

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA ALCOÓLICA (*Saccharomyces cerevisiae*) COMO
FONTE PROTÉICA NA ALIMENTAÇÃO DE JUVENIS DE PACU (*Piaractus
mesopotamicus*, PISCES, TELEOSTEI): ASPECTOS METABÓLICOS E DE
DESEMPENHO PRODUTIVO**

Delma Machado Cantisani Padua

Bióloga

JABOTICABAL – SP

Permitida a cópia total ou parcial desde que citada a referência – A autora

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA ALCOÓLICA (*Saccharomyces cerevisiae*) COMO
FONTE PROTÉICA NA ALIMENTAÇÃO DE JUVENIS DE PACU (*Piaractus
mesopotamicus*, PISCES, TELEOSTEI): ASPECTOS METABÓLICOS E DE
DESEMPENHO PRODUTIVO**

Autora: *Delma Machado Cantisani Padua*

Orientadora: *Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati*

Co-orientador: *Prof. Dr. Dalton José Carneiro*

Dissertação apresentada ao Centro de
Aqüicultura da UNESP, como parte das
exigências para obtenção do título de
MESTRE em AQUICULTURA, área de
concentração em Aqüicultura.

JABOTICABAL

Estado de São Paulo - Brasil

Setembro - 1996

Ao João,

Gabriela e Mariana

dedico com amor.

Aos meus pais

Maria Rosa (*in memoriam*)

e Armando

Aos meus sogros

Maria da Paz

e Ismar

Aos meus irmãos

Diair

e Marco Antonio

ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Prof.a Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pela orientação, incentivo e pela oportunidade de compartilhar grandes lições de otimismo e dedicação ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro, pela co-orientação, e atenção sempre a nós dedicadas.

Ao Prof. Dr. Wagner Cotroni Valenti, pelas primeiras orientações no aperfeiçoamento, sempre com amizade dedicação e profissionalismo.

À Prof.a Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares, pelo apoio, sugestões e auxílio no planejamento das avaliações limnológicas.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros, pelas valiosas sugestões nas análises estatísticas.

Ao Prof. MSc. Paulo César da Silva, da Universidade Federal de Goiás, pelo auxílio na concessão dos peixes.

À Prof.a Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, pelo auxílio nas análises de morfometria do fígado.

Às doutoras membros da Banca Examinadora, pelas contribuições nas correções e sugestões, que permitiram o aprimoramento deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Lewis Green Jhon e Dra. Ísis do Carmo Kettefhut, da Escola de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela colaboração nas análises de aminoácidos e ácidos graxos livres.

Às colegas Elenise Gonçalves de Oliveira, Valéria Souza Leão e Marta Verardino De Stéfani pela dedicação e competência com que auxiliaram nas análises e coletas dos materiais.

Às amigas Regina Helena Sant'ana de Faria e Célia Maria Sampaio, com quem tivemos um convívio bastante alegre e gratificante.

À amiga Ana Silvia, funcionária da biblioteca, pela dedicação e carinho com que sempre atendeu minhas solicitações.

Aos Técnicos de laboratório, Damares, Euclides, Coelho, Lúcia Helena e Sr. Orandi, do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal, pelo pronto auxílio na condução das análises.

À Zootecnista Tereza Cristina Ribeiro Dias e aos funcionários Silvia Regina, Marcelo Escatolin, Mauro, Waldemir, Maurício e João Batista do CAUNESP, pelo apoio técnico.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Aqüicultura, pela contribuição à minha formação profissional.

Aos colegas da Pós - Graduação e, *in memoriam* de João Guilherme Durigan, pelos bons momentos compartilhados no curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

... Foi lá (nas Ilhas Salomon) que me conscientizei de que o grande lance não é chegar ao destino, mas estar trabalhando para chegar lá. Chegar acaba com a graça, com a luta gostosa, com o sonho. O bom é estar no campo jogando. É claro que ganhar é ótimo, mas quem realmente ama o que faz, o fazer é o extremo do prazer ...

Trecho de “Aventuras no Mar”, Hélio Setti Jr.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELA	xi
LISTA DE FIGURA	xii
RESUMO	xiii
INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Leveduras	5
2.1.1. Composição química e valor nutritivo	7
2.2. Desempenho produtivo	13
2.3. Fatores limitantes ao emprego da levedura como alimento	20
2.4. Aspectos do metabolismo	23
2.4.1. Considerações gerais	23
2.4.2. Alterações metabólicas em peixes alimentados com dietas contendo levedura	26
2.4.3. Características estruturais do fígado de peixes	33
2.5. Exigência protéica do pacu	37
2.6. Composição corporal	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. Delineamento e condições experimentais	48
3.2. Dietas e manejo alimentar	49
3.3. Obtenção das amostras e metodologia	53

3.3.1. Biometrias e desempenho produtivo	53
3.3.2. Parâmetros metabólicos e de morfometria	54
3.3.3. Análise de composição corporal	58
3.3.4. Avaliações das condições ambientais	59
3.4. Análises estatísticas	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. Condições ambientais	63
4.2 Desempenho de produção	69
4.2.1. Mortalidade e alterações morfológicas	75
4.3.Composição corporal	77
4.4. Aspectos do metabolismo	81
4.4.1. Estudo morfométrico do fígado	94
5. CONCLUSÕES	99
6. SUMMARY	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Composição em AA da proteína de levedura e outras fontes protéicas . . .	12
2. Valores de variáveis metabólicas do pacu	26
3. Composição em AA da proteína do músculo do pacu	43
4. Composição química aproximada dos ingredientes das dietas	50
5. Composição percentual e calculada das dietas experimentais	50
6. Composição em AA das dietas experimentais e das duas fontes protéicas	52
7. Variáveis limnológicas	64
8. Temperaturas ambiente, máxima e mínima	64
9. Resultados das análises estatísticas do desempenho de produção	71
10. Resultados das análises estatísticas dos dados de composição corporal	77
11. Resultados das análises estatísticas das variáveis metabólicas	82
12. Resultados das análises estatísticas das variáveis morfométricas dos hepatócitos	95

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Instalações experimentais	61
2. Obtenção das amostras	62
3. Variáveis limnológicas	68
4. Variação diária da temperatura, manhã e tarde	69
5. Variáveis de desempenho produtivo	74
6. Variáveis metabólicas	94
7. Variáveis morfométricas dos hepatócitos	98

RESUMO

O presente experimento avaliou o efeito de diferentes níveis de levedura seca de destilaria alcoólica (*Saccharomyces cerevisiae*) em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) sobre aspectos do metabolismo, desempenho produtivo e composição corporal. Em delineamento em blocos casualizados, em esquema de parcela subdividida no tempo ("Split Plot in Time") foram testados quatro níveis de substituição da farinha de peixe por levedura, 25, 50, 75 e 100 %, com duas avaliações, aos 45 e 87 dias do início do experimento. As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia, ad libitum. Duzentos peixes foram distribuídos em 20 tanques com capacidade para 1330 l, instalados no interior de uma estufa e com fluxo individual de água. Os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se adequados ao longo do experimento. Foi possível a substituição da farinha de peixe por levedura até o nível de 75 % sem se constatar prejuízo nos diversos parâmetros analisados. O nível mais elevado de levedura na dieta (100 %) levou aos piores resultados de desempenho produtivo, com menor taxa de crescimento instantâneo. Não houve influência significativa dos tratamentos sobre a composição corporal dos peixes, exceto pela maior concentração de material mineral no corpo dos peixes que receberam 100 % de substituição. Este nível de substituição provocou alta mortalidade. Foi observado, nos peixes alimentados com dietas contendo 100 % de substituição de farinha de peixe por levedura, hiperglicemia e decréscimo no glicogênio hepático, conteúdo total de lipídios e proteína plasmática. Seguindo o mesmo padrão de resposta, os hepatócitos apresentaram a mais baixa área e volume do citoplasma no mesmo tratamento. Aumento nos níveis de hematócrito foram detectados nos peixes que receberam dieta com 100 % de proteína fornecida pela levedura, aos 87 dias. As demais dietas com levedura (25, 50 e 75 %) proporcionaram comportamento semelhante, comparado à dieta controle, quanto às características estudadas. Em conclusão, os resultados do presente estudo,

sugerem que a dieta com substituição total da farinha de peixe por levedura demonstrou um efeito antinutricional.

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de peixes e crustáceos aumentou 96 % de 1984 a 1990, representando uma taxa média anual de crescimento de 16 % (TACON, 1993). Peixes de águas doces tropicais e subtropicais geralmente dominam a produção. Nos Estados Unidos da América, o consumo de peixes per capita aumentou 84 % de 1960 a 1995, de 4,7 para 8,6 kg (ANUALPEC,1995). Assumindo que a taxa de crescimento anual desse setor se mantenha nas próximas décadas, então, o provimento de fertilizantes e rações deverá ser proporcional.

A aqüicultura é uma atividade emergente nos países em crescimento e, com a sensível redução na oferta de produtos de pesca, a elevada demanda por pescado de qualidade e os avanços nos processos tecnológicos desse setor, há uma tendência na intensificação do cultivo, bem como da produção de compostos alimentares especializados.

A alta exigência protéica em dietas é uma característica marcante nos organismos aquáticos, sendo duas a três vezes mais alto que o requerimento protéico para animais terrestres.

Por causa desta exigência crítica, as dietas de peixes cultivados contêm altos níveis de proteína bruta fornecidos principalmente pela farinha de peixe, fonte protéica convencional, de alto valor biológico para cultivo de organismos aquáticos, mas que vem sendo substituída nas rações, uma vez que são escassas, de alto custo e apresenta enorme variabilidade em sua composição nutricional.

O item alimentação pode representar valores acima de 60 % do custo total de produção em cultivo intensivo ou semi-intensivo de organismos aquáticos e o componente proteína deve ser considerado com cuidado, uma vez que é o ingrediente mais caro da dieta, justificando os esforços pelo domínio dos princípios de alimentação em peixes. A seleção dos ingredientes utilizados na ração desempenhará uma importante função, impondo ao cultivo seu sucesso nutricional e, conseqüentemente, econômico.

Entre os produtos que podem substituir os suplementos protéicos convencionais usados na alimentação animal, destacam-se os microorganismos (algas, bactérias e fungos) considerados fonte de proteína unicelular, subprodutos vegetais, combinações de fontes de ingredientes complementares ou a suplementação direta do nutriente.

O Brasil, sendo o maior produtor mundial de álcool de cana-de-açúcar, com uma produção estimada para a safra de 95 em 12,7 bilhões de litros (YOSHII, 1995) e cuja indústria alcooleira apresenta uma boa capacidade instalada de produção e, com reivindicações do setor por novos investimentos no PROÁLCOOL, é um país privilegiado quanto ao aproveitamento dos subprodutos no processamento da cana-de-açúcar, notoriamente a levedura. Segundo DESMONTS (1966), a disponibilidade da levedura usada para produção de álcool (*Saccharomyces cerevisiae*) é de 2 kg de levedura seca por hectolitro produzido.

Os resultados satisfatórios da utilização da levedura tanto na alimentação humana como animal, levaram algumas empresas a investir maiores recursos em pesquisas que visem otimizar a produção do alimento, por meio de processos que permitam extrair maior quantidade do produto os quais, por outro lado, quando liberados e não processados, podem causar prejuízos ambientais pela elevação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO).

O potencial das leveduras como componente de dietas para consumo de animais de granja vem sendo atualmente investigado com freqüência. Entretanto, a principal limitação ao uso de leveduras como fonte primária de proteínas é o elevado nível de ácidos nucléicos, a parede celular rígida e a palatabilidade (sabor amargo). Conseqüentemente se a produção de levedura for economicamente viável, seu futuro comercial dependerá principalmente dos efeitos metabólicos potencialmente indesejáveis de substâncias associadas como o RNA.

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, sendo um peixe de alto valor econômico, tem sido estudado sob aspectos variados de sua biologia. No entanto, alguns aspectos da cultura desta espécie tais como exigência nutricional e resposta metabólica em função da dieta, ainda são pontos que necessitam maiores estudos e que fornecerão informações básicas para otimização de sua exploração zootécnica.

O presente trabalho teve por objetivo estudar os efeitos da substituição da fonte convencional de proteína de origem animal por levedura seca da fermentação alcoólica (*Saccharomyces cerevisiae*), em dietas práticas para o pacu (*P. mesopotamicus*), através dos parâmetros metabólicos e de seu desempenho produtivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leveduras

Ainda é muito discutida a classificação taxionômica dos organismos do REINO FUNGI, constituído pelo único FILO EUMYCOTA, por serem indivíduos muito heterogêneos. As leveduras fazem parte da CLASSE ASCOMICETOS predominando as do gênero *Saccharomyces* em utilizações industriais, destacando-se: *S. cerevisiae* e *S. uvarum*.

Segundo DESMONTS (1966), as leveduras usadas na indústria alcooleira podem ser classificadas em dois tipos: de recuperação e de cultura. As primeiras, do gênero *Saccharomyces*, constituem-se em um subproduto da fermentação alcoólica do mosto açucarado, obtido em meio anaeróbio após a centrifugação do vinho; nesse caso, a produção de levedura é secundária à produção de álcool. As

leveduras de culturas, geralmente pertencentes ao gênero *Candida* (ou *Torula*), são obtidas por meio do cultivo em substrato de vinhaça ou melaço, com fermentação aeróbia, o que resulta em uma intensa multiplicação de células, bem maior do que aquela verificada pelo processo anaeróbio e, nesse caso, a levedura é o produto principal.

O emprego das leveduras como alimento, particularmente como fonte protéica, foi durante a Primeira Guerra Mundial, com sucesso comprometido por problemas de palatabilidade principalmente. Mesmo assim, em 1945 grande quantidade de *Saccharomyces* sp. foi usada na alimentação animal e humana (LOESECKE, 1946).

Alguns exemplos de proteínas unicelulares (“Single Cell Protein” - SCP, que são, proteínas de organismos unicelulares) utilizadas em rações para peixes de água doce incluem: algas (*Spirulina maxima*, *Spiragryra maxima*, *Cladophera glomerata*, *Hydrodictyon reticulatum*, *Chlorella* spp.), bactérias (*Methanobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Micrococcus* spp.) e fungos (*Candida* spp., *Saccharomyces* spp., *Torula* spp., *Kluyvenomyces* spp.) (TACON, 1993).

A fonte protéica unicelular mais usada em rações para aquicultura é a levedura, tanto as de cervejaria como a alcoólica, ou preparados de leveduras produzidos comercialmente (“Toprina”), merecendo destaque, em nossa região, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, obtida de destilaria de álcool de cana-de-açúcar.

Usada na alimentação de peixes como uma fonte de proteínas, vitaminas (pigmentos carotenóides) e enzimas exógenas, as proteínas unicelulares sustentam uma promessa futura como possível substituto da farinha de peixe, pela sua habilidade de se desenvolver em uma vasta variedade de substratos e subprodutos, por crescer em espaços limitados, e com bom controle e geralmente independente do clima, serem capazes de duplicar sua biomassa em curtos períodos, além da possibilidade de controle de sua composição nutricional por meio de manipulações ambientais ou genéticas (SCHULZ & OSLAGE, 1976).

2.1.1. Composição química e valor nutritivo

A composição química e o valor nutritivo da levedura são dependentes de fatores como substrato, grau de aeração do meio, espécie de levedura, tratamentos impostos ao meio de cultura, condições de secagem e idade das células. O meio de cultura utilizado é o fator mais importante, afetando a taxa de crescimento e a composição em proteínas e lipídios (HSU, 1961; DESMONTS, 1968). Dependendo da espécie, as leveduras podem ser utilizadas como concentrado protéico, gordura comestível, aditivo de alimentos ou fonte de vitaminas D e B (HSU, 1961).

O conteúdo em proteína bruta da levedura varia de 30 a 60 % e sua fração nitrogenada contém em média 70 a 80 % de aminoácidos, 8 a 12 % de ácidos nucléicos, 6 a 8 % de amônia, além de glucosaminas, galactosaminas, glutatona,

lecitina e outros compostos em concentrações menores (ROSE & HARRISON, 1970).

Segundo SCHULZ & OSLAGE (1976), o conteúdo em ácido nucléico é proporcional à taxa de crescimento da massa celular, sendo desta forma influenciado por alguns fatores durante o processo de fermentação. Em estudo com leveduras cultivadas em diversos substratos, inclusive melão, os autores obtiveram teores entre 6 a 12 % de ácidos nucléicos. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por KIHLEBERG (1972), que variaram entre 5 a 12 %. O teor em ácido nucléico é um dos fatores limitantes do emprego das leveduras na alimentação animal, sendo de grande importância o controle deste fator quando se pretende produzi-las industrialmente com finalidade de alimentação animal.

SCARINCI et al. (1990) analisaram 10 cepas de leveduras possíveis de utilização na alimentação animal, cultivadas em soro de leite. Em todos os casos foi detectado alto teor de proteína total (38,91 a 55,09 %), como também de proteína verdadeira (30,55 a 53,47 %). Em todas leveduras analisadas, o teor de RNA foi baixo (4,43 a 10,41 %), sendo este valor importante quando a biomassa se destina à alimentação.

A intensificação dos esforços em utilizar a fermentação microbiana para a produção de nutrientes levou SCHULZ & OSLAGE (1976) a investigarem a composição química de 10 espécies de leveduras cultivadas em substratos não convencionais.

O conteúdo em proteína bruta variou entre 39 e 68 %, com ênfase à alta concentração de lisina, 6,6 a 8,4 g/16 g N, sendo insatisfatório o teor em aminoácidos sulfurados, 1,5 a 3,3 g/16 g N. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cultivada em melaço, apresentou teor protéico de 51,5 %, sendo inferior ao das leveduras cultivadas em soro de leite (64,0 %), licores sulfíticos (55,3 %) e petróleo (67,8 %) e superior às cultivadas em metanol (38,8 %).

A levedura de recuperação obtida nas destilarias de álcool de cana-de-açúcar, como a utilizada na presente pesquisa, apresenta teor protéico médio de 30 a 38 % (MACHADO et al., 1984; MIYADA, 1987; EMBRAPA, 1991).

A composição em aminoácidos das leveduras é razoavelmente bem balanceada, destacando-se teores elevados de lisina, razão pela qual é reconhecida sua utilização como suplemento protéico em dietas à base de cereais (KIHLBERG, 1972). Em relação às proteínas do ovo, é deficiente em aminoácidos sulfurados, triptofano e aromáticos (HSU, 1961; SHACKLADY et al., 1973; COZZOLINO, 1982). NELSON et al. (1960) analisaram 271 tipos de levedura e, em 37 espécies do gênero *Saccharomyces*, verificaram teores de 2,43 a 3,85 % de lisina, 0,38 a 0,67 % de metionina e 0,17 a 0,54 % de triptofano. O teor protéico das células variou de 32,50 a 56,25 %. Para uma análise comparativa, na Tabela 1 é apresentada a composição em aminoácidos de algumas leveduras, da farinha de peixe, da proteína

padrão de referência da FAO (Food Agriculture Organization) , da proteína do ovo e a exigência protéica da carpa.

Alguns pesquisadores têm procurado melhorar a qualidade de dietas que contenham levedura como única fonte protéica em alimentação de salmonídeos, pela suplementação com aminoácidos cristalinos (NOSE, 1974a,b; MAHNKEN, et al. 1980; MURRAY & MARCHANT, 1986). Foi observado que nem sempre a suplementação melhora o crescimento dos animais. Em todos os casos, a dieta experimental foi inferior quando comparada à controle, com farinha de peixe. NOSE (1974a,b) verificou que a cistina e arginina suplementares melhoraram o crescimento da truta em 25 %, metionina e lisina não foram efetivas em promover o crescimento, e com a fenilalanina foi observado decréscimo.

Seis produtos a base de levedura foram produzidos e utilizados por SARWAR et al. (1986) como fonte protéica em dietas para ratos. Os autores testaram a suplementação da proteína na dieta a base de levedura com 0,2 % de L- metionina ou L- cistina. A suplementação com cistina teve pouco efeito no consumo e no ganho de peso, quando comparada a dietas suplementadas com metionina.

O perfil nutricional de produtos a base de levedura, com a adição de 0,1 a 0,2 % de metionina à proteína, é equivalente a produtos elaborados com proteína de soja ou farinha de peixe. De acordo com a “Food and Drug Administration” (FDA), somente

células secas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* e *Klugveromyces fragilis* podem ser utilizadas como aditivos em gêneros alimentícios para consumo humano, pelo fato de já terem sido submetidas aos testes toxicológicos exigidos por este órgão (BOZE et al., 1992).

O teor de extrato etéreo de leveduras de recuperação de destilaria alcoólica, apresenta variações de 0,12 a 1,6 %. Dependendo da espécie da levedura e do processo de fermentação, pode-se elevar o teor de gordura em até 60 %, quando no substrato a quantidade de nitrogênio for reduzida e a de açúcar elevada (HSU, 1961).

KANEKO et al. (1976) determinaram o teor de lipídios de 30 espécies de leveduras, verificando uma variação de 6,3 a 32,3 % em lipídios totais na matéria seca. Na levedura *S. cerevisiae*, o teor de lipídios foi de 7,2 %, dos quais 52 % eram constituídos pelo fosfolipídios. SCHULZ & OSLAGE (1976) verificaram que na fração extrato etéreo de dez diferentes leveduras os ácidos graxos insaturados predominam com considerável porção de poliácidos.

Os carboidratos representam de 15 a 60 % do peso seco das leveduras, sendo representados em média por, 27 % de glucanas, 21 % de mananas, localizados na parede celular, 12 % de glicogênio e, 33 % de trealose, carboidratos de reserva energética (ROSE & HARRISON, 1970).

Tabela 1. Comparação da composição em aminoácidos das proteínas de leveduras, da farinha de peixe, do ovo, da proteína de referência da FAO/WHO e, o requerimento em aminoácidos essenciais da carpa.

Aminoácidos (Aas)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	g/16gN								
Triptofano (TRP)	0,55	0,81	0,52	0,83	1,33	0,39	1,40	1,00	0,70
Arginina (ARG)	2,35	3,40	1,36	5,02	5,82	3,78	6,50	5,00	3,90
Isoleucina (ILE)	2,37	4,19	1,48	3,41	4,85	2,15	5,50	4,00	2,30
Leucina (LEU)	3,45	6,16	2,17	5,64	7,35	3,77	9,10	7,00	4,20
Lisina (LYS)	3,33	5,72	2,07	5,83	7,85	3,98	6,90	5,50	5,30
Metionina (MET)	0,79	1,18	0,43	2,27	2,84	nd	3,40	3,50	1,60
½ Cistina (CYS) ₂	0,53	0,84	0,39	0,81	0,70	nd	0,50	nd	0,80
Fenilalanina (PHE)	1,96	3,16	1,18	2,94	4,35	1,81	5,80	6,00**	3,00
Treonina (THR)	2,27	4,41	1,58	3,16	4,55	1,99	5,20	4,00	3,20
Valina (VAL)	2,52	4,66	1,78	4,68	5,65	2,59	6,70	5,00	3,00
Histidina (HIS)	1,17	nd	0,69	1,80	2,22	1,40	2,60	2,00	1,30
Alanina (ALA)	nd	5,56	2,00	nd	6,34	3,51	nd	nd	nd
Ác. Aspártico	nd	9,31	3,21	nd	9,35	4,72	nd	nd	nd
Ác. Glutâmico	nd	11,68	3,42	nd	13,30	4,93	nd	nd	nd
Glicina (GLY)	1,87	3,41	1,12	4,80	4,50	3,60	nd	nd	nd
Prolina (PRO)	nd	2,88	1,04	nd	nd	2,67	nd	nd	nd
Serina (SER)	nd	4,59	1,68	2,88	nd	1,93	nd	nd	nd
Tirosina (TYR)	1,60	nd	0,88	2,39	nd	1,49	4,60	nd	2,00

Levedura de recuperação 1- (NRC, 1983 "Brewer yeast- *S. cerevisiae*"); 2- (MIYADA, 1987); 3- (EMBRAPA, 1991); Farinha de peixe 4- (NRC, 1983); 5- (MAHNKEN et al., 1980); 6- (EMBRAPA, 1991)

7- Proteína do ovo (NRC, 1983); 8- Proteína de referência (United Nations FAO/WHO, 1985); 9- Requerimento da carpa (OGINO, 1980); * Sulfurados totais (MET+CYS); ** Aromáticos totais (PHE+TYR); nd = não determinado

Com relação aos minerais, as leveduras apresentam um teor variando de 5 a 10 %, sendo o potássio e o fósforo seus maiores componentes, além de cálcio, magnésio, sódio e enxofre na forma de sulfitos (COZZOLINO, 1982). Dependendo da espécie, do substrato e do tipo de fermentação, a levedura pode apresentar um excesso de fósforo em relação ao cálcio, em média 1,53 % de fósforo e 0,15 % de cálcio (DESMONTS, 1968; SHACKLADY et al., 1973).

Quanto às vitaminas, pode-se afirmar que as leveduras são fontes muito ricas em vitaminas do complexo B, especialmente em tiamina, riboflavina, niacina e ácido pantotênico e são freqüentemente usadas como suplemento vitamínico em dietas de monogástricos. Além disso, as leveduras são ricas em ergosterol, o que as torna

excelente fonte de vitamina D (HSU, 1961; SCHULZ & OSLAGE, 1976; YOUSRI, 1982) . SHACKLADY et al. (1973) determinaram o teor de algumas vitaminas em leveduras cultivadas em parafina, tendo observado 180 mg/kg de riboflavina; 125 a 430 mg/kg de ácido nicotínico; 10 a 125 mg/kg de ácido pantotênico; 1430 a 3265 mg/kg de inositol e 2000 a 8300 mg/kg de colina. O relato do uso de levedura hidrolisada como suplemento vitamínico em dietas de peixes cultivados fornece um exemplo do potencial dos produtos da biomassa de levedura na alimentação de peixes (HUET, 1975).

2.2. Desempenho produtivo

O emprego de alguns métodos biológicos como critério de avaliação da fonte protéica, fornece informações mais compreensivas sobre a qualidade da proteína do que somente sua composição química.

Segundo SGARBIERI (1987), as proteínas podem diferir entre si em sua qualidade nutricional e isto está associado primariamente às diferenças no conteúdo de seus aminoácidos, especialmente daqueles considerados essenciais. O conhecimento, em si, do conteúdo de aminoácidos essenciais não é conclusivo para caracterizar a qualidade de uma proteína. Alguns índices, baseados em métodos químicos, microbiológicos e biológicos, estabelecem melhor a relação entre a composição da

proteína e sua qualidade nutricional. Entre outros índices, o autor destaca o escore químico, a digestibilidade da proteína e a taxa de eficiência protéica.

KIESSLING & ASKBRANDT (1993) avaliaram a qualidade nutricional de duas cepas de bactéria como fonte protéica na alimentação da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Apesar das condições experimentais serem idênticas em ambos experimentos, incluindo a composição bruta da dieta, o perfil de aminoácidos e ácidos graxos, os resultados foram marcadamente diferentes. O consumo alimentar médio para os dois tratamentos foi semelhante, mas provavelmente a menor disponibilidade dos aminoácidos e a presença de componentes tóxicos em uma proteína unicelular causaram o menor desempenho produtivo.

Utilizando níveis crescentes (0, 25 e 40 %) de levedura alcana, *Candida* sp., em substituição à farinha de peixe em péletes comerciais, na alimentação de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivada em água doce, MAHNKEN et al. (1980) verificaram que foi possível a substituição em todos os níveis testados, não havendo diferença no desempenho e sobrevivência dos peixes entre as dietas experimentais e o controle. Entretanto, quando foram testados níveis crescentes (0, 25, 50, 75 e 100 %) de substituição da farinha de peixe pela mesma levedura, em cultivo de salmão “coho” em água salgada, os resultados foram diferentes. A taxa de crescimento decresceu linearmente com o acréscimo da levedura na dieta.

Poucas pesquisas foram conduzidas utilizando a levedura, *S. cerevisiae* na alimentação de peixes de águas doces tropicais. Entretanto, vários trabalhos vêm sendo conduzidos há décadas com o objetivo de testar leveduras de petróleo produzidas comercialmente para a alimentação de diversas espécies de teleósteos, como por exemplo, carpa (*Cyprinus carpio*) (ATAACK et al., 1979; SHCHERBINA et al., 1987), tilápia (*Oreochromis mossambicus*) (DAVIES & WAREHAM, 1988), salmão “coho” (*Oncorhynchus Kisutch*) e truta arco-íris (*Salmo gairdneri*, *Oncorhynchus mykiss*) (SHIMMA & NAKADA, 1975; SHIMMA & SHIMMA, 1976; MAHNKEN et al., 1980; DABROWSKI et al., 1980; TACON & COOKE, 1980; RUMSEY et al., 1990; RUMSEY et al., 1991; RUMSEY et al., 1992).

Em ensaio com alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), BARROS et al. (1986) avaliaram os efeitos da substituição do farelo de soja por níveis crescentes (0, 40, 60 e 80 %) de levedura seca de álcool (*S. cerevisiae*). Foi constatada diminuição ($P < 0,05$) no peso e comprimento com o acréscimo de levedura na ração. ALVES et al. (1988), em experimento semelhante com tilápia-do-Nilo, quando a fonte protéica farelo de soja foi substituída por níveis crescentes (0, 33, 66 e 100 %) de levedura seca de vinhaça (*S. cerevisiae*) verificaram que esta nova fonte protéica pôde substituir até 36,97 % do farelo de soja sem prejuízos.

Com a finalidade de determinar a digestibilidade aparente da proteína em dietas para o híbrido tambacu (*Colossoma macropomum* ♀ x *Piaractus mesopotamicus* ♂),

utilizando fontes não convencionais de proteína em aquicultura, SOUZA & MATTOS (1989) testaram 4 dietas contendo levedura de fermentação alcoólica (*S. cerevisiae*) ou farinha de carne e ossos em, inclusões correspondentes a 25 ou 50 % da proteína bruta total da dieta. Foram obtidos coeficientes de digestibilidade aparentes superiores ($P < 0,05$) nas dietas incluindo levedura, com valores de 82,86 e 81,38 % (respectivamente 25 e 50 % de inclusão). Entre os fatores que influenciaram os resultados, os autores destacam o efeito interativo entre os nutrientes, o elevado teor nutritivo da levedura de fermentação alcoólica e, especificamente, o teor de fibra bruta das dietas.

Diversas fontes protéicas não convencionais, bactéria, alga, extrato concentrado de soja e levedura de petróleo ("Toprina"), produzidos comercialmente, foram avaliados por ATACK et al. (1979) em ensaio de crescimento com carpa comum (*Cyprinus carpio*). As dietas foram as mesmas utilizadas em ensaio anterior, com truta, para possível comparação dos resultados. Com base no desempenho produtivo (taxa de crescimento instantâneo, conversão alimentar, taxa de eficiência protéica, utilização líquida de proteína, digestibilidade e valor biológico), os autores concluíram que a carpa, assim como a truta, quando cultivada em tanques requer proteína de alta qualidade. As proteínas de bactérias e leveduras foram as fontes que apresentaram os melhores resultados, sendo que as demais não foram recomendadas para o cultivo intensivo da espécie.

MARTIN et al. (1993) observaram em ensaio com truta arco-íris (*O. mykiss*) que a digestibilidade protéica elevou-se com o acréscimo da biomassa seca de levedura *Candida utilis* (0, 25 e 35 % da PB) na dieta, com comportamento inverso para eficiência alimentar e taxa de eficiência protéica. Os resultados demonstraram que a inclusão da levedura não alterou o balanceamento das dietas e não causou significativa perda no desempenho de crescimento dos peixes.

Ao avaliar a utilização do nitrogênio pela truta arco-íris (*S. gairdneri*), alimentada com levedura *Hansenula anomala*, HIGUERA et al. (1981) constataram significativa decréscimo no consumo alimentar, ganho de peso e taxa de eficiência protéica.

RUMSEY et al. (1991) observaram que o crescimento e a utilização do alimento pela truta arco-íris (*O. mykiss*) decresceram ($P < 0,05$) quando o nível dietário de biomassa de levedura foi superior a 25 %, sendo detectado neste nível de substituição os melhores resultados de desempenho dos peixes.

TACON & COOKE (1980), conduziram estudo com truta arco-íris (*O. mykiss*) com o objetivo de determinar o valor nutricional de extrato de ácido nucléico. Testaram níveis baixo e intermediário (<25 %) e alto (50 %) de consumo de proteína unicelular. Todas as dietas testadas resultaram em ótima taxa de crescimento, não diferindo ($P > 0,05$) do controle, com exceção da dieta de maior inclusão de ácido nucléico, a qual apresentou resposta de crescimento muito fraca. Tendência similar

foi exibida para a eficiência de conversão alimentar. Apesar da alta digestibilidade aparente das dietas suplementadas com ácido nucléico (93,57 a 92,94 %) e do alto consumo de nitrogênio dos peixes, a deposição e eficiência aparente de deposição de nitrogênio foram mais baixas que nos peixes alimentados com a ração controle. É importante salientar que, embora, os autores tenham encontrado aumento ($P < 0,05$) na concentração de uréia plasmática e na atividade de uricase do fígado, nos peixes alimentados com o mais alto nível de ácido nucléico, não houve indicação de ação “economizadora” de nitrogênio. Assim, os autores sugerem que o nitrogênio do ácido nucléico não possui valor nutricional para peixes que recebam um suplemento adequado de nitrogênio de aminoácidos e, desta forma não deveria ser incluído nas estimativas de proteína bruta da dieta ($N \times 6,25$) ou nos cálculos de utilização líquida de proteína, baseado no consumo total de nitrogênio.

Em estudo semelhante, conduzido por RUMSEY et al. (1992), os resultados divergem do exposto acima. Os autores avaliaram os efeitos de níveis crescentes de extrato de RNA de levedura equivalentes a níveis dietários de 7,5, 20, 30 e 50 % de *S. cerevisiae*, adicionados a uma dieta basal purificada e fornecidos para truta arco-íris (*O. mykiss*). As dietas suplementadas com níveis crescentes de extrato de RNA apresentaram melhora ($P < 0,05$) no consumo alimentar, conversão alimentar, crescimento, utilização de nitrogênio e baixa mortalidade. Estes dados sugerem que a truta é capaz de utilizar o nitrogênio não protéico para biossíntese de aminoácidos

não essenciais, sugerindo o efeito de “economia” de nitrogênio, quando o RNA é adicionado à dietas deficientes em nitrogênio.

DAVIES & WAREHAM (1988) demonstraram, em experimento conduzido com tilápias (*O. mossambicus*), que até 40 % da farinha de peixe pode ser substituída por proteína unicelular, sem redução ($P > 0,05$) no desempenho produtivo. Substituições superiores resultaram em substancial redução na taxa de crescimento. O desbalanceamento em aminoácidos poderia ser um dos fatores que reduziu a utilização de proteína ou levou a uma queda no consumo. A baixa conversão alimentar das dietas que continham 15 a 20 % de proteína unicelular indicou uma progressiva redução do valor nutricional comparado à dieta controle. A presença de nitrogênio não protéico principalmente, dos ácidos nucléicos, afetou o cálculo do conteúdo “verdadeiro” de proteína bruta na formulação das dietas.

SHCHERBINA et al. (1987) determinaram a digestibilidade dos nutrientes da levedura do grupo *Candida* cultivada sobre hidrocarbonetos (“Paprin”), em ensaio com carpa (*C. carpio*). Os autores concluíram que a carpa foi capaz de digerir e absorver proteínas (88 %) e carboidratos (82 %). Os lipídios (67 %) e cinza (54 %), com exceção do fósforo (85 %), foram os menos assimilados. A utilização de energia foi de 85 %. A viabilidade dos 18 aminoácidos estudados foi de 93,4 % e dos 10 aminoácidos essenciais de 94 %. De acordo com o escore de assimilação, a ordem de limitação dos aminoácidos essenciais da levedura para a carpa foi a

seguinte: fenilalanina (54 %), histidina (72 %), arginina (83 %) e metionina (85 %). Comparando este estudo, em que o escore foi estimado pela ordem de assimilação e, o estudo que estima o escore pela concentração real de cada aminoácido na proteína do alimento (HSU, 1961; SHACKLADY et al., 1973; COZZOLINO, 1982), nota-se que para a carpa, a fenilalanina foi o aminoácido limitante, enquanto que a metionina foi facilmente absorvida, sendo contrário à maioria dos estudos sobre composição química, que apresentam a metionina como primeiro aminoácido essencial limitante em leveduras.

2.3. Fatores limitantes ao emprego da levedura como alimento

Problemas associados ao uso de proteínas unicelulares como fonte primária de proteína incluem dois fatores principais: a presença de paredes celulares rígidas, o nível elevado de ácidos nucléicos e a palatabilidade (SCHULZ & OSLAGE, 1976; SÁNCHEZ-MUNIZ et al., 1978 e 1982 ; TACON & COOKE, 1980; MATTOS et al., 1983; MURRAY & MARCHANT, 1986; ALVES et al., 1988; DAVIES & WAREHAM, 1988; RUMSEY et al., 1990; PACHECO, 1996).

ROBERTS & BULLOCK (1988) relataram que o consumo de dois tipos de proteínas unicelulares induziram a formação de carcinomas biliares em peixes. Segundo os autores, fontes protéicas deficientes em aminoácidos essenciais ou em proporções desbalanceadas geralmente promovem crescimento limitado do peixe, podendo o

mesmo apresentar sintomas como erosão da nadadeira dorsal, anormalidades na coluna vertebral e escurecimento da pele.

A deficiência em aminoácidos sulfurados e em tocoferol, levam ao desenvolvimento de uma necrose hepática em ratos, quando a levedura é utilizada na alimentação (McLEAN & BEVERIDGE, 1952).

As leveduras, quando consumidas vivas, continuam a atividade fermentativa no aparelho digestivo causando transtornos e avitaminoses pela absorção das vitaminas do bolo alimentar. A inativação das leveduras pode ser feita por termólise com rompimento da parede celular e liberação dos aminoácidos, aumentando sensivelmente o valor biológico desta fonte protéica (DESMONTS, 1968). A parede celular das células é resistente às enzimas digestivas, tornando os componentes intracelulares parcialmente indisponíveis. Segundo KIHLEBERG (1972), a extração da proteína celular melhora muito sua digestibilidade e valor biológico.

SCHULZ & OSLAGE (1976) atribuíram a baixa digestibilidade de algumas leveduras testadas, em ensaios com ratos à permanência da parede celular intacta de grande parte das leveduras, resultado também observado por MURRAY & MARCHANT (1986) em experimento com truta (*Salmo gairdneri*).

RUMSEY et al. (1991) recomendam a remoção ou quebra da parede celular das leveduras para facilitar a digestão das proteínas intracelulares na alimentação de salmonídeos. Quando as células de leveduras foram rompidas e fornecidas à truta, a absorção do nitrogênio aumentou em 20 % e a energia metabolizável em 10 %. A digestibilidade do nitrogênio foi de 87 % e não diferiu da farinha de peixe. RUMSEY et al. (1992) observou alta mortalidade em trutas que receberam adenina de levedura.

O problema de mais difícil solução para utilização de proteínas unicelulares para fins alimentícios consiste no alto conteúdo de ácidos nucleicos, principalmente o ácido ribonucleico (RNA), cuja quantidade pode atingir até um terço do total da proteína (SHETTY & KINSELLA, 1982).

PACHECO (1996) avaliou propriedades funcionais, nutricionais e tóxicas de concentrados protéicos de levedura (*Sccharomyces* sp.), obtidos por rompimento das células e, submetidos a diferentes tratamentos químicos para redução do conteúdo de RNA. Ensaio biológicos com ratos revelaram melhora na digestibilidade e utilização líquida de proteínas nos concentrados tratados, em comparação às células rompidas. Os tratamentos utilizados para extração dos ácidos ribonucleicos não provocaram efeitos tóxicos nos ratos, pois os índices séricos avaliados situaram-se dentro da faixa de normalidade.

2.4. Aspectos do metabolismo

2.4.1. Considerações gerais

Modificações na disponibilidade de substratos são direta ou indiretamente responsáveis pela maioria das alterações do metabolismo. Como mencionado anteriormente, o conteúdo em ácidos nucléicos da proteína de levedura pode variar entre 6 e 12 g / 100g (SCHULZ & OSLAGE, 1976). A hidrólise de proteínas de levedura que contenha 1 g de ácido nucléico produz aproximadamente 340, 260 e 400 mg de bases púricas e pirimídicas, ácido fosfórico e açúcar (pentose), respectivamente (HEAF & DAVIES, 1976). Estes valores fornecem indicação do potencial de uma dieta com ácidos nucléicos em alterar a composição dos fluidos corporais ou da capacidade de alguns tecidos em utilizar os produtos formados.

A maior parte dos ácidos nucléicos da dieta é ingerida na forma de nucleoproteínas, a partir das quais os ácidos nucléicos são liberados no conduto intestinal por ação de enzimas proteolíticas. Enzimas pancreáticas (nucleases) e intestinais (polinucleosidases e fosfatases) desdobram os ácidos nucléicos em nucleotídeos que a seguir são hidrolizados a nucleosídios por enzimas nucleotidases e fosfatases. Os vários nucleosídios podem ser absorvidos diretamente ou desdobrados por enzimas fosforilases intestinais à bases purínicas (adenina e

guanina, sendo hipoxantina e xantina intermediários no metabolismo das purinas) ou pirimidínicas (citosina, timina e uracila) livres (MARTIN Jr., 1982).

O catabolismo das bases nitrogenadas ocorre principalmente no fígado. Somente as purinas são convertidas pelas enzimas guanase e xantina oxidase a ácido úrico e urato de sódio, produtos muito pouco solúveis e, na ausência destas enzimas, não se forma o ácido úrico. Isto contrasta com o metabolismo das bases pirimidínicas que resultam em produtos finais altamente solúveis e são excretadas na forma de amônia, β -alanina e ácido β -aminoisobutírico, não causando problemas (MARTIN Jr., 1982).

Os produtos de excreção provenientes do metabolismo das purinas variam com a espécie animal. Nos mamíferos, exceto o homem e os macacos, há a enzima uricase que oxida o ácido úrico a alantoína ($\text{ácido úrico} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{uricase}} \text{alantoína} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$), que é posteriormente degradada a uréia e ácido glioxílico por uma série de enzimas e excretado (KINSELLA et al., 1985). Os anfíbios, aves e répteis não possuem uricase, excretando ácido úrico e guanina como produtos finais do metabolismo nitrogenado (MARTIN Jr., 1982).

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas em mamíferos que não possuem uricase (homem e macacos). O excesso de ácido úrico no sangue está associado a algumas condições dietárias incluindo jejum, alto consumo de frutose,

gorduras, proteína e ácido nucléico. Dos vários componentes dietários que afetam os níveis de ácido úrico, o consumo de ácido nucléico é o mais marcante (CLIFFORD & STORY, 1976). A elevação do ácido úrico produz efeitos tóxicos e distúrbios no metabolismo de gorduras e carboidratos (KIHLBERG, 1972).

Segundo WALTON (1988) a excreção nitrogenada tem sido vastamente estudada em peixes e foi demonstrado que entre 60 a 90 % do nitrogênio excretado está na forma de amônia, sendo o fígado o principal órgão de formação. Outros tecidos como rins e músculo têm menor importância na formação de NH_3 . Cerca de 90% desta substância é excretada pelas brânquias, sendo as vias urinárias menos representativas.

Estudos recentes sugerem que peixes são capazes de metabolizar doses relativamente elevadas de ácidos nucléicos por possuírem alta atividade hepática da uricase (HIGUERA, 1981; KINSELLA et al., 1985). RUMSEY et al., 1991 avaliaram os efeitos da concentração dietária da biomassa seca de levedura de cervejaria (*S. cerevisiae*) sobre a atividade da uricase do fígado em trutas arco-íris. A atividade da uricase hepática não foi afetada até o nível de 50 %, porém, causou um aumento maior que o dobro quando o nível de inclusão foi de 75 %.

O estudo da composição e da função dos componentes teciduais e do sangue do peixe é de fundamental importância para o conhecimento das condições biológicas

e bioquímicas normais e patológicas. Tais informações são particularmente importantes quando ajudam a interpretar as modificações induzidas por condições intrínsecas, como estado fisiológico e nutricional. Para tanto é necessário delimitar as faixas normais de seus valores. Entretanto, grandes variações podem ocorrer em função da idade, sexo, fatores genéticos, alterações ambientais e nutricionais. A Tabela 2 agrupa alguns dados de variáveis metabólicas analisadas em pacus (*P. mesopotamicus*) adultos (RANZANI-PAIVA & GODINHO, 1988), juvenis (SOUZA, 1994) e tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*) adulto (OLIVEIRA, 1993), mantidos em condições experimentais de criação.

Tabela 2. Valores de parâmetros metabólicas do pacu: Hematócrito (Hem, %), Glicemia (Gli, mg/100 g), Proteína plasmática (PP, g/100 ml), Ácidos graxos livres (AGL, $\mu\text{mol/ ml}$), Glicogênio do músculo (GM, g/%), Glicogênio do fígado (GF, g/ %), Lipídios totais do fígado (LTF, mg/%), Índice hepatossomático (IHS, %).

Autores	Valores das variáveis observadas							
	Hem	Gli	PP	AGL	GM	GF	LTF	IHS
1♂	-	64 a 200	2,1 a 7,6	-	-	-	-	0,9 a 1,5
1♀	-	43 a 200	2,1 a 8,0	-	-	-	-	0,9 a 1,2
2	40,89	67,83	4,74	0,34	0,024	2,20	3,15	1,27
3	-	95,99	4,01	0,35	-	4,59	2,43	1,56

1-pacu adulto (RANZANI-PAIVA & GODINHO,1988); 2- pacu juvenil (SOUZA, 1994); 3- tambacu adulto, híbrido o tambaqui x pacu (OLIVEIRA,1993).

2.4.2. Alterações metabólicas em peixes alimentados com dietas contendo levedura

A qualidade de um alimento “novo” deve ser avaliada não só sob o ponto de vista dos nutrientes, como também dos possíveis contaminantes e principalmente a

observação de alterações metabólicas que possam trazer ao organismo do animal (MOURA, 1985).

De acordo com MURAT (1981), estudos sobre controle metabólico de peixes mostram que estes podem estar baseados essencialmente na quantidade e qualidade da proteína da dieta. Desta forma, a digestão, assimilação, metabolismo intermediário e gliconeogênese parecem ser dependentes do suprimento de aminoácidos. Estudos sobre metabolismo nutricional de peixes têm demonstrado relação entre níveis de glicose e proteína da dieta. HERTZ et al. (1989) evidenciaram este fato em *C. carpio* e observaram que os níveis de glicose plasmática dos peixes que receberam dieta com teores elevados de proteína foram significativamente maiores que os dos peixes controle. Entretanto, CARNEIRO (1983), testando níveis crescentes de proteína em rações isocalóricas para o pacu (*P. mesopotamicus*), observou que o nível de proteína nas dietas não influenciou os níveis glicêmicos, mas causou uma diminuição nos níveis de ácidos graxos livres, evidenciando menor mobilização de reservas lipídicas em dietas de maior teor protéico.

Embora existam vários trabalhos sobre o desempenho produtivo de peixes alimentados com levedura, são poucos os que observaram as alterações metabólicas. SÁNCHEZ MUNIZ et al. (1978) investigaram variáveis hematológicas em trutas (*S. gairdneri*) alimentadas com proteína unicelular (*Hansenula anomala*). A

uréia plasmática apresentou tendência de aumento nas dietas com levedura e aumento significativo da amônia plasmática. Por outro lado, embora o ácido úrico plasmático não tenha alterado, foi detectado altos teores no rim. Os resultados sugerem um elevado metabolismo de proteínas e ácidos nucléicos, provavelmente como consequência da composição química das leveduras. Os níveis de proteína plasmática não foram afetados pelo consumo de levedura, mas a taxa albumina:globulina foi modificada. Os valores obtidos para hemoglobina e hematócrito foram similares nos dois grupos. As células vermelhas do sangue das trutas alimentadas com dieta à base de levedura, aumentaram significativamente (43 %). O decréscimo no consumo de alimento, distúrbios renais causados pelo acúmulo de ácido úrico e desordens no metabolismo de proteínas, podem explicar a eritropoiese anormal, levando à anemia microcítica e hipocrômica.

Na tentativa de melhor esclarecer os mecanismos que no estudo prévio causaram uma anemia hipocrômica e microcítica, SÁNCHEZ-MUNIZ et al. (1982) investigaram alterações dos eritrócitos de trutas arco-íris sob as mesmas condições. Foi observado um aumento em eritrócitos imaturos. Inclusões basófilas específicas detectadas nos eritrócitos das trutas alimentadas com levedura, ocorrem, segundo os autores, em várias anemias e estados patológicos, nos quais a biossíntese de hemoglobina é alterada. Todos eritrócitos imaturos apresentaram reação negativa para peroxidase, em contraste aos maduros e, isto indicou uma possível alteração no mecanismo de peroxidação dos eritrócitos imaturos, com menor proteção destes

contra o excesso de peróxido de hidrogênio, produzido durante a degradação dos ácidos nucleicos. Alterações no metabolismo das células imaturas levaram à formação de Met-Hb não funcional, que não se regenera a Hb funcional. Uma demanda por oxigênio aumentou os estímulos para a eritropoiese e conseqüentemente a produção de formas jovens imaturas.

Em outras espécies animais também tem se observado efeitos nefrotóxicos pelo acúmulo de ácido úrico nos rins, com distúrbios no metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos (CLIFFORD & STORY, 1976; HEAF & DAVIES, 1976). PÓO & MILLÁN (1990) não observaram alteração na relação hepatossomática em frangos alimentados com rações contendo alta concentração de levedura. No entanto, a relação peso do rim / peso do corpo aumentou com a concentração da levedura nas rações. A alta concentração de ácido úrico observada nos tecidos, seria um indicador dos efeitos do consumo de levedura, sendo mais sensível que o ácido úrico plasmático. Não foram observadas alterações nos parâmetros lipídicos plasmáticos. No entanto, os lipídios totais hepáticos apresentaram ligeira tendência de queda em resposta ao incremento de levedura dietária.

Em estudo com ratos, HEAF & DAVIES (1976) administraram altas doses de RNA derivado de levedura (*Torula*). Foi observado aumento nos níveis plasmáticos de ácido úrico e uridina, sendo isto pouco significativo quando comparado ao alto conteúdo de uracil plasmático, que aumentou mais de vinte vezes em relação ao

controle. Comparando a composição do citoplasma dos eritrócitos e do plasma, os autores observaram que a concentração de uracil foi de mesma ordem, sugerindo que possa ter ocorrido transporte tanto de uracil como de uridina nos eritrócitos. Com relação às purinas, estas não foram detectadas no plasma, mas sim nos eritrócitos, conseqüentemente deve-se esperar que cause alguma alteração nos eritrócitos.

As purinas presentes no ácido nucléico (adenina, guanina, xantina e hipoxantina) foram avaliadas separadamente em ensaio de crescimento e comportamento metabólico em ratos por CLIFFORD & STORY (1976). A adenina foi a única base que reduziu consideravelmente o consumo alimentar e a taxa de crescimento e que aumentou a atividade das enzimas adenina fosforribosiltransferase, 5'-nucleotidase e adenosina deaminase do fígado, bem como as concentrações de adenina livre e isto foi evidente no menor nível dietário testado, 0,1 %. As demais purinas fornecidas não produziram efeitos consistentes nas concentrações das enzimas hepáticas, exceto a xantina, que aumentou a atividade da hipoxantina fosforribosiltransferase

RUMSEY et al. (1992) conduziram experimento similar, com truta arco-íris (*O. mykiss*), com objetivo de avaliar os efeitos das bases purínicas livres, extraídas do RNA de levedura (*S. cerevisiae*). Corroborando o experimento anterior com ratos, a adenina foi a única base que demonstrou ser um potente inibidor do consumo

alimentar e crescimento, além de possível toxicidade, demonstrada pela alta mortalidade dos peixes que receberam este tratamento. Em experimento conduzido paralelamente, os autores não observaram efeitos negativos no desempenho produtivo quando foram fornecidos níveis crescentes de extrato de RNA da mesma levedura. Assim, os resultados indicaram que a adenina livre ou ligada ao ácido nucléico é de importante consideração quando se avalia a levedura.

Ao avaliar os efeitos da incorporação de levedura (*Candida sp*) em ração comercial para o salmão “coho” (*O. kisutch*), MAHNKEN et al. (1980) concluíram que a saúde dos animais permaneceu normal em todos os níveis testados. Os valores de hematócrito não se alteraram, sugerindo a não ocorrência de anemia e da mesma forma, não ocorreu estresse nutricional sugerido por hiperglicemia.

TACON & COOKE (1980) avaliaram os efeitos do fornecimento de extrato de ácido nucléico comparável a níveis: baixo, intermediário e alto de proteína unicelular na dieta para truta (*O. mykiss*). Não foi observada diferença aparente entre os tratamentos em termos de índice hepatossomático e valor de hematócrito. Foi detectado aumento ($P < 0,05$) na concentração de uréia plasmática e atividade da uricase do fígado de trutas que receberam dieta com maior concentração de ácidos nucléicos, comparado com os peixes da dieta controle. A alta digestibilidade aparente das rações suplementadas com ácido nucléico e o aumento concomitante da uréia plasmática e atividade de uricase do fígado levaram os autores a supor que

o extrato de ácidos nucléicos estava sendo assimilado e metabolizado pelos peixes a produtos finais de excreção, não dando nenhum ganho de nitrogênio aos animais.

HIGUERA et al. (1981) estudaram os produtos finais do metabolismo do nitrogênio no plasma, fígado e rim de trutas (*S. gairdneri*) alimentadas com levedura (*Hansenula anomala*). Foi observado aumento da uréia plasmática e isto foi atribuído ao alto catabolismo de nucleotídeos, uma vez que o consumo de proteína decresceu com o aumento de levedura. Dietas com levedura não influenciaram o ácido úrico do fígado. Isto sugere que a uricase do fígado deve estar presente e ativa em quantidades suficientes para metabolizar o ácido úrico extra. Além disso, o índice hepatossomático, tomado como indicador das condições do fígado, não foi afetado pelas dietas experimentais. O ácido úrico do rim foi aumentado em três vezes nas trutas alimentadas com dietas de levedura. Este resultado pode ser atribuído tanto à baixa concentração de uricase no rim, quanto à inibição desta enzima pelo acúmulo do substrato ou produto de reação.

Ao avaliar os efeitos da utilização da levedura de petróleo na alimentação da truta arco-íris (*S. gairdneri*), SHIMMA & NAKADA, (1975) notaram que o padrão típico de ácidos graxos da levedura é mais nitidamente refletido na carcaça que no fígado. Os lipídios hepáticos dos peixes que receberam dieta contendo farinha de peixe apresentaram conteúdos mais elevados de colesterol que os peixes alimentados com proteína unicelular.

SHIMMA & SHIMMA (1976) observaram que trutas (*S. gairdneri*) alimentadas com dieta contendo levedura de petróleo apresentam concentração plasmática de colesterol mais baixa que os peixes do controle. Após submeter o grupo controle por 10 dias de jejum, o colesterol plasmático atingiu valores próximos ao grupo tratado com levedura.

MOURA et al., (1979) ao avaliarem a influência da levedura (*S. cerevisiae*) em parâmetros bioquímicos de ratos, observaram aumento significativo de lipídios totais hepáticos nos animais alimentados com proteína unicelular, em relação ao grupo controle. Isto foi atribuído às diferenças na síntese de lipoproteínas de baixa densidade, levando a um acúmulo de gordura no fígado.

2.4.3. Características estruturais do fígado de peixes

A literatura relativa a características estruturais do fígado de peixes de água doce, em geral, é pouco elucidativa, principalmente quanto a alterações em função das fontes alimentares. A respeito do fígado dos vertebrados, ELIAS & BENGELSDORE (1952) relataram que sua estrutura é uniforme a partir dos peixes *selachios*. Mas, segundo MISHRA et al. (1988), várias modificações são observadas a nível morfológico e histológico do aparelho digestivo de peixes, devido a variedade dos padrões de alimentação.

MORAES (1995) realizou estudo morfológico e morfométrico do fígado de onze espécies de peixes teleósteos de água doce, incluindo o pacu. Os dados da cariometria evidenciaram diferenças ($P < 0,01$) entre os hepatócitos das onze espécies. No pacu, foram encontradas as maiores células, e na carpa as menores. Segundo o autor, as diferenças devem estar relacionadas ao hábito alimentar, o que altera a morfologia do aparelho digestivo, com a presença de pigmentos diversificados e número de hepatócitos. Espécies com células hepáticas menores podem apresentar um número compensatório destas.

Em estudo com alevinos de “milkfish” (*Chanos chanos*), STORCH et al. (1983) testaram os efeitos de diferentes tipos de dietas, fornecidas após sete dias de jejum, sobre as características dos hepatócitos. Foi demonstrado que estas células respondiam diferentemente ao tipo de dieta, envolvendo alterações em seu tamanho, retículo endoplasmático, mitocôndrias e nos conteúdos de glicogênio e lipídio. O alimento vivo e a dieta rica em proteína resultaram em melhor recuperação dos hepatócitos após jejum. Ficou demonstrado a correlação entre diferentes dietas e estrutura dos hepatócitos e que isto pode determinar a aceitabilidade e qualidade do alimento.

STORCH & JUARIO (1983) observaram que os alevinos de “milkfish” submetidos ao jejum, apresentaram redução do tamanho das células e do núcleo, perda aparente

do nucléolo, condensação da cromatina e diminuição nos estoques de glicogênio entre outras alterações dos hepatócitos.

Estudos sobre síntese protéica relacionado à alterações de RNA e DNA da célula devido ao estado nutricional, tem sido vastamente estudado (MOURA, 1985). Segundo o autor, a divisão e o crescimento celular são vulneráveis aos efeitos da desnutrição e da qualidade da proteína. O crescimento celular corresponde à síntese de novas proteínas, realizados pelos polissomos, que depende de suplementação de aminoácidos e nucleotídeos. De um modo geral a deficiência em aminoácidos sulfurados conduz a um decréscimo na quantidade de poliribossomos pesados no fígado, reduzindo a velocidade de síntese de r-RNA e das proteínas hepáticas.

MOURA & ZUCAS (1981) avaliaram o valor biológico da levedura *S. cerevisiae* em ensaio com ratos e observaram que o teor hepático de RNA e DNA (mg/g), do grupo que recebeu levedura diferiu significativamente do controle. Isto foi atribuído à deficiência no aminoácido sulfurado metionina, que participa como doador de grupamentos metílicos de derivados do DNA e RNA, à redução na atividade da DNA polimerase ou à hiperfrosia hepática. Também foi sugerido que a qualidade da proteína da levedura pode ter influenciado a velocidade de divisão celular.

CLIFFORD & STORY (1976) observaram, em experimento com ratos, que níveis hepáticos de nucleotídeos de adenina e guanina elevam-se com o acréscimo respectivamente de cada nucleotídeo na dieta. Isto provavelmente reflete a incorporação direta de purinas da dieta nos nucleotídeos purínicos do fígado. Em estudo com truta arco-íris, RUMSEY et al. (1992) também observaram que o acréscimo de RNA de levedura na dieta aumentou ($P < 0,01$) a concentração de ácidos nucléicos no fígado. Segundo os autores, sendo o fígado o local primário do metabolismo dos ácidos nucléicos, níveis elevados refletem sua incorporação no tecido hepático. Entretanto o significado não é claro, pois a inclusão ácidos nucléicos na dieta não é considerada essencial para o desenvolvimento.

TACON & COOKE (1980) estudaram os efeitos de doses crescentes de extrato de ácidos nucléicos na alimentação de truta arco-íris (*O. mykiss*). Não foi observado diferença aparente entre os tratamentos quanto à histologia de fígado e rim, índice hepatossomático e valor de hematócrito. RUMSEY et al. (1991) ao incorporar doses crescentes de biomassa seca de levedura de cervejaria em dietas para truta arco-íris também não observaram alterações patológicas e histológicas no fígado e rins. Utilizando a levedura *S. cerevisiae* na alimentação de ratos até a terceira geração, COZZOLINO (1982) não observou problemas de ordem toxicológica, sendo que as análises histológicas mostraram-se normais. Em experimentos com rato em crescimento, MATTOS et al. (1983) substituíram até 100 % da fonte protéica pela levedura de fundo de dorna (*S. cerevisiae*) e verificaram que seu fornecimento não

causou prejuízo à saúde dos animais, por não apresentarem alterações histológicas no fígado, rins, baço e intestino.

2.5. Exigência protéica do pacu

O nível ótimo de proteína em dietas para peixes é influenciado e interage com muitos fatores como: condições ambientais, estado fisiológico, hábito alimentar, atividade física, densidade de estocagem, digestibilidade da proteína, relação energia:proteína, composição de aminoácidos da dieta, taxa de arraçoamento (OGINO,1980; NRC, 1983; HEPHER,1988; WILSON, 1988; WEATHERLEY & GILL, 1989). Desta forma, deve-se ter precaução ao comparar resultados de experimentos realizados sob diferentes condições.

Em condições naturais, o pacu (*P. mesopotamicus*) é uma espécie predominantemente herbívora, com preferências frugívora e / ou granívora, podendo incluir em sua dieta ítems secundários como peixes, crustáceos e às vezes, moluscos (SILVA, 1985). Tal diversidade alimentar, segundo SAINT'PAUL (1986), favorece o cultivo desta espécie em cativeiro, uma vez que está apta a receber ingredientes de origem vegetal e subprodutos de origem agrícola, o que reduz o custo de produção, no tocante à alimentação.

SOUZA & MATTOS (1989) avaliaram duas fontes alternativas de proteína, a levedura de fermentação alcoólica (*S. cerevisiae*) e a farinha de carne e ossos para alimentação do híbrido tambacu. Foi obtido maior coeficiente de digestibilidade ($P < 0,05$) nas dietas incluindo levedura, sugerindo que esta combinação apresentava a composição mais compatível com o hábito alimentar das espécies que formam o híbrido, favorecendo a ação das enzimas no processo digestivo.

DABROWSKI et al.(1980) conduziram três experimentos com truta arco-íris (*S. gairdneri*) para determinar se a proteína unicelular *Geotricum candidum* poderia substituir 100, 75, ou 50 % da farinha de peixe em dietas peletizadas. Foi possível concluir que substituições superiores a 50 % causaram significativo decréscimo no ganho de peso, taxa de eficiência protéica e utilização líquida de proteína. Foi observado, efeito marcante do tamanho dos peixes sobre os resultados. KITAMIKADO et al. (1964) e SATIA (1974) em trabalho com truta arco-íris também mostraram efeito do tamanho do animal sobre ação de dietas, sugerindo mudanças na exigência em fases diferentes do crescimento.

BRENER et al. (1988) determinaram a exigência em proteína bruta para o máximo desempenho produtivo de alevinos de pacu (22,2 g), utilizando dietas semipurificadas. A exigência média, no primeiro período experimental (67 dias), foi de 35,9 % e, no segundo (91 dias) não houve efeito dos níveis de PB sobre o desempenho. No período total (158 dias) a exigência média de PB foi de 37,3 %.

Por meio da avaliação do desempenho produtivo de alevinos de pacu (39 g), CARNEIRO (1983) observou que os valores de ganho de peso e crescimento se elevaram linearmente com os teores de 14, 18, 22, e 26 % de proteína bruta na dieta, supondo-se que a exigência protéica pode ser maior que 26 %.

Com o objetivo de determinar a influência da relação energia/proteína da dieta no desempenho produtivo de alevinos de pacu, CANTELMO et al. (1994) testaram três níveis de proteína bruta e energia digestível. Os melhores resultados para ganho em peso, taxa de crescimento específico e ganho de proteína corporal foram obtidos com níveis de proteína e energia respectivamente de 26 % e 2600 kcal ED/kg ração.

SILVA et al. (1994) avaliaram o teor de proteína na ração (20, 26 e 32 %) para pacus cultivados em tanque-rede sob diferentes taxas de estocagem (30, 60 e 90 peixes/m³), utilizando rações isocalóricas (4000 kcal/kg ração). Não houve interação entre os fatores estudados. A conversão alimentar aparente melhorou linearmente à medida que se elevou a densidade de estocagem e o teor de PB da ração.

A exigência em aminoácidos essenciais é um dado básico necessário quando se pretende utilizar fonte protéica alternativa, como plantas ou proteínas unicelulares, as quais são deficientes em certos aminoácidos.

Segundo WILSON (1988), a exigência qualitativa de aminoácidos foi estudada com sucesso por Halver, em 1957. A essencialidade dos vários aminoácidos para peixes tem sido determinada tanto por estudos de crescimento como de substrato marcado com ^{14}C . Com base nestes estudos, várias espécies têm demonstrado exigir: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina.

SILVA (1986) avaliou a essencialidade dos aminoácidos metionina e treonina na nutrição do pacu e, a ocorrência de opérculos defeituosos e, o menor ganho de peso nos peixes com dietas deficientes, evidenciaram tal essencialidade.

A exigência quantitativa em aminoácidos essenciais para peixes tem sido determinado pelo seu fornecimento, em níveis graduais, em dietas teste para produzir curvas de dose-resposta. Entretanto, dietas semipurificadas ou purificadas nem sempre são adequadamente assimiladas. Alternativamente, a concentração de aminoácidos livres no sangue, a oxidação de aminoácidos marcados radioativamente ou a determinação da deposição diária de aminoácidos no corpo do peixe têm sido utilizada para determinar a exigência quantitativa, estimada somente para cinco espécies: carpa comum (*Cyprinus carpio*), truta arco-íris (*O. mykiss*), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), enguia japonesa (*Anguilla japonica*) e salmão “chinook” (*Oncorhynchus tshawytscha*) (WEATHERLEY & GILL 1989; TACON, 1987).

Alguns estudos relatam que o padrão de aminoácidos essenciais (AAE) do corpo inteiro, tecido muscular ou “ova” podem ser usados como estimativa do requerimento na formulação de dietas. Comparando os dados obtidos em ensaios pelos métodos anteriormente descritos e a proporção relativa dos mesmos dez aminoácidos essenciais presentes no corpo não foi constatada diferença (ARAI, 1981; KETOLA, 1982; WILSON & POE, 1985; GATLIN, 1987; OSTROWSKI & DIVAKARAN, 1989).

Segundo COWEY & LUQUET (1983), tem sido encontrada alta correlação entre composição de aminoácidos do músculo e a exigência obtida por estudos de dose-resposta para muitas espécies de peixes. Os autores sugerem que, sendo o músculo o principal tecido em formação nos peixes em crescimento, sua composição em aminoácidos indica o padrão exigido nas dietas.

A composição em aminoácidos no músculo é extremamente constante entre espécies de peixes e, parece não ser afetada por fatores biológicos como sexo, idade, maturidade sexual ou dieta (MASLENNIKOVA, 1974). NJAA & UTNE (1984) analisaram a composição em aminoácidos de 15 espécies de peixes marinhos e verificaram notável similaridade, com exceção ao alto conteúdo de histidina em peixes pelágicos. MAI et al. (1980), determinaram a composição em aminoácidos de seis espécies de água doce do lago Cayuga (Ithaca, NY), sem observar variação significativa na concentração de cada aminoácido nas diferentes espécies.

A composição em aminoácidos das ovas e da proteína corporal em três grupos de tamanho do bagre do canal foi determinada por WILSON & POE (1985). A composição em aminoácidos do corpo inteiro não diferiu com o tamanho do peixe, entretanto para a ova foi observada diferença com a proteína corporal. Uma correlação positiva foi observada pela regressão do padrão de exigência sobre o padrão de proteína corporal. Estes dados indicam que o perfil de aminoácidos do corpo inteiro, independente do tamanho do peixe, é válido como estimativa quando a exigência quantitativa ainda não foi determinada em estudos de crescimento. De outra forma, quando o requerimento quantitativo de um determinado aminoácido essencial (em geral lisina) obtido em ensaio de crescimento é conhecido, o requerimento para os outros nove AAE pode ser estimado pelo ajuste de seus níveis de acordo com a composição corporal (WILSON *)

Segundo TACON (1987), na falta de informação precisa sobre a exigência em aminoácidos essenciais para uma espécie, este pode ser calculado com base no padrão de AAE do corpo inteiro, já que os aminoácidos essenciais (incluindo cistina e tirosina) constituem cerca de 35 % do total da exigência protéica na maioria dos peixes já estudados.

* WILSON, R.P. (Palestra conferida na Faculdade de Ciências Agrária e Veterinária - UNESP - Campus de Jaboticabal) Comunicação pessoal, 1995.

Assim, adaptando a fórmula sugerida pelo autor, para o pacu, cuja exigência em proteína bruta foi aceita como 26 %, teremos: 26 % x 35 % x % do AAE no corpo/ 10000 = % do AAE requerido (expresso na base de 100 % de matéria seca, i.e. 26 % de PB na ração). A composição em aminoácidos da proteína do músculo do pacu, determinada por MACHADO (1989) e MAIA (1992), encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Composição em aminoácidos na proteína do músculo do pacu, e comparação de sua exigência estimada com a determinada para a carpa.

Aminoácidos Aas	1	2	3* gAA / 16gN	4*	5*
Triptofano	nd	nd	nd	0,7(0,24/35)	0,8 (0,3/38,5)
Lisina	10,0	12,5	4,38(1,14/26)	5,3(1,85/35)	5,7(2,2/38,5)
Histidina	2,2	3,6	1,27(0,33/26)	1,3(0,45/35)	2,1(0,8/38,5)
Arginina	6,6	8,2	2,88(0,75/26)	3,9(1,36/35)	4,2(2,6/38,5)
Valina	3,9	7,0	2,46(0,64/26)	3,0(1,05/35)	3,6(1,4/38,5)
Treonina	3,8	5,8	2,04(0,53/26)	3,2(1,15/35)	3,9(1,5/38,5)
Metionina	2,8	2,0	0,69(0,18/26)	1,6(0,56/35)	3,1(1,2/38,5)
Isoleucina	4,5	6,2	2,15(0,53/26)	2,3(0,80/35)	2,3(0,9/38,5)
Leucina	8,8	11,3	3,96(1,03/26)	4,2(1,47/35)	3,4(1,3/38,5)
Fenilalanina	4,3	5,8	2,04(0,56/26)	3,0(1,05/35)	6,5(2,5/38,5)
Alanina	5,1	7,8	nd	nd	nd
½ Cistina	0,8	0,8	0,27(0,07/26)	0,8(0,28/35)	nd
Ác. Aspártico	10,5	12,9	nd	nd	nd
Serina	nd	4,9	nd	nd	nd
Ác. Glutâmico	19,8	21,8	nd	nd	nd
Prolina	nd	4,5	nd	nd	nd
Tirosina	3,8	4,9	1,73(0,45/26)	2,0(0,70/35)	nd
Glicina	nd	5,9	nd	nd	nd

AAs na proteína do músculo do pacu 1. (MACHADO, 1989), 2. (MAIA, 1992), 3. requerimento em AAE estimado para o pacu segundo TACON, 1987, 4. requerimento em AAE para carpa (OGINO,1980), 5. requerimento em AAE para carpa (NRC,1983), * expresso em porcentagem da proteína, e entre parênteses, o numerador é o requerimento como porcentagem da dieta e o denominador é a porcentagem total de proteína da dieta, nd = não determinado.

2.6. Composição corporal

O conhecimento da composição corporal dos peixes fornece informações para se determinar níveis adequados de substituição dos ingredientes utilizados na dieta,

assim como a melhor conversão alimentar em conexão com a demanda de qualidade pelos consumidores.

As principais classes de substâncias presentes no corpo dos peixes são as mesmas dos outros animais, sendo nos peixes, 70 a 80 % constituídos por água, 20 a 30 % por proteínas, 2 a 12 % por lipídios e em menores quantidades carboidratos e minerais, apresentando variações em função da espécie, tamanho, condição fisiológica, alimentação e condições ambientais (WEATHERLEY & GILL,1989). Segundo ZEITLER et al.(1984), o nível de arraçoamento e o balanceamento em nutrientes das dietas são as variáveis que têm maior influência sobre a composição corporal.

LOVE (1980) enunciou que um aumento na concentração de qualquer constituinte corporal, seja água, lipídios ou proteínas, leva a um decréscimo do outro e, desta forma, a soma permanece aproximadamente constante.

ECKMANN (1987) testou duas fontes protéicas e diferentes níveis de proteína em ensaio com juvenis de tambaqui (*C. macropomum*). Foi observado que a taxa de crescimento e a composição corporal foram fortemente influenciados pela qualidade dos alimentos. As taxas de crescimento, de 1,1 a 2,5 % de ganho de peso seco/ dia, foram proporcionais aos níveis de proteína bruta (25 a 37 %), enquanto que o conteúdo de matéria seca do corpo inteiro (35 a 26 %) foi inversamente proporcional

à taxa de crescimento. A composição corporal dos peixes de crescimento mais rápido apresentou os mais altos níveis de proteína (53 %) e mais baixos de gordura (26 %). Variações na taxa de crescimento e composição corporal em relação à qualidade do alimento foram também observados para truta arco-íris (PAPOUTSOUGLOU & PAPAPARASKEVA PAPOUTSOUGLOU, 1978).

Vários autores têm observado em diferentes ensaios, como os de restrição alimentar (SOUZA, 1994), níveis de arraçoamento (CARNEIRO et al. 1994), relação proteína / energia da ração (ZEITLER et al. 1984) e níveis de proteína (MILLIKIN, 1982), que o conteúdo de gordura corporal relaciona-se inversamente aos de água, proteína e minerais.

RUMSEY et al. (1992) conduziram estudos com truta arco-íris (*O. mykiss*) alimentadas com dietas contendo níveis crescentes (0,6; 1,6; 2,5; e 4,1 %) de extrato de ácido nucléico de levedura, correspondentes a níveis de 7,5; 20; 30 e 50 % de *S. cerevisiae* na dieta. A proteína e a gordura corporal não foram afetadas em qualquer nível do extrato, mas os três níveis mais elevados de inclusão causaram significativo aumento em cinzas. Aumento semelhante nos valores de cinza corporal causado por altos níveis de ácidos nucléicos foi observado por outros autores (TACON & COOKE, 1980; DAVIES & WAREHAM, 1988). Foi especulado por estes autores que o ácido nucléico da dieta reduziu a motilidade do intestino, desta forma aumentando o tempo disponível para digestão e absorção de minerais. Peixes

alimentados com biomassa de levedura apresentaram conteúdo corporal de proteína bruta e cinza mais elevados, com níveis de lipídios mais baixos que os peixes do grupo controle, nos estudos de DABROWSKI et al. (1980); MAHNKENN et al. (1980) e, MARTIN et al.(1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Duzentos e cinquenta exemplares de juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (= *Colossoma mitrei*, BERG, 1895), pesando em média 40 g, cedidos pelo Setor de Piscicultura da Universidade Federal de Goiás e provenientes de uma mesma desova induzida, permaneceram por um período de aclimação de 15 dias, em viveiro externo, do Centro de Aqüicultura da UNESP - Campus de Jaboticabal. Posteriormente os animais foram transferidos para os tanques experimentais, onde o trabalho foi conduzido por 87 dias a partir de 22 de novembro de 1993.

A levedura de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*), utilizada neste estudo, denominada levedura de recuperação, é obtida por fermentação anaeróbica do mosto açucarado e separada por centrifugação do vinho, com posterior secagem do leite de levedura, constituindo-se em um

subproduto do processo de produção do álcool. A levedura utilizada foi doada à UNESP, pela Destilaria Santa Adélia S/A, situada em Jaboticabal, SP, safra de outubro de 1993.

3.1. Delineamento e condições experimentais

Utilizando delineamento em blocos casualizados (DBC), num esquema de parcela subdividida no tempo (“Split Plot in Time”), foram testados cinco níveis (0, 25, 50, 75 e 100 %) de substituição da farinha de peixe por levedura seca de álcool, com duas avaliações no tempo (aos 45 e 87 dias do início do experimento). Foram constituídos quatro blocos de peso e comprimento médios iniciais respectivamente de: A = $28,1 \pm 3,9$ g e $9,6 \pm 0,4$ cm, B = $32,7 \pm 5,4$ g e $10,0 \pm 0,4$ cm, C = $40,9 \pm 6,4$ g e $10,8 \pm 0,6$ cm e D = $55,4 \pm 9,5$ g e $11,8 \pm 0,7$ cm, sendo cada um designado aos 5 tratamentos e, aleatoriamente, aos vinte tanques experimentais, cada bloco constituindo uma parcela com dez peixes.

Todos os peixes do experimento foram submetidos a uma semana de adaptação às instalações e ao manejo, recebendo ração comercial, com 22 % de proteína bruta, duas vezes ao dia. Após o período de adaptação, foi feita a biometria para peso e comprimento e iniciaram-se os tratamentos. Foi mantido um estoque excedente de peixes em outro tanque, para reposição de animais, caso ocorressem perdas, antes de iniciarem os tratamentos e que após este período foram liberados.

Utilizaram-se vinte tanques retangulares de alvenaria, de 1,85 m de comprimento por 0,90 m de largura e 0,80 m de profundidade, com capacidade para 1330 l, instalados no interior de uma estufa, com cobertura de tela de nylon. Os tanques foram providos de fluxo individual e contínuo de água e com sistema de escoamento no fundo (Figura 1). Antes do povoamento com os juvenis de pacu, procedeu-se à análises limnológicas, para confirmar a qualidade adequada da água. Semanalmente e, também, sempre que necessário, os tanques foram sifonados, retirando-se os resíduos e algas que se desenvolviam no fundo e paredes. A densidade de estocagem foi de aproximadamente 300 g/m^2 , equivalente a uma biomassa de 300 kg/ha. Os peixes foram observados diariamente quanto a apresentação de comportamento incomum, variações morfológicas e mortalidade.

3.2. Dietas e manejo alimentar

Foram utilizadas cinco dietas isoprotéicas e isocalóricas com aproximadamente 26 % de proteína bruta (PB) e 4,0 kcal de energia bruta /g ração. A fonte protéica animal, farinha de peixe, foi substituída por níveis crescentes de levedura seca de álcool e todas as dietas continham os mesmos ingredientes vegetais, em diferentes proporções, para possibilitar o balanceamento. A análise bromatológica dos ingredientes (Tabela 4) e posteriormente das rações (Tabela 5) foram realizadas pelo esquema de Weende. O nitrogênio total foi determinado pelo método microkjeldahl e a proteína bruta foi calculada multiplicando-se o conteúdo de

nitrogênio da amostra pelo fator 6,25 (SILVA, 1990). Uma amostra de farinha de peixe, levedura e cada dieta, foi moída, peneirada, homogeneizada e desengordurada para determinação analítica de aminoácidos totais pelo método de cromatografia de troca iônica (Tabela 6).

Tabela 4. Composição química aproximada dos ingredientes, expressa na base de 100% MS

Nutrientes	Ingredientes					
	Milho	F. Trigo	F. Arroz	F. Soja	F. Peixe	Levedura
Proteína Bruta (%)	8,31	14,61	13,56	48,30	56,00	32,64
Extrato Etéreo (%)	4,19	3,80	15,67	0,70	5,95	0,81
Matéria Seca (%)	87,72	87,71	89,28	90,50	93,73	89,13
Fibra Bruta (%)	2,21	9,75	11,46	4,11	-	-
Material Mineral (%)	0,20	5,28	10,56	6,20	36,93	3,25
ENN ¹ (%)	72,71	54,27	38,03	31,19	-	52,43

*Laboratório de Nutrição Animal - UNESP - Jaboticabal ¹- ENN = extrativos não nitrogenados

Tabela 5. Composição percentual, calculada e determinada das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	TRATAMENTO -(níveis de substituição %)				
	1 - (0)	2 - (25)	3 - (50)	4 - (75)	5 - (100)
Milho	39,10	30,53	24,90	17,30	11,35
F. Trigo	10,75	13,00	10,00	9,00	7,00
F. Arroz	12,50	14,40	18,00	22,00	25,00
F. Soja	13,40	13,70	14,50	15,02	15,85
Levedura	0,00	9,95	20,00	29,88	39,80
F. Peixe	23,25	17,42	11,60	5,80	0,00
Supl. min. vitam. ¹	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Compos. Calculada (Compos. Determinada por análise)					
Proteína Bruta (%)	26,01(28,00)	26,01(26,16)	26,00(27,82)	26,00(27,39)	26,00(27,47)
Extrato Etéreo (%)	6,33 (6,60)	6,11 (6,38)	6,11 (6,04)	6,15 (5,75)	6,09,,(5,87)
Matéria Seca - MS (%)	88,81(91,56)	88,63(91,24)	88,50(91,36)	88,37(91,30)	88,23(90,81)
Fibra Bruta (%)	3,89 (2,31)	4,16,,(3,45)	4,18 (2,68)	4,40 (2,48)	4,45 (2,41)
Mat. Mineral (%)	11,38 (8,17)	9,87,,(7,91)	8,31 (6,96)	6,88 (6,53)	5,31 (5,75)
ENN (%)	41,19(46,48)	42,49(47,34)	43,90(47,86)	44,95(51,63)	46,38(49,31)
Ener. Br., kcal/kg	4059,70	4056,20	4052,90	4050,90	4047,31

*Laboratório de Nutrição de Peixes e Laboratório de Nutrição Animal - UNESP - Jaboticabal

¹- Rovimix (Roche) = em 1000 g: vit. A 9.000.000UI; vit.E 10.000 UI; vit. K3 4 g; vit.B1 2 g; vit.B2 5g; vit.B6 5 g; vit. B12 40 mg; ác. nitotínico 40 g; ác. pantotênico 25 g; bacitracina de zinco 10 g; anti-oxidante 30 g; selenito 50 g; - Rologomix (Roche) = quantidade em 500 g: ferro 90 g; cobre 10 g; cobalto 2 g; manganês 40 g; zinco 70 g; iodo 2 g.

Determinada a composição em aminoácidos das dietas experimentais e das duas fontes protéicas (g AA/100 g de proteína), a qualidade das proteínas totais foi avaliada pelo cálculo do escore químico (EQ) e índice de aminoácidos essenciais

(IAAE). Ambos os métodos comparam os aminoácidos da proteína testada com aqueles da proteína do ovo (NRC, 1983), reconhecidas como completa e de alto valor biológico para peixes (HEPHER, 1988). Assim, para o cálculo do EQ se assume que a proteína do ovo é a de maior valor biológico para promover o crescimento e este será limitado pelo aminoácido essencial da dieta, cuja taxa em relação à proteína do ovo é menor. $EQ = \frac{g \text{ AAE na proteína testada} \times 100}{g \text{ do correspondente AAE na proteína Ovo}}$

O índice de aminoácidos essenciais (IAAE) é um cálculo mais apurado, dado pela média geométrica da taxa de todos os aminoácidos essenciais obtidos anteriormente pelo escore químico (HEPHER, 1988).

$$IAAE = \sqrt[n]{\frac{100a}{a_p} \times \frac{100b}{b_p} \times \frac{100c}{c_p} \times \dots \times \frac{100j}{j_p}}$$

onde: a, b, c... j são as porcentagens de AAEs na proteína avaliada

$a_p, b_p, c_p \dots j_p$ são as porcentagens de AAE na proteína padrão

n = número de aminoácidos considerados

As rações peletizadas foram estocadas em, a -20 °C, retirando-se porções para consumo semanal. O arraçoamento foi realizado diariamente duas vezes ao dia, por volta das 8 e 17 h, *ad libitum*. Nas condições proporcionadas pelas instalações, era possível observar os animais alimentando-se e assim a ração foi fornecida aos poucos, até saciação, de modo a não haver sobras ou somente poucos peletes. O alimento fornecido foi considerado consumido.

Tabela 6. Escore químico, Índice de AA Essenciais e Composição em aminoácidos das duas fontes protéicas e, das dietas experimentais.

Aminoácidos ^(*) (g/100g proteína)	Levedura (EQ ⁽¹⁾)	F. Peixe (EQ)	Tratamentos = níveis de substituição da f. de peixe por levedura					Requerimento ⁽³⁾ gAA/100 Proteína
			0 (EQ)	25 (EQ)	50 (EQ)	75 (EQ)	100 (EQ)	
Prot. Bruta (%) ^(**)	32,64	56,00	28,00	26,16	27,82	27,39	27,47	-
Triptofano	1,40 (100)	0,62 (44)	0,68 (49)	1,00 (71)	1,03 (74)	0,49 (35)	0,61 (44)	-
Lisina	8,29 (120)	4,63 (67)	6,29(91)	6,00 (87)	5,06 (93)	5,17 (75)	5,47 (79)	4,38 (1,40/26)
Histidina	2,47 (95)	2,21 (85)	3,23 (124)	3,22 (124)	2,44 (94)	2,69 (103)	2,71 (104)	1,27 (0,33/26)
Arginina	4,97 (76)	5,07 (78)	5,37 (92)	7,10 (109)	5,09 (78)	5,40 (83)	5,27 (81)	2,88 (0,75/26)
Valina	5,36 (80)	5,07 (76)	3,76 (56)	4,47 (67)	3,27 (49)	4,16 (62)	3,98 (59)	2,46 (0,64/26)
Treonina	5,75 (110)	2,96 (57)	3,83 (74)	3,47 (67)	3,31 (64)	3,76 (72)	4,19 (81)	2,04 (0,53/26)
Metionina	2,52 (86)	2,32 (83)	1,47 (64)	0,94 (55)	2,59 (76)	3,05 (106)	2,20 (66)	0,69 (0,18/26)
Isoleucina	5,08 (92)	3,41(62)	3,34 (61)	5,91 (107)	3,07 (56)	3,19 (58)	3,67 (67)	2,15 (0,56/26)
Leucina	7,83 (86)	6,20 (68)	7,78 (85)	8,52 (94)	6,42 (71)	6,24 (69)	6,10 (67)	3,96 (1,03/26)
Fenilalanina	4,81 (80)	3,07 (55)	5,36 (82)	4,72 (86)	3,54 (60)	3,75 (61)	3,88 (67)	2,04 (0,53/26)
Alanina	5,97	4,47	4,28	3,68	4,00	4,20	4,99	
½ Cistina	0,85	0,90	1,02	1,21	0,39	1,10	0,38	0,27 (0,07/26)
Ác. Aspártico	9,18	4,49	6,28	6,20	5,98	5,91	9,20	
Serina	2,55	3,00	4,31	3,80	3,61	4,22	4,22	
Ác. Glutâmico	10,37	6,24	9,06	7,89	8,32	9,09	12,73	
Prolina	3,57	5,52	5,57	4,27	3,61	3,78	4,34	
Tirosina	3,56	2,64	3,17	4,21	2,71	2,62	3,07	1,73 (0,45/26)
Glicina	4,34	5,05	4,42	3,74	3,61	3,70	3,83	
IAAE ⁽²⁾	91,54	66,23	75,13	84,15	68,43	69,40	69,86	

(*) - Média de duplicata (Análise de aminoácidos realizada no Centro de Química de Proteínas - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP)

(**) - Média de duplicata (Análise realizada no Laboratório de Nutrição Animal - Jaboticabal - UNESP)

(1) - EQ - Escore Químico = porcentagem do aminoácido essencial na proteína testada/ porcentagem do correspondente aminoácido na proteína do ovo, contendo as seguintes porcentagens: Isoleucina, 5,5; Lisina, 6,9; Meti. + Cistina, 3,9; Fenilalanina + Tirosina, 10,4; Treonina 5,2; Triptofano, 1,4; Valina, 6,7; Histidina, 2,6; Arginina, 6,5; Leucina, 9,1 (NRC, 1983).

(2) - IAAE = Índice de aminoácidos essenciais = média geométrica das taxas de todos aminoácidos na proteína testada em relação à proteína do ovo acima referida.

(3) - Requerimento em AAE para o pacu, com base na composição do músculo, (MAIA, 1992) estimado segundo TACON (1987); % de AAE total do requerimento da maioria dos peixes = 35 % (incluindo cistina e tirosina) x porcentagem da proteína da dieta (26 %) x conteúdo do referido aminoácido essencial no músculo/10.000

3.3. Obtenção das amostras e metodologia

Foram feitas duas coletas de material biológico no experimento. Aos 45 dias do início do experimento cinco peixes de cada parcela foram amostrados ao acaso, repetindo-se a colheita no final do experimento (87 dias), com os cinco animais restantes. As amostras destinaram-se às análises de parâmetros metabólicos, composição corporal e morfometria.

3.3.1. Biometrias e desempenho produtivo

Nos mesmos períodos acima descritos realizaram-se as biometrias. Na primeira (início) foram pesados e medidos todos indivíduos. Aos 45 dias 50 % da população, ou seja, cinco peixes, os mesmos que se destinaram à coleta de material biológico e aos 87 dias os cinco restantes. Utilizando-se ictiômetro, com aproximação em milímetros e balança, com aproximação para miligramas, foram registrados o comprimento total, comprimento padrão e o peso total do animal. Nestas ocasiões, efetuou-se o controle de consumo de ração.

O ganho em peso foi calculado pela diferença entre a média de peso dos peixes de cada parcela no início e a cada intervalo em que foi realizada a biometria. A taxa de crescimento instantâneo é freqüentemente empregada como um dos métodos mais úteis de apresentação dos dados, especialmente como uma base para comparação

entre diferentes estágios do ciclo de vida. Para obter os dados necessários para o cálculo, as medidas do peso foram feitas nos intervalos acima descritos, assim possibilitando formar uma série de tempos que reproduz uma taxa instantânea de variações ou taxa de crescimento. A taxa de crescimento instantâneo ou ganho de peso médio diário em porcentagem, foi assim calculado:

$$G = \frac{\text{Log}_e y_T - \text{Log}_e y_t}{\text{Tempo}(\text{dias})} \times 100$$

onde: G = crescimento; y_T = peso final (no tempo T); y_t = peso inicial (no tempo t); e = base no logaritmo natural

A conversão alimentar dos peixes foi calculada pela relação entre as médias de consumo de ração e de ganho em peso de cada parcela, a cada intervalo de avaliação. A taxa de eficiência protéica foi determinada pela relação entre as médias de ganho em peso e de consumo de proteína bruta da dieta em cada parcela, a cada intervalo de avaliação. O índice de consumo diário foi calculado pela relação entre o consumo alimentar diário e, o peso, médios de cada parcela.

3.3.2. Parâmetros metabólicos e de morfometria

Os procedimentos para coleta das amostras foram mantidos sempre os mesmos em cada avaliação (aos 45 e 87 dias). Pela manhã (8 h), após jejum de 16 a 18 h, os peixes foram capturados, com auxílio de puçá, transportados para o laboratório e

acondicionados em recipientes de 50 l com água de mesma origem, mantida com aeração.

Cada exemplar retirado do recipiente foi anestesiado com tricáína metanosulfonato (MS-222) 0,1 g/l e em seguida coletou-se o sangue (Figura 2), no menor tempo possível, por punção da veia caudal, com seringa heparinizada. A amostra obtida destinou-se às análises de: hematócrito, glicemia, proteína e ácidos graxos livres do plasma.

Para análise do hematócrito foram utilizados capilares heparinizados, com amostras do sangue total, centrifugadas à 5000 rpm por 5 minutos, sendo o volume determinado por leitura com cartela padrão.

A glicemia foi determinada pelo método de KING & GARNER (1947). Para isto, utilizou-se 1 ml de sobrenadante obtido por centrifugação à 2.000 rpm, durante 10 min., originado de 1,8 ml de solução isotônica (sulfato de sódio, sulfato de cobre), 0,1 ml de sangue total e 0,1 ml de tungstato de sódio à 10 %. Após a centrifugação, o sobrenadante foi congelado a -20 °C até o dia da análise, a qual foi feita adicionando-se 1 ml de reagente cúprico e 3 ml de arsenomolibidico. A cor obtida foi lida em espectrofotômetro a 540 nm.

Na determinação da proteína total do plasma, pelo método da reação com biureto, conforme GORNALL et al. (1949), utilizou-se 0,1 ml de plasma, 0,9 ml de água e 4 ml do reagente biureto. Após 15 minutos foi feita a medição da absorvância da solução em espectrofotômetro, a 560 nm de comprimento de onda.

Os ácidos graxos livres do plasma foram extraídos e determinados segundo metodologia de DOLE & MEINERTZ (1960). Utilizou-se 0,2 ml de plasma para o processo de extração com heptana. Na titulação, foi acrescentada uma solução indicadora preparada com timol azul a 0,1 % e a viragem (aparecimento da cor mostarda) foi obtida adicionando soda em presença de nitrogênio.

Ainda sob efeito do anestésico, o animal foi sacrificado por secção da medula espinhal ao nível do opérculo, procedendo-se, a seguir, a abertura da cavidade abdominal e coleta do fígado (Figura 2) para avaliação do índice hepatossomático (relação percentual entre peso do fígado e peso corporal total) e obtenção de amostras sempre da mesma região para análises de glicogênio, lipídios totais e histologia. Uma porção dorsal de músculo branco também foi amostrada para análise de glicogênio.

O glicogênio hepático e muscular foram determinados por espectrofotometria, segundo método da antrona descrito por CARROL, et al. (1956). A extração do glicogênio em 500 mg de fígado ou músculo foi feita utilizando-se KOH à 30 %, 5

gotas de Na_2SO_4 , em solução contendo água e álcool etílico. A glicose resultante da quebra das moléculas de glicogênio reagiu com a antrona, produzindo a cor lida à 620 nm.

Por meio do método gravimétrico, descrito por BLIGH & DYER (1959), determinou-se os lipídios totais do fígado. O homogenato de lipídios, em clorofórmio, propanol e água, extraído de 500 mg de tecido foi evaporado à secura, em estufa a 60 °C por 1 h, num recipiente previamente pesado. Após a secagem, o frasco foi pesado em balança analítica, obtendo-se o total de lipídios pela diferença de pesos.

Uma amostra do lobo distal do fígado foi usada para análise morfométrica dos hepatócitos. A amostra foi colocada em solução fixadora de Bouin, onde permaneceu por 24 h. Depois da desidratação em série crescente de álcoois e da passagem pela bateria de benzóis, as diversas amostras foram incluídas em parafina, microtomizadas de maneira semi-seriada com 7 μm de espessura e, em seguida, coradas de acordo com a técnica da hematoxilina de Harris-eosina (HE), segundo MAIA (1979). A análise morfométrica dos cortes semi-seriados do fígado de três animais por parcela foi realizada por meio do sistema analisador de imagem da KONTRON ELETRONIK (Video Plan), sendo medidos os seguintes parâmetros: áreas e volumes do hepatócito e do núcleo e seus diâmetros máximo e mínimo.

3.3.3. Análise de composição corporal

Os corpos inteiros de cinco peixes de cada parcela foram acondicionados separadamente em sacos plásticos e congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para determinação da composição proximal. Os corpos parcialmente descongelados foram moídos por blocos e homogeneizados, sendo que amostra em duplicata de 8 g cada, deste material, foi liofilizada até atingir peso constante a $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Desta primeira matéria seca (1^{a}MS) obteve-se posteriormente, por secagem em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 12 h, a segunda matéria seca (2^{a}MS), verificando-se a constância de peso em balança analítica com aproximação de 0,0001 g. A partir destes dados, peso úmido e seco, foi calculada a porcentagem de umidade. Alíquotas desta amostra, com 100 % de matéria seca original (MSO), destinaram-se às demais análises: extrato etéreo (extrator de Soxhlet), proteína bruta pelo método microkjeldahl e cinzas (mufla a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas).

Todo material coletado, acondicionado e identificado (sangue, fígado, músculo e corpos inteiros), foi imediatamente congelado e mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento das análises.

3.3.4. Avaliações das condições ambientais

As condições ambientais foram avaliadas em cinco tanques, um de cada tratamento, escolhidos aleatoriamente dentro dos quatro blocos (repetições) constituídos e, também, da água da canaleta de entrada. Semanalmente, por volta das 9 h, coletou-se amostras de água, pelos procedimentos convencionais, para determinação de oxigênio dissolvido, porcentagem de saturação, pH, alcalinidade, condutividade e amônia. Estimou-se também nestes tanques, por ocasião das amostragens, a taxa de renovação diária da água. A temperatura da água foi aferida diariamente por volta das 8 e 17 h, em todos os tanques, em um ponto mediano da superfície, sendo também controlada as temperaturas máxima e mínima do ambiente no interior da estufa. A temperatura foi reportada como valores médios dos quatro blocos de cada tratamento.

O teor de O_2D e a porcentagem de saturação foram analisados pelo método de Winkler, segundo GOLTERMAN et al. (1978). A alcalinidade total foi determinada adicionando primeiramente o indicador fenolftaleína (coloração rosada) e procedendo-se à titulação com H_2SO_4 a 0,02 N, conforme metodologia de GOLTERMAN et al. (1978). O pH foi medido em laboratório com um peagâmetro Quimis. A condutividade elétrica foi determinada por um condutivímetro E 527 Metrohm Herisaw e a amônia analisada por método colorimétrico, com leitura em espectrofotômetro, de acordo com os métodos descritos por KOROLEFF (1976). As

leituras de absorvência foram feitas em espectrofotômetro Baush Lomb, modelo Spectronic 20. A taxa de renovação diária de água foi calculada pela relação entre o volume do tanque e o tempo cronometrado, em que a torneira de abastecimento leva para completar 1 l, medido em bequer graduado.

3.4. Análises estatísticas

Os resultados do experimento, montado em delineamento de blocos casualizados em esquema de parcela subdividida no tempo (“Split Plot in Time”), com níveis crescentes de incorporação de levedura seca de destilaria alcoólica (0, 25, 50, 75 e 100 %) em substituição à de farinha de peixe, com duas avaliações no tempo (aos 45 e 87 dias), foram submetidas à análise de variância e testes de comparação de médias (Tukey a 5 %), conforme procedimento GLM do SAS (1985). Para a análise dos parâmetros de desempenho produtivo, metabolismo e estrutura dos hepatócitos, foram utilizadas repetições dentro de bloco.

Laboratórios solicitados para realização das análises: - Laboratórios de Biofísica e Histologia do Dept^o de Morfologia e Fisiologia Animal - UNESP - Jaboticabal (glicogênio, lipídios totais, glicemia, hematócrito e morfometria). - Laboratório de Limnologia - Centro de Aqüicultura - UNESP - Jaboticabal (O₂D, % de saturação, pH, alcalinidade, condutividade, NH₃). - Laboratório de Nutrição de Peixes - Centro de Aqüicultura - UNESP - Jaboticabal (preparo das dietas). - Laboratório de Nutrição Animal - UNESP - Jaboticabal (composição proximal dos ingredientes, dietas e carcaças). - Laboratório de Biotecnologia - UNESP - Jaboticabal (proteína plasmática). - Laboratório de Química de Proteínas - USP - Ribeirão Preto (aminoácidos das dietas e fontes protéicas). - Laboratório de Química de Lipídios - USP - Ribeirão Preto (ácidos graxos livres do plasma). - Laboratório de Piscicultura - Centro de Aqüicultura - UNESP - Jaboticabal (biometrias , coleta do material biológico).

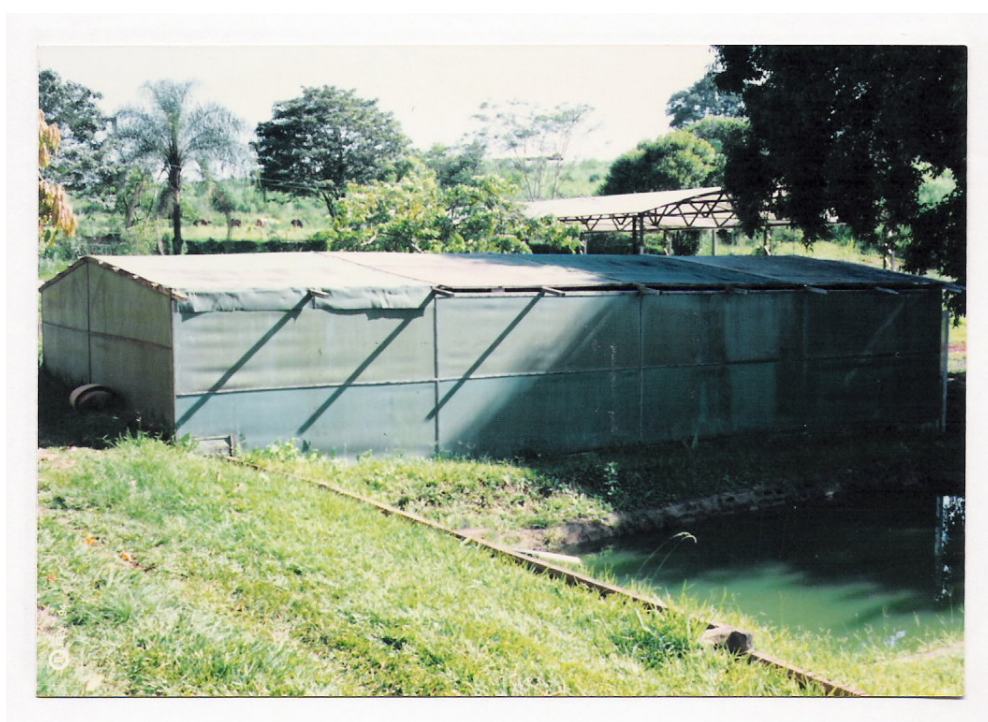


Figura 1. Instalações - vista externa da estufa e detalhes dos tanques experimentais

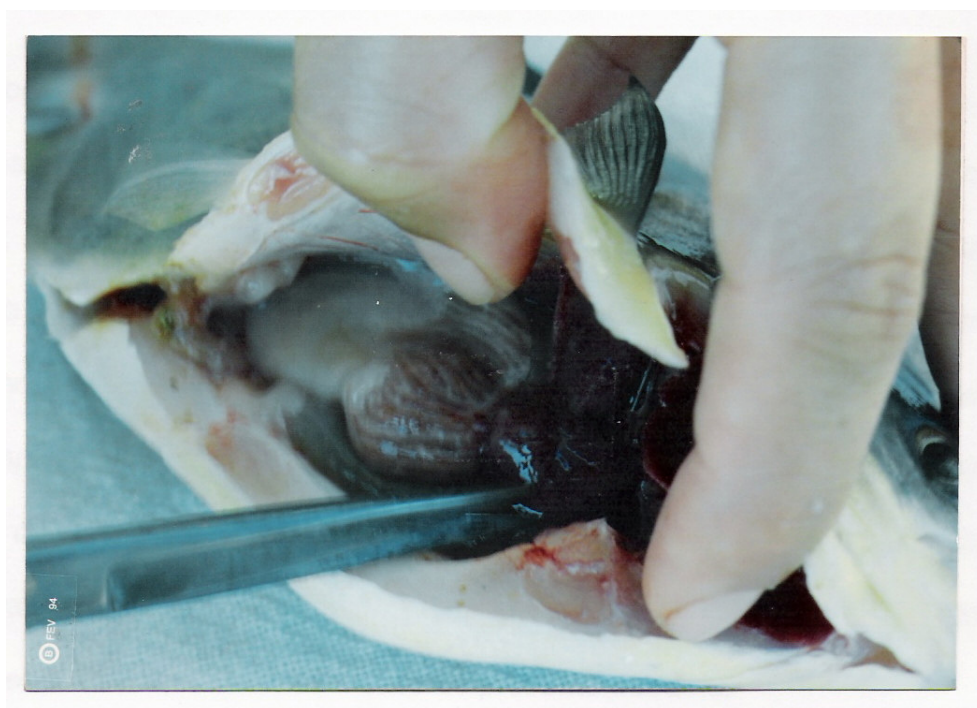
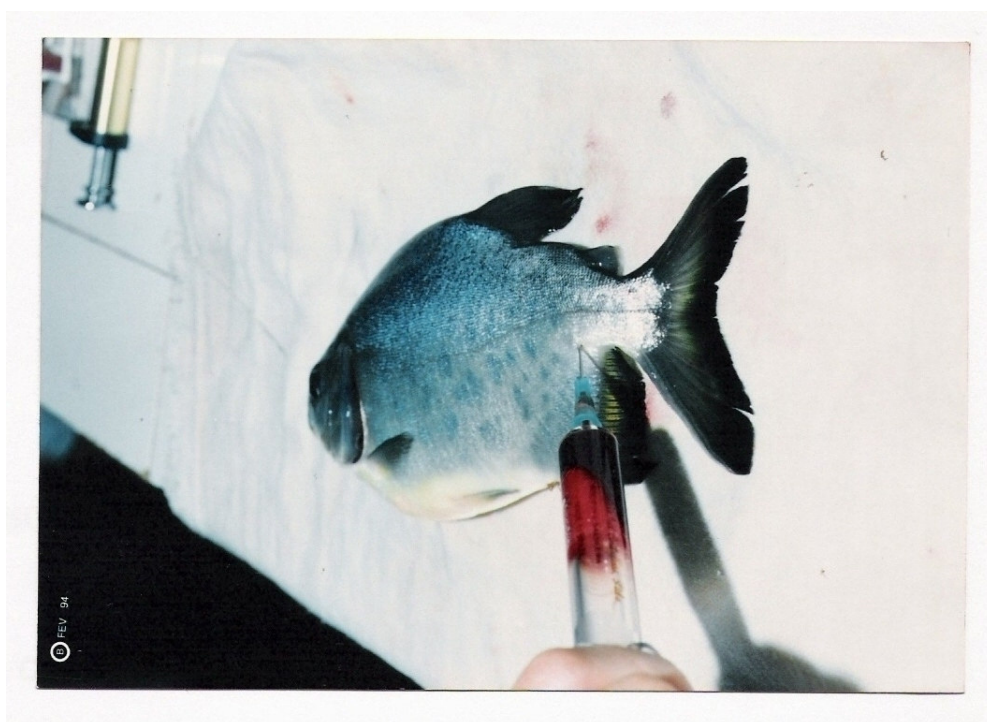


Figura 2. Obtenção das amostras - coleta de sangue e fígado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Condições ambientais

Os valores médios e desvios-padrões das variáveis limnológicas analisadas em cinco tanques, um de cada tratamento, amostrados aleatoriamente dentro dos quatro blocos, e da água da canaleta de entrada, estão apresentados na Tabela 7. Foi objetivo demonstrar a influência dos tratamentos sobre as condições ambientais, mantendo-se sempre os mesmos tanques para possível comparação de seus perfis de comportamento. As variações mais importantes que devem ser monitoradas em cultivo de peixes, segundo SIPAÚBA -TAVARES (1995), são: oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade, condutividade elétrica, temperatura, nutrientes e outras referentes a cultivo em viveiros, não sendo o caso do presente trabalho.

A diferença de temperatura entre a água dos tanques foi mínima, mantendo-se constante ao longo do experimento como observado pela Tabela 7. No primeiro mês do experimento a média da temperatura máxima ambiente no interior da estufa foi de 43,2 °C. Nos trinta dias seguintes houve uma queda, voltando a subir no último mês, (de 35,9 para 43,2 °C), Tabela 8. Observa-se que a temperatura da água dos tanques sofreu influência direta da temperatura ambiente, pois a água se originava de uma represa à montante. A instalação da estufa protegeu os tanques de intempéries ambientais, evitando possíveis picos nas variações dos parâmetros limnológicos.

Tabela 7. Variáveis limnológicas, médias e desvios-padrões das análises semanais, no período de 87 dias, e média da temperatura diária da água (manhã + tarde).

Variáveis	Tratamentos - tanques					
	entrada	1	2	3	4	5
O ₂ D (mg/l)	5,52 ± 0,31	4,70 ± 0,58	4,99 ± 0,42	4,32 ± 0,84	4,74 ± 0,52	3,70 ± 1,48
% Saturação	75,84 ± 4,96	64,69 ± 7,04	68,38 ± 6,33	58,62 ± 9,79	65,08 ± 6,74	50,14 ± 19,95
Amônia (µg-N/l)	22,56±13,13	39,04±28,21	39,69±22,59	44,90±25,47	41,20±29,54	75,90 ± 45,95
pH	6,81 ± 0,35	6,96 ± 0,33	6,95 ± 0,34	6,95 ± 0,36	6,94 ± 0,35	6,99 ± 0,33
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /l)	12,08 ± 0,85	14,18 ± 1,60	13,84 ± 1,41	13,98 ± 1,17	13,78 ± 1,62	14,77 ± 2,76
Condutividade (µScm)	20,00 ± 0,00	29,23 ± 2,77	28,46 ± 3,76	30,77 ± 7,60	28,46 ± 3,76	44,29 ± 22,99
Taxa de renov.(1330/dia)	-	4,18 ± 2,21	5,79 ± 2,57	2,87 ± 1,81	3,60 ± 1,31	2,33 ± 1,27
Temperatura da água (°C)	-	28,02 ± 1,54	28,02 ± 1,58	27,96 ± 1,57	28,03 ± 1,54	28,04 ± 1,55

*Laboratório de Limnologia - Centro de Aqüicultura - Jaboticabal - SP

Tabela 8. Valores médios semanais (n=7) das temperaturas ambiente, máximas e mínimas (°C)

TEMP	DIAS												
	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	87
Max	42,8	46,0	43,7	40,2	34,0	36,3	35,2	37,9	42,5	36,9	47,3	45,0	44,5
Min	21,3	20,4	25,0	24,5	22,0	22,4	22,7	22,9	24,0	24,4	25,7	24,9	24,9

A temperatura da água, registrada ao longo do experimento, encontra-se dentro da faixa considerada ideal (25 a 30 °C), de conforto térmico para espécies de clima tropical, conforme PROENÇA & BITTENCOURT (1994). Observou-se que os peixes

não se alimentaram nos dias em que as temperaturas da água foram menores que 26 °C e que ocorreu mortalidade total de duas parcelas (blocos B e D) do tratamento 5 (100 % de substituição), uma semana após serem registradas as menores temperaturas (Figura 4). Verificou-se que após este período, as temperaturas se mantiveram dentro da faixa ideal para o desenvolvimento do pacu.

Assim como a temperatura, as demais variáveis limnológicas analisadas apresentaram perfil de comportamento semelhante entre os tanques, com exceção feita para o tanque que continha os peixes que receberam o tratamento 5, onde foram detectados os valores mais inadequados, tanto em relação à água da canaleta de entrada, como em relação aos outros tanques (Figura 3). Isto se deve, provavelmente, à menor taxa de renovação média diária ($2,33 \pm 1,27$ volume total/dia) detectada neste tanque (Tabela 7). Considerando que os peixes consumiram alimento em quantidade semelhante aos demais deste bloco (D), isto pode ter elevado a concentração de material em decomposição e a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), como caracterizado pela maior concentração de amônia ($75,9 \pm 45,95$ µg/l), alcalinidade ($14,77 \pm 2,76$ mgCaCO₃/l), e condutividade ($44,29 \pm 22,99$ µS/cm) e menores concentrações de O₂D ($3,70 \pm 1,48$ mg/l) e porcentagem de saturação de O₂ ($50,14 \pm 19,95$ %). Outro fato que provavelmente tenha influenciado na qualidade da água deste tanque, foi a instabilidade dos peletes do tratamento 5 (100 % de substituição), os quais se esfarelavam facilmente ao manuseio e dissolviam mais rapidamente na água.

Os valores e o perfil de comportamento das variáveis limnológicas nos cinco tanques correspondentes aos tratamentos, verificados durante o período experimental, são apresentados na Figura 3. Os teores de oxigênio dissolvido considerados ótimos para a maioria dos peixes de águas doces tropicais, encontram-se acima de 5 mg/l (BOYD, 1984; PROENÇA & BITTENCOURT, 1994; SIPAÚBA - TAVARES, 1995). A oscilação média na concentração de O₂ nos tanques foi de 4,7 a 3,7 mg/l e a água da canaleta apresentou valor médio de 5,52 mg/l (Tabela 7). Visualiza-se pela Figura 3 que os tanques correspondentes aos tratamentos 5 e 3 apresentaram concentração de oxigênio menos adequada na amostragem do 21º dia do experimento (0,94 e 2,80 mg/l respectivamente), sendo que somente o tanque correspondente ao tratamento 2 estava adequado (4,9 mg/l) e nos demais (correspondentes ao tratamento 1 e 4) o nível foi suportável (3,8 mg/l). Após este período, as concentrações de O₂D foram restabelecidas, oscilando dentro dos limites considerados adequados.

Os valores médios do pH da água dos tanques mantiveram-se próximos ao neutro, com variação de $6,99 \pm 0,33$ a $6,94 \pm 0,35$. A água, dos tanques e da entrada, apresentaram a mesma variação e, somente no 49º dia, a água dos tanques correspondentes aos tratamentos 2 e 5 registraram pH mais elevado (Figura 3). Os valores observados estão dentro de uma amplitude satisfatória para o cultivo de peixes (BOYD, 1984; SIPAÚBA -TAVARES, 1995).

Os baixos valores de alcalinidade, verificados durante o período experimental (Figura 3), evidenciam a baixa capacidade tamponante da água. A faixa ideal de concentração de bases, que proporciona a maior produtividade de peixes está entre 20 a 300 mg/l, expressa em carbonato de cálcio (PROENÇA & BITTENCOURT, 1994; SIPAÚBA -TAVARES, 1995).

Como esperado, a água da canaleta de entrada registrou o menor valor de condutividade elétrica (20,00 $\mu\text{S}/\text{cm}$) durante todo o experimento. Em contraste, a água do tanque correspondente ao tratamento 5 apresentou os maiores valores com média de $44,29 \pm 22,99 \mu\text{S}/\text{cm}$ (Tabela 7). Esta variável, segundo SIPAÚBA - TAVARES (1995), quando alta, indica elevado grau de decomposição, sendo que em viveiros de piscicultura do CAUNESP tem-se observado variação entre 23 a 71 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

A concentração total de amônia é resultante da forma ionizada (NH_4) ou não ionizada (NH_3), sendo, esta última, a mais tóxica aos peixes. Quanto mais alto o pH e a temperatura, maior é a porcentagem de amônia na forma tóxica. Na faixa entre 0,4 a 2,5 mg/l, o teor de amônia é subletal, sendo que a concentração abaixo de 0,05 mg/l é considerada ideal para o desenvolvimento de peixes (PROENÇA & BITTENCOURT, 1994). Os teores médios de amônia oscilaram entre $39,04 \pm 29,36$ a $75,9 \pm 49,62 \mu\text{g}/\text{l}$ (Tabela 7). Mesmo procedendo-se ao sifonamento dos tanques, nota-se um aumento na concentração de amônia com o aumento da temperatura da

água no primeiro mês do experimento, provavelmente devido às concentrações de amônia na água da entrada, embora, no último mês, quando a temperatura da água também foi elevada, as concentrações de amônia foram menores.

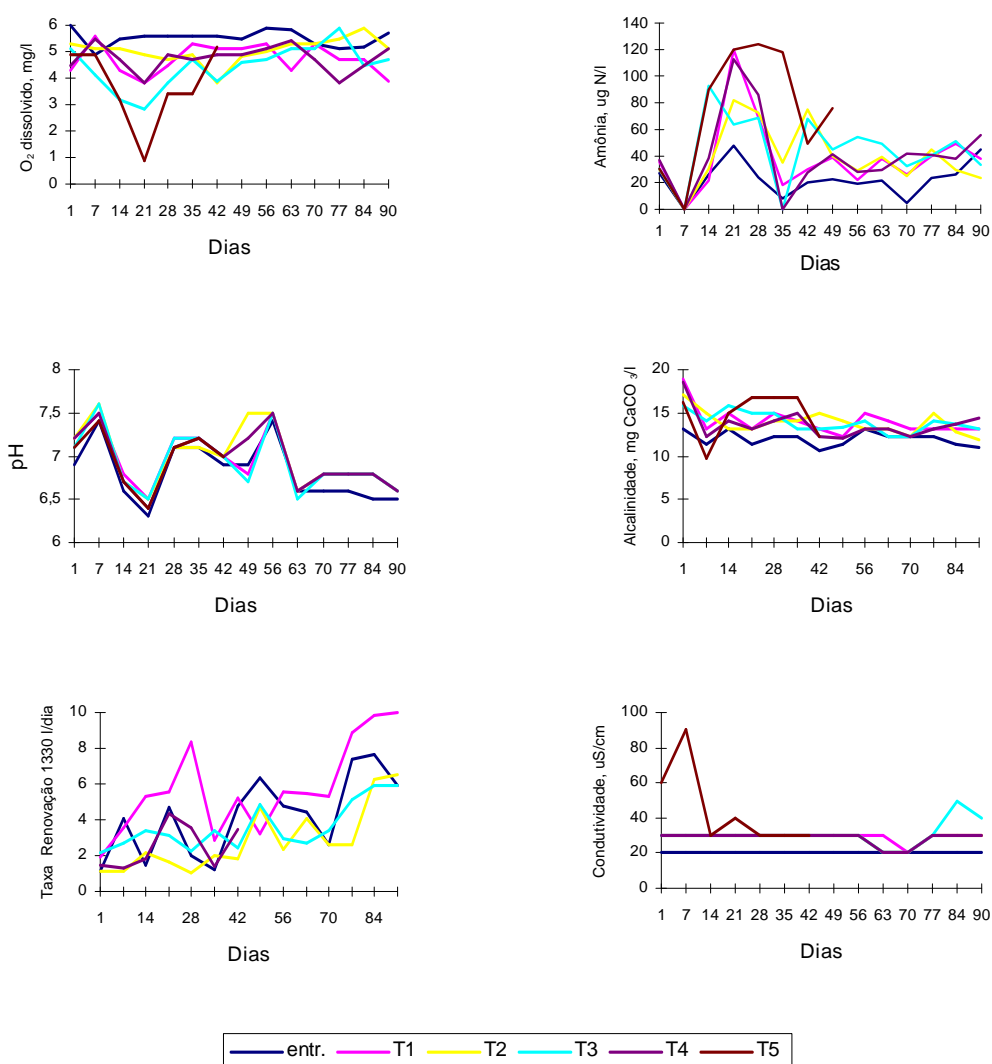


Figura 3. Variáveis limnológicas obtidas nos 5 tanques, em amostragens semanais durante período experimental

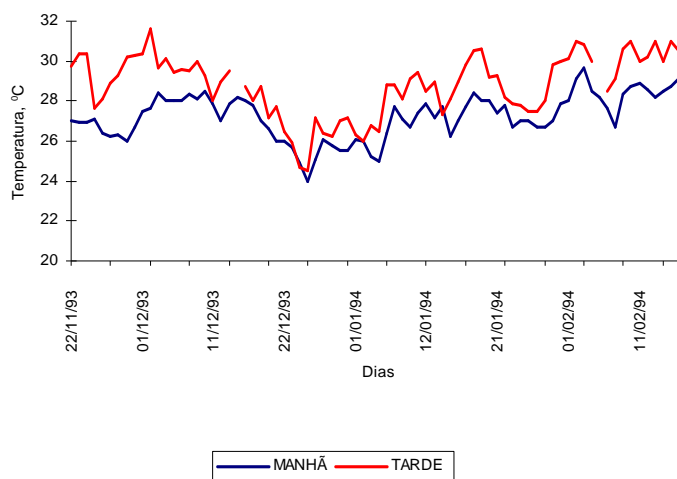


Figura 4. Variação diária da temperatura, manhã e tarde, média dos tanques (n=20 tanques).

4.2. Desempenho de produção

Os dados de desempenho produtivo médio dos juvenis de pacu, frente aos diferentes níveis de levedura na dieta, estão expressos na Tabela 9.

A análise de variância não demonstrou efeito significativo ($P > 0,05$) da substituição crescente da farinha de peixe pela levedura alcoólica sobre as variáveis de desempenho produtivo analisadas (peso corporal, comprimento corporal, ganho de peso, consumo alimentar, índice de ingestão diário, conversão alimentar, taxa de eficiência protéica e taxa de crescimento instantâneo). Embora de forma não significativa, verifica-se que o nível mais alto de levedura alcoólica apresentou os piores resultados de desempenho produtivo.

Observa-se, pela Tabela 5, que os níveis de substituição de 25, 50, 75 e 100 % correspondem a inclusão de 9,95; 20,00; 29,88 e 39,80 % de levedura na ração, ou seja, 12,49; 25,11; 37,7 e 49,96 % da proteína total da ração. SOUZA & MATTOS (1989) avaliaram duas fontes protéicas para alimentação do híbrido tambacu e obtiveram os melhores resultados de digestibilidade para as dietas que continham 25 e 50 % da proteína bruta vinda da levedura alcoólica. MARTIN et al. (1993), em ensaio com truta arco-íris, constataram que a levedura pode substituir até 35 % da proteína bruta sem alterar o balanceamento da dieta e sem perda significativa do desempenho de crescimento. Esses trabalhos corroboram os dados do presente experimento, quanto aos índices de substituição da farinha de peixe. Por outro lado, os resultados obtidos com 100 % de substituição, que denotam efeito negativo em relação aos outros tratamentos, concordam com estudos de TACON & COOKE (1980), DABROWSKI (1980), DAVIES & WAREHAN (1978), BARROS et al. (1986), que demonstraram redução na taxa de crescimento e piora na conversão alimentar com altas inclusões de levedura (50 % PB).

Segundo TACON & COOKE (1980), peixes que recebem dietas com alta inclusão de ácido nucléico, apesar de apresentarem alto consumo de nitrogênio e alta digestibilidade aparente, mostram baixa eficiência aparente de deposição. Os autores sugerem que o nitrogênio do ácido nucléico não possui valor nutricional para peixes que recebam um suplemento adequado de nitrogênio de aminoácidos. Outro fator salientado no estudo acima citado é o erro no cálculo da proteína bruta para

alimentos como levedura, por se utilizar o fator geral $N_2 \times 6,25$. Vários outros autores também alertam para este tipo de erro (MATTOS et al., 1983; DAVIES & WAREHAM, 1988; RUMSEY et al., 1992; KIESSLING & ASKBRANDT, 1993). Desta forma, o conteúdo disponível de proteína poderia ter sido superestimado na levedura e nas dietas com substituição. Assim, os peixes deste tratamento receberiam menos proteína disponível do aqueles que ingeriram a dieta controle com farinha de peixe, o que poderia justificar a menor taxa de crescimento instantâneo (1,36 %).

Tabela 9. Resumo da análise de variância do desempenho de produção, coeficientes de variação e médias por quadrados mínimos, das características estudadas, Peso médio final (P), Comprimento Padrão (CP), Ganho em Peso (GP), Consumo Alimentar (CAL), Índice de Consumo Diário (ICD), Conversão Alimentar (CA), Taxa de Eficiência Protéica (TEP) e Taxa de Crescimento Instantâneo (TCI).

Causas de Variação	Valores de F para as variáveis analisadas							
	P (g)	CP (mm)	GP (g)	CAL (g)	ICD (%)	CA	TEP (%)	TCI (%)
Bloco	6,72**	8,06**	2,36 ^{NS}	7,00**	0,57 ^{NS}	0,35 ^{NS}	1,10 ^{NS}	0,62 ^{NS}
Tratamento (T)	0,49 ^{NS}	0,18 ^{NS}	0,76 ^{NS}	0,91 ^{NS}	1,11 ^{NS}	2,08 ^{NS}	2,63 ^{NS}	1,05 ^{NS}
Avaliação (A)	212,57**	262,07**	0,14 ^{NS}	29,90**	14,07**	2,15 ^{NS}	0,88 ^{NS}	11,73**
T x A	4,75 ^{NS}	2,75 ^{NS}	2,26 ^{NS}	1,84 ^{NS}	0,59 ^{NS}	1,88 ^{NS}	1,33 ^{NS}	1,62 ^{NS}
CV (Tratamento)	65,14	18,80	44,80	27,79	16,14	25,87	19,34	22,49
CV (Avaliação)	20,21	5,53	41,33	9,14	14,49	38,35	39,30	38,25
Médias:								
Tratamento								
1 (0)	121,69	14,75	60,87	88,99	1,79	1,75	2,50	1,56
2 (25 %)	112,29	14,49	49,58	74,78	1,60	1,63	2,58	1,46
3 (50 %)	120,83	14,77	53,03	94,71	1,80	1,94	2,15	1,46
4 (75%)	117,96	14,76	55,55	82,11	1,68	1,59	2,58	1,55
5 (100 %)	100,38	14,29	41,41	77,66	1,87	2,08	2,07	1,36
Avaliação								
1 (45 dias)	88,89 ^b	13,65 ^b	50,39	77,52 ^b	1,92 ^a	1,67	2,48	1,78 ^a
2 (87 dias)	143,82 ^a	15,67 ^a	55,66	91,12 ^a	1,55 ^b	1,88	2,32	1,18 ^b

** (P,0,01), *(P,0,05), NS - não significativo, ^{aj} Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Nota-se pela Tabela 9, que os peixes que não receberam F. de peixe (trat. 5) apresentaram, em média, o menor peso (100,38 g), ganho de peso (41,41 g) e, também, baixo consumo (77,66 g), mas em contrapartida, apresentaram o maior

índice de ingestão diária média (1,87 %) e, conseqüentemente, a maior conversão alimentar (2,08). Segundo HEPHER (1988), uma explicação, neste caso, seria que o peixe parece alimentar-se até certo nível para suprir sua exigência em nutrientes, mais que pelo volume ou peso do alimento. Assim, observa-se que os peixes que receberam a dieta com maior teor de levedura apresentaram, em média, maior índice de ingestão diária como um efeito compensatório para suprir suas necessidades nutricionais. Isto pode indicar para esta dieta uma deficiência de algum nutriente, como possível desbalanceamento em aminoácidos ou baixa digestibilidade, notado também pela menor taxa de eficiência protéica (2,07 %). MARTIN et al. (1993) também observaram, em ensaio com truta arco-íris, que o acréscimo da levedura *Candida utilis*, na dieta, reduziu a taxa de eficiência protéica, apesar da elevada digestibilidade e com baixa eficiência alimentar. DABROWSKI et al. (1980) constataram que dietas com alta inclusão da levedura *Geotricum candidum* foram deficientes em alguns aminoácidos e, como conseqüência, os peixes apresentaram aumento na conversão alimentar, decréscimo na taxa de eficiência protéica e utilização líquida de proteína.

O período de avaliação exerceu influência significativa ($P < 0,01$) sobre o peso corporal, comprimento corporal, consumo de alimento, índice de ingestão diária e taxa de crescimento instantâneo. Isto está de acordo com o trabalho conduzido por DABROWSKI et al. (1980), que observaram efeito marcante do tamanho dos peixes sobre a capacidade de utilizar a fonte protéica unicelular *G. candidum* em níveis

crescentes da substituição da farinha de peixe. KITAMIKADO et al. (1964) reportaram imensas diferenças entre trutas arco-íris, em sua habilidade de utilizar a proteína da dieta, dependentes do tamanho do peixe. Em estudo sobre requerimento protéico do pacu, BRENER et al. (1988) dividiram o período total do experimento em duas avaliações e também evidenciaram diferenças na exigência protéica com o aumento no peso.

Verifica-se pela Tabela 9 e Figura 5, que o consumo alimentar individual médio na primeira avaliação foi menor que na segunda ($P < 0,01$), sendo respectivamente de 77,52 g e 91,12 g, com comportamento inverso para o índice de consumo, com maior valor (1,92 %) na primeira avaliação e menor (1,55 %) na segunda ($P < 0,01$). Segundo HEPHER (op. cit.), o consumo é dependente do peso do peixe. Com o aumento do peso corporal, o nível de saciação aumenta, embora a taxa de saciação relativa (nível de saciação/peso corporal) decresça. De SILVA & GUNASEKERA (1989), em estudo de avaliação da fonte protéica, representaram o consumo em g/g peixe/dia e g/peixe/dia. Foi observado, como na presente pesquisa, que peixes maiores consomem consideravelmente menos por peso corporal do que peixes pequenos.

A taxa de crescimento instantâneo médio foi superior ($P < 0,01$) no primeiro período (1,78 %) de avaliação. Isto vem de encontro ao dado anterior de índice de ingestão diária, também superior ($P < 0,01$) neste período. Constata-se que embora nesse

período não tenha ocorrido diferença significativa ($P>0,05$) na taxa de eficiência protéica, há uma tendência a elevar-se. Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, pois segundo NIKOLSKI (1963), do período inicial de crescimento até a maturidade, o alimento é utilizado para o rápido crescimento corporal, como forma de adaptação contra predadores. Assim, juvenis de peixes requerem mais proteína que adultos além de exigirem maior quantidade de proteína de origem animal (WEATHERLEY & GILL, 1989). Observa-se que a proteína de levedura possibilitou maior taxa de eficiência protéica no primeiro período, parecendo acompanhar a exigência dessa primeira fase de crescimento rápido, segundo observado pela taxa de crescimento instantâneo superior nesta fase.

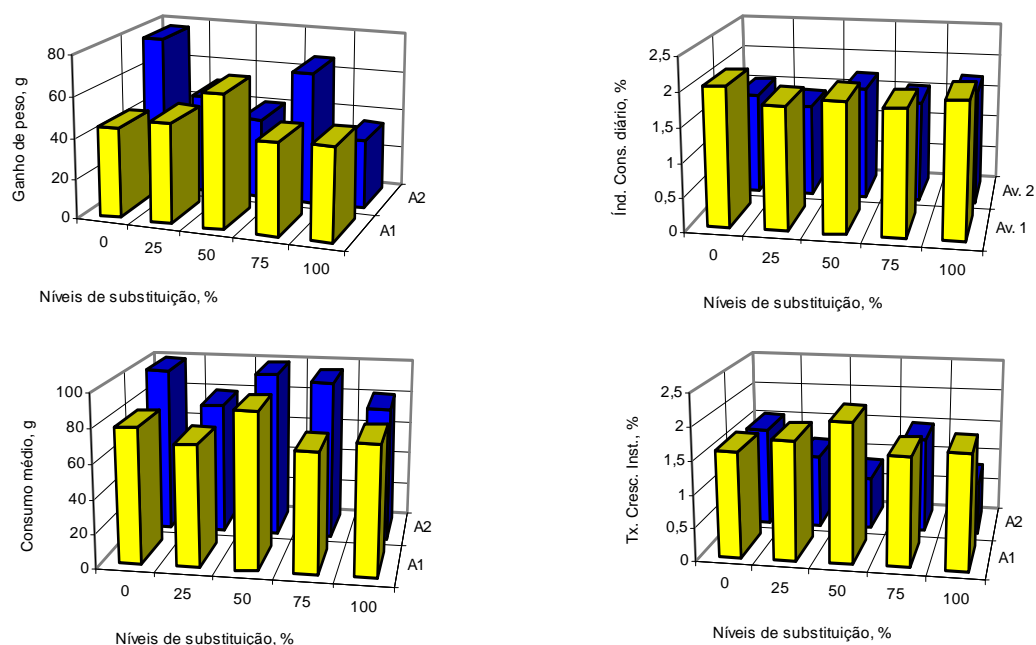


Figura 5 . Variáveis de desempenho produtivo, efeitos dos níveis de substituição de levedura seca de álcool na ração e das diferentes épocas de avaliação.

4.2.1. Mortalidade e alterações morfológicas

Dezoito dias após o início do experimento, quatro peixes que receberam 50 % de substituição morreram por falta de O₂ dissolvido na água, devido à interrupção do fluxo de água por entupimento da torneira de abastecimento. Os peixes sobreviventes desse tanque nadavam à superfície da água com o lábio inferior distendido, sintoma característico de falta de oxigênio (PROENÇA & BITTENCOURT, 1994). Com o restabelecimento do fluxo, os peixes sobreviventes recuperaram-se satisfatoriamente.

Aos trinta e sete dias do início do experimento os peixes dos blocos B e D que receberam 100 % de substituição da proteína e, os do bloco C, controle (0 %) apresentaram natação desequilibrada, coloração acinzentada e brilhante na base das nadadeiras e, algumas vezes, ao longo do corpo e, escurecimento da pele, associado à erosão das nadadeiras. Todos os tanques receberam tratamento com verde malaquita (0,15 g/1000 l) e formol (1 ml/100 l) por três dias consecutivos (UNTERGASSER, 1989), sendo que os peixes controle recuperaram-se totalmente, enquanto que 50 % dos alimentados com 100 % de substituição, as duas parcelas citadas, morreram gradativamente. Este fato coincidiu com a época em que foram registradas as mais baixas temperaturas. A alta mortalidade observada neste tratamento poderia estar relacionada a algum fator de desnutrição ou componente

tóxico da levedura, visto que estes peixes apresentaram deficiência na resistência para suportar um período desfavorável nas condições ambientais.

Recentemente, em revisão sobre impacto de fatores nutricionais no sistema imunológico de salmão do Atlântico (*Salmo salar*), WAAGBO (1994) comentou a importância de nutrientes da dieta no metabolismo geral e na imunidade do animal, sugerindo que o conhecimento do manejo alimentar melhora condições de cultivo, reduzindo perdas devido a doenças.

Segundo ROBERTS & BULLOCK (1988), fontes protéicas deficientes em aminoácidos essenciais ou em proporções desbalanceadas determinam crescimento limitado do peixe, podendo apresentar alguns sintomas como erosão da nadadeira dorsal, anormalidades na coluna vertebral e escurecimento da pele.

Altas mortalidades foram observadas em truta arco-íris, quando RUMSEY et al. (1992) forneceram dietas que continham bases púricas livres, extraídas de RNA de levedura. A adenina foi a única base que demonstrou ser um potente inibidor do crescimento, além da possível toxicidade demonstrada pela alta mortalidade dos peixes que receberam este tratamento.

4.3. Composição corporal

As médias dos valores das variáveis de composição corporal, bem como a comparação das médias (Tukey 5 %), dos juvenis de pacus alimentados com as diferentes dietas, em duas épocas de avaliação, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resumo da análise de variância, coeficientes de variação e médias por quadrados mínimos das características de composição corporal estudadas, proteína bruta (PB), umidade (UMID), extrato etéreo (EE) e cinza (CZ) em 100 % de MS e matéria seca original (MSO).

Causas de Variação	Valores de F para as variáveis analisadas				
	PB (%)	MSO	UMID (%)	EE (%)	CZ (%)
Bloco	1,54 ^{NS}	1,40 ^{NS}	1,39 ^{NS}	1,24 ^{NS}	0,72 ^{NS}
Tratamento (T)	2,97 ^{NS}	0,46 ^{NS}	0,45 ^{NS}	0,47 ^{NS}	4,27 [*]
Avaliação (A)	9,59 ^{**}	32,29 ^{**}	33,29 ^{**}	24,24 ^{**}	0,00 ^{NS}
T x A	0,41 ^{NS}	0,86 ^{NS}	0,86 ^{NS}	1,38 ^{NS}	2,81 ^{NS}
CV (Tratamento)	5,20	8,21	2,88	12,94	10,34
CV (Avaliação)	3,36	4,08	1,43	3,62	10,60
Médias:					
Tratamentos					
1 (0)	48,03	26,59	73,41	37,60	7,70 ^{ab1/}
1 (25 %)	49,43	26,37	73,66	38,15	6,76 ^b
3 (50 %)	51,35	25,79	74,21	36,29	6,86 ^{ab}
4 (75 %)	51,31	25,55	74,45	35,33	6,85 ^{ab}
5 (100 %)	52,86	24,91	75,09	34,94	8,17 ^a
Avaliação					
1 (45 dias)	51,26 ^a	24,92 ^B	75,08 ^a	35,60 ^b	7,24
2 (87 dias)	49,52 ^b	26,97 ^A	73,03 ^b	37,62 ^a	7,14

^{**} (P<0,01), ^{*} (P<0,05), NS - não significativo; ^{1/} Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Foram encontrados efeitos significativos (P<0,05) dos níveis de substituição da levedura sobre o conteúdo de cinza, com o menor valor nos peixes que receberam 25 % de substituição (6,76 %), o qual diferiu (P<0,05) dos que receberam 100 % de substituição (8,75 %), não ocorrendo, porém, significância das avaliações sobre este

parâmetro. O acréscimo da levedura em substituição à farinha de peixe não foi causa de variação ($P>0,05$) para o conteúdo de proteína bruta, umidade e extrato etéreo. Por outro lado, estas variáveis foram influenciadas ($P<0,01$) pelas avaliações aos 45 e 87 dias, ocorrendo decréscimo na proteína e umidade e aumento no extrato etéreo. Os teores de umidade no primeiro período de avaliação foram de 75,08 % e no segundo de 73,05 %. Estes valores estão próximos aos obtidos por KINSELLA (1977), ao analisar a composição proximal de diversas espécies de peixes de água doce, sendo que o menor valor encontrado foi para truta do lago, com teor médio de 72,4 % e o máximo de 80,5 % para o “rock bass”.

Verifica-se que o aumento da incorporação de levedura alcoólica nas dietas provocou apenas tendência de elevação dos teores de proteína bruta e umidade, e isto correlacionou-se negativamente com o teor de lipídios, que tendeu a diminuir com a substituição das fontes protéicas.

Os resultados obtidos neste experimento para o tratamento 5, estão de acordo com os verificados por diversos autores, que ao avaliarem os efeitos da incorporação de vários tipos de levedura ou inclusão de ácido nucléico, em dietas para peixes, notaram elevado conteúdo de cinza e proteína, com níveis mais baixos de lipídios na composição corporal (TACON & COOKE, 1980; DABROWSKI et al., 1980; MAHNKEN et al., 1980; DAVIES & WAREHAM, 1988; RUMSEY et al., 1992; MARTIN et al., 1993). Foi especulado por TACON & COOKE (1980) e DAVIES & WAREHAM (1988) que o ácido nucléico das dietas com levedura reduziu a

motilidade do intestino, aumentando desta forma o tempo disponível para digestão e absorção de minerais. Para RUMSEY et al. (1992), isto pode ser explicado pela maior concentração de material mineral nas dietas de maior inclusão de RNA. Também, como pode ser observado pela Tabela 5, a dieta controle apresentou o maior teor de matéria mineral, provavelmente relacionado à qualidade da farinha de peixe, e isto se refletiu na composição corporal dos peixes deste tratamento.

Resultados semelhantes também foram relatados por outros autores que avaliaram a restrição alimentar ou a subalimentação sobre os componentes corporais. Foi demonstrado nestes casos, que ocorreu redução nos constituintes corporais dos peixes e que isto resultou em hidratação dos tecidos. Houve aumento na porcentagem de água, proteína bruta e cinza, contrapondo-se naturalmente à porcentagem de lipídios (SOUZA, 1994; CARNEIRO, 1994). Do mesmo modo, é possível que tenha ocorrido alguma deficiência nutritiva, nas dietas com maior inclusão de levedura alcoólica, uma vez que as variáveis corporais analisadas indicam tendência semelhante, embora menos acentuada que nos trabalhos de restrição alimentar.

Comparando os dados das variáveis de composição corporal com aqueles da taxa de crescimento instantâneo, nota-se que ambos foram influenciados ($P < 0,01$) pelo período de avaliação. Aos 45 dias do experimento, se obteve maior índice de

crescimento (1,78 %) que aos 87 dias (1,18 %) e isto correlacionou-se positivamente com o maior conteúdo médio de proteína bruta (51,26 %) e umidade (75,08 %) e inversamente ao conteúdo de lipídio (35,60 %) no mesmo período. Estes resultados concordam com os obtidos por ECKMANN (1987), que observou em experimento com juvenis de tambaqui (*C. macropomum*) que o corpo dos peixes de crescimento mais rápido continha os mais altos níveis de proteína bruta e mais baixos de matéria seca e gordura e isto foi proporcional ao nível protéico da dieta.

Com relação aos tratamentos, embora não significativamente, a dieta controle (sem substituição) proporcionou a maior taxa de crescimento instantâneo (1,56 %) mas, por outro lado, apresentou o menor teor de proteína bruta (48,03 %). A dieta com 100 % de substituição, que apresentou o menor índice de crescimento (1,36 %), resultou em peixes com maior conteúdo de proteína bruta (52,86 %). Isto contradiz o que se observou para os períodos de avaliação, assim como os resultados obtidos por ECKMANN (1987). Desta forma, supõe-se que o maior conteúdo protéico dos peixes que receberam 100 % de substituição, com a menor taxa de crescimento, possa ocorrer em função de presença de fator de desnutrição, como nos casos de subalimentação. Além do que, as dietas com maior inclusão de levedura poderiam conter menor conteúdo de proteína bruta verdadeira, pois conforme alguns autores (DAVIES & WAREHAM, 1988; RUMSEY et al., 1992; KIESSLING & ASKBRANDT, 1993) em produtos com alto teor de ácidos nucléicos como leveduras é um engano a utilização do fator $N_2 \times 6,25$ no cálculo da proteína bruta.

Outros autores também constataram aumentos de proteína e cinza corporal e redução na taxa de crescimento com o acréscimo de levedura na dieta de peixes (TACON & COOKE, 1980; DABROWSKI et al., 1980; MAHNKEN et al., 1980; MARTIN et al., 1993).

De modo geral, o conteúdo de lipídios nos peixes tende a aumentar com a idade (tamanho), declinar durante inverno e alcançar o máximo no final das estações de alimentação (WEATHERLEY & GILL, 1989). PAPOUTSOGLOU & PAPAPARASKEVA-PAPOUTSOGLOU(1978) observaram, em estudo comparativo da composição corporal de trutas arco-íris (*Salmo gairdneri* R.), em relação ao tipo de dieta e taxa de crescimento, que o aumento do tamanho do peixe leva a diminuição do conteúdo de água e aumento de gordura, com menores alterações em proteínas e minerais. Isto está de acordo com os resultados do presente estudo, sendo detectado maior conteúdo de lipídios na segunda avaliação.

4.4. Aspectos do metabolismo

Os resultados da análise de variância, coeficientes de variação e médias comparadas pelo teste de Tukey das variáveis metabólicas estudadas, frente às diferentes concentrações de levedura na dieta e nos dois períodos de avaliação são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Resumo da análise de variância, coeficientes de variação e médias comparadas pelo teste de Tukey (5 %) das características metabólicas estudadas, Hematócrito (Hem), Glicemia (Gli), Proteína Plasmática (PP), Ácidos Graxos Livres (AGL), Glicogênio Total do Músculo (GTM), Glicogênio Total do Fígado (GTF), Lipídios Totais do Fígado (LTF) e Índice Hepatossomático (IHS).

Causas de Variação	Valores de F para as variáveis analisadas							
	Hem (%)	Gli (mg/100 ml)	PP (g/100 ml)	GTM g %	GTF (g/%)	AGL (μmol/ml)	LTF (mg/100mg)	IHS (%)
Bloco	4,18 [*]	0,74 ^{NS}	5,80 [*]	0,66 ^{NS}	1,51 ^{NS}	1,18 ^{NS}	2,06 ^{NS}	0,70 ^{NS}
Tratam. (T)	0,08 ^{NS}	1,62 ^{NS}	1,64 ^{NS}	0,44 ^{NS}	1,76 ^{NS}	0,36 ^{NS}	3,40 ^{NS}	1,92 ^{NS}
Aval. (A)	80,46 ^{**}	93,57 ^{**}	2,59 [*]	17,38 ^{**}	63,31 ^{**}	0,55 ^{NS}	41,03 ^{**}	10,24 ^{**}
T x A	1,12 ^{NS}	(6,65 ^{**})	(3,82 ^{**})	2,11 ^{NS}	(2,60 [*])	0,78 ^{NS}	(3,62 ^{**})	1,25 ^{NS}
T (A1)	-	0,96 ^{NS}	1,87 ^{NS}	-	5,97 ^{**}	-	2,51 ^{NS}	-
T (A2)	-	7,36 ^{**}	5,36 ^{**}	-	2,48 ^{NS}	-	7,11 ^{**}	-
CV Tratam.	11,39	31,12	28,83	176,16	44,66	36,63	44,37	25,56
C V Aval.	5,79	18,71	20,38	102,62	18,05	23,92	30,39	15,20
Médias:								
Tratamentos		A1 A2	A1 A2		A1 A2		A1 A2	
1 (0)	31,58	110,88 ^A 146,48 ^{bB}	5,34 ^{A1/} 5,00 ^{abB}	0,0080	7,14 ^{aA} 5,71 ^B	0,49	2,72 ^A 3,62 ^{acB}	2,18
2 (25 %)	31,89	105,91 ^A 131,91 ^{bcdB}	4,61 ^A 5,87 ^{abB}	0,0092	6,46 ^{abA} 5,57 ^B	0,47	2,52 ^A 3,99 ^{abB}	2,09
3 (50 %)	31,90	100,23 ^A 138,69 ^{bcdB}	4,97 ^A 5,43 ^{abB}	0,0131	6,62 ^{aA} 5,66 ^B	0,46	2,11 ^A 3,00 ^{bcdB}	2,28
4 (75 %)	31,50	113,38 ^A 121,34 ^{cdB}	5,09 ^A 5,47 ^{abB}	0,0100	7,21 ^{aA} 4,93 ^B	0,46	1,66 ^A 3,34 ^{adB}	2,22
5 (100 %)	32,43	103,72 ^A 178,07 ^{abB}	4,62 ^A 4,37 ^{bB}	0,0183	5,14 ^{bA} 4,99 ^B	0,45	2,31 ^A 2,19 ^{bB}	2,00
Avaliação								
1 (45 dias)	30,55 ^b	107,17	4,95	0,0129 ^a	6,58	0,45	2,27	2,23 ^a
2 (87 dias)	33,07 ^a	140,00	5,37	0,0077 ^b	5,41	0,48	3,34	2,10 ^b

** (P<0,01); * (P<0,05); NS - não significativo; ^{1/} -valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey. (Letras maiúsculas comparam médias nas linhas e minúsculas nas colunas).

Os níveis crescentes de biomassa seca de levedura alcoólica em substituição à farinha de peixe nas dietas não foram causa de alteração significativa ($P > 0,05$) para as diferentes variáveis metabólicas estudadas (hematócrito, glicemia, proteína plasmática, ácidos graxos livres, glicogênio total do músculo, glicogênio total do fígado, lipídios totais do fígado e índice hepatossomático).

As características metabólicas analisadas apresentaram diferenças significativas para os períodos de avaliação, com excessão de ácidos graxos livres. Verifica-se que houve interação significativa entre tratamento e períodos de avaliação para glicemia, proteína plasmática, lipídios totais do fígado ($P < 0,01$) e glicogênio total do fígado ($P < 0,05$).

Os níveis glicêmicos não apresentaram diferença significativa com o acréscimo de levedura na dieta até os 45 dias do experimento. Já, na segunda avaliação (87 dias), a concentração de levedura na dieta elevou significativamente ($P < 0,05$) a glicemia dos peixes que receberam 100 % de substituição. Segundo HEAF & DAVIES (1976) a hidrólise de proteínas de levedura que contem 1 g de ácido nucléico produz aproximadamente 400 mg de açúcar (pentose) e, em seu experimento com ratos, a dieta com RNA de levedura aumentou a concentração de ribose no intestino e na urina, sem efeito significativo na concentração plasmática. Isto não se confirmou para peixes no presente experimento, uma vez que foi detectado na dieta com 100 % de substituição, aos 87 dias, o teor mais elevado de

glicemia (178,07 mg/100 ml) que diferiu significativamente ($P < 0,05$) dos demais níveis de inclusão. O valor médio de glicemia dos peixes observado aos 45 dias foi menor ($P < 0,01$) que aos 87 dias (de 107,17 para 140,00 mg/100 ml). MAHNKEN et al. (1980) ao avaliar a glicemia do salmão “coho” alimentado com doses crescentes de levedura na ração concluíram que a saúde dos animais permaneceu normal por não ocorrer hiperglicemia (fator de estresse nutricional). O elevado teor de glicose no sangue dos peixes que receberam o tratamento 5 (100 % de substituição), aos 87 dias, pode ter ocorrido por um estresse nutricional, embora a hiperglicemia verificada nos outros grupos (0, 25, 50 e 75) não seja explicada pela presença da levedura, já que o controle também mostrou o mesmo perfil. Por outro lado, nenhum fator ambiental se destacou no período e o manejo foi padronizado.

A concentração de glicogênio hepático foi menor ($P < 0,01$) na segunda avaliação (de 6,58 para 5,41 %). Os níveis crescentes de levedura na dieta foram causas de variação no primeiro período de avaliação, obtendo-se para 100% de substituição o menor teor (5,14 %), que diferiu ($P < 0,05$) dos demais. Na segunda avaliação houve apenas tendência de diminuição, com efeito pronunciado nas dietas de maior inclusão de levedura (75 e 100 %).

O maior teor de glicemia e mais baixa concentração de glicogênio hepático observados nos peixes que receberam 100 % de substituição na segunda avaliação, pode indicar uma deficiência da glicogênese ou seja, na capacidade de transformar

a glicose em glicogênio. O teor da glicose sanguínea depende das taxas de produção e utilização desta molécula por alguns tecidos, fígado, músculo e tecido adiposo (Cooney & Newsholme, 1984 citados por MADAR & AREL, 1991). A glicose é canalizada para estoques de combustíveis, tais como triacilglicerol e glicogênio. Para a indução destes processos requer-se estimulação de enzimas envolvidas nos mesmos. Na via de depósito do glicogênio temos a glicogênio sintase, enzima interconvertível que existe nas formas ativa e inativa no músculo, fígado e tecido adiposo, dependendo do estado fisiológico do animal, como jejum ou realimentação e que incorpora glicose em glicogênio via UDPG (Nedergaard & Lindberg, 1982 citados por MADAR & HAREL, 1991).

A explicação para o fato verificado nesta pesquisa, de disponibilidade de substrato, e baixa concentração de glicogênio pode estar baseada em várias possibilidades. Pode-se por exemplo, aventar a possibilidade de inibição da glicogênio sintase.

Os derivados de nucleotídeos da uridina são coenzimas importantes em reações que envolvem o metabolismo da galactose e a polimerização da glicose. Nessas reações, os substratos são uridina difosfatoglicose (UDP Glu) e a uridina difosfatogalactose (UDP Gal). A UDP Glu é o precursor do glicogênio (MARTIN Jr., 1982).

Altos níveis de uridina provenientes do RNA da levedura seriam substrato para a formação de UTP e, conseqüentemente, UDPG, ocorrendo, neste caso, inibição da glicogênio sintetase por excesso de substrato. MURRAY et al. (1990) cita que em bactérias capazes de sintetizar um metabólito biossintético, a presença deste no meio de cultura reduz sua nova síntese através da repressão. Uma pequena molécula, como uma purina ou um aminoácido, pode inibir a síntese das enzimas envolvidas na sua síntese.

Pode ter ocorrido elevada produção de uridina difostato, com o acréscimo da levedura. A quebra do RNA da levedura em suas bases púricas e pirimidínicas livres, (adenina, guanina, citosina, uracil) pode ter elevado a concentração de uracil, substrato para formação de uracildifostato. CLIFFORD & STORY, (1976) observaram, em ensaio com ratos, tratados com dietas suplementadas com adenina, houve alteração da atividade de enzimas purínicas hepáticas. Ao administrar altas doses de RNA de levedura em dietas para ratos, HEAF & DAVIES (1976) observaram aumento nos níveis plasmáticos de ácido úrico e uridina, sendo este valor pouco significativo quando comparado ao alto conteúdo de uracil plasmático, o qual chegou a aumentar mais de 20 vezes em relação ao controle.

Pode-se, ainda, supor que o açúcar responsável pelos altos valores de glicemia não seja exclusivamente glicose, mas, em grande parte, pentoses derivadas da hidrólise da proteína bruta da levedura. O método utilizado para determinação de glicose

neste experimento, na verdade, é inespecífico, quantificando todos os açúcares presentes no sangue dos animais alimentados com 100 % de levedura. A insulina é um hormônio pancreático liberado por efeito de glicose (MOMMSEN & PLISETSKAYA, 1991) e que atua como ativador da glicogênio sintase por mecanismo de fosforilação (MURRAY et al., 1990). No presente experimento, o prejuízo na glicogênese poderia ser a falta de estímulo na secreção de insulina pela presença de outros açúcares que não a glicose e, conseqüentemente, falha na ativação da glicogênio sintase.

Por outro lado, MOURA (1985) sugere que dietas deficientes em aminoácidos essenciais conduzam à queda na síntese de r-RNA e das proteínas hepáticas. Embora pela análise de aminoácidos da dieta utilizada no presente trabalho, fosse demonstrado a presença de quantidade suficiente dos aminoácidos essenciais, sua disponibilidade biológica não foi testada. Quanto se utilizou proteína animal a disponibilidade dos aminoácidos poderia ter ocorrido. Na substituição total pode ter havido deficiência deste nutriente para o peixe.

Alterações semelhantes às do presente trabalho no metabolismo de carboidratos também foram encontradas, em peixes submetidos à situação estressante, como constatado por agentes tóxicos (REDDY & YELLAMMA, 1991; GOVINDAN et al., 1994; SHAKOORI et al., 1994; GANATHY et al., 1994), exposição à ambientes

ácidos (TAM et al., 1987) e presença de fatores antinutricionais (RUMSEY et al., 1992).

No tocante ao glicogênio muscular houve uma diminuição significativa ($P < 0,01$) após 87 dias de tratamento, à semelhança do obtido para glicogênio hepático em tratamento de total substituição da proteína de origem animal, e no decorrer do tempo, fazendo supor ocorrência de mecanismo semelhante no sugerido para glicogênio hepático.

Observa-se para lipídios totais do fígado, comportamento inverso ao verificado para glicogênio hepático nos períodos de avaliação. Na segunda avaliação, os valores médios foram superiores ($P < 0,01$) aos observados na primeira (de 2,27 para 3,34 mg / 100 mg). Aos 87 dias a concentração de levedura na dieta foi causa de variação significativa ($P < 0,05$) para lipídio hepático. Verificou-se, neste período, que 100 % de substituição levou à menor concentração de lipídio (2,19 %). Esta menor concentração nos peixes, no nível de 100 % de substituição aos 87 dias, pode significar processo lipogênico deprimido como ocorreu na síntese de glicogênio.

Segundo MURRAY et al. (1990), a velocidade de liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo e fígado é afetada por muitos hormônios que influenciam tanto a velocidade de esterificação como a velocidade de lipólise. A insulina inibe a

liberação dos ácidos graxos do tecido adiposo e fígado, que é inibida por um decréscimo de ácidos graxos livres do plasma circulante. Aumenta a lipogênese e a síntese de acilglicerol e aumenta a oxidação da glicose a CO_2 via desvio das pentoses-fosfato. Todos estes efeitos dependem da presença de glicose e podem ser explicados, em grande parte, com base na capacidade da insulina acelerar a captação de glicose pelas células. Isto é alcançado pela insulina que leva a translocação dos transportadores de glicose do aparelho de Golgi para a membrana plasmática. Também, tem sido observado que a insulina aumenta a atividade da piruvato-desidrogenase, acetil-CoA-carboxilase e glicerol-fosfato-aciltransferase, o que reforçaria os efeitos que surgem do aumento da captação de glicose sobre a intensificação da síntese dos ácidos graxos e triacilgliceróis. Atualmente acredita-se que estas três enzimas são reguladas de forma coordenada por modificação covalente, i. é, por mecanismo de fosforilação-defosforilação. Uma ação importante da insulina no tecido hepático é inibir a atividade da lipase hormônio-sensível, reduzindo, não só a liberação dos ácidos graxos, mas, também do glicerol.

Em peixes (MOMMSEN & PLISESTKAYA, 1991), estes efeitos são relatados embora em algumas espécies seja possível encontrar resultados divergentes. A hipótese do açúcar circulante no tratamento com 100 % de levedura não ser exclusivamente glicose, mas também pentoses, com conseqüente ausência de estimulação de insulina, vem de encontro a um possível processo de lipogênese deprimida. Também como MOURA (1985) sugeriu, a deficiência em aminoácidos

essenciais poderia diminuir a síntese de proteínas hepáticas ou seja, das enzimas atuantes neste tecido. SHIMMA & SHIMMA (1976), em estudo com trutas arco-íris alimentadas com dietas contendo levedura de petróleo, observaram nítida redução no conteúdo de colesterol do fígado, comparado ao grupo controle. Analogamente à estes estudos, SOUZA (1994) observou diminuição significativa no conteúdo de lipídio hepático de pacus juvenis submetidos a 30 dias de restrição alimentar.

Qualquer alteração que tenha ocorrido no metabolismo lipídico hepático, esta não se refletiu no nível de ácidos graxos livres plasmáticos, já que a relação entre a concentração de levedura na dieta e os ácidos graxos livres plasmáticos não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$), assim como para os períodos de avaliação.

Para a proteína total plasmática, verificou-se que os períodos de avaliação foram causas de variação significativa ($P < 0,05$), sendo maior a concentração (5,37 g/100 ml) nos peixes mantidos até 87 dias. Nesta segunda avaliação, os peixes que receberam 100 % de levedura apresentaram as mais baixas concentrações (4,37 g/100 ml). O aumento verificado com o passar do tempo pode ser reflexo da menor taxa de crescimento instantâneo verificado neste período. Embora houvesse disponibilidade de substrato, pela administração na dieta, o organismo não utilizou para síntese protéica como no período anterior, quando ocorreu maior taxa de crescimento. Quanto aos níveis mais baixos de proteína plasmática verificados com

100 % de inclusão, pode-se argumentar, de mesmo modo que para carboidratos e lipídios. Também para síntese protéica, pode ter havido depressão do mecanismo biossintético por prejuízo no sistema enzimático, corroborando o perfil observado para os outros substratos energéticos. SÁNCHEZ -MUNIZ et al. (1978) observaram em trutas, que os níveis de proteína plasmática não foram afetados pelo consumo de levedura, como verificado na presente pesquisa, mas os autores verificaram que houve mudança na taxa albumina: globulina.

Foi detectado aumento significativo ($P < 0,01$) no valor de hematócrito para os períodos de avaliação, de 30,55 % aos 45 dias para 33,07 % aos 87 dias (Tabela 11), estando dentro da faixa considerada normal, conforme dados apresentados na Tabela 2. Isto demonstra que, em média, a continuidade do tratamento elevou o valor de hematócrito. SÁNCHEZ-MUNIZ et al. (1978) observaram em trutas alimentadas com dietas contendo levedura, aumento significativo (43 %) nas células vermelhas do sangue, porém sem correspondente aumento da hemoglobina, e sem alteração significativa do hematócrito. Esta eritropoiese anormal levou a uma anemia microcítica e hipocrômica, que investigada em experimento subsequente (SÁNCHEZ-MUNIZ et al., 1982) foi atribuída à intoxicação dos eritrócitos por peróxido de hidrogênio, produto do catabolismo de ácidos nucléicos, o que os tornou não funcionais por conter meta hemoglobina, estimulando uma demanda por oxigênio e conseqüentemente maior produção de eritrócitos. HEAF & DAVIES (1976) constataram em estudo com ratos que receberam doses elevadas de RNA

de levedura, que ocorre transporte de bases nitrogenadas pelos eritrócitos. Analogamente a este estudo, efeitos semelhantes foram observados por JOHANSON-SJÖBECK et al. (1975) com enguias submetidas ao jejum. Foi observado aumento nos valores de hematócrito pela liberação de eritrócitos dos depósitos sangüíneos, sendo que este aumento não acompanhou a biossíntese de hemoglobina, o que pôde ser atribuído a uma deficiência de ferro, caracterizado por uma anemia microcítica e hipocrômica, como observado por SÁNCHEZ-MUNIZ et al. (op. cit.) em estudo dos efeitos da levedura em dietas para trutas. KAMRA (1966) também observou aumento no valor de hematócrito após submeter o bacalhau (*Gadus morhua*) a trinta dias de jejum. Sugere-se, assim, que no presente estudo, a tendência de aumento do hematócrito pode indicar aumento na produção de eritrócitos, estimulado pelo transporte de bases nitrogenadas, assim como SÁNCHEZ-MUNIZ et al. (1982) mostraram aumento de eritrócitos imaturos, produzidos por estímulo de demanda de O₂.

TACON & COOKE (1980) em estudo com truta arco-íris e MAHNKEN et al. (1980) com salmão "coho", ao avaliar os efeitos do acréscimo de levedura na ração não detectaram diferença significativa em termos de valor de hematócrito e índice hepatossomático. O menor índice hepatossomático notado aos 87 dias neste experimento (2,10 %) está de acordo com alterações ocorridas nos depósitos de glicogênio e lipídio. Baixo índice hepatossomático observado por KIESSLING & ASKBRANDT (1993) em trutas arco-íris que receberam dietas com proteína

unicelular, indicou um distúrbio metabólico causado por um componente tóxico desconhecido nesta fonte protéica.

De outra forma, sendo o fígado o principal órgão de formação dos produtos finais do metabolismo do nitrogênio, segundo WALTON (1988), o fato de não ter sido detectada alteração do índice hepatossomático, tomado como indicador da condição do fígado, com o acréscimo de levedura na dieta (Tabela 11), sugere que a uricase deve estar presente e ativa em quantidades suficientes para metabolizar o ácido úrico formado com o acréscimo da levedura. HIGUERA et al. (1981) constataram que não houve alteração do índice hepatossomático de trutas alimentadas com dietas que continham levedura e, assim, concluíram que a uricase deveria estar ativa, uma vez que não ocorreu acúmulo de ácido úrico. Entretanto, os autores observaram que o acréscimo de levedura na dieta provocou um aumento de três vezes na concentração de ácido úrico do rim, com elevação significativa do índice rim-somático. Os resultados foram atribuídos tanto à baixa concentração de uricase no rim, quanto à inibição desta enzima pelo acúmulo de substrato ou produto de reação.

Estudos recentes sugerem que salmonídeos são capazes de metabolizar doses relativamente elevadas de ácidos nucléicos por possuírem alta atividade hepática da uricase, sendo o ácido úrico o principal substrato (HIGUERA et al., 1981; KINSELLA et al., 1985; RUMSEY et al. 1991).

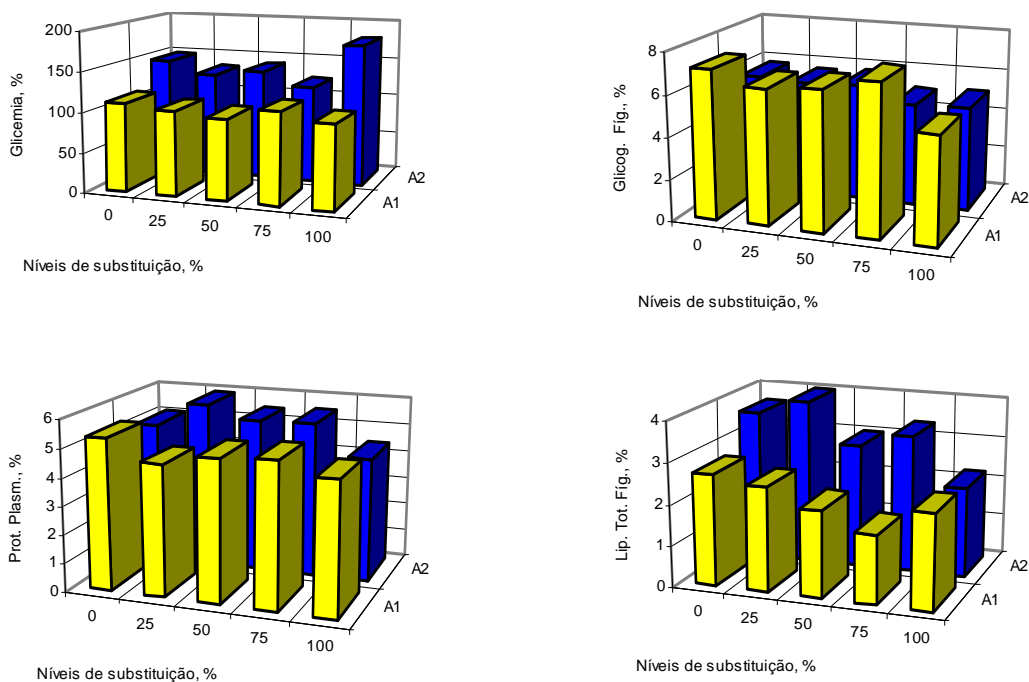


Figura 6. Variáveis metabólicas, efeitos dos níveis de levedura seca de álcool na ração e das diferentes épocas de avaliação.

4.4.1. Estudo morfométrico do fígado

Na Tabela 12 são apresentados os dados de morfometria dos hepatócitos de juvenis de pacu, frente aos diferentes níveis de levedura, e referentes às duas fases experimentais.

Pela análise de variância, detectou-se diferença significativa do aumento da substituição da farinha de peixe pela levedura alcoólica sobre as variáveis morfométricas dos hepatócitos, área da célula ($P < 0,01$), área do núcleo, volumes celular e nuclear ($P < 0,05$). A área e o volume celular foram superiores ($P < 0,01$) nos

peixes do controle, exceto para a substituição de 50 %, que não diferiu significativamente do controle, para a área da célula.

Tabela 12. Resumo da análise de variância, coeficientes de variação e médias comparadas pelo teste de Tukey das características de morfometria dos hepatócitos estudadas, área da célula (AC), área do núcleo (AN), volume da célula (VC) e volume do núcleo (VN).

C. de Variação	Valores de F para as variáveis analisadas			
	AC (μm^2)	AN (μm^2)	VC (μm^3)	VN(μm^3)
Bloco	0,37 ^{NS}	0,34 ^{NS}	0,37 ^{NS}	0,49 ^{NS}
Tratamento (T)	9,45 ^{**}	5,66 [*]	10,18 [*]	5,51 [*]
Avaliação (A)	40,64 ^{**}	32,00 ^{**}	41,70 ^{**}	40,83 ^{**}
T x A	0,67 ^{NS}	(2,74 [*])	0,48 ^{NS}	3,44 ^{NS}
T (A1)	-	3,96 ^{**}	-	-
T (A2)	-	4,22 ^{**}	-	-
CV Tratamento	17,72	11,76	18,27	11,23
CV Avaliação	12,09	12,74	12,52	12,07
Médias:				
Tratamentos		A 1	A 2	
1 (0)	159,96 ^a	16,47 ^{acA1/}	14,33 ^{acB}	16,90 ^a
2 (25%)	132,06 ^b	15,04 ^{bcA}	12,63 ^{bcB}	13,81 ^b
3 (50 %)	137,89 ^{ab}	15,55 ^{bcA}	15,21 ^{ab}	14,44 ^b
4 (75 %)	132,37 ^b	16,77 ^{acA}	15,32 ^{ab}	13,68 ^b
5 (100 %)	116,70 ^b	18,59 ^{aA}	14,37 ^{acB}	12,04 ^b
Avaliação:				
1 (45 dias)	146,21 ^a	16,38	15,33 ^a	1,82 ^a
2 (87 dias)	137,98 ^b	14,37	13,31 ^b	1,58 ^b

** (P<0,01); * (P<0,05); NS - não significativo; ^{1/} -valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.(Letras maiúsculas comparam médias nas linhas e minúsculas nas colunas).

RUMSEY et al. (1992) observaram, que o acréscimo de RNA de levedura na ração, elevou (P<0,05) a concentração de ácido ribonucléico no fígado, porém sem afetar o total de nitrogênio. Segundo os autores, sendo o fígado o local primário do metabolismo dos ácidos nucleicos, níveis elevados refletem sua incorporação no tecido hepático. CLIFFORD & STORY (1976) obtiveram resultados semelhantes em ensaio com ratos, sendo observado que os níveis hepáticos de nucleotídeos de adenina e guanina, elevaram-se com o acréscimo, respectivamente, de cada nucleotídeo na dieta, que reflete a incorporação direta de dietas de purinas nos

nucleotídeos purínicos do fígado. Além disso, os autores observaram aumento na atividade de diversas enzimas no fígado. Isto pode estar associado a aumento do volume e área do núcleo, mas tal fato não ocorreu no presente trabalho. Outros autores não observaram diferença na estrutura celular do fígado, com o acréscimo de levedura na dieta, porém verificaram aumento da atividade da enzima uricase, em estudo com trutas arco-íris (TACON & COOKE, 1980).

A observação da redução da área e volume celular, com acréscimo de levedura na ração, correlaciona-se positivamente com os resultados de glicogênio hepático e IHS, apresentados na Tabela 11. Resultados semelhantes, de redução no tamanho dos hepatócitos, foram obtidos em ensaio realizado por STORCH & JUARIO (1983), quando alevinos de “milkfish” foram submetidos ao jejum. Foi observado também, redução no tamanho do núcleo, perda aparente do nucléolo, condensação da cromatina e diminuição nos estoques de glicogênio. Pode-se, assim, observar, que na presente pesquisa, o acréscimo de levedura levou a uma redução significativa ($P < 0,01$) no tamanho da célula, já no menor nível de inclusão de levedura (25 %).

O período de avaliação foi causa de variação para as características morfométricas dos hepatócitos. Aos 45 dias do experimento, como demonstra a Tabela 12, as médias das variáveis analisadas foram superiores às da segunda avaliação (87 dias). Este comportamento em relação à área e volume celular, reflete os resultados verificados para glicogênio do fígado e índice hepatossomático (Tabela 11).

Os resultados obtidos divergem de alguns estudos, quando não foi verificada alterações histológicas no fígado de peixes alimentados com levedura (RUMSEY et al., 1992; TACON & COOKE, 1980), assim como também em ensaios com ratos (COZZOLINO, 1982; MATTOS et al., 1983).

Verifica-se que houve interação ($P < 0,05$) entre tratamento e avaliação para a área do núcleo dos hepatócitos ($P < 0,05$). O comportamento das médias pode ser melhor visualizado pela observação da Figura 7. Aos 45 dias, a maior e menor médias foram observadas respectivamente, nos tratamentos com 100 % e 25 % de substituição ($18,59 \mu\text{m}^2$ e $15,04 \mu\text{m}^2$), enquanto que, na segunda avaliação, a maior e menor medias ocorreram respectivamente, nos tratamentos com 75 % e 25 % de substituição ($15,32 \mu\text{m}^2$ e $12,63 \mu\text{m}^2$). Estes resultados não mostram um perfil regular, de modo que se possa aventar hipótese coerente. Em caso de aumento da área do núcleo por efeito da inclusão de levedura os animais controle teriam que apresentar os menores valores, o que não ocorreu.

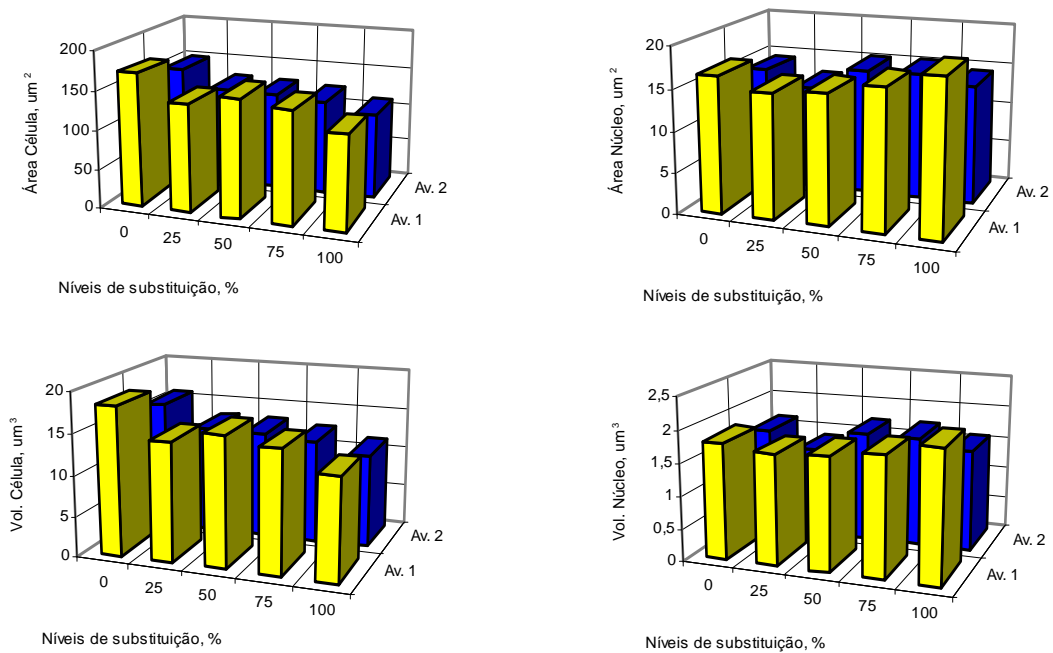


Figura 7. Variáveis morfométricas, efeito dos níveis de levedura seca de álcool na ração e das diferentes épocas de avaliação

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo foram:

- Até o nível de 75 % de substituição da farinha de peixe por levedura não se constatou efeitos negativos nos diversos parâmetros avaliados.
- A presença de levedura nas dietas, aos 87 dias, alterou a curva de crescimento dos peixes, que apresentaram, em média, menor taxa de crescimento instantâneo e menor taxa de eficiência protéica.
- As concentrações de proteína bruta e umidade do corpo dos peixes que receberam 100 % de levedura em substituição à farinha de peixe tenderam a aumentar, enquanto a concentração de cinzas foi significativamente superior e, com perfil inverso para lipídios.

- A levedura das dietas proporcionou aos peixes menor resistência às condições ambientais desfavoráveis, constatado pelo alta mortalidade (50 %) no tratamento com 100 % de substituição.

- O elevado nível de glicemia dos peixes que receberam 100 % de substituição e a baixa concentração hepática de glicogênio apontam para uma deficiência da glicogênese. O processo de lipogênese e proteogênese também se mostraram prejudicados nesta condição. O IHS acompanhou a redução do glicogênio hepático.

- Aumento no hematócrito por efeito do tratamento com 100 % de levedura, só apareceu após 87 dias.

- A análise morfométrica dos hepatócitos refletiu a incapacidade na glicogênese. A redução na área e volume celular, com acréscimo de levedura na ração, correlacionou-se positivamente com os resultados de glicogênio hepático e IHS.

Nas condições do presente trabalho, os resultados obtidos permitem concluir que a inclusão de levedura alcoólica (*Saccharomyces cerevisiae*) como fonte de substituição de proteína animal não mostrou efeito prejudicial no desempenho produtivo e metabolismo de juvenis de pacu até o nível de 75 % de substituição, em tratamento de 87 dias. Ao nível de 100 %, observaram-se alterações nos parâmetros citados, indicando um possível efeito antinutricional desta dieta.

Em face dos resultados sugere-se uma investigação mais acurada para verificar a possibilidade das alterações ocorrerem com níveis de substituição mais baixos, quando os animais forem alimentados por tempo mais longo, sugere-se estudos sobre disponibilidade biológica dos nutrientes da dieta, através de testes de digestibilidade.

6. SUMMARY

The present experiment assessed the effect of inclusion of different levels of the single cell protein molasses yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in the diet of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) replacing fish meal. Five isoproteic (26 % CP) and isocaloric (4000 kcal GE/kg) diets were formulated in which the levels of substitution by yeast were 25, 50, 75 and 100 % and tested in two periods, following a Split Plot in Time design. Diets were fed twice a day ad libitum. Two hundred fish were allotted in 20 cement tanks of 1330 l, with continuous water flow, and sampled at 45 and 87 days after start feeding. It was possible to include until 75 % of molasses yeast in substitution of fish meal without negative effects in the parameters analyzed. The highest level of yeast in the diet (100 %) showed delayed growth, with low specific growth rate and did not affected significantly the body composition, excepting for higher mineral content. The same level of yeast provoked high mortality of fish. Its was observed hyperglycemia and decrease in liver glycogen, total liver lipid content and plasma protein in fish fed on diet containing 100 % molasses yeast. Following the same pattern of response hepatocytes showed the lowest area and volume of cytoplasm, at the same treatment. Increase in hematocrit levels appeared at 100 % molasses yeast diet only at 87 days. The other molasses yeast diets (25, 50 and 75 %) presented similar performance compared to control diet. Concluding, the results of the present study suggest that the diet with total replacement of fish meal by molasses yeast showed an antinutritional effect.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L.M.C. et al. Avaliação de níveis crescentes de levedura seca *Saccharomyces cerevisiae*, de vinhaça incorporados às rações de Tilápias-do-Nilo *O. niloticus*. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE AQUICULTURA, 6, SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 5, 1988. Florianópolis. *Resumos...* p.52.
- ANUALPEC 95. *Anuário estatístico da pecuária de corte*. São Paulo, 1995 268 p.
- ARAI, S. A purified test diet for coho salmon, *Oncorhynchus kisutsch*, fry. *Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish.*, Tokyo, v.47, p.547-50, 1981.
- ATAACK, T. H., JAUNCEY, K., MATTY, A. J. The utilization of some single proteins by fingerling mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, Amsterdam, v.18, p.337-48, 1979.
- BARROS, M. M. et al. Utilização da levedura de álcool de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) em dietas para alevinos de Tilápia-do-Nilo

- (*Oreochromis niloticus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 23, 1986, Campo Grande, *Anais ...* p.89.
- BLIGH, E.G., DYER, W.J.A. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, Ottawa, v. 37, n.8, p.911-17, 1959.
- BOYD, C.E. *Water quality in warmwater fish ponds*. 3 ed. Alabama: Auburn University, Craftmaster Printers, 1984. 359 p.
- BOZE, H., MOULIN, G., GALZY, P. Production of food and fodder yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.*, London, v.12, n.1/2, p.65-86, 1992.
- BRENER, M. et al. Determinação da exigência de proteína do pacu (*Colossoma mitrei* Berg, 1895). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 25, 1988, Viçosa. *Anais...* p.78.
- CANTELMO, O. A., GOMES, S. Z., RIBEIRO, M. A. R. Níveis de proteína e energia para o crescimento do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Homberg, 1887). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 8, ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 3, Piracicaba, 1994, *Resumos...* p. 44.
- CARNEIRO, D. J., CARVALHO, D. D. G., DIAS, T. C. R. Avaliação da composição corporal do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após desenvolvimento inicial sob alimentação com vários níveis de arraçoamento e proteína bruta em dietas isocalóricas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 8, ENCONTRO BRASILEIRO DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 3, Piracicaba, 1994, *Resumos...* p.45.

- CARNEIRO, D.J. *Níveis de proteína e energia na alimentação do pacu Colossoma mitrei (Berg, 1895)*. Jaboticabal, 1983. 56p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.
- CARROL, N.V. LONGLEY, R.W., ROE, J.H. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.220, p.583-90, 1956.
- CLIFFORD, A. J., STORY, D. L. Levels of prunes in foods and their metabolic effects in rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 106, p.435-42, 1976.
- COWEY, C.B., LUQUET, P. Physiological basis of protein requirements of fishes. Critical analyses of allowances. In: ARNAL, M., PION, R., BONIN, D. (Ed.). *Protein Metabolism and Nutrition*. Clermont-Ferrand: INRA, 1983. p.364-84.
- COZZOLINO, S.M.E. *Valor nutritivo da biomassa de Saccharomyces cerevisiae. Estudo em gerações sucessivas de ratos*. São Paulo, 1982. 147p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- DABROWSKI, K. et al. Effect of *Geotricum candidum* protein substitution in pelleted fish feeding on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich) and on the utilization of the diet. *Aquaculture*, Amsterdam, v.21, p.213-32, 1980.
- DABROWSKI, K.R. Ontogenical aspects of nutritional requirements in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, V.85 A, n.4, p.639-55, 1986.

- DAVIES, S. J., WAREHAM, H. A preliminary evaluation of an industrial single cell protein in practical diets for Tilapia (*Oreochromis moçambicus*, Peters). *Aquaculture*, Amsterdam, v.73, p.189-99, 1988.
- De SILVA, S., GUNASEKERA, R. M. Effect of dietary protein level and amount of plant ingredient (*Phaseolus aureus*) incorporated into the diets on consumption, growth performance and carcass composition in *Oreochromis niloticus* (L.) fry. *Aquaculture*, Amsterdam, v.80, p.121-33, 1989.
- DESMONTS, R. Tecnologia da produção dos fermentos secos de destilaria. *Bol. Inf. Assoc. Paul. Med.*, São Paulo, v.8, n2, p.1-11, 1966.
- DESMONTS, R. Utilização do levedo na alimentação da criança. *Conf. Ped. Prát.*, São Paulo v.39, n.7, p.7-18, 1968.
- DOLE, V.P., MEINERTZ, H. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.235, n.9, p.2595-99, 1960.
- ECKMANN, R. Growth and body composition of juvenile *Colossoma macropomum* Cuvier 1818 (Characoidei) feeding on artificial diets. *Aquaculture*, Amsterdam, v.60, p.292-303, 1987.
- ELIAS, H., BENGEOSDORE, H. The structure of the liver of vertebrates. *Acta Anat.*, Chicago, v.14, n.4, p.297-337, 1952.
- EMBRAPA. *Tabela de composição química e valores energéticos de Alimentos para Suínos e Aves*. Concordia, 1991. p.97

- FAO/WHO/UNU. *Energy and protein requirements*. Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. Geneva: FAO/WHO and the United Nations University, 1985. (Series, 724).
- GANATHY, V. et al. Effect of hexachlorocyclohexane on biochemical composition of the fish *Channa punctatus*. *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.*, v.4, n.1, p.15-20, 1994.
- GATLIN.III, D.M. Whole- body amino acid composition and comparative aspects of amino acid nutrition of the goldfish, golden shine and fathead minnow. *Aquaculture*, Amsterdam, v.60, p.223-29, 1987.
- GOLTHERMAN, H.L., CLYMO, R.S., OHNSTAD, M.A.M. *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. London: Blackwell , 1978. 213p.
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID. M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.17, p.751-66, 1949.
- GOVINDAN,V.S., JACOB, L., DEVIKA, R. Toxicity and metabolic changes in *Gambusia affinis* exposed to phosphamidon. *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.*, v.4, n.1, p.1-6, 1994.
- HEAF, D.J. , DAVIES, J.I. Effects of RNA supplementation of rat diets on the composition of body fluids. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, v.36, p.361-402, 1976.
- HEPHER, B. Requirement for protein. In:____. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p.175-216.
- HERTZ, Y. Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio*): the effects of cobalt and chromium. *Aquaculture*, Amsterdam, v.76, p.255-67, 1989.

- HIGUERA, M. de La. et al. Nitrogen utilization by rainbow trout (*Salmo Gairdneri*) fed on the yeast *Hansenula anomala*. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v. 69A, p.583-86, 1981.
- HSU, W.C. Protein from sugar on Taiwan. *Sugar Azucar*, v.56, n.7, p.33-36, 1961.
- HUET, M. *Tratado de Piscicultura*. Madrid: Mundi-Prensa, 1975. 728p.
- JOHANSON-SJÖBECK, M.L. et al. Metabolic and hematological effects of starvation in the european eel, *Anguilla anguill* L. II. Hematology. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v.52A, p.431-34, 1975.
- KAMRA, S.K. Efec of starvation and refeeding on some liver and bloo constituents of atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *J. Fish. Res. Board Can.* Ottawa, v.23, p.975-982,1966.
- KANEKO, H. et al. Lipid composition of 30 species of yeast. *Lipids*, Champaign v.11, n.12, p.837-44, 1976.
- KETOLA, H.G. Amino acid nutrition of fishes: requirements and suplementation of diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v.73B, p.17-24, 1982.
- KIESSLING, A., ASKBRANDT, S. Nutritive value of two bacterial straing of single-cell protein for rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, Amsterdam, v.109, p.119-130, 1993.
- KIHLBERG, R. The microbe as a source of food. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, v.26, n.4, p.426-65, 1972.
- KING, E.J., GARNER, R.J. Calorimetric determination of glucose. *J. Clin. Pathol.* London, v.1, p.30-3, 1947.

- KINSELLA, J.E., GERMAN, B. , SHETTY, J. Uricase from fish liver: isolation and some properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v.82b, p.621-24, 1985.
- KINSELLA, J.E., SHIMP, J. L., MAI, J., WEIHRAUCH, J. Sterol, phospholipid, mineral content and proximate composition of filetes of select fresh-water fish species. *J. Food Biochem.*, v. 1, p.131, 1977.
- KITAMIKADO, M., MORISHITA, T., TACHINO, S. Degestibility of dietary protein in rainbow trout - II. Effect of starch and oil contents in diets, and size of fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, Tokyo, v.30, p.50-55, 1964.
- KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRANSHOFFK, K. (Ed.) *Methods of sea water analysis*. Weinheim: Verlag. Chemie, 1976. p.117-181.
- LOESECKE, H.W. Controversal aspects: yeast in human nutrition. *J. Am. Diet. Assoc.*, Chicago, v.22, p. 485-93, 1946.
- LOVE, R.M. *The chemical biology of fishes*. London: Academic Press, 1970. 547p.
- MACHADO, M.G.S. *Composição em nutrientes e caracterização das proteínas do filé do pacu (Colossoma mitrei, Berg, 1895)*. Campinas, 1989, 63p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- MACHADO, P. F. et al. Valor nutritivo da levedura (*Saccharomyces cerevisiae* sp) para vacas em lactação. *Rev. Soc. Bras. Zoot.*, Viçosa, v.13, n.14, p.509-19, 1984.

- MADAR, Z., HAREL, A. Does the glycogen synthase (E C 2. 4. 1. 21) of brown adipose tissue play a regulatory role in glucose homeostasis? *Br. J. Nutr.*, v.66, p.95-104, 1991.
- MAHNKEN, C. V. W., SPINELLI, J., WAKNITZ, F. W. Evaluation of an alkane yeast (*Candida* sp.) as a substitute for fish meal in Oregon moist pellet: feeding trials with coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, Amsterdam, v.20, p.41-56, 1980.
- MAI, J. et al. E. Protein and amino acid composition of select freshwater fish. *J. Agric. Food Chem.*, New York, v. 28, p.884-85, 1980.
- MAIA, E.L. *Otimização da metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição em ácidos graxos e aminoácidos de peixes de água doce*. Campinas, 1992. 242p. (Tese Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- MAIA, V. *Técnica Histológica*. 2 ed. São Paulo. Atheneu, 1979. 246 p.
- MARTIN Jr., D.W. Metabolismo dos nucleotídeos purínicos e pirimidínicos. In: HARPER, H. A., RODWELL, V. W., MAYES, P. A. *Manual de Química Fisiológica*. São Paulo: Atheneu, 1982. p.458-78.
- MARTIN, A. M., GODDARD, S., BEMISTER, P. Production of *Candida utilis* as aquaculture feed. *J. Sci. Food Agric.*, Chichester, v.61, p.363-70, 1993.
- MASLENNIKOVA, N.V. The amino acid composition of some fish tissues. *J. Ichtiol.*, Bethesda, v.14, p.943-54, 1974.

- MATTOS, W. R. S., d'ARCE, R. D., MACHADO, F. P., MARCOS, A. L. M. Avaliação da qualidade da proteína de levedura seca (*Saccharomyces sp.*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 20, 1983, Pelotas. *Anais...* p.119.
- McLEAN, J. R., BEVERIDGE, J.M.R. Hepatic necrosis induced by dietary means. VI. The effect of varying the level and nature of protein on the level of fat on the development of liver necrosis. *J. Nutr.*, Bethesda, v.47, p.358- 63, 1952.
- MILLIKIN, M. R. Effect of dietary protein concentration on growth, feed efficiency, and body composition of age - 0 striped bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, Bethesda, v. 111, p.373-78, 1982.
- MISHRA, K.P., EHSAN, S., AHMAD, M.F. Comparative histoenzymological studies of liver of some teleosts in relation of to their feeding habits. *Folia Morphol.*, Prague, v. 36, n.3, p.386-92, 1988.
- MIYADA, V. S. *A levedura seca na alimentação de suínos: estudos adicionais sobre seu valor protéico e vitamínico*. Piracicaba, 1987, 159 p. Tese (Livre Docência) Escola Superior de Agricultura Luiz deQueiroz, Universidade de São Paulo.
- MOMMSEN, T.P., PLISETSKAYA, E.M. Insulin in fishes and agnathans: structure, and metabolic regulation. *Rev. Aquat. Sci.*, Boca Raton, v.4, n.2-3, p.225-59, 1991.
- MORAES, L. de M. *Estudo comparativo da morfologia e morfometria hepática de várias espécies de teleosteos*. Jaboticabal, 1995, 48p. (Trabalho apresentado à

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal para graduação em Zootecnia).

MOURA et al. Influência da proteína da biomassa (single Cell Protein), a nível de 8 %, obtida a partir de *Saccharomyces sp*, em alguns parâmetros bioquímicos no rato. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA, 5, 1979, San Salvador. *Anais...*

MOURA, E.C.V. Fontes protéicas não convencionais. Perspectivas de seu uso na alimentação. In: NOBREGA, F.J. *Desnutrição intra-uterina e pós-natal*. São Paulo: Panamed, 1985. p.43-64.

MOURA, E.C.V., ZUCAS, S.M. Valor biológico da proteína derivada da cana-de-açúcar pelo desenvolvimento de *Saccharomyces sp*. na vinhaça (Biomassa). I. Estudo a nível de 8 % de proteína na ração. *Ciênc. Cult.*, São Paulo, v. 33, n. 7, 1981.

MURAT, J.C. Endocrine control of nutrition in cyclostomes and fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v.68A, p.149-58, 1981.

MURRAY, A.P., MARCHANT, R. Nitrogen utilization in rainbow trout fingerling (*Salmo gairdneri*, Richardson) fed mixed microbial biomass. *Aquaculture*, Amsterdam, v.54, p.263-75, 1986.

MURRAY, R.K. et al. *Harper: Bioquímica*. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 1990, 705 p.

NELSON, G. E. N. et al. Lysine, Methionine and Tryptophan content of microorganisms. II Yeast. *Appl. Microbiol.*, Washington, v.8, p.179-82, 1960.

- NIKOLSKY, G. V. *The ecology of fishes*. 16. ed. New York: Academic Press, 1976. 351 p.
- NJAA, L.R., UTNE, F. Comparison of amino acid composition of fifteen species of whole fish. *Fish. Skrifter, Ernæring*, v.2, n.2, p.25-33, 1982. In: *Rev. Nutr. Abstr.-B*, Oxon, v.54, n.8, p.416, 1984. (Abstracts 3091).
- NOSE, T. Effects of amino acids supplemented to the petroleum yeast on growth of rainbow trout fingerlings. I. A preliminary experiment. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, Tokyo, v.24, p.57-63, 1974a.
- NOSE, T. Effects of amino acids supplemented to the petroleum yeast on growth of rainbow trout fingerlings. II. Methionine and cystine. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, Tokyo, v.24, p.101-108, 1974b.
- NRC (National Research Council) *Nutrient requirement of warmwater fishes and shellfishes*. Washington: Academic Press, 1983. 102p.
- OGINO, C. Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, Tokyo, v. 46, p.171-174, 1980.
- OLIVEIRA, E. G. de *Variações sazonais em parâmetros metabólicos do Tambacu (fêmea Colossoma macropomum x macho Piaractus mesopotamicus)*, Jaboticabal, 1993. 92 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- OSTROWSKI, A. C., DIVAKARAN, S. The amino acid and fatty acid compositions of selected tissues of the dolphin fish (*Coryphaena hippurus*) and their nutritional implications. *Aquaculture*, Amsterdam, v.80, p.285-99, 1989.

- PACHECO, M.T.B. *Propriedades funcionais, nutricionais e toxicológicas de concentrados protéicos de levedura (Saccharomyces sp.), obtidos por diferentes processos de extração*. Campinas, 1996. 158 p. Tese (Doutorado em Ciências da Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- PAPOUTSOUGLOU, S. E., PAPAPARASKEVA-PAPOUTSOUGLOU, E. G. Comparative studies on body composition of rainbow trout (*Salmo gairdineri* R.) in relation to type of diet and growth. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 13, p. 235-43, 1978.
- PÓO, M.E., MILLÁN, N. Efecto de la concentracion dietaria de la levedura (*Saccharomyces carlsbergensis*) recuperada de la creveza, en pollos machos wares. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Guatemala, v.11, p. 95-100, 1990.
- PROENÇA, C.E.M., BITTENCOURT, P.R.L. *Manual de piscicultura tropical*. Brasilia: IBAMA/ DIREN/ DEPAQ/ DIPEA, 1994, 195p.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T., GODINHO, H. M. Características do plasma sangüíneo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, Homberg, 1887 (= *Colossoma mitrei*, Berg, 1895) em condições experimentais de criação. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 15, p.169-77, 1988.
- REDDY, A.T.V., YELLAMMA, K. Perturbations in carbohydrate metabolism during cypermethrin toxicity in fish, *Tilapia mossambica*. *Biochem. Int.*, Marrickville, v.23, n.4, p.633-38, 1991.

- ROBERTS, R. J., BULLOCK, A. M. Nutritional pathology. In: HALVER, J. E. *Fish Nutrition*. New York: Academic Press, 1988. p. 424-69.
- ROSE, A.H., HARRISON, J.N. *The Yeast*. London: Academic Press. 1970. v.3.
- RUMSEY, G.L., HUGHES, S.G., KINSELLA, J.E. Use of dietary yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) nitrogen by lake trout. *J. World Aquacult. Soc.*, Baton Rouge, v.22, p.205, 1990.
- RUMSEY, G.L., KINSELLA, J.E., SHETTY, K.J., HUGHES, S.G. Effect of high dietary concentration of brewers dried yeast on growth performance and liver uricase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Anim. Feed Sci. Technol.* Amsterdam, v.33, p.177-183, 1991.
- RUMSEY, G.L., WINFREE, R.A., HUGLES, S.G. Nutritional value of dietary nucleic acid and purine bases to rainbow trouts (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, Amsterdam, v.108, p.97-110, 1992.
- SAINT-PAUL, U. Potencial for aquaculture of South American fresh water fishes: a review. *Aquaculture*, Amsterdam, v.54, p.205-40, 1986.
- SÁNCHEZ MUNIZ, F.J. et al. Hematological consequence of feeding trout with a single cell protein (*Hansenula anomala*). *Proc. Nutr. Soc.*, London, v. 37, 82A, 1978
- SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J., HIGUERA, M. de la, VARELA, G. Alterations of erythrocytes of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by the use of *Hansenula anomala* yeast as sole protein source. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v.72A, n.4, p. 673-96, 1982.

- SARWAR, G., PEACE.R.W., BOTTING, H.G. Protein quality of food yeast and metabolism of their purines by rats. *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, v. 34, n. 5, p. 709-20, 1986.
- SATIA, B. P. Quantitative protein requirements of rainbow trout. *Prog. Fish Cult.*, Bethesda, v.36, p.80-85, 1974.
- SCARINCI, H. E., UMANSKY, G., MENDOZA, M. S. C. Estudio de la composicion quimica de biomasas celulares de leveduras. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Guatemala, v.40, n.4, p.594-602, 1990.
- SCHULZ, E., OSLAGE, H. J. Composition and nutritive value of single-cell protein (SCP). *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v.1, p.9-24, 1976.
- SGARBIERI, V.C. *Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento*. Campinas: UNICAMP, 1987. p.19, 243.
- SHACKLADY, C.A., WALKER, T., GATUMEL, E. Leveduras cultivadas sobre alcanos. Seguridad de empleo y utilization en alimentacion animal. *Zootechnia*, Madrid, v. 22, n.1-2, p.31-42, 1973.
- SHAKOORI, A.R. et al. Biochemical changes induced by inorganic mercury on blood, liver and muscle of freshwater chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.*, v.4, n.2, p.81-92, 1994.
- SHCHERBINA, M. A. et al. Availability of amino acids in yeast raised on hydrocarbons for carp, *Cyprinus carpio*. *J. Ichtyol*, Washington, v.27, p.23-28, 1987.

- SHETTY, K.J., KINSELLA, J.E. Isolation of yeast protein with reduced nucleic acid level using reversible acylating reagents: some properties of isolated protein. *J. Agric. Food Chem.*, Easton, v. 30, n. 6, p. 1166-1971, 1982.
- SHIMMA, Y., NAKADA, M. Utilization of petroleum yeast in fish feed. II. Effect on growth and body lipids of rainbow trout fingerlings raised in cages. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, Tokyo, v.24, p.111-120, 1975.
- SHIMMA, Y., SHIMMA, H. Utilization of petroleum yeast in fish feed. IV. Plasma cholesterol content and fatty acid composition of erythrocytes of rainbow trout. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, Tokyo, v.26, p.71-78, 1976.
- SILVA, A.J. da *Aspectos da alimentação do pacu adulto, Colossoma mitrei (Berg, 1985) (Pisces Characidae), no Pantanal do Mato Grosso*. Rio de Janeiro: 1985. 92p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SILVA, D.J. *Análise de alimentos: Métodos Químicos e Biológicos*. 2. ed., Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1990. 165p.
- SILVA, L. A. *Estudo preliminar sobre a essencialidade dos aminoácidos metionina e treonina na nutrição do pacu, Colossoma mitrei (Berg, 1895)*. Jaboticabal, 1986, 34p. (Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal para graduação em zootecnia).
- SILVA, M. O. B., BERTECHINI, A. G., MELLO, C. B. M. Teor de proteína na ração para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), cultivados em tanques-rede com várias taxas de estocagem. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE

- AQUICULTURA, 8, ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 3, Piracicaba, 1994, *Resumos...* p.44.
- SIPAÚBA -TAVARES, L. H. S. *Limnologia aplicada à aquicultura*. Jaboticabal. FUNEP, 1995, 70p.
- SOUZA, R. R. P. de, MATTOS, W. R. S. Digestibilidade aparente da proteína em dietas para o híbrido de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 26, 1989. Porto Alegre. *Anais...* p.231.
- SOUZA, V. L. *Efeitos da restrição alimentar e da realimentação no metabolismo de pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus*)*. Jaboticabal, 1994. 163 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- STORCH, V., JUARIO, J. V. The effect of starvation and subsequent feeding on the hepatocytes of *Chanos chanos* (Forsskal) fingerlings and fry. *J. Fish Biol.* London, v. 23, p.95-103, 1983.
- STORCH, V., STÄHLIN, W., JUARIO, J. V. Effect of different diets on the ultrastructure of hepatocytes of *Chanos chanos* fry (Chanidae: Teleostei): an electron microscopic and morphometric analysis. *Mar. Biol.*, New York, v.74, p.101-104, 1983.
- TACON, A. G. J. *The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - a training manual. 1. The essential nutrients*. Brasília: FAO, 1987. 117 p. (Documento de Campo, 2/E).

- TACON, A.G.J. *Feed ingredients for warmwater fish: Fish meal and other processed feedstuffs*. Rome: FAO, 1993. 64p. (Fisheries Circular, 856).
- TACON, A.G.J., COOKE, D.J. The nutritional value of dietary nucleic acids to trout. *Nutr. Rep. Int.* Stoneham, v.22, p.631-40, 1980.
- TAM, W.H. et al. Modification of carbohydrate metabolism and liver vitellogenic function in brown trout (*Salvelinus fontinalis*) by exposure to low pH. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Ottawa, v. 44, n.3, p.630-35, 1987.
- UNTERGASSER, D. *Handbook of Fish Diseases*. Neptune City: TFH, 1989, 160p.
- WAAGBO, R. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *salmo solar*. *Aquacult. Fish. Manag.*, Oxford, v.25, n.2, p.175-97, 1994.
- WALTON, M. J. Aspects of amino acid metabolism in teleost fish. In: COWEY, C. B., MACKIE, A. M., BELL, J. G. *Nutrition and Feeding in Fish*. New York: Academic Press, 1988. p.47-67.
- WEATHERLEY, A.H., GILL, H.S. *The biology of fish growth*. London: Academic Press, 1989. 443 p.
- WILSON, R. P. Amino acid and protein requirement of fish. In: COWEY, C. B., MACKIE, A. M., BELL, J. G. *Nutrition and Feeding in Fish*. London: Academic Press, 1988. p. 1-16.
- WILSON, R.P., POE, E. Relationship of whole body and egg essential amino acid patterns to amino acid requirement pattern in channel catfish. (*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v.80B, p.385-88, 1985.
- YOSHII, R. J. Cana-de-açúcar. *Inf. Econ.* São Paulo, v.25, n.3, p.73, 1995.

- YOUSRI, R.F. Single cell protein its potential use for animal and human nutrition. *World Rev. Anim. Prod.*, Rome. v.18, n.23, p.46-67, 1982.
- ZEITLER, M. H., KIRCHGESSNER, M., SCHWARZ, F. J. Effects of different protein and energy supplies on carcass composition of carp (*Ciprynus carpio* L.). *Aquaculture*, Amsterdam, v.36, p.37-48, 1984.