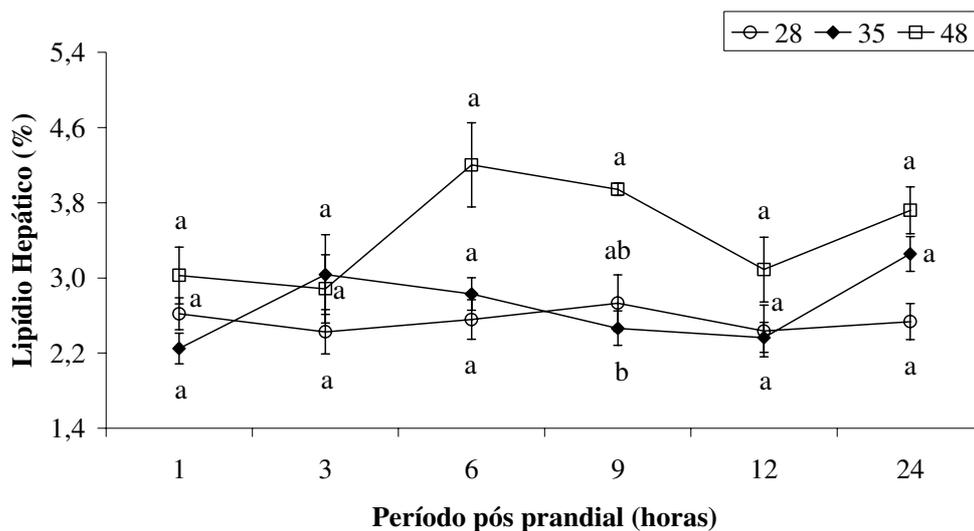


Figura 16. Lipídio hepático de pacu alimentado por 3 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos no mesmo tempo de coleta ($p<0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

As concentrações de lipídio muscular não diferiram entre os tratamentos ($p>0,05$). Entretanto, houve um aumento gradativo de 3 horas a 12 horas (de 0,6 a 0,9%) após a alimentação, e diminuição às 24 horas em todos os grupos (Figura 17).

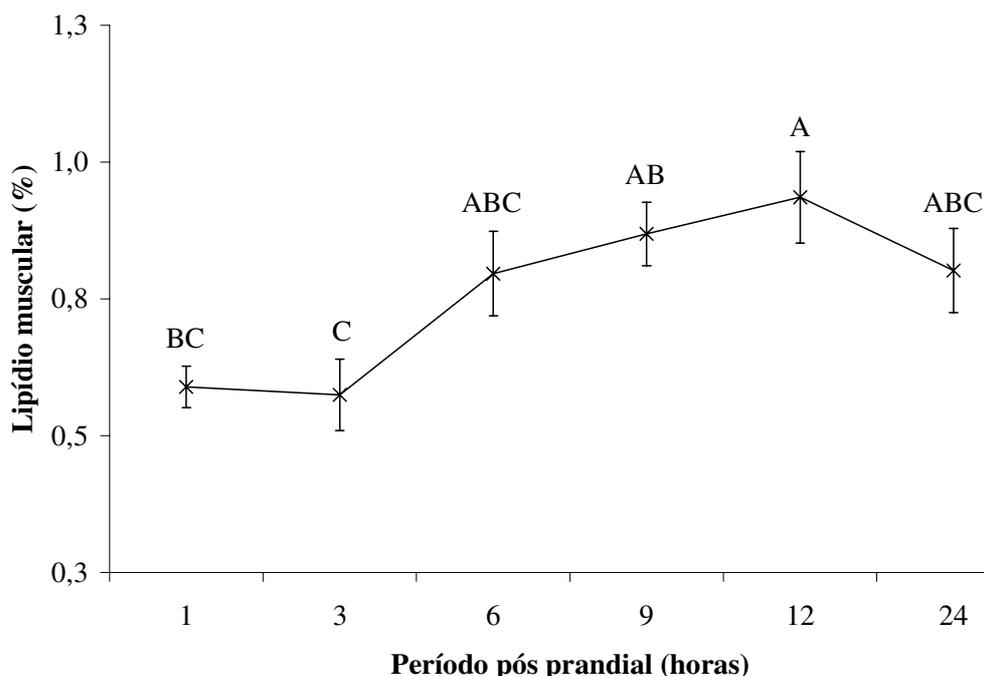


Figura 17. Lipídio muscular de pacu alimentado por 3 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Índices biométricos

Os valores médios do índice hepato-somático (IHS) foram maiores para os peixes das dietas com nível maior de carboidrato (Figura 18).

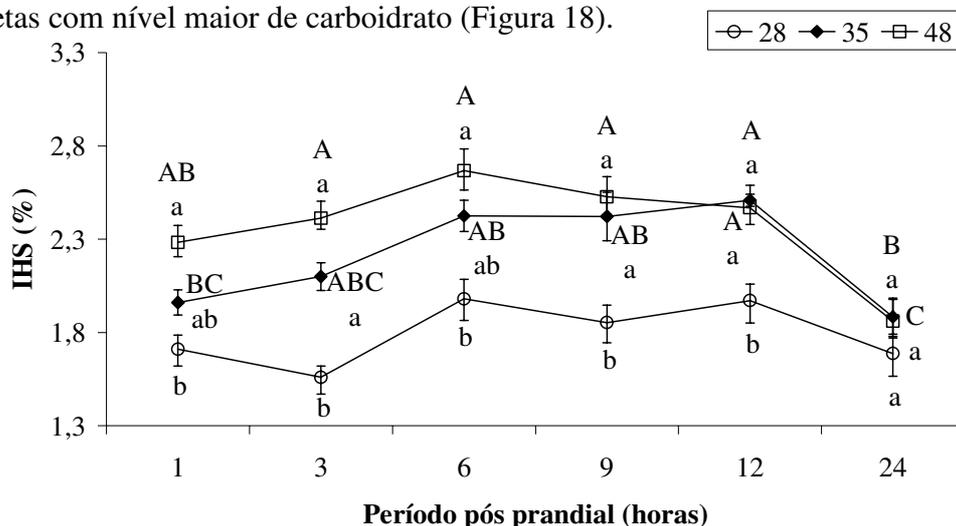


Figura 18. Índice hepato-somático de pacu alimentado por 3 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas em cada tratamento nos diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Os valores médios do índice estomaco-somático cheio (IESc) dos 3 grupos diminuíram, nas 24 horas do período pós-prandial, de 4,5 para 1,4%. Não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos em um mesmo tempo de amostragem ($p>0,05$) (Figura 19).

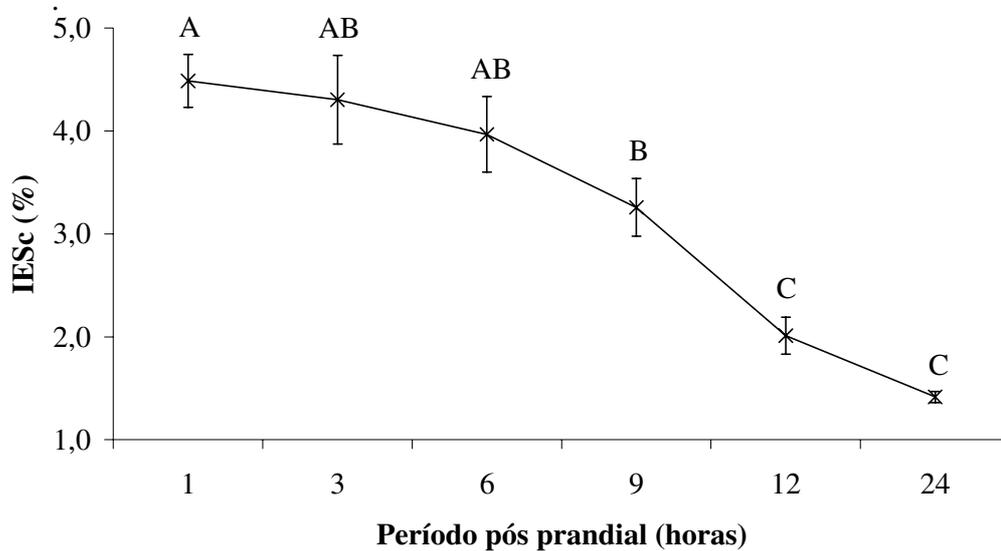


Figura 19. Índice estomaco-somático de pacu alimentado por 3 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

O índice intestino-somático cheio (IIES) apresentou o mesmo perfil nos 3 grupos, não se registrando diferença significativa entre tratamentos em um mesmo tempo de amostragem ($p>0,05$). De uma a 6 horas após a alimentação ocorreu aumento gradual deste índice para todos os grupos e a partir deste período redução até às 24 horas (Figura 20)

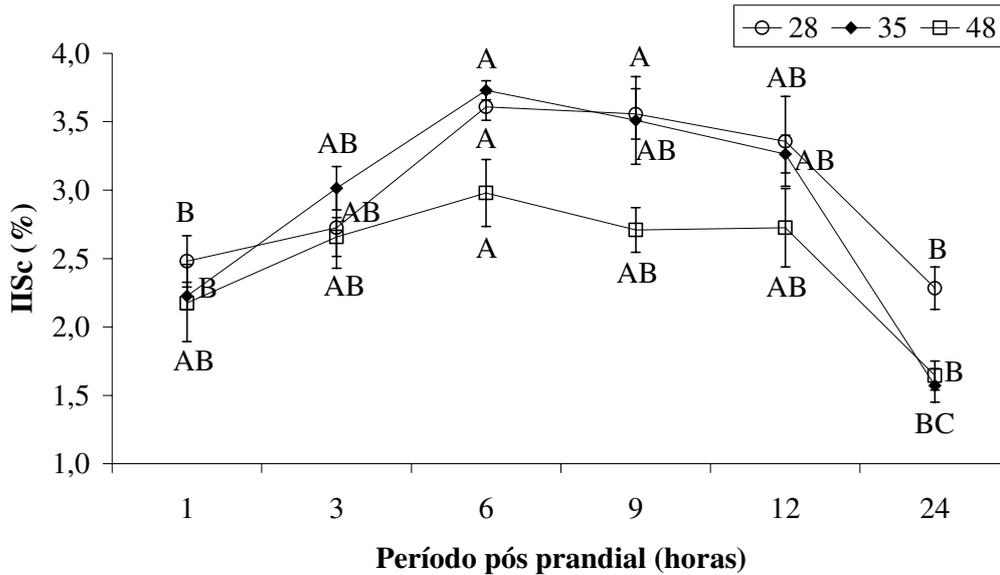


Figura 20. Índice intestino-somático de pacu alimentado por 3 dias com 28, 35 e 48% de carboidrato na dieta em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras maiúsculas indicam diferença significativa em cada tratamento nos diferentes tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

DISCUSSÃO

A dinâmica dos metabólitos analisados frente à manipulação das condições de alimentação do pacu, com dietas contendo níveis variáveis de carboidratos, sugere que a espécie tem alta tolerância à ingestão de carboidratos.

O ritmo de absorção dos carboidratos dietários foi semelhante em ambas as condições testadas, ou seja, tanto na alimentação crônica (60 dias de alimentação) quanto na alimentação aguda (3 dias de alimentação), sendo que a maior quantidade de glicose no sangue foi registrada 3 horas após a alimentação, especialmente na dieta com 48% de carboidrato, e a recuperação dos valores iniciais se deu 6 horas depois, exceto nos peixes que receberam cronicamente 48% de carboidrato. Nestes, as concentrações de glicose no sangue se mantiveram mais altas até o final do período pós-prandial, indicando utilização mais lenta do nutriente. Comparando a dinâmica da glicemia nas duas condições de alimentação, a partir de 6 horas, pode-se observar, independente dos níveis de carboidratos, uma utilização mais rápida da glicose ingerida nos peixes alimentados por 3 dias com as dietas experimentais. A alimentação crônica parece ter modificado o ritmo de utilização da glicose pelos tecidos, embora, exceto pelas concentrações registradas nos peixes que receberam cronicamente 48% de carboidrato, todas as outras estão dentro de faixa de valores considerados fisiológicos para o pacu (Souza et al., 2000; Takahashi et al., 2006; Abimorad et al., 2007).

Em revisão sobre a intolerância dos peixes a carboidratos, Moon (2001) relata diferentes respostas de tolerância a glicose, sendo que a permanência da hiperglicemia é dependente da espécie e de protocolo experimental. De modo geral, a tolerância é investigada por meio de testes de tolerância a glicose após administração do carboidrato. Essa administração pode diferir quanto a via (intraperitoneal, oral, muscular, venosa) e quanto a quantidade da glicose. Além disso, a intolerância e incapacidade de utilização da glicose circulante aumentam com a carnivoría, ou se o peixe é de água doce ou marinho e até mesmo em diferentes linhagens. Finalmente, a fonte de carboidrato também pode afetar a resposta hiperglicêmica a administração de glicose. Estudos com teste de tolerância à glicose em truta arco-íris (Bergot, 1979) e *turbot* (*Scophthalmus maximus*) (García-Riera e Hemre, 1996) têm demonstrado que é necessário um período de 24 horas para a recuperação da glicose plasmática aos níveis basais e um tempo maior ainda para a recuperação da glicose plasmática de bacalhau do Atlântico (Hemre, 1992) e salmão do Atlântico (Hemre et al., 1995). O contrário foi observado que espécies onívoras e herbívoras como carpa comum (Hertz et al., 1989), híbrido de tilápia (Lin e Shiau, 1995) e bagre do canal (Wilson e Poe, 1987) mostraram período hiperglicêmico curto (1-3, 4 e 6 horas, respectivamente), da mesma forma que o observado no pacu. Testes de tolerância a glicose em pacu (Urbinati, E.C., dados não publicados) demonstraram que, 6 horas após injeção intraperitoneal de 500 mg de glicose/kg de peixe, as concentrações de glicose circulantes já tinham retornado aos valores anteriores a injeção, o que reforça os argumentos de que o pacu é uma espécie com alta tolerância à ingestão de carboidrato, fato também reforçado por sua dieta natural rica em itens contendo carboidratos (Silva, 1985).

O conceito de tolerância é discutível, mas Hilton et al. (1987) distinguiram um nível de carboidratos ótimo de um tolerável em dietas de peixes, definindo tolerável como aquele que não prejudica o crescimento ou leva a mortalidade, enquanto que um nível ótimo é o que resulta na utilização completa da glicose como substrato oxidativo na produção de energia e composto poupador de proteína. Se o carboidrato é dado em excesso, pode se tornar uma sobrecarga metabólica.

De acordo com revisão de Hemre et al. (2002), embora a glicose seja a molécula central do metabolismo da maioria dos vertebrados, especialmente mamíferos, nos peixes ela parece ter um papel subordinado ao papel dos lipídios e proteínas, mesmo tendo importância primária como substrato oxidativo para algumas células e tecidos de peixes. Da glicose ingerida, parte é oxidada para fornecimento de energia, parte transformada em glicogênio hepático e muscular, e parte é utilizada para produção de lipídio no fígado. Segundo Brauge et

al. (1994), quando o carboidrato absorvido não é utilizado para energia, este pode ser depositado no fígado, tanto em forma de glicogênio como na forma de lipídio. Com base no peso, o principal local de depósito do glicogênio é o fígado do peixe e baixas concentrações são encontradas em outros órgãos como cérebro e músculo esquelético (Soengas et al., 1996). Se a quantidade de músculo do corpo do peixe for levada em consideração, a quantidade de glicogênio depositada no músculo é muito maior que a do fígado mas essa reserva tem papel exclusivo para uso do trabalho muscular, não sendo considerado local de reserva energético geral. O salmão do Atlântico mostrou uma correlação linear entre deposição de glicogênio e amido da dieta até 30% da matéria seca, embora as quantidades estocadas não fossem suficientes para prejudicar a função hepática ou o tamanho do órgão (Hemre et al., 1995).

No pacu, as concentrações de glicogênio hepático não tiveram alterações com relação aos níveis de carboidrato dietário. Somente nos peixes da alimentação crônica, verificou-se um aumento gradual na deposição do glicogênio a partir de 6 horas após a alimentação, indicando canalização da glicose circulante como reserva hepática, sem indicativo de excesso em decorrência dos níveis de carboidratos ingeridos.

As vias lipogênicas estão mais ativas no período absorptivo do peixe, quando a ingestão de energia pela dieta excede o gasto energético do organismo. Os ácidos graxos podem originar de dieta lipídica ou serem sintetizados a partir da dieta de carboidratos (Brauge et al., 1994). Segundo Ribeiro et al. (2007), a síntese de ácidos graxos é favorecida pela disponibilidade de substratos, como derivados do metabolismo da glicose, e com isso a síntese dos triglicerídios, a forma usual de gordura armazenada, é também favorecida. O triglicerídio formado é envolto, no fígado, em partículas de lipoproteínas de densidade muito baixa, que seguem até os tecidos extra-hepáticos, como os tecidos adiposo e muscular.

No presente estudo, as concentrações de ácidos graxos livres plasmáticos e triglicerídeos séricos não sofreram influência dos níveis de carboidrato dietário, reforçando a indicação de que o pacu foi capaz de usar eficientemente até a quantidade mais alta de carboidrato ingerido.

Se por um lado as concentrações de ácidos graxos livres se elevam em condições de restrição alimentar (Souza et al., 2000), os níveis de colesterol não são afetados por essa condição nutricional (Bilinski e Gardner, 1968, citados por Christiansen e Klungsoyr, 1988). A concentração de colesterol sérico neste estudo, não foi influenciada pelas dietas quando os peixes foram alimentados por 60 dias com as dietas experimentais, mas foram mais altos no experimento agudo, quando os peixes receberam a dieta de nível intermediário de carboidrato.

Segundo Lewander et al. (1974) e Larson e Fänge (1977), os níveis de ácidos graxos e colesterol sérico nos peixes são elevados se comparados aos mamíferos.

Alguns autores têm observado aumento do lipídio corporal com o aumento de carboidratos digestíveis na dieta (Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Lanari et al., 1999). No caso do pacu, a quantidade de lipídio muscular dos peixes que receberam alimentação aguda e crônica não foi influenciada pelos níveis de carboidratos dietários, embora tenha sido observada tendência na deposição de lipídio nos músculos dos peixes alimentados por 60 dias com as dietas de nível intermediário e alto de carboidrato (1,25; 1,58 e 1,59% nas dietas de baixo, intermediário e alto carboidrato, respectivamente).

Em salmonídeos e mamíferos, o principal órgão para estocagem de lipídio é o tecido adiposo, mas outros peixes usam o fígado e músculos como órgão de depósito (Tashima e Cahill, 1965, citados por Christiansen e Klugsoyr, 1988). A importância relativa destes sítios de reserva varia entre as espécies. Em espécies marinhas, em geral, o fígado funciona como um órgão de armazenamento de gordura em peixes lentos e que vivem no fundo, como o bacalhau, enquanto que os peixes rápidos, como os pelágicos, por exemplo a cavala, armazenam gordura nos músculos (Christiansen e Klugsoyr, 1988).

No presente estudo, a relação direta da atividade lipogênica com o aumento de carboidratos na dieta pode ser melhor evidenciada por maior deposição de lipídio no fígado que ocorreu nos peixes alimentados cronicamente com 35 e 48% de carboidrato, a partir de 12 horas após a alimentação. Alta atividade lipogênica no fígado foi observada em outros estudos com espécies de água doce, como a tilápia (Shiau e Chen, 1993; Shiau e Lin, 1993; Shiau e Peng, 1993, Shiau e Liang, 1995) e o bagre do canal (Robinson e Li, 1995), que utilizaram amido gelatinizado, como fonte de carboidrato na dieta. Em espécies marinhas, o mesmo foi observado em esturjão (Hung et al., 1989; Deng et al., 2000) e salmão do Atlântico (Arnesen et al., 1995).

O aumento do índice hepato-somático (IHS), observado nos dois experimentos (alimentação aguda e crônica), foi coerente somente com o perfil de deposição de lipídio hepático, já que nenhuma alteração ocorreu na quantidade de glicogênio.

As concentrações de proteína total sérica não sofreram influência dos níveis de carboidrato dietário.

Por meio dos índices estômago e intestino-somático pode-se observar a passagem do alimento pelo trato gastro-intestinal. O esvaziamento do estômago se deu gradativamente, ao longo do período pós-prandial, num perfil semelhante entre peixes da alimentação crônica e aguda, exceto por maior volume na dieta de 48%, 9 horas após a alimentação. O mesmo perfil

de esvaziamento gástrico foi observado por Venou et al. (2003), utilizando dieta com trigo extrusado. Os níveis de digesta no estômago foram maiores em relação a utilização de trigo cru, milho cru ou milho extrusado. Ao mesmo tempo em que se dava o esvaziamento gástrico, observou-se que o conteúdo intestinal aumentou até 12 horas após alimentação nos peixes cronicamente adaptados às dietas e apenas 6 horas nos peixes da alimentação aguda, sendo as maiores quantidades de alimento encontradas nos peixes alimentados com 28 e 35 % de carboidratos. As diferenças são apenas numéricas, mas mostram que podem ser correlacionadas com o trânsito simultâneo do alimento pelo estômago dos peixes alimentados cronicamente com dietas experimentais. Segundo Seaborn e Stoecker (1989), o amido pode tornar mais lenta a digestão e a passagem do alimento pelo intestino que carboidratos mais simples.

Há basicamente 2 possíveis explicações para a capacidade reduzida de utilização da glicose da dieta pelos peixes (Moon, 2001; Hemre et al., 2002). Uma seria a quantidade de insulina circulante e outra envolveria os mecanismos de utilização periférica da glicose, relacionada a presença de receptores de insulina, transportadores de glicose e enzimas envolvidas na metabolização da glicose. Uma possível causa de baixa utilização da glicose da dieta pelos peixes seria uma disfunção da regulação nutricional entre duas grandes vias metabólicas no fígado: a baixa capacidade para armazenar excesso de glicose na fase pós-prandial (síntese de glicogênio ou lipogênese) (Cowey e Walton, 1989; Wilson, 1994) e/ou a alta atividade persistente de produção de glicose hepática quando carboidratos são fornecidos na dieta (Panserat et al., 2000; Panserat et al., 2001).

No presente estudo, as respostas do metabolismo do pacu durante o período pós-prandial demonstraram que mesmo aumentando a quantidade de carboidrato na dieta de 28 para 48 %, a espécie não apresenta sinais de resistência ao uso deste nutriente e que ela é um modelo adequado para estudo do controle da homeostase glicêmica e dos mecanismos periféricos de utilização da glicose na fase pós-prandial.

REFERÊNCIAS

A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 1984. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 14 ed. Arlington. 937p.

ABIMORAD, E.G., CARNEIRO, D.J., URBINATI, E.C. 2007. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles fed diets containing different protein, lipid, and carbohydrate levels. *Aquac. Res.* 38, 36-44.

ARNESEN, P. KROGDAHL, A., SUNDBY, A. 1995. Nutrient digestibilities, weight gain and plasma and liver levels of carbohydrate in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) fed diets containing oats and maize. *Aquac. Nutr.* 1, 151-158.

BERGOT, F. 1979. Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp. Biochem. Physiol.* 64, 543-547.

BILINSKI, E., GARDNER, L.J. 1968. Effect of starvation on free fatty acid level in blood plasma and muscular tissues of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Canada* 25, 1555-1560.

BLIGH, E.G., DYER, W.J., 1959. Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.

BRAUGE, C., MÉDALE, F., CORRAZE, G. 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* 123, 109-120.

CHRISTIANSEN, D.C., KLUNGSOYR, L. 1988. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B, 710-711.

COWEY, C., DE LA HIGUERA, M., ADRON, J.W. 1977b. The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 38, 385-395.

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

DENG, D.F., REFSTIE, S., HEMRE, G.I., CROCKER, C.E., CHEN, H., CECH, JR., J.J. HUNG, S.S.O. 2000. A new technique of feeding, repeated sampling of blood and continuous collection of urine in white sturgeon. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 191-197.

FIGUEIREDO-GARUTTI, M. L. Carboidrato como fonte de energia, o efeito do cromo trivalente na dieta e ação da insulina em juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 1996, 65p.

FRAGNITO, P.S. Efeito de diferentes níveis de carboidratos e energia bruta sobre o desempenho de produção de alevinos de tambacu, *Colossoma macropomum*, e machos de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Trabalho de Graduação em Zootecnia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1991, 67p.

GARCIA-RIERA, M.P., HEMRE, G.I. 1996. Glucose tolerance in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquac. Nutr.* 2 (2), 117–120.

HEMRE, G.I. 1992. Studies on carbohydrate nutrition in cod (*Gadus morhua*). Dr. scientiarum thesis. Institute of Nutrition, University of Bergen, Norway.

HEMRE, G.I., MOMMSEN, T.P., KROGDAHL, Å. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac. Nutr.* 8 (3) 175-194.

HEMRE, G.I., SANDNES, K., LIE, Ø., WAAGBØ, R. 1995. Blood chemistry and organ nutrient composition in *Atlantic salmon, Salmo salar* L., fed graded amounts of wheat starch. *Aquac. Nutr.* 1, 37–42.

HENDRIX, D.L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. *Crop Sci.* 25, 1306-1311, 1993.

HERTZ, Y., EPSTEIN, N., ABRAHAM, M., MADAR, Z., HEPHER, B., GERTLER, A. 1989. Effects of metformin on plasma insulin, glucose metabolism, and protein synthesis in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 76, 255-267.

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

HILTON, J.W., PLISETSKAYA, E.M., LEATHERLAND, J.F. 1987. Does oral 3,5,3'-triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Fish Physiol. Biochem. 4, 113-120.

HUNG, S.S.O., FYNN-AIKINS, F.K., LUTES, P.B., XU, R.P., 1989. Ability of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different carbohydrate sources. J. Nutr. 119, 727-733.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Norme Internationale: riz détermination de la teneur en amylose. Suisse, 1987. 5 p. (ISO 6647).

KARKALAS, J.J. 1985. An improved enzymatic method for the determination of native and modified starch. J. Sci. Food Agric. 36, 1016.

KAUSHIK, S.J., OLIVA-TELES, 1985. A. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. Aquaculture 50, 89-101

LANARI, D., POLI, B.M., BALLESTRAZZI, R., LUPI, P., D'AGARO, E., MECATTI, M. 1999. The effects of dietary fat and NFE levels on growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Growth rate, body and fillet composition, carcass traits and nutrient retention efficiency. Aquaculture 179, 351-364.

LARSON, A., FÄNGE, R. 1977. Cholesterol and free fatty acids (FFA) in the blood of marine fish. Comp. Biochem. Physiol. 57B, 191-196.

LEWANDER, K., DAVE, G., SJOBECK, M.J.L., LARSON, A., LIDMAN, U. 1974. Metabolic and hematological studies on the yellow and silver phases of the European eel, *Anguilla anguilla* L. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. Comp. Biochem. Physiol. 47B, 571-581.

LIN, J.S., SHIAU, S.Y. 1995. Hepatic enzyme adaptation to different dietary carbohydrates in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*, Fish. Physiol. Biochem. 14, 165-170.

MENTON, D.J. Research considerations into the nutrition of *Colossoma* and *Piaractus* in relation to culture conditions. In: Hernandez R, Editor. Cultivo de *Colossoma*, Guadalupe, Colombia, 1989: 75-84.

MOON, T.W., FOSTER, G.D., PLISETSKAYA E.M., 1989. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food 6 weeks. *Can. J. Zool.* 67, 2189-2193.

MOON, T.W. 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. B* 129, 243-249.

PANSERAT, S., MÉDALE, F., BRÈQUE, J., PLAGNES-JUAN, E., KAUSHIK S. 2000. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr. Biochem.* 11, 22-29.

PANSERAT, S., PLAGNES-JUAN, E., KAUSHIK, S., 2001. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204, 2351–2360.

RIBEIRO, P.A.P., BRESSAN, M.C., LOGATO, P.V.R., GONÇALVES, A.C.S. 2007. Nutrição Lipídica para peixes. *Revista Eletrônica Nutritime* 4 (2), 426-445.

ROBINSON, E.H., LI, H.M. 1995. Catfish nutrition. Part. I. Nutrients and feeds. *Aquaculture Magazine*, may/jun, 44-53.

SEABORN, C.D., STOECKER, B.J. 1989. Effects of starch, sucrose, fructose and glucose on chromium absorption and tissue concentrations in obese and lean mice. *J. Nutr.* 119, 1444-1451.

SHIAU, S. Y., PENG, C.Y. 1993. Protein-sparing effect by carbohydrates in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture*. 117 (3-4), 327- 334.

SHIAU, S., LIN, S. 1993. Effect of supplemental dietary chromium and vanadium on the utilization of different carbohydrates in tilapia, *O. niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture* 110, 321-330.

SHIAU, S.Y., CHEN, M.J. 1993. Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) as influenced by different chromium sources. *J. Nutr.* 123, 1747-1753.

SHIAU, S.Y., LIANG, H.S.1995. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. *J. Nutr.* 125, 976-982.

SILVA, A. J. Aspectos de alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (Berg, 1985) (Pisces, Characidae), no Pantanal de Mato Grosso. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1985. 92p.

SOENGAS, J.L., STRONG, E.F., FUENTES, J., VEIRA, J.A.R., ADNÉRÉS, M.D. 1996. Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 491–511.

SOUZA, V.L., OLIVEIRA, E.G., URBINATI, E.C. 2000. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *J. Aqua. Trop.* 15, 371-379.

SUAREZ, R.K.; MOMMSEN, T.P. 1987. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Can. J. Zool.* 65, 1869-1882.

TAKAHASHI, L.S., BALDAN, A.P., URBINATI, E.C. 2006. Growth performance and energetic metabolism of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed diets supplemented with ammonium metavanadate. *Aquac. Res.* 37, 1372-1377.

TASHIMA, L., CAHILL, G.F. 1965. Fat metabolism in fish. In *Handbook of Physiology*, Sec 5: Adipose Tissue, ed. Reynolds, A.E., Cahill, G.F. Am. Physiol. Soc. p. 55.

URBINATI, E.C., GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora UFSM, 2005, v. Único, p. 225-246.

VENOU, B., ALEXIS, M.N., FOUNTOULAKI, E., NENGAS, I., APOSTOLOPOULOU, M., CASTRITSI-CATHARIOU, I. 2003. 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* 225, 207–223.

WILSON, R.P., POE, W.E. 1987. Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono- and disaccharides as energy sources. *J. Nutr.* 117, 280-285.

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

CAPÍTULO 4

Respostas metabólicas pós-prandiais de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, ao jejum e realimentação após adaptação a dietas com diferentes níveis de carboidratos

RESUMO

Este estudo teve como objetivo verificar as respostas metabólicas pós-prandiais (24 horas) do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), submetidos ao jejum e realimentação previamente adaptados por 60 dias ou não a dietas com diferentes níveis de carboidrato. Foram avaliadas em dois experimentos: (1) jejum e realimentação com três dietas isoprotéicas e isoenergéticas, contendo diferentes níveis de carboidrato (CHO): baixo (28%), alto (48%) e controle/intermediário (35%), após 60 dias de alimentação com as dietas experimentais; (2) jejum e realimentação com as mesmas dietas, depois de 15 dias de alimentação com a dieta controle. *Experimento 1* - os peixes (peso inicial de $31,4 \pm 2,14$ g) foram alimentados com as dietas experimentais por 60 dias e submetidos a 7 dias de jejum e realimentados por 3 dias com as dietas experimentais (peso final de $143,55 \pm 24,92$ g). *Experimento 2* - os peixes (peso inicial de $63,5 \pm 5,3$ g) foram alimentados com a dieta controle por 15 dias e então submetidos a 7 dias de jejum e realimentados por 3 dias com as dietas experimentais. Depois da realimentação os peixes foram amostrados 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após a oferta da 1^o alimentação do dia em ambos os experimentos. Após anestesia, o sangue dos peixes foi retirado para análise de glicemia, ácidos graxos livres, triglicerídios, colesterol e proteína total. Nos tecidos foram determinados: concentração de glicogênio e lipídio total no fígado e lipídio total no músculo. Fígado, estômago e intestino foram pesados para cálculo dos índices hepato-somático, estomaco-somático cheio, intestino-somático cheio. O pacu, espécie herbívora com preferência frugívora, mostrou possuir mecanismos bioquímicos bem adaptados para manter a homeostase metabólica depois da restrição alimentar e realimentação com carboidrato, especialmente quando foram previamente adaptados com altos níveis do nutriente. A dieta pré-jejum influenciou na resposta metabólica dos peixes. A glicemia foi similar em ambos os grupos de peixes, porém o pico da concentração sanguínea foi menor nos peixes adaptados, bem como sua remoção, indicando melhor utilização de glicose pelos peixes. Os peixes submetidos ao jejum previamente adaptados às dietas experimentais com carboidrato mostraram o mesmo perfil metabólico com relação às concentrações de ácidos graxos livres no plasma, lipídio hepático, lipídio muscular, glicogênio hepático e proteína total sérica independente dos níveis de carboidrato fornecido na dieta. As concentrações de ácidos graxos livres no sangue foram menores nos peixes adaptados reforçando a homeostase metabólica dos peixes não mobilizaram gordura para demanda energética. Apesar dos perfis do trânsito alimentar mostrarem que os peixes adaptados tinham alimento disponível no estômago como os peixes não adaptados, eles não absorveram a mesma taxa de glicose que os outros peixes.

Palavras-Chave: carboidrato, pacu, restrição, realimentação, metabolismo pós-prandial

ABSTRACT

The present study investigated the metabolic postprandial (24h) responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to feed restriction and refeeding previously adapted for 60 days or not to diets with varying levels of carbohydrates. Two experiments were performed: (1) feed restriction and refeeding with three isoproteic and isoenergetic diets containing varying levels of carbohydrates (CHO): low (28%), high (48%) and intermediary/control (35%) after 60-days of feeding with experimental diets; (2) feed restriction and refeeding with the same diets after 15 days feeding the control diet. Experiment 1 – Adapted fish: fish (initial weight 31.4 ± 2.14 g) were fed with the experimental diets for 60 days and then (final weight 143.5 ± 24.9 g) submitted to 7 days of feed restriction and 3 days of refeeding with the experimental diets. Experiment 2 – Fish without adaptation: fish (initial weight 63.5 ± 5.3 g) were fed with the control diet for 15 days and then submitted to 7 days of feed restriction and 3 days of refeeding with the experimental diets. After refeeding fish were sampled at 1, 3, 6, 9, 12 and 24 h after the first feeding in both experiments. After anesthesia, fish blood was drawn for glucose, free fat acids, triglycerids, cholesterol and total protein determination. Liver glycogen and total lipid and muscle lipid were determined. Liver, stomach and intestines were weighed for hepatic, full stomach-somatic and intestine-somatic indexes calculation. Pacu, an eating fruit fish, showed to present well adapted biochemical mechanisms to maintain the metabolic homeostasis after feed restriction and refeeding with carbohydrate, especially when previously adapted to high levels of the nutrient. The diet offered before the feed restriction influenced in the metabolic response of fish. Glycemia of both groups of fish were similar but the peak of the blood concentrations were lower in adapted fish as well as the blood removal, indicating better utilization of glucose by fish. Restricted fish that were or not carbohydrate adapted had the same profile of the blood free fat acids, liver glycogen and total lipid and muscle lipid and blood total protein regardless of the dietary carbohydrate. The blood free fat acids concentrations were higher in adapted fish reinforcing the metabolic homeostasis because adapted fish did not to mobilize fat to balance energy demand. In spite of the food transit profiles show that adapted fish had the food available in stomach as long as the no adapted fish they did not absorb glucose in the same rate than the other fish.

Key-words: carbohydrates, pacu, restriction, refeeding, postprandial metabolism

INTRODUÇÃO

Os peixes, em seu ambiente natural, alternam períodos de alimentação e jejum, em resposta a fatores como temperatura e reprodução, disponibilidade de alimento, por exemplo. Durante este período, o animal apresenta alterações fisiológicas para promover ajuste biológico e as conseqüências finais são altamente dependentes da espécie, idade do peixe e condições experimentais, tais como temperatura da água, fotoperíodo, dieta pré-jejum e duração do jejum (Love, 1980; Weatherley e Gill, 1987; Blasco et al., 1991).

Estudos têm sido realizados com intuito de maximizar o crescimento dos peixes. A restrição alimentar e a realimentação tem sido utilizadas como ferramenta para induzir ganho de peso compensatório e permitem redução no fornecimento de ração, principal componente do custo de produção. Segundo Souza et al. (2003), durante o período de outono/inverno, pode-se utilizar na criação do pacu, ciclo alimentar de seis semanas de restrição alternadas com sete semanas de realimentação, sem que sua capacidade de crescimento compensatório seja prejudicada. Juvenis de pacu foram submetidos a seis dias de alimentação e um de jejum, ou três dias de alimentação e um de jejum, sem que o desempenho produtivo fosse inferior ao do grupo continuamente alimentado, gerando economia de até 25% de ração (Oda et al., 2006).

Várias hipóteses tentam explicar o aumento da taxa de crescimento que ocorre após período de restrição alimentar. Uma delas é o aumento no consumo alimentar após o jejum (Hayward et al., 1997) e outra seria a resposta hormonal durante e após o período de restrição alimentar (Gaylord et al., 2001).

Hsieh e Shiau (2000) testaram diferentes fontes de carboidrato (glicose e amido) com inclusão de 40 % na dieta de tilápias. Os peixes foram alimentados por oito semanas, seguido de jejum por 1, 2 e 3 semanas. Segundo os autores, as respostas fisiológicas da tilápia durante o jejum foram afetados pelas dietas pré-jejum, relacionado aos diferentes carboidratos oferecidos.

Os carboidratos representam uma fonte energética de baixo custo, porém muitos peixes não toleram altos níveis e a inclusão máxima na dieta vai depender da espécie. Considerando o hábito alimentar do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), espécie herbívora com preferência frugívora, o objetivo deste estudo foi verificar as respostas metabólicas do peixes alimentados com níveis variáveis de carboidrato na dieta, utilizando a estratégia de restrição alimentar como ferramenta para o estudo das alterações bioquímicas e metabólicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Dietas experimentais

Três dietas isoprotéicas e isoenergéticas com suplementação mineral e vitamínica foram formuladas para conter baixo nível de carboidrato (28%), alto nível de carboidrato (48%) e um nível intermediário (35%) que constituiu a dieta controle. Os ingredientes e a composição proximal das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Fórmula e composição proximal das dietas experimentais.

<i>Ingredientes</i>	<i>Dietas (níveis de carboidrato)</i>		
	<i>Baixo</i>	<i>Controle</i>	<i>alto</i>
Farinha de peixe	27,00	27,00	28,50
Farelo de soja	8,75	14,75	16,50
Amido milho pré gelatinizado ¹	5,00	26,00	45,00
Farelo de trigo	14,75	7,50	1,75
Farelo de arroz	19,50	8,25	1,25
Óleo de soja	5,50	3,75	1,00
Óleo de peixe	1,00	1,00	1,00
Minerais e vitaminas ²	0,75	0,75	0,75
Casca de arroz	9,00	6,00	3,75
Caulin	8,75	5,00	0,50
Total	100,00	100,00	100,00
<i>Composição analisada (%)</i>			
Matéria seca	93,8	93,8	94,1
Proteína bruta	26,0	26,6	26,4
Proteína digestível	23,0	24,3	24,6
Extrato etéreo	13,4	11,6	6,8
Fibra bruta	9,3	7,0	3,7
Matéria mineral	17,0	13,3	9,2
Carboidratos ³	28,18	35,25	48,00
Amido total	16,6	22,4	38,8
Amilopectina / Amilose	97,7 / 2,30	96,37 / 3,63	91,82/ 8,18
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4.107	4.128	4.097

Farinha de peixe (PB= 63%).

¹ Corn Products Brasil®

² Premix Peixe Inicial Fri ribe®. Ac. fólico (1,5 mg); Ác. pantotênico (30 mg); colina (225 mg); cobre (15 mg); ferro (150 mg); iodo (7,5 mg); manganês (105 mg); selênio (0,225 mg); zinco (225 mg); niacina (150 mg); biotina (0,150mg); Vit. A (4500 UI); Vit. B1 (9 mg); Vit. B12 (30 mcg); Vit. B2 (12 mg); Vit. B6 (4,5 mg); Vit. C (300 mg); Vit. D3 (4500 UI); Vit. E (90 UI); Vit. K (9 mg) e antioxidante (187,50 mg).

³Carboidrato estimado= Matéria seca – Proteína bruta – Extrato etéreo – Fibra bruta – Matéria mineral.

Após o processamento, as rações foram analisadas segundo a AOAC (1984), a energia bruta por bomba calorimétrica (Parr 1281 Calorimeter), o amido pelo método de amilase

(Hendrix, 1993) e glicose-oxidase (Karkalas, 1985), e os constituintes do amido (amilose e amilopectina) segundo a ISO 6647 (International Organization for Standardization, 1987).

Para o preparo das dietas, os ingredientes foram peneirados, misturados e peletizados. As rações foram mantidas a -20°C até o fornecimento aos peixes e análise da composição.

Animais e Condições Gerais de Manutenção

Para cada experimento, 144 pacus, adquiridos na Piscicultura Águas Claras (Mococa, SP), foram distribuídos em 12 caixas de polietileno de 100 L (12 peixes por caixa), com renovação contínua de água e aeração. Durante 15 dias de adaptação às condições laboratoriais, os peixes receberam ração controle (Tabela 1), duas vezes ao dia, até a saciedade aparente.

Protocolo Alimentar e Análises

Jejum e realimentação após adaptação por 60 dias a dietas com diferentes níveis de carboidrato: Após adaptação às condições laboratoriais, recebendo a dieta controle (35% de carboidrato), os peixes ($31,4 \pm 2,14$ g) foram alimentados com as dietas experimentais [baixo carboidrato (28%), alto carboidrato (48%) e controle (35%)] (Tabela 1) por 60 dias. Após este período, os pacus foram submetidos a 7 dias de jejum e realimentados por 3 dias. Ao término dos 3 dias de realimentação, os peixes foram amostrados após a oferta da 1^a alimentação do dia (peso final de $143,55 \pm 24,92$ g).

Jejum e realimentação sem adaptação a dietas com diferentes níveis de carboidratos: Após adaptação às condições laboratoriais, recebendo a dieta controle (35% de carboidrato), os peixes ($63,5 \pm 5,3$ g) foram submetidos a 7 dias de jejum e realimentados por 3 dias com as dietas experimentais [baixo carboidrato (28%), alto carboidrato (48%) e controle (35%)]. Ao término deste período, os peixes foram amostrados após a 1^a alimentação do dia.

Cada dieta experimental foi oferecida a peixes de 4 caixas (12 peixes por caixa), duas vezes ao dia (09h:00 e 17h:00) até a saciedade aparente. Ao término do período de alimentação, os peixes foram amostrados 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após a 1^a alimentação do dia, sendo capturados 2 animais por caixa (oito animais para cada tempo de amostragem para cada dieta).

Os peixes foram anestesiados com benzocaína (50 mg L^{-1}) e o sangue retirado por punção caudal. Uma alíquota foi separada para a análise de glicemia (kit Labtest) e ácidos graxos livres (kit Wako, EUA), utilizando EDTA fluoretado para extração do plasma, e o

restante do sangue centrifugado a 3000 rpm, durante 10 min, para separação do soro que foi estocado a -20°C até determinação da concentração de triglicerídeos (Kit Labtest), colesterol (kit Labtest) e proteína total (kit Labtest). Em seguida, os animais foram pesados, sacrificados e após a abertura do abdômen, o fígado foi retirado e estocado a -20°C para determinação da concentração de glicogênio (Moon et al., 1989) e lipídio total (Bligh e Dyer, 1959). No músculo branco, a partir de fragmento retirado da região caudal, foi analisada a concentração de lipídio total. O fígado, estômago e intestino foram pesados para cálculo dos índices: hepato-somático [IHS (%) = (peso do tecido hepático/ peso corporal) x 100], estomaco-somático cheio [IESc = (peso do estômago cheio/ peso corporal) x 100], intestino-somático cheio [IISc = (peso do intestino cheio/ peso corporal) x 100].

As variáveis químicas e físicas da água apresentaram valores recomendados para a espécie (Urbinati e Gonçalves, 2005) durante todo o experimento. O oxigênio dissolvido se manteve acima de 4,9 mg L⁻¹, a temperatura da água foi mantida a 29,2 ± 0,83 °C, o pH variou de 7,5 a 8,0 e a concentração de amônia total variou de 0,032 a 0,085 mg L⁻¹. O fluxo de água foi contínuo, com troca total em aproximadamente 20 vezes ao dia. O fotoperíodo utilizado foi de 12 horas luz: 12 horas escuro.

Análise estatística

Para verificar o efeito do tratamento (dietas) no tempo de amostragem (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após a alimentação) nos parâmetros analisados, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 6 [três dietas x seis tempos de coleta com 4 repetições (caixas)]. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), no programa estatístico SAS, versão 8.

RESULTADOS

Jejum e realimentação após adaptação por 60 dias a dietas com diferentes níveis de carboidrato

Parâmetros sanguíneos

A concentração de glicose plasmática diferiu significativamente (p<0,05) entre tratamentos às 3 e 9 horas após alimentação, quando os peixes que receberam o nível mais elevado de carboidrato tinham maior concentração de glicose comparado aos que receberam menor quantidade (Figura 1).

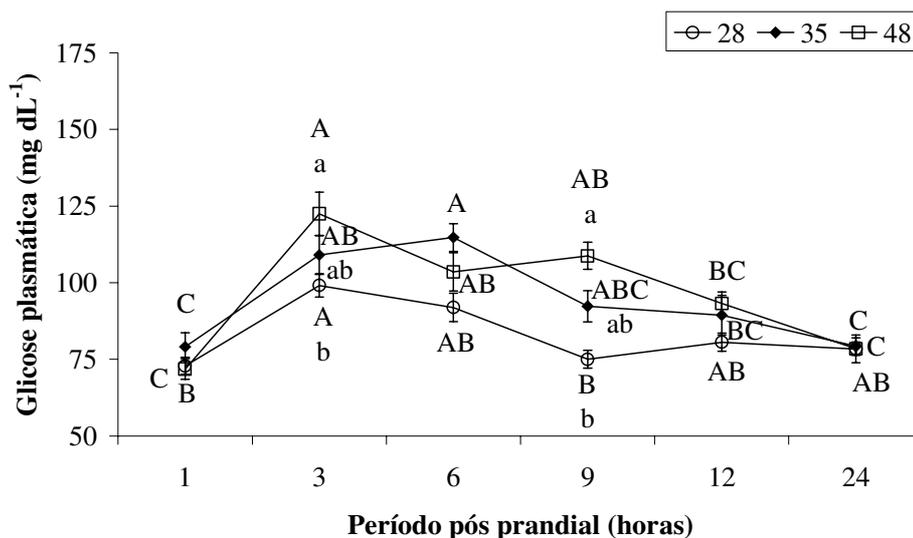


Figura 1. Glicose plasmática de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas em cada tratamento nos tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Os níveis de carboidrato na dieta não alteraram as concentrações de ácidos graxos livres ($p > 0,05$). Entretanto, houve um aumento gradual a partir das 9 horas até às 24 horas após alimentação (Figura 2).

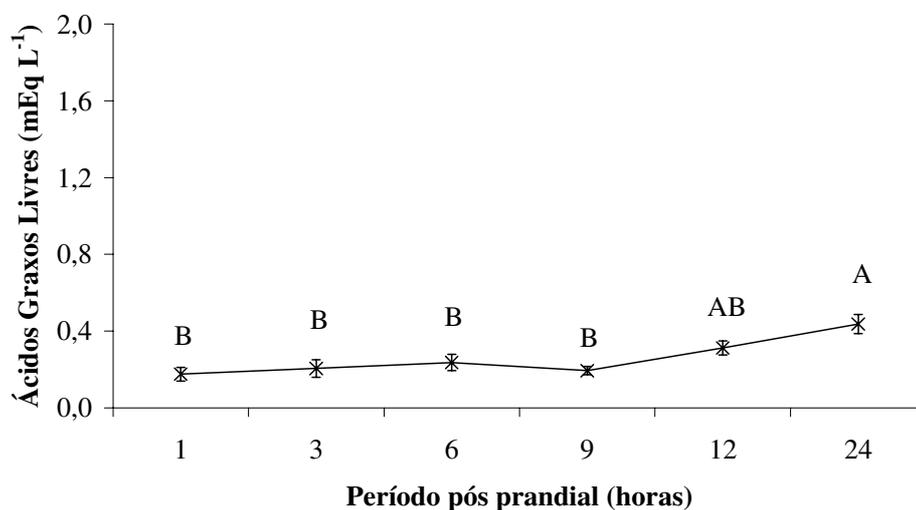


Figura 2. Ácidos graxos livres no plasma de pacu alimentado com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato) por 60 dias, após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias. Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

As concentrações séricas de triglicerídeos foram afetadas ($p < 0,05$) pelas dietas apenas 9 horas após alimentação, quando os peixes alimentados com a dieta de 35% de carboidrato apresentaram valores maiores comparado aos peixes alimentados com menor inclusão de carboidrato.

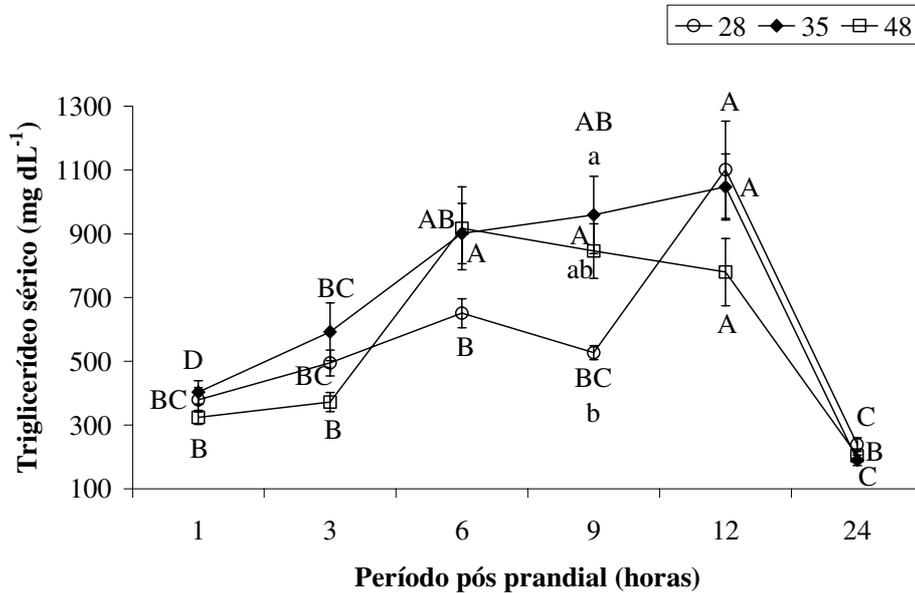


Figura 3. Triglicerídeos séricos de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas entre cada tratamento nos tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

As concentrações séricas de colesterol não se alteraram durante o período pós-prandial ($p > 0,05$). Entretanto, os peixes alimentados com 35% de carboidrato apresentaram valores de colesterol mais altos comparado aos grupos alimentados com as outras dietas (Figura 4).

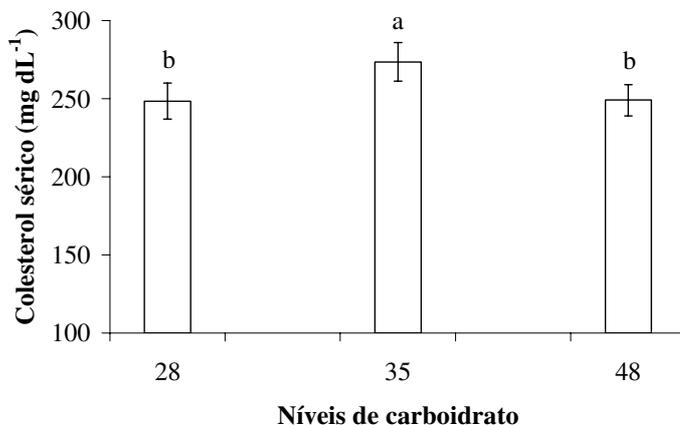


Figura 4. Colesterol sérico de pacu, após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias, depois de alimentados por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada barra representa a média dos tempos de amostragem, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) entre tratamentos. Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

As concentrações séricas de proteína total não diferiram entre os tratamentos ($p>0,05$), porém houve redução 6 e 9 horas após a alimentação e aumento às 12 e 24 horas, em todos os grupos (Figura 5).

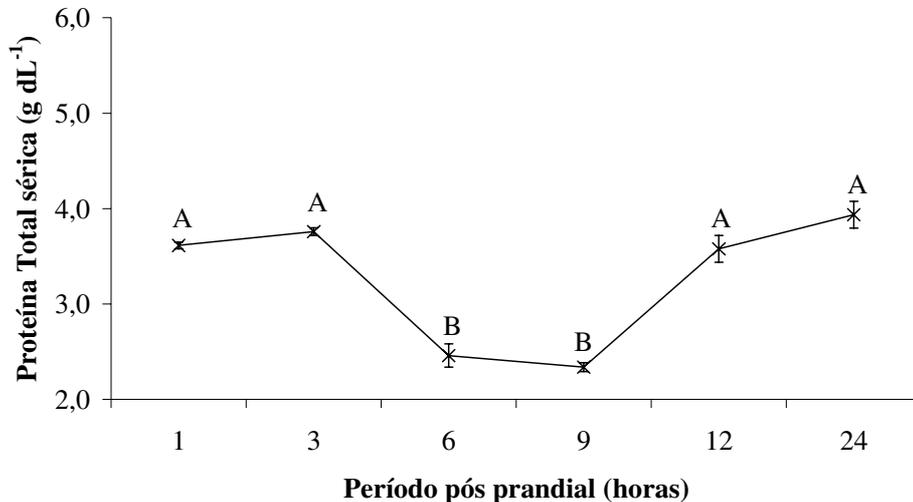


Figura 5. Proteína total sérica de pacu alimentado com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato) por 60 dias, após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias. Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença ($p<0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Parâmetros teciduais

Em relação à concentração glicogênio hepático, não houve efeito das dietas ou do período pós-prandial ($p>0,05$). O valor médio encontrado foi de 19,23 % ($\pm 0,84$).

A concentração de lipídio hepático não diferiu entre os tratamentos ($p>0,05$). No entanto, houve um aumento gradual a partir das 12 horas após a alimentação até 24 horas depois, independente do tratamento (Figura 6).

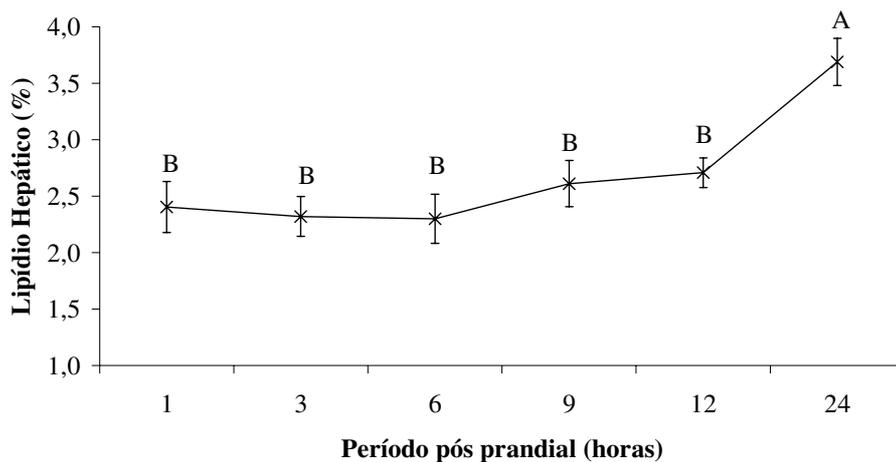


Figura 6. Lipídio hepático de pacu alimentado com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato) por 60 dias, após jejum de 7 dias e realimentação por 3 dias. Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

A porcentagem de lipídio muscular não diferiu ($p > 0,05$) entre os peixes alimentados com as diferentes dietas durante o período pós-prandial.

Índices biométricos

O índice hepato-somático (IHS) foi maior nos peixes alimentados com a dieta de 48% de carboidrato em todo o período pós-prandial, comparado com os peixes que receberam menor nível de inclusão de carboidrato. Com relação a cada tratamento nos tempos de amostragem, o perfil foi semelhante nos 3 grupos de peixes, com uma redução do IHS às 24 horas (Figura 7).

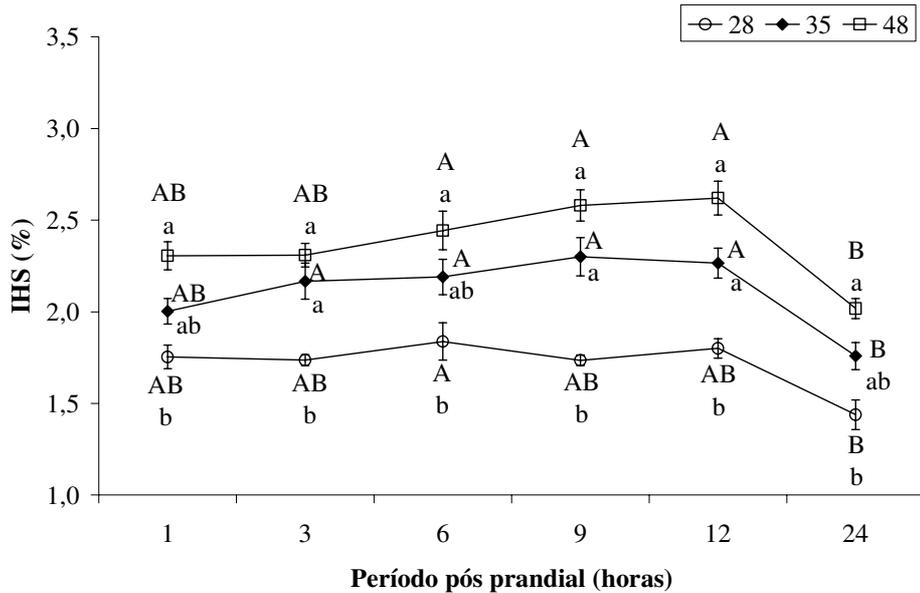


Figura 7. Índice hepato-somático de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas entre cada tratamento nos tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Não foram detectadas diferenças ($p > 0,05$) no índice estomaco-somático cheio (IESc) por efeito das dietas. Os valores médios dos 3 grupos diminuiram gradativamente, nas 24 horas do período pós-prandial (Figura 8).

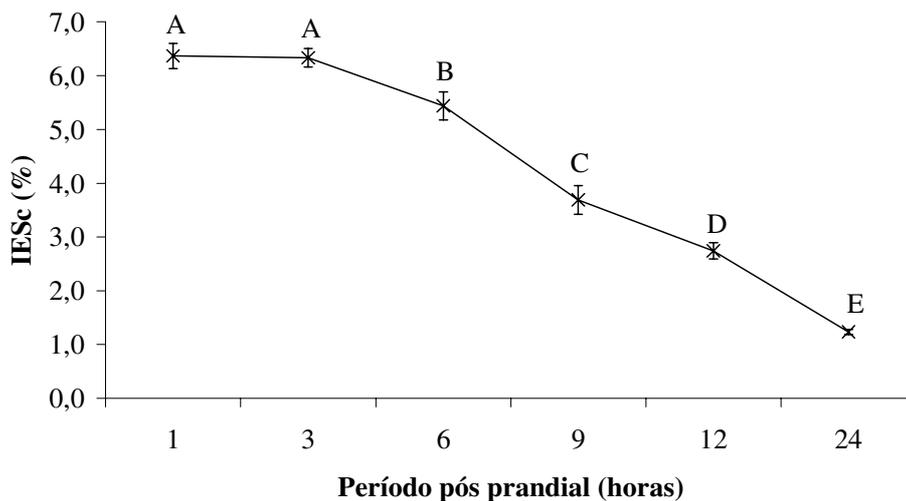


Figura 8. Índice estomaco-somático de pacu alimentado com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato) por 60 dias, após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias. Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

O índice intestino-somático cheio (IISc) apresentou perfil semelhante nos 3 grupos, porém foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre tratamentos 1, 3 e 12 horas após alimentação. Os valores registrados nos peixes alimentados com 28% de carboidrato foram maiores comparados aos peixes que receberam 48% de carboidrato na dieta. Observou-se aumento gradual deste índice em todos os grupos das 6 até 12 horas e redução às 24 horas após alimentação (Figura 9).

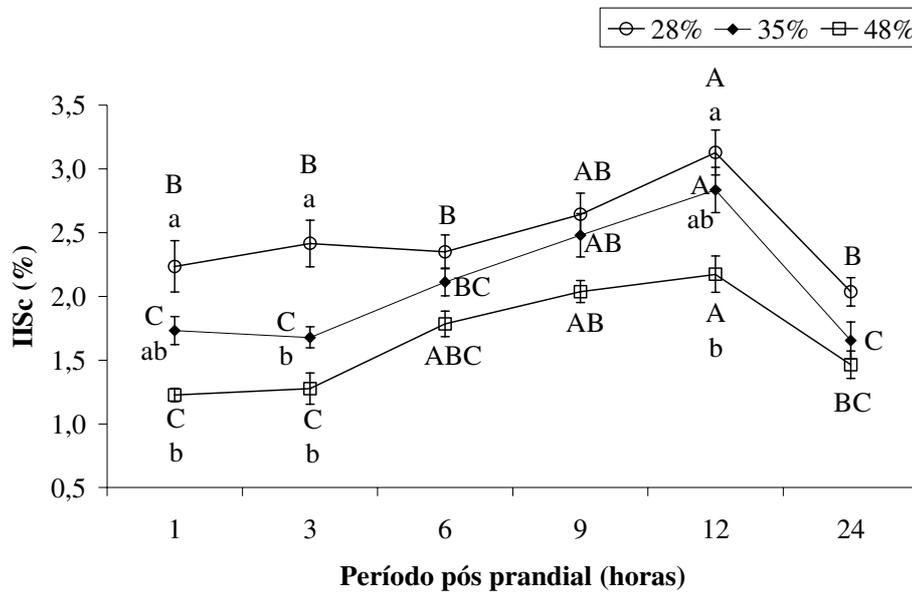


Figura 9. Índice intestino-somático de pacu alimentado por 60 dias com dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença a entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas entre cada tratamento nos tempos de coleta ($p<0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Jejum e realimentação sem adaptação a dietas com diferentes níveis de carboidratos

Parâmetros sanguíneos

As concentrações de glicose sanguínea mais elevadas, nos 3 grupos experimentais, foram registradas 3 horas após a alimentação. Elas diferiram ($p<0,05$) entre tratamentos apenas às 3 horas após alimentação, sendo os valores mais elevados os dos tratamentos de alta inclusão de carboidrato e de nível intermediário, comparado com os que receberam menor quantidade de carboidrato.

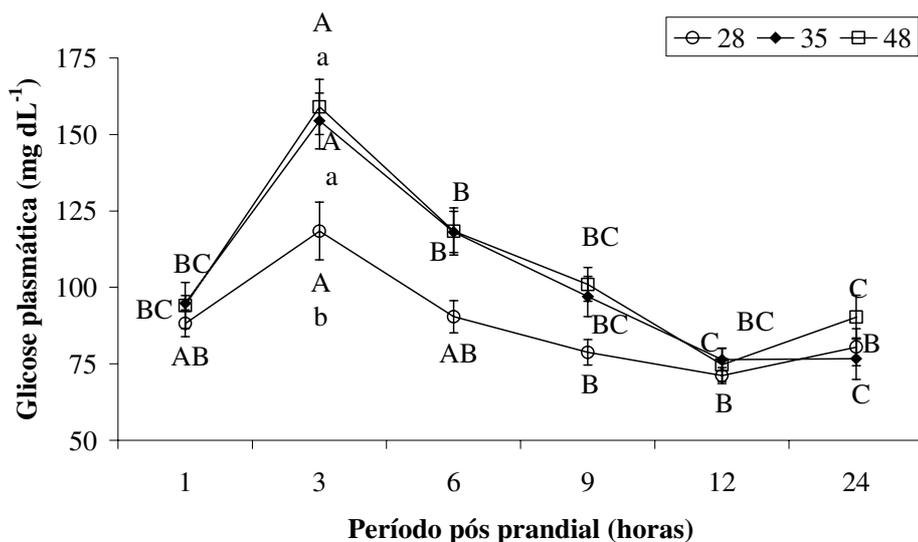


Figura 10. Glicose plasmática de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas) Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas entre cada tratamento nos tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) nos valores de ácidos graxos livres no plasma nos tempos de amostragem em relação aos tratamentos. Porém, houve aumento da concentração ($p < 0,05$), relacionado ao aumento de carboidrato na dieta, quando se considera todo o período pós-prandial (Figura 11). Com relação ao perfil deste metabólito, representado pela média de todos os tratamentos, se observa menor valor de ácidos graxos livres às 9 horas após alimentação (Figura 12).

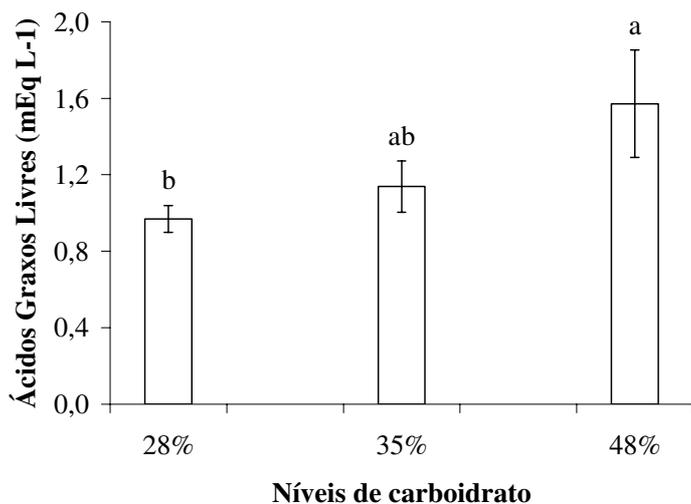


Figura 11. Ácidos graxos livres de pacu, após jejum de 7 dias e realimentação por 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada barra representa a média dos tempos de amostragem de cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) entre tratamentos. Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

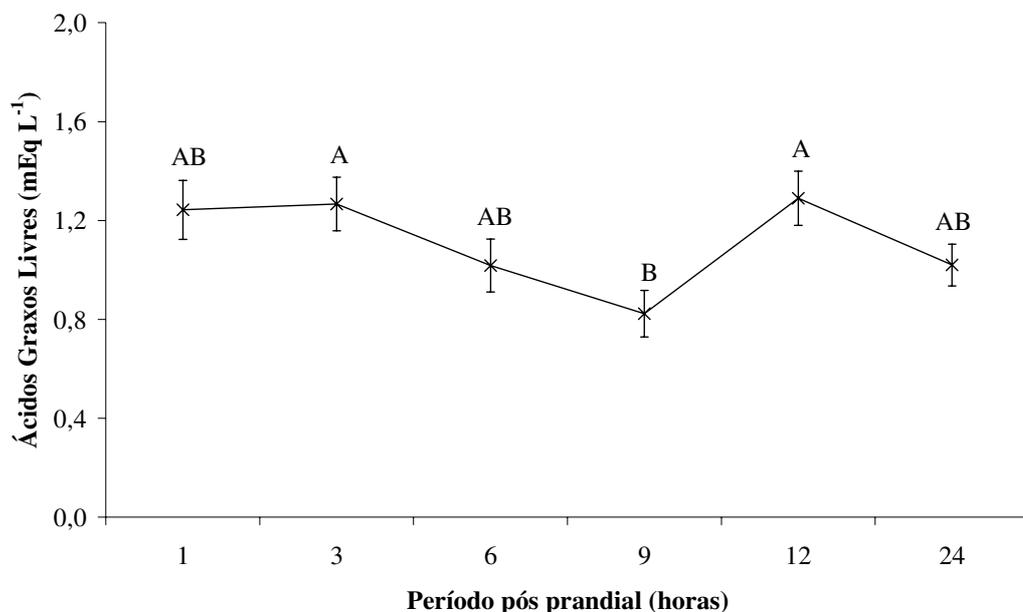


Figura 12. Ácidos graxos livres no plasma de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre os tempos de amostragem. Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

As concentrações séricas de triglicerídeos foram afetadas ($p < 0,05$) pelas dietas 9 e 12 horas após alimentação. Valores mais altos de triglicerídeos foram registrados nos grupos alimentados com a dieta de 35% e 48 % de carboidrato na dieta. Os peixes alimentados com baixo carboidrato na dieta não apresentaram diferenças durante o período pós-prandial (Figura 13).

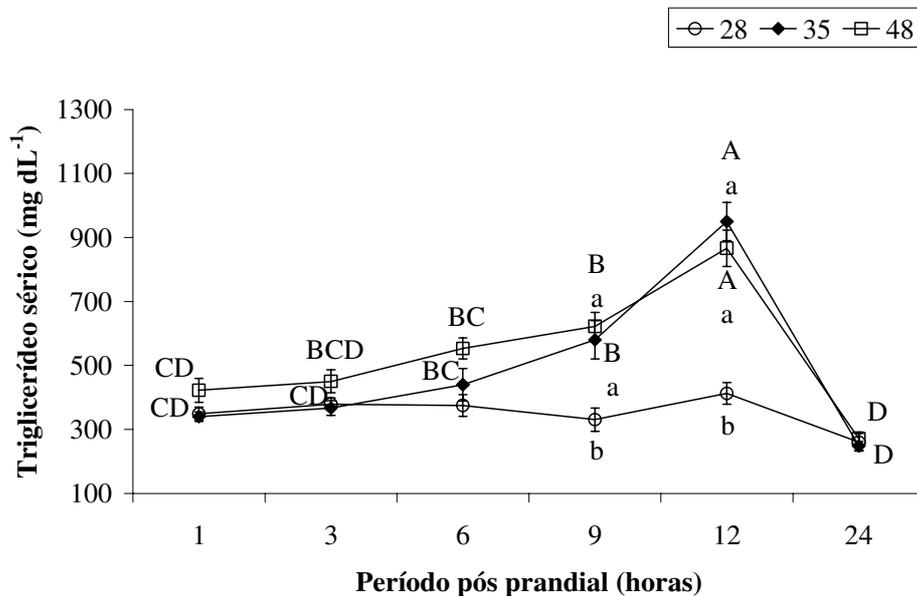


Figura 13. Triglicerídeos séricos de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo de coleta e letras maiúsculas entre cada tratamento nos tempos de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Com relação às concentrações séricas de colesterol e proteína total, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os peixes alimentados com as diferentes dietas e durante o período pós-prandial.

Parâmetros teciduais

Os níveis de carboidratos da dieta não alteraram a concentração de glicogênio hepático ($p>0,05$). Porém, houve um aumento gradual na deposição deste carboidrato durante todo o período pós-prandial, com diferenças ($p<0,05$) 12 e 24 horas após alimentação (Figura 14).

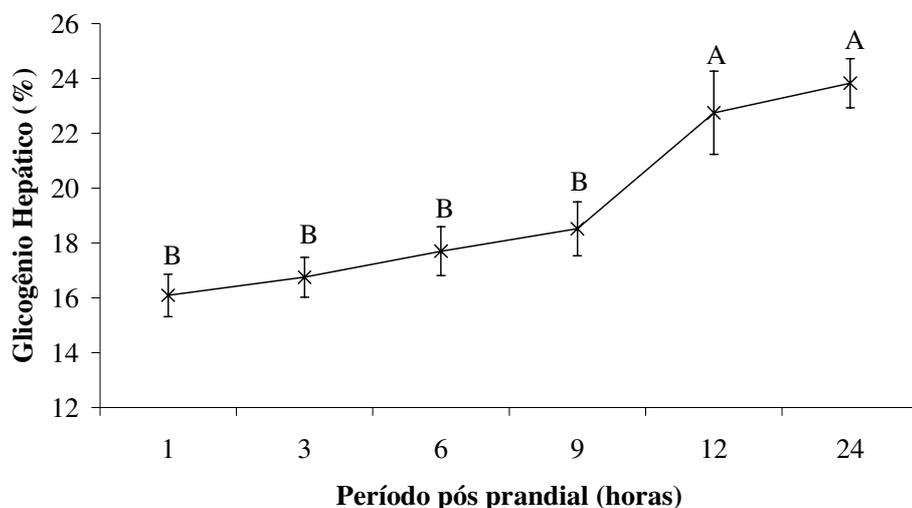


Figura 14. Glicogênio hepático de pacu após jejum de 7 dias e realimentação por 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença ($p<0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

As concentrações de lipídio hepático não diferiram entre os tratamentos ($p>0,05$). Entretanto, houve um aumento gradativo de 9 horas a 24 horas após a alimentação (Figura 15).

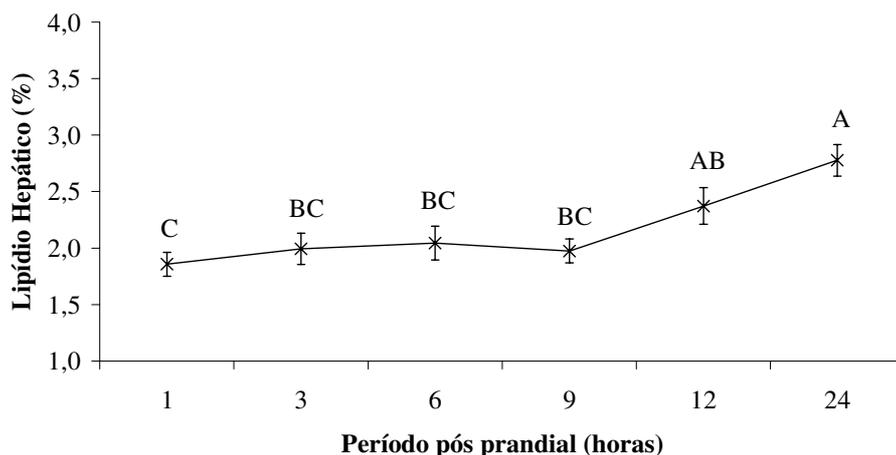


Figura 15. Lipídio hepático de pacu após jejum de 7 dias e realimentação por três dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Com relação às concentrações de lipídio muscular, não houve alteração durante o período pós-prandial ($p > 0,05$). Entretanto, os peixes alimentados com a dieta com 48% de carboidrato apresentaram menores valores de lipídio muscular comparado aos grupos alimentados com as outras dietas (Figura 16).

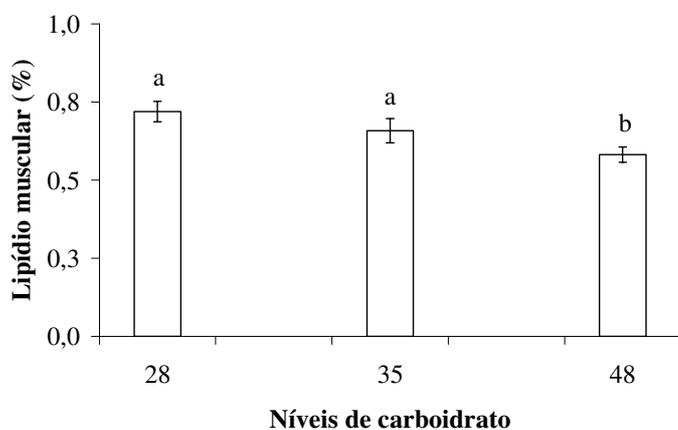


Figura 16. Lipídio muscular de pacu após jejum de 7 dias e realimentação por 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada barra representa a média dos tempos de tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) entre tratamentos. Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Índices biométricos

Em relação ao índice hepato-somático (IHS) não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$) ao longo do período pós-prandial. Entretanto, no grupo alimentado com 48% de

carboidrato foram observados maiores valores, em todo o período, comparado ao grupo alimentado com 28% de carboidrato (Figura 17).

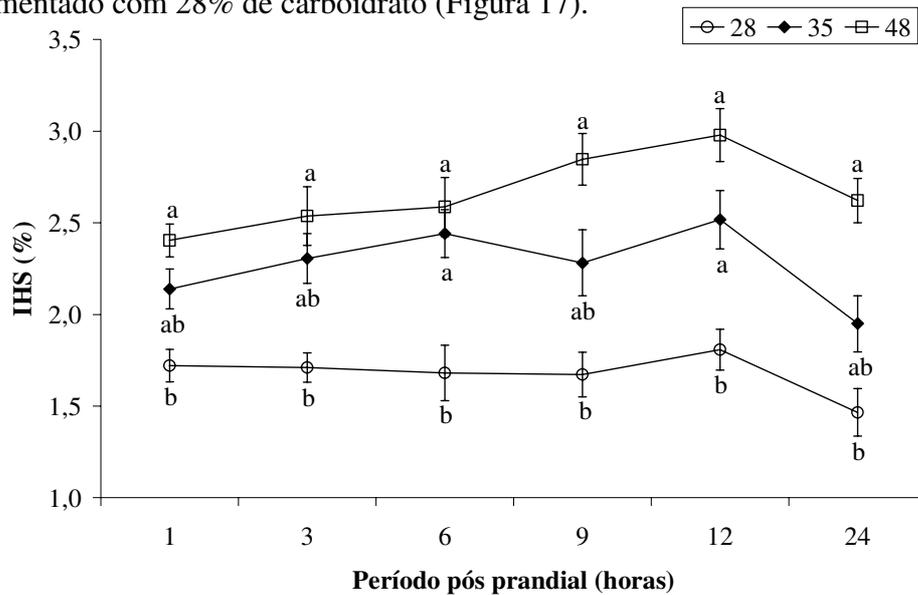


Figura 17. Índice hepato-somático de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo de coleta ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

Os valores médios do índice estomaco-somático cheio (IESc) dos 3 grupos diminuiram gradativamente, nas 24 horas do período pós-prandial. Não foram observadas diferenças entre tratamentos em um mesmo tempo de amostragem ($p > 0,05$) (Figura 18).

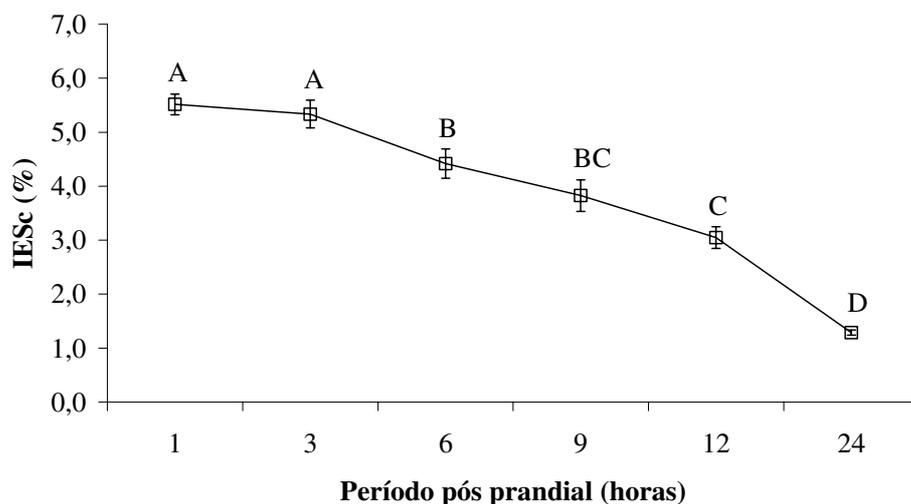


Figura 18. Índice estomaco-somático de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato). Cada ponto representa a média de todos os tratamentos, que não diferiram entre si. Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) entre os tempos de coleta (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas após alimentação). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

O índice intestino-somático cheio (IIESc) apresentou diferença entre tratamentos ($p < 0,05$) apenas 1 hora após alimentação, sendo os valores mais elevados os dos tratamentos de menor inclusão de carboidrato na dieta (28%) comparado aos peixes alimentados com 48% de carboidrato na dieta. Os peixes alimentados com baixo carboidrato na dieta não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) durante o período de amostragem (Figura 19).

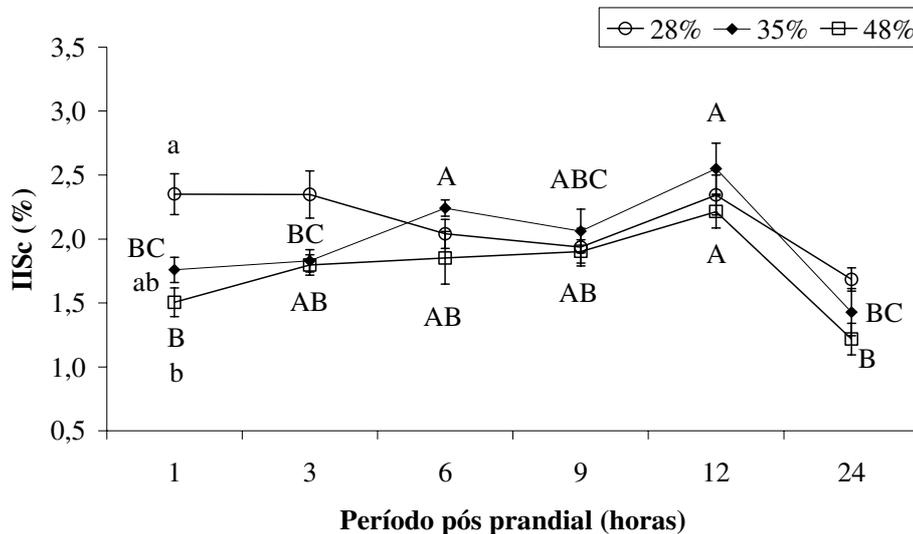


Figura 19. Índice intestino-somático de pacu após jejum de 7 dias e realimentação de 3 dias com as dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato), em diferentes tempos após alimentação (1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas). Letras minúsculas diferentes indicam diferença ($p < 0,05$) entre tratamentos no mesmo tempo de coleta. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre cada tratamento nos tempos de coleta. Barras verticais representam erro padrão da média ($n=8$).

DISCUSSÃO

Estudos com espécies carnívoras mostram que a ingestão de carboidrato altamente digestível resulta em hiperglicemia, permanecendo por muitas horas, devido à capacidade limitada destes peixes em utilizar carboidratos (Wilson, 1994). No entanto, o pacu, espécie herbívora com preferência frugívora, mostrou possuir mecanismos bioquímicos bem adaptados para manter a homeostase após a ingestão de carboidratos, principalmente quando submetidos ao jejum após prévia adaptação a níveis altos de carboidrato dietário. O manejo pré-jejum interferiu na homeostase energética do pacu. Os peixes submetidos a jejum que foram previamente adaptados por 60 dias às dietas experimentais (28, 35 e 48% de carboidrato) apresentaram o mesmo perfil metabólico com relação às concentrações de ácidos graxos livres no plasma, lipídio hepático, lipídio muscular, glicogênio hepático e proteína total sérica independente dos níveis de carboidrato fornecido na dieta.

Com relação à glicemia, um indicador importante da tolerância a carboidratos, os peixes adaptados às dietas apresentaram valores mais baixos no tempo máximo de absorção, porém, observou-se uma persistência dos valores glicêmicos no período pós-prandial, resultado de uma absorção mais lenta, fato verificado principalmente na dieta com 48% de carboidrato. Contudo, os valores mais baixos de glicose 3 horas após alimentação, em relação aos grupos não adaptados as dietas, sugerem uma melhor utilização do carboidrato nos peixes submetidos ao jejum e realimentação, após a adaptação às dietas. Os peixes que não foram adaptados as dietas experimentais também apresentaram um pico de glicose plasmática 3 horas após alimentação, mas 6 horas depois a glicose havia sido removida da circulação em maior quantidade, indicando uma utilização mais rápida. Em matrinxã (*Brycon cephalus*), 12 horas após ingestão de alimento, elevados valores de glicose circulante e glicogênio hepático foram observados, caracterizando o período de absorção, e 72 horas após, significativa redução nos dois parâmetros, indicando a mudança para a condição de jejum. Nestes animais, a manutenção de altos níveis de ácidos graxos livres durante o período de jejum e o aumento observado 14 dias após a última refeição foram considerados como indicação da contribuição significativa do tecido adiposo em fornecer energia ao peixe, mostrando que o matrinxã na ausência de glicose rapidamente altera seu metabolismo para manter a homeostase. Essa flexibilidade no metabolismo de glicose, que caracteriza uma espécie onívora, está relacionada a mudanças nos hormônios pancreáticos que permitem ajustes metabólicos graduais durante a transição da condição prandial à privação de alimento (Figueiredo-Garutti, 2000).

A glicose é um importante combustível metabólico nos vertebrados e vários mecanismos atuam para assegurar um constante suprimento para os tecidos glicose-dependentes, tais como células vermelhas do sangue, tecidos nervosos, entre outros. A glicose pode originar-se do intestino durante a digestão e absorção de carboidratos ingeridos além de ser produzida pelo fígado e rins por glicogenólise, ou através da gliconeogênese a partir de lactato, aminoácidos e glicerol (Christiansen e Klungsoyr, 1987).

A homeostase da glicose plasmática observada neste estudo está relacionada à absorção do carboidrato dietário. Estudos mostram a capacidade adaptativa de enzimas digestivas em resposta a diferentes dietas e níveis de carboidrato dietário. Almeida et al. (2006) observaram em tambaqui, espécie de hábito alimentar semelhante ao pacu, resposta das enzimas digestivas em peixes alimentados por 48 dias com dietas com diferentes níveis de proteína e lipídio na dieta. Os peixes apresentaram maior atividade das proteases no estômago com o aumento da proteína na dieta. A lipase foi observada em todo trato gastro-intestinal e

alta atividade foi observada no estômago, porém, os cecos pilóricos, intestino anterior e posterior também responderam as dietas lipídicas. A amilase também foi detectada em todo trato gastro-intestinal, no entanto, os cecos pilóricos apresentaram uma produção mais relevante. Em outro estudo, Côrrea et al. (2007) verificaram em tambaqui alimentados por 15 dias com dietas semi-purificadas, contendo diferentes níveis de amido de milho (30, 40 e 50%), um aumento na amilase e maltase, no trato digestório da espécie, relacionado ao aumento dos níveis de amido na dieta de 40 para 50%.

Além disso, o transporte intestinal desempenha importante função no metabolismo intermediário como um potencial regulador de liberação dos hormônios intestinais (Krogdahl et al., 2005). Em mamíferos, tem se revisado a hipótese que o trato gastro-intestinal tem um papel-chave na regulação da homeostase glicêmica, como exemplificado pelos altos picos de insulina depois da ingestão de glicose, ao contrário do que acontece com injeção intra-venosa. Em peixes, é evidente que o peptídeo GLP (glucagon-like peptide) atua significativamente na movimentação da glicose intestinal, no entanto sua exata função ainda precisa ser identificada. (Hemre et al., 2002).

A concentração de glicogênio, no presente estudo, não foi alterada pelas dietas e durante o período pós-prandial nos peixes adaptados. No entanto, nos peixes que não foram adaptados às dietas experimentais iniciou-se um aumento na deposição deste carboidrato a partir das 9 horas após alimentação, possivelmente de origem dietária. O carboidrato absorvido quando não é utilizado para energia pode ser depositado no fígado, tanto em forma de glicogênio como na forma de lipídio (Brauge et al., 1994). O mesmo ocorreu neste estudo com os níveis de lipídio hepático dos peixes das duas condições (adaptados e não adaptados).

Segundo Souza et al. (2000), a redução do glicogênio hepático no início da restrição, em um estudo com juvenis de pacu (peso médio de 141,7 g), submetidos à restrição alimentar por 60 dias e realimentados por 30 dias, indicou que esta é uma reserva prontamente disponível para favorecer a homeostase glicêmica, sendo mantida ou restabelecida pela mobilização de outras fontes de energia como os lipídios e as proteínas. Estes autores observaram, ainda, que, em períodos curtos de restrição alimentar, a concentração de lipídio no fígado e outros tecidos diminuiu, ao mesmo tempo em que o de ácidos graxos livres no plasma aumentou.

Em estudo posterior, com a mesma espécie, Souza et al. (2002) observaram a mesma dinâmica de mobilização das reservas energéticas durante a restrição alimentar. Além disso, os depósitos energéticos hepáticos foram facilmente recuperados quando restabelecido o fornecimento de alimento, evidenciando que a capacidade de sobreviver a períodos de

privação alimentar depende da habilidade da espécie em utilizar suas reservas endógenas verificado em peixes submetidos a quatro ciclos de quatro e seis semanas de restrição alimentar seguidas de nove e sete semanas de realimentação, respectivamente.

Hsieh e Shiau (2000) verificaram que a dieta pré-jejum interfere nas respostas fisiológicas da tilápia. Os peixes foram alimentados com dietas contendo diferentes carboidratos (glicose e amido) e posteriormente submetidos ao jejum (1, 2 e 3 semanas). Durante a primeira semana de jejum, o glicogênio hepático e o lipídio corporal foram usados como fontes de energia para as duas dietas oferecidas (glicose e amido). No entanto, após 2 semanas de jejum, enquanto os peixes alimentados previamente com a dieta contendo amido utilizaram o glicogênio hepático e lipídio corporal como principais fontes de energia, nos peixes alimentados com a dieta contendo glicose, a maior parte da energia utilizada foi derivada do catabolismo de proteínas e lipídios corporais.

Em relação ao metabolismo de lipídios, a concentração dos ácidos graxos livres plasmáticos foi muito inferior nos peixes adaptados às dietas. Os peixes que não foram adaptados às dietas experimentais previamente ao jejum apresentaram diferenças nas concentrações de ácidos graxos livres diretamente relacionadas aos níveis de carboidrato dietário, e diferenças na concentração de triglicerídeos, 9 e 12 horas após alimentação com as dietas de maior carboidrato (35 e 48%) comparado aos peixes que foram realimentados com as dietas de 25% de carboidrato. Segundo Sheridan (1988), elevados níveis de ácidos graxos representam a mobilização de lipídios, que envolve a quebra de triglicerídeos em ácidos graxos livres na corrente sanguínea. No pacu, as concentrações mais baixas de ácidos graxos livres nos peixes adaptados às dietas confirmam a facilidade de se atingir a homeostase energética sem esforço de produção de energia por lipólise. No caso dos peixes não adaptados previamente o sistema metabólico dos peixes acionou a produção de ácidos graxos em maior intensidade. Ao mesmo tempo, nos dois manejos alimentares, houve progressiva produção de triglicerídeos que foram encontrados na circulação e no fígado, sem grandes diferenças entre as dietas. Essa mobilização de lipídios para deposição não chega a ser suficiente para aparecer em maior quantidade nos músculos.

O esvaziamento do estômago se deu gradativamente, ao longo do período pós-prandial, num perfil semelhante entre peixes adaptados ou não às dietas. O perfil do conteúdo intestinal foi semelhante para as duas condições (adaptados e não adaptados). Observa-se que o esvaziamento do estômago coincide com a repleção dos intestinos, especialmente de 6 a 12 horas após a alimentação, nos peixes previamente às dietas, o que não ocorre com os não adaptados. Comparando-se estes perfis com os perfis glicêmicos, pode-se inferir que mesmo

tendo a mesma quantidade de alimento disponível para absorção (ou até mais), os peixes previamente adaptados não absorveram a mesma quantidade de açúcar, o que é mais um indicador da importância da adaptação no estabelecimento de mecanismos de tolerância e utilização de carboidratos pelo pacu.

REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). 1984. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 14 ed. Arlington. 937p.
- BLASCO, J., FERNÁNDEZ, J., GUTIÉRREZ, J. 1991. The effects of starvation and refeeding on plasma amino acid levels, *Cyprinus carpio* L., 1758. J. Fish Biol. 38, 587-598.
- BLIGH, E.G., DYER, W.J., 1959. Rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.
- BRAUGE, C., MÉDALE, F., CORRAZE, G. 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. Aquaculture 123, 109-120.
- CHRISTIANSEN, D.C., KLUNGSOYR, L. 1987. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. Comp. Biochem. Physiol. 88B, 701-711.
- CORREA, C.F., AGUIAR, L.H., LUNDSTEDT, L.M., MORAES, G. 2007 Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. Comp. Biochem. Physiol. 147A, 857-862.
- FIGUEIREDO-GARUTTI, M.L., NAVARRO, I., CAPILLA, E., SOUZA, R.H.S., MORAES, G., GUTIÉRREZ, J., VICENTINI-PAULINO, M.L.M. 2002. Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. Comp. Biochem. Physiol. A 132, 467-476.
- GAYLORD, T.G., MACKENZIE, D.S., GATLIN III, D.M., 2001. Growth performance, body composition, and plasma thyroid hormone status of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to short-term feed deprivation and refeeding. Fish Physiol. Biochem. 24, 73-79.
- HAYWARD, R.S., NOLTIE, D.B., WANG, N. 1997. Notes: use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth and rates. Trans. Am. Fish Soc. 126, 316-322
- HEMRE, G.I., MOMMSEN, T.P., KROGDAHL, A. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. Aquac. Nutr. 8, 175-194.
- HENDRIX, D.L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. Crop Sci., v.25, p.1306-1311, 1993.

HSIEH, S.L., SHIAU, S.Y. 2000. Effects of diets containing different carbohydrates on starved condition in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Fisheries Science 66 (1), 32-37.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Norme Internationale: riz détermination de la teneur en amylose. Suisse, 1987. 5 p. (ISO 6647).

KARKALAS, J.J. 1985. An improved enzymatic method for the determination of native and modified starch. J. Sci. Food Agric. 36, 1016.

KROGDAHL, A.; HEMRE, G.I.; MOMMSEN, T.P. Carbohidrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. Aquaculture Nutrition, v.11, n.2, p.103-122, 2005.

LOVE, R.M. The chemical biology of fishes. Vol. 2. London: Academic Press, 1980. p. 133-229.

MOON, T.W., FOSTER, G.D., PLISETSKAYA E.M., 1989. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food 6 weeks. Can. J. Zool. 67, 2189-2193.

ODA, G.M. Metabolismo e desempenho produtivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) juvenis submetidos a diferentes estratégias de alimentação. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2006.

SHERIDAN, M.A.1988 Lipid dynamic in fish: Aspects of absorption, transportation, deposition, and mobilisation. Comp. Biochem. Physiol. 90B, 679-690.

SOUZA, V.L., OLIVEIRA, E.G., URBINATI, E.C. 2000. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). J. Aquac. Trop. 15, 371-379.

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

SOUZA,V.L., URBINATI, E.C., MARTINS, M.I.E.G., SILVA, P.C. 2003. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetidos a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. Rev. Brás. Zoot. 32,19-28.

URBINATI, E.C., GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFSM, 2005, v. Único, p. 225-246.

WEATHERLEY, A.H., GILL, H.S. The biology of fish growth. London: Academic Press, 1987. 443p.

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

CAPÍTULO 5

Identificação de proteína transportadora de glicose GLUT4 em músculo esquelético de pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

Estudos preliminares.

Identificação de proteína transportadora de glicose GLUT4 em músculo esquelético de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Estudos preliminares.

Ana Paula Baldan¹, Fernanda Yumoto da Silva, Patrícia Monteiro Seraphin², Elisabeth Criscuolo Urbinati¹

Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n. 14.884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

Departamento de Fisiologia, FCT, UNESP, Rua Roberto Simonsen, 305. 1906 Presidente Prudente, SP, Brasil.

RESUMO

Na maioria dos vertebrados, a glicose entra nas células por difusão facilitada mediada por uma família de proteínas transportadoras de glicose, as GLUTs. A utilização de carboidratos por peixes vem despertando grande interesse na pesquisa. O presente estudo determinou a expressão molecular da GLUT 4 no músculo esquelético de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), um peixe tropical onívoro, que utiliza carboidratos na sua dieta natural.

Peixes juvenis foram distribuídos em aquários de 100 L, adaptados as condições laboratoriais e alimentados até a saciedade aparente com uma dieta contendo 48% de carboidrato duas vezes ao dia. Os peixes anestesiados foram sacrificados para remoção do músculo esquelético, congelados e mantidos a -20°C para posterior determinação da GLUT 4 por ensaio de Western Blotting. Tecido muscular esquelético de rato foi utilizado como controle na expressão da proteína no tecido. A concentração da proteína total no tecido foi determinada. A identificação molecular da GLUT 4 no músculo foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando quimiluminescência para evidência das bandas. As bandas foram analisadas por densitometria óptica. Foi possível detectar neste estudo a proteína transportadora de glicose GLUT-4 em musculatura esquelética de pacu, sendo sua expressão menor do que a observada em mamíferos.

ABSTRACT

In most of the vertebrates, glucose entry into cells by facilitated diffusion mediated by proteins of the GLUT family. Recently the ability of fish to utilize carbohydrate has gained interest. The present study determined the molecular expression of GLUT 4 in skeletal muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), an omnivorous tropical fish, that utilize carbohydrates in its natural diet.

Juvenile fish distributed in 100L aquaria were adapted to laboratory conditions being fed to satiation with a diet containing 48% carbohydrate twice a day. Anesthetized fish were killed and skeletal muscle fragments were removed, frozen and kept at – 20 °C for further GLUT 4 determination by Western Blotting assay. Rat skeletal muscle was used as control of the tissue protein expression. The total protein content in the tissue was determined. The molecular identification of GLUT 4 in the muscle was done by electrophoresis in polyacrilamide utilizing chemiluminescency to evidence the bands. The bands were analyzed by optical densitometry. This study was able to detect the protein GLUT-4 in skeletal muscle of pacu, and his expression was less than that observed in mammals.

INTRODUÇÃO

Na maioria dos animais, a glicose entra nas células por difusão facilitada mediada por uma família de proteínas transportadoras de glicose, as GLUTs. Em mamíferos, 13 diferentes isoformas de GLUT já foram identificadas (GLUT1-4), cada uma produto de um gene separado e com diferente distribuição e função. Estas diferentes isoformas pertencem a uma família de glicoproteínas estruturalmente relacionadas (Pessin & Bell, 1992) que facilitam a captação de glicose e que são igualmente expressas em células de mamíferos de maneira tecido-específica (Mueckler, 1994).

O metabolismo de glicose dos peixes tem sido bastante estudado em relação, principalmente, aos mamíferos, visto que os tecidos periféricos destes animais (músculo, por exemplo, que representa 50% do peso corporal) têm capacidade mais baixa de utilização da glicose (Cowey & Walton, 1989). Independente da baixa taxa de absorção nos tecidos de peixes (Cowey & Walton, 1989; Blasco et al., 1996), há evidências indiretas sugerindo que a entrada de glicose nas células possa ser mediada por transportadores da família GLUT. Em um estudo com tilápia, um peixe onívoro, anti-corpos contra GLUT-1 de mamíferos reagiram com uma proteína presente no coração e cérebro dos peixes (Wright et al., 1998). Em outro estudo, embriões transgênicos de truta que expressaram a GLUT-1 humana mostraram aumento da absorção de glicose e do metabolismo (Krasnov et al., 1999). Na truta, Planas et al. (2000) identificaram uma molécula de GLUT com alta homologia do GLUT-4 de mamíferos, que se expressou no músculo esquelético, rim e brânquias, tecidos com alta utilização de glicose.

A utilização de carboidratos por peixes cultivados tem despertado grande interesse na pesquisa. Investigações na área de nutrição têm abordado a capacidade de utilização deste nutriente em várias espécies. Segundo Wilson (1994), peixes de águas tropicais utilizam níveis mais altos de carboidrato dietário que peixes de água fria e os marinhos. A eficiência de utilização entre as espécies ainda não é claro. Estudos da fisiologia metabólica em peixes podem ser inovadores, contribuindo com informações importantes para possíveis melhorias no campo da aquicultura. O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) se apresenta como um modelo interessante para o estudo do metabolismo de carboidratos, visto que sua dieta natural inclui sementes e frutos, naturalmente ricos neste nutriente, sugerindo que a espécie possua mecanismos bem desenvolvidos para sua utilização. Assim, a identificação de proteína transportadora de glicose em músculo esquelético de pacu pode contribuir para o entendimento de aspectos do controle metabólico dos peixes, contribuindo com informações importantes para melhoria da criação.

O objetivo do presente trabalho é demonstrar a expressão de proteína transportadora de glicose GLUT-4 em músculo esquelético de pacu.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados exemplares juvenis de pacu provenientes da Piscicultura Águas Claras (Mococa, SP), distribuídos em caixas de polietileno, capacidade de 100 L, com renovação contínua de água e aeração. Os peixes foram adaptados às condições laboratoriais, recebendo uma dieta formulada com 48% de carboidrato, duas vezes ao dia, até a saciedade aparente do animal. A temperatura da água ($29,5 \pm 0,72^{\circ}\text{C}$) foi mensurada diariamente, o pH (7,5 a 8,0), o oxigênio dissolvido (acima de $5,2 \text{ mg L}^{-1}$), e a concentração de amônia total ($0,020$ a $0,062 \text{ mg L}^{-1}$) foram determinados semanalmente.

Amostras

Após anestesia (benzocaína, 50 mg L^{-1}), os animais foram sacrificados para remoção do tecido muscular esquelético. As amostras de tecido removidas para o ensaio de Western Blotting foram congeladas e estocadas em -20°C até utilização. Tecido muscular esquelético de rato foi utilizado como padrão e tratados da mesma forma que as amostras de peixe. As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia, Unesp - Universidade Estadual Paulista, Campus de São Vicente.

Preparação das amostras para o Western Blotting

As amostras de músculo esquelético foram submetidas a um processo de fracionamento de membranas celulares segundo Yonemitsu et al., (2001). Em resumo, as amostras foram homogeneizadas em tampão TRIS HCl 10 mM; EDTA 1 mM, sacarose 250 mM, pH 7,4, usando-se POLYTRON PT 3000 KINEMATICA® (BRINKMAN), e centrifugadas a 760 g durante 10 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi guardado e o precipitado re-suspenso em mesmo tampão (1/3 do volume inicial) e submetido a nova centrifugação (760 g) por 10 minutos, a 4°C . Os dois sobrenadantes juntos foram submetidos a ultracentrifugação (190.000 g) durante 75 minutos, a 4°C . O sedimento foi re-suspenso em 200 μL de tampão de homogeneização e estocado a -20°C até utilização.

A concentração de proteína total das diferentes frações de membranas celulares foi avaliada com base no método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Western Blotting – Quantificação do GLUT4

A determinação da quantidade de proteína GLUT4 nos diferentes tecidos (rato e peixe) foi realizada utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida (Machado et al., 1994; Seraphim et al., 1997), com a utilização de quimiluminescência (ECL) para detecção das bandas.

O método consiste na utilização de quantidades iguais de proteína, solubilizadas em tampão de Laemmli, sujeitas a SDS-PAGE (10%) e então transferidas eletroforicamente para membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (AMERSHAM Biosciences). Após bloqueio com albumina sérica bovina em PBS (8%) durante 30 minutos, as membranas foram incubadas com anticorpo específico do estudo, anti-GLUT4 (diluição 1:3000 em PBS 1x acrescido de 8%BSA) durante 3 horas a 37°C. Posteriormente foi feita uma incubação com o anticorpo secundário anti-IgG marcado com peroxidase, diluído 1:1000, em solução bloqueadora BSA 1% durante 1 hora (AMERSHAM Biosciences). As membranas foram lavadas com PBS, e agitadas vigorosamente em 600 µL de reagente de detecção nº1, acrescidos de 600 µL de reagente de detecção nº 2 do kit ECL™ - Western blotting Detection Reagents (AMERSHAM Biosciences) por 2 minutos, e expostas a Hyperfilm® (High Performance Radiography Film - AMERSHAM Biosciences) por 15 minutos para detecção das bandas resultantes.

O anticorpo anti-GLUT4 utilizado foi um anti-soro comercial de coelho (Chemicon International, Temecula, Califórnia), uma vez que o transportador de glicose é estrutural e evolutivamente bem conservado entre as espécies e em teste inicial de padronização de condições foi apresentada boa imunorreatividade com amostras de musculatura esquelética de bagre.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação de presença de proteínas transportadoras de glicose em tecido muscular de *Piaractus mesopotamicus*.

Após a realização de análise com várias concentrações de homogeneizados de proteína muscular de *Piaractus mesopotamicus*, foram encontrados os seguintes parâmetros ótimos para detecção da presença de proteína GLUT4:

- 1) anticorpo específico (anti-GLUT4) em diluição 1:3000.
- 2) concentração de aplicação da amostra entre 75µg a 100µg.
- 3) tempo de exposição para revelação do filme em torno de 10 minutos.

A imagem apresentada na Figura 1 indica a banda protéica encontrada na musculatura esquelética de pacu, com peso molecular próximo ao do GLUT-4 encontrado em mamíferos (rato), porém a densidade do blot em peixes encontra-se expressa em proporção mais reduzida comparada com a observada em rato. Planas (2000) identificou em músculo esquelético de truta marrom cDNA similar ao do gene do GLUT-4 encontrado em mamífero. Evidências moleculares mostraram a presença de proteína equivalente ao GLUT-4 caracterizados em diferentes espécies de peixes (Capilla et al., 2002). Apesar de ser observada uma menor expressão de GLUT-4 em peixes, a expressão desta proteína parece ser similar à encontrada em mamíferos.

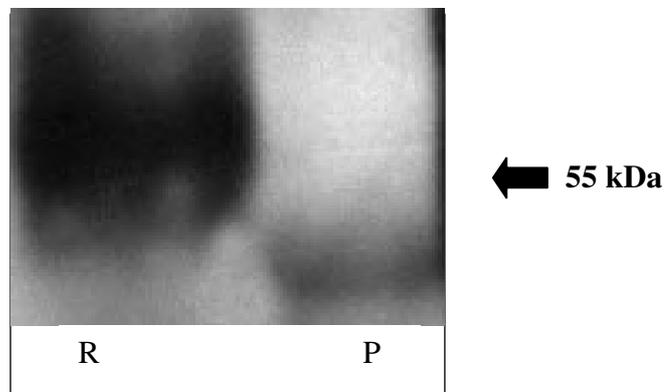


Figura 1. Detecção da GLUT-4 em músculo esquelético de rato (R) e pacu (P), por Western blotting. Amostra de fracionamento de membrana total na concentração de 30 μ g em rato e 100 μ g em pacu.

CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível detectar proteína transportadora de glicose GLUT-4 em musculatura esquelética de pacu, sendo sua expressão menor do que a observada em mamíferos.

REFERÊNCIAS

- BLASCO, J., FERNÁNDEZ-BORRÁS, J., MARIMON, I., REQUENA, A. 1996. Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: effect of an intravascular glucose load. *J Comp Physiol B* 165, 534–541.
- CAPILLA, E., DIAZ, M., GUTIERREZ, J., PLANAS, J.V. 2002. Physiological regulation of the expression of a GLUT4 homolog in fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E44-9.
- COWEY, J.Y., WALTON, M.J. 1989. In: *Fish Nutrition* (Halver, J.E., Ed.), pp. 259-329, Academic Press, New York.
- KRASNOV, A., PITKÄNEN, T.I., REINISALO, M., MÖLSÄ, H. 1999. Expression of human glucose transporter type 1 and rat hexokinase type II complementary DNAs in rainbow trout embryos: effects on glucose metabolism. *Mar. Biotechnol.* 1, 25-32.
- LOWRY, O.H., ROSEMBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDAL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-75.
- MACHADO, U.F., SHIMIZU, I., SAITO, M. 1994. Reduced content and preserved translocation of glucose transporter (GLUT 4) in white adipose tissue of obese mice. *Physiol. Behav.* 55, 621-625.
- MUCKLER, M. 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219,713-25.
- PESSIN, J.E., BELL, G.I. 1992. Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol.* 54,911–930.
- PLANAS J.V., CAPILLA, E., GUTIÉRREZ, J. 2000. Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. *FEBS letters* 481, 266-70.
- SERAPHIM, P.M., BARTOL, I., CIPOLLA-NETO, J., MACHADO, U. F. Quantification of GLUT4 transporter in insulin-sensitive tissues from pinealectomized rats. In: Webb, S. W.; Puigo-Domingo, M.; Moller, M.; Pévet, P. *Pineal Update – from molecular mechanisms to clinical implications*, PJD publications limited, Westbury, NY, USA, p. 99-106, 1997.

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

WRIGHT JR., J.R., O'HALI, W., YANG, H., HAN, X.X., BONEN, A. 1998. GLUT-4 deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111, 20-27.

CAPÍTULO 6

Considerações Finais

Considerações finais

As diferentes condições experimentais deste estudo mostraram que o pacu apresenta alta capacidade de utilização de carboidratos dietários, evidenciada pela melhor conversão alimentar, taxa de eficiência protéica, alta digestibilidade da proteína e amido das dietas, além da capacidade de homeostase energética da espécie quando alimentada com a dieta com alto nível de carboidrato dietário (48%). A capacidade de uso de carboidratos foi corroborada pelo estudo que identificou a presença da proteína transportadora de glicose (GLUT4), no músculo de pacu, um dos mecanismos moleculares que indicam a tolerância de um organismo de mobilização e uso de glicose.

Embora os resultados encontrados sejam fortes indicadores da tolerância do pacu ao uso de carboidratos dietários, outros estudos são necessários para verificar os mecanismos de controle hormonal e bioquímico/enzimático de digestão e metabólico envolvidos na utilização de carboidrato pela espécie.

Neste estudo o pacu confirma ser um modelo interessante para o estudo das vias bioquímicas envolvidas no metabolismo de carboidratos, contribuindo para o entendimento da baixa utilização de carboidratos por espécies carnívoras.