

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

**ENZIMAS EXÓGENAS NA ALIMENTAÇÃO DE  
CACHARA (*Pseudoplatystoma reticulatum*).**

**MARCIA REGINA STECH**

**Zootecnista**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2009

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

**ENZIMAS EXÓGENAS NA ALIMENTAÇÃO DE CACHARA  
(*Pseudoplatystoma reticulatum*).**

**Marcia Regina Stech**

Zootecnista

**Orientador: Prof. Dr. Dalton José Carneiro**

**Co-orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior**

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2009

Stech, Marcia Regina  
S799e Enzimas exógenas na alimentação do cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) / Marcia Regina Stech. – – Jaboticabal, 2009  
x, 116 f. ; il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Dalton José Carneiro

Co-orientador: João Martins Pizauro Júnior

Banca examinadora: Wilson Massamitu Furuya, Antonio Carlos de Laurentiz, Elisabeth Criscuolo Urbinati, Marta Verardino de Stefani

Bibliografia

1. Peixe-nutrição. 2. Enzimas. 3. Piscicultura. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.043:636.085

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

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

MARCIA REGINA STECH – filha de Aparecida Alves Bernardino Stech e Angelo Stech nasceu em Itápolis, SP, no dia 01 de Agosto de 1973. Em março de 1992 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias em Jaboticabal - SP, onde foi bolsista de iniciação científica (PIBIQ-CNPQ), desenvolvendo estudo de avaliação dos fatores antinutricionais de diferentes cultivares de soja, sob orientação da Profa. Dra. Maria Regina Barbieri de Carvalho. Em julho de 1996, saiu para estágio supervisionado junto ao Programa de Melhoramento Genético de Nelore, com orientação do Prof. Dr. Humberto Tonhati e supervisão do Dr. Raysildo Barbosa Lôbo. Em fevereiro de 1997, graduou-se em Zootecnia. Em março de 1997, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias em Jaboticabal - SP, sob orientação do Prof. Dr. Dalton José Carneiro, foi bolsista da FAPESP, defendendo sua dissertação sobre o uso de soja processada na alimentação de pacu em março de 1999. No mesmo ano ingressou no curso de Doutorado em Biotecnologia, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista em Araraquara, sob orientação da Profa. Dra. Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira, não concluindo o mesmo por motivos de saúde. Em março de 2006, ingressou no Doutorado novamente, desta vez no curso de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias em Jaboticabal - SP, sob orientação do Prof. Dr. Dalton José Carneiro e co-orientação do Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior, foi bolsista da FAPESP, defendendo sua tese em dezembro de 2009.

“Tudo que sei é que nada sei” – Sócrates (470-399 a.C)

## DEDICATÓRIA

*Dedico estes anos de minha vida a todos os produtores de peixes carnívoros que acreditam no seu trabalho e o fazem com amor e perseverança.*

## AGRADECIMENTOS

Uma tese nunca é conduzida sozinha e agora é hora de agradecer...

Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro pela orientação, amizade, confiança e por ter acreditado que eu conseguiria retornar ao meio acadêmico, quando eu já não imaginava que isto seria possível. Nada que eu possa escrever aqui poderá traduzir toda a gratidão e admiração que sinto por ele. Mais do que um orientador ou amigo, é um exemplo de caráter e dedicação ao bem coletivo.

Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior por ter me recebido em seu laboratório, pela paciência, desprendimento com que conduziu sua orientação e finalmente por ter me mostrado o que é re-pesquisar. Levarei para sempre o exemplo de humildade de uma mente brilhante.

Ao Dr. Claudinei da Cruz, por compartilhar momentos de frustração e desespero, além de colaborar incomensuravelmente para que as análises histológicas fossem realizadas. Obrigada pelas inúmeras sugestões, pelas dúvidas tiradas durante os horários mais inusitados e principalmente perdão pela cobrança desmedida.

Aos membros das bancas de qualificação e de defesa: Dr. Claudinei da Cruz; Profa. Dra. Maria Cristina Thomaz; Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati; Profa. Dra. Marta Verardino De Stéfani; Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya; Prof. Dr. Antonio Carlos de Laurentiz.

A Profa. Dra. Nilva Kazue Sakomura e Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior pelas sugestões na elaboração do projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros, por toda a colaboração na realização da análise estatística e amizade.

A Profa. Dra. Maria Célia Portella, por ser uma facilitadora em minha vida, por abrir mão de estar com seu próprio marido para que este me auxiliasse.

A Fátima Harnich, por sua profunda paciência e colaboração na execução das análises enzimológicas e companheira nos momentos mais difíceis. Esta tese teria sido muito mais difícil sem a tua presença.

A Vanessa Sato, pela colaboração na execução das análises enzimológicas e aos demais amigos do Laboratório de Enzimologia Aplicada: Thiago, Vanessa, Gustavo, Flávio, Adriano, Ciça, Andréia, Diego, Gisele, Michael e todos aos demais que convieram comigo neste laboratório.

A Profa. Dra. Maria Regina Barbieri de Carvalho, por ter sido responsável por toda a minha formação básica de pesquisadora e por sempre estar disposta a me auxiliar no que que fosse durante meu doutorado.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, que através de seus funcionários (dos faxineiros à direção), me acolheram durante tantos anos, e que fizeram daqui a minha segunda casa, e meu porto seguro de conhecimento.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP – Caunesp, por todas as facilidades, por disponibilizar espaço, veículos e principalmente pessoas para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Caunesp, que em todos os momentos me acompanharam e me favoreceram nesta jornada, principalmente Silvia, Mauro, Marcio (Perereca), Marcio Alves, Donizete, Fátima, Vera, Dona Ana (*in memoriam*) e Valdecir.

As empresas que, muito gentilmente, em muito facilitaram o desenvolvimento desta tese: DSM pela doação das enzimas, vitaminas e aminoácidos; ADM Specialty Feed Ingredients pela doação de ingredientes; Vansil e ao CEPTA através do Paulo Sérgio Ceccarelli por auxiliarem quando os peixes ficaram doentes; Piscicultura Piraí pela doação dos peixes para o pré-experimento; Mar & Terra por disponibilizar o frigorífico para coleta de pâncreas para a produção de colipase

A Profa. Dra Marcia Rita Fernandes Machado por ter me recebido em seu laboratório para processamento do material histológico.

A Profa. Dra. Adelaide Beleia da Universidade de Londrina, pela realização das análises de fitato.

Ao Dr. Alcides Cintra, e ao doutorando Guilherme Band por todo auxílio nas minhas horas de desespero, aonde sozinha eu não teria conseguido!

A FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento deste projeto e pela bolsa de estudo.

A Capes que através da Reitoria desta Universidade me concedeu os primeiros meses de bolsa de estudo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Caunesp (LANOA): Luiz Fernando, Rodrigo Takata, Ana Laura Gayão, Ancilon Jr, Gisele, Gustavo, Thiago (Nogento), Thiago, Olivia, Eduardo Abmoradi por todo o companheirismo.

Aos estagiários do LANOA, cuja ajuda foi essencial para a realização desta tese: Graziela, Joaquim, Ivan, Caio, Alisson.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia do Caunesp: Fabiana, Róbson, Daniela, Marina, Zé Bob.

Aos colegas e amigos da FCAV que colaboram durante as disciplinas e atividades rotineiras: Frida (agora no Peru), Leonardo (agora em Maceió), Rose (agora em Cuiabá), Marcio, minha gratidão será eterna!

A minha família em especial ao meu pai (Angelo), minha mãe (dona Cida) e minhas irmãs (Angela e Rosângela), pela minha educação, suporte financeiro e emocional. Amo muito vocês, sempre!

As pessoas que conviveram na minha intimidade, compartilhando o meu lar e minha luta. Obrigada Vivian, Lucília, Rosângela, Fernanda e Silvia. Vocês alegraram a minha vida!

A Flavio A. Finatti, por perder suas melhores horas de sono cuidando dos peixes comigo.

A Marcelo Augusto Cicogna por ter sido o meu melhor amigo em todos estes anos. Tua capacidade de mudar meu humor é inigualável.

A todos da Fri-Ribe pelo aprendizado e companheirismo.

A todos os demais que colaboraram para o desenvolvimento desta tese, mas que por falta de memória não foram mencionados.

A Deus por ter colocado tantos anjos em minha vida!

## SUMÁRIO

Resumo.....	ix
Abstract.....	x
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Objetivos .....	7
Referências Bibliográficas.....	8
CAPÍTULO 2 – AÇÃO DA FITASE E DO COMPLEXO DE AMILASE COM ENDO- $\beta$ -GLUCANASE SOBRE OS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE DE MACRONUTRIENTES E ABSORÇÃO DE MINERAIS EM CACHARA ( <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> ) .....	15
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução .....	17
Material e Métodos.....	19
Resultados .....	22
Discussão.....	26
Conclusões .....	29
Agradecimentos .....	29
Referências Bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 3 - CRESCIMENTO E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE JUVENIS DE CACHARA ( <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> ) COM DIETAS CONTENDO FITASE E AMILASE COM ENDO- $\beta$ -GLUCANASE.....	34
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introdução .....	36
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	42
Conclusão .....	55
Agradecimentos .....	56

Referências Bibliográficas.....	56
CAPÍTULO 4 – PERFIL DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DE JUVENIS DE CACHARA ( <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> ) ALIMENTADOS COM ENZIMAS EXÓGENAS E DIFERENTES PROPORÇÕES DE PROTEÍNA DE ORIGEM ANIMAL .....	62
Resumo.....	62
Abstract.....	63
Introdução .....	64
Material e Métodos.....	66
Resultados e Discussão.....	71
Conclusões .....	76
Agradecimentos .....	76
Referências Bibliográficas.....	77
CAPÍTULO 5 – HISTOLOGIA DO TRATO DIGESTÓRIO DE JUVENIS DE CACHARA ( <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> ) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO ENZIMAS EXÓGENAS E DIFERENTES PROPORÇÕES DE PROTEÍNA DE ORIGEM ANIMAL.	84
Resumo.....	84
Abstract.....	85
Introdução .....	86
Material e Métodos.....	87
Resultados e Discussão.....	90
Conclusões .....	105
Agradecimentos .....	106
Referências Bibliográficas.....	106
ANEXO.....	115

## ENZIMAS EXÓGENAS NA ALIMENTAÇÃO DE CACHARA (*Pseudoplatystoma reticulatum*).

**Resumo** - Neste trabalho foi avaliado o uso de enzimas exógenas: amilase com endo- $\beta$ -glucanase (AG) e fitase (Fi) em dietas para cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*). Foram realizados ensaios de digestibilidade de nutrientes de dietas contendo quatro diferentes níveis destas enzimas, em esquema fatorial 4x4. Este estudo mostrou que a adição das enzimas alteraram os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e de absorção dos minerais. No entanto as alterações foram dependentes dos níveis utilizados, e houve interações entre os níveis das enzimas estudadas. Após, foi realizado um ensaio de desempenho com 70 dias de duração, no qual foi avaliado o efeito da ausência de enzimas ou adição de 150 mg de AG kg<sup>-1</sup>; 2.500 UF kg<sup>-1</sup>; 100 mg de AG kg<sup>-1</sup> com 1.500 UF kg<sup>-1</sup> em duas dietas (com 30 ou 60% da proteína de origem animal). Neste experimento, além do desempenho produtivo dos peixes, foram observadas alterações na produção endógena das enzimas digestivas; alterações histológicas do trato gastrintestinal, pâncreas e fígado; alterações na composição da carcaça; e na retenção de fósforo, cálcio e magnésio nos ossos. O sinergismo observado entre as enzimas estudadas sugere que o uso destas enzimas pode melhorar o aproveitamento das dietas para peixes carnívoros, aumentando a energia disponível, mas isto vai depender do balanceamento adequado da dieta em que são empregadas. As alterações das enzimas digestivas e histológicas observadas mostraram que as adições das enzimas exógenas avaliadas exerceram um papel importante na nutrição do cachara, no aumento do aproveitamento da proteína e dos carboidratos.

**Palavras-chave:** digestibilidade, enzimas digestivas, proteína animal, minerais.

## EXOGENOUS ENZYMES IN BARRED SORUBIM (*Pseudoplatystoma reticulatum*) DIETS.

**Abstract** - This work evaluated the exogenous enzymes amylase with endo- $\beta$ -glucanase (AG) and phytase (Fi) in Barred sorubim (*Pseudoplatystoma reticulatum*) diets. Apparent nutrients digestibility assays were done with four different enzyme levels, in a 4x4 factorial scheme. This study showed that the enzymes addition changed the nutrients apparent digestibility coefficients and the minerals absorption. However, the alterations were dependents on the levels used, and there were interactions between the evaluated enzymes levels. After, a 70 days long performance assay was done, in which was evaluated the absence or presence of 150 mg of AG.kg<sup>-1</sup>; 2,500 UF.kg<sup>-1</sup>; 100 mg of AG.kg<sup>-1</sup> + 1,500 UF.kg<sup>-1</sup> enzymes in two diets (30 or 60% of animal-protein). In this experiment, fish performance and alterations in the endogenous production of the digestive enzymes; histologic changes in the gastrointestinal tract, pancreas, and liver; carcass composition changes; phosphorus, calcium, and magnesium retention in the bone were observed. The synergism observed among the enzymes evaluated suggests that its use can improve the diets profit to carnivore fishes, increasing the available energy, depending on the adequate balance in each diet though. The digestive and histologic enzymes alterations observed showed that the addition of the exogenous enzymes evaluated played an important role in the Barred sorubim nutrition, in the protein and carbohydrates profit improving.

**Keywords:** digestibility, digestive enzymes, animal protein, minerals.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A adição das enzimas em dietas pode melhorar a utilização de nutrientes e diminuir a excreção destes no ambiente (LUDKE et al., 2002). Com o uso de enzimas é possível diminuir a poluição ambiental pela redução da excreção de nutrientes ao meio aquático.

As enzimas são, em sua grande maioria, proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem como catalisadores biológicos, possibilitando e ou aumentando a velocidade das reações químicas no organismo (CHAMPE & HARVEY, 1989). A estrutura molecular das enzimas é bastante frágil e, conseqüentemente, pode ser desnaturada por calor, álcalis, metais pesados e outros agentes oxidantes (GRAHAM & INBORR, 1991).

De acordo com a sua finalidade, as enzimas usadas em rações para monogástricos podem ser divididas em dois tipos: enzimas destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas digestórias endógenas dos animais e enzimas que esses animais não podem sintetizar, como as  $\beta$ -glucanases, pentosanases e  $\alpha$ -galactosidases (HENN, 2002).

As enzimas comercialmente produzidas são geralmente provenientes de bactérias do gênero *Bacillus sp.*, fungos do gênero *Aspergillus sp.* e leveduras (FIREMAN & FIREMAN, 1998). Portanto, os microrganismos são a principal fonte de enzimas exógenas produzidas industrialmente, por meio de culturas aeróbias, sendo derivadas de fermentação.

As enzimas podem atuar na inativação de fatores antinutricionais e aumentar o valor nutricional da proteína dos alimentos por meio da transformação de componentes complexos em nutrientes absorvíveis. A adição de enzimas em dietas para monogástricos tem sido uma prática comum para aves e suínos e tem se mostrado vantajosa na maioria dos casos (BELLAYER, 2005). Para peixes, poucos estudos têm sido realizados com a adição de enzimas às dietas.

KOLKOVSKI (2001) ao fazer uma revisão sobre a contribuição de enzimas exógenas na alimentação de larvas de peixes observou resultados contraditórios,

fazendo com que a importância da suplementação enzimática ainda seja tema não concluído.

A principal enzima estudada para dietas de organismos aquáticos é a fitase. Esta enzima tem como principal finalidade agir sobre o ácido fítico que é um dos principais fatores antinutricionais existentes nas plantas. O ácido fítico ou o fitato encontrado nos cereais, legumes e grãos de oleaginosas, é um quelante de minerais como o fósforo, cálcio, magnésio, ferro e o zinco, além de se ligar a proteínas e aminoácidos (COWIESON et al., 2004). Cerca de 70% do fósforo dos ingredientes vegetais utilizados em rações para peixes encontra-se na forma de fósforo fítico. Os peixes não produzem sua própria fitase para quebrar o fitato e assim liberar os nutrientes que passam pelo trato digestório sem serem digeridos (VIELMA et al., 1998). Por isso são importantes os estudos sobre a utilização de fitase exógena, que melhora a disponibilidade do fósforo e também dos aminoácidos (McCUAIG et al., 1972).

Maior ganho de peso, maior retenção de minerais na carcaça e adequada disponibilidade dos macrominerais para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram verificados por RODEHUTSCORD & PFEFFER (1995); LANARI et al. (1998) e VIELMA et al. (1998) com a suplementação entre 1.000 a 1.500 unidades de fitase (UF)  $\text{kg}^{-1}$  de dieta, em relação à dieta sem a suplementação da enzima. HUGHES & SOARES (1998), avaliando dietas com diferentes níveis de inclusão de fitase para alevinos de "striped bass" (*Morone saxatilis*), observaram que a inclusão de 2400 UF  $\text{kg}^{-1}$  de dieta melhorou a retenção de minerais nos ossos e aumentou a concentração de fósforo sérico.

Em estudos com o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), JACKSON et al. (1996), avaliando a inclusão de fitase na concentração de zero; 500; 1.000, 2.000 e 4.000 UF  $\text{kg}^{-1}$  de dieta, concluíram que 500 UF  $\text{kg}^{-1}$  foram suficientes para permitir adequado desempenho e deposição de fósforo nos ossos dos peixes. FURUYA et al. (2001), em trabalho realizado com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de 9 a 40g de peso vivo, avaliaram a inclusão de zero; 500; 1.500 e 3.000 UF  $\text{kg}^{-1}$  de dieta. Além do melhor desempenho, os autores observaram que os peixes que receberam a dieta com 500 UF  $\text{kg}^{-1}$  apresentaram maior retenção de cálcio, fósforo, ferro, zinco e magnésio.

A adição de carboidratases foi reportada para *Salmo salar* (CARTER et al., 1992, 1994), larvas de *Sparus aurata* (KOLKOVSKI et al., 1993), *Penaeus monodon* (BUCHANAN et al., 1997), *Bidyanus bidyanus* (STONE et al., 2003a,b) e para *Labeo rohita* (KUMAR et al., 2006). Foram descritos efeitos positivos com o aumento da digestibilidade do carboidrato, da energia e da matéria seca quando se utilizou  $\alpha$ -amilase exógena (STONE et al., 2003a). A amilase exógena tem como função diminuir a viscosidade da digesta, permitindo maior ação das outras enzimas, além de aumentar a digestão do próprio amido. A suplementação enzimática em dietas pode promover uma pré-hidrólise dos componentes da dieta antes mesmo do oferecimento aos peixes, como hipotetizado por DABROWSKI et al. (1979) e confirmado por STONE et al. (2003a) que relataram aumento na quantidade de açúcares na dieta suplementada comparada com a dieta sem suplementação. Do mesmo modo, as endo-glucanases de bactérias podem combater o efeito antinutricional dos glucanos (polissacarídeo não amiláceo), diminuindo a viscosidade da dieta, aumentando a disponibilidade de polissacarídeos e açúcares (BEDFORD & PARTRIDGE, 2001).

CARTER et al. (1992, 1994) investigaram o efeito de amilase dietética e de uma mistura de enzimas (tripsina, protease ácida e alcalina, amiloglicosidase, amilase e celulase) em juvenis de salmão (*Salmo salar*). Não se observaram efeito sobre o crescimento ou utilização de proteína quando a amilase dietética foi usada, mas houve efeito positivo no crescimento e utilização de proteína com o uso da mistura enzimática.

OGUNKOYA et al. (2006) também verificaram efeito positivo sobre os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína bruta, lipídio, fósforo e energia, ao estudarem a incorporação de farelo de soja e um complexo enzimático composto por xilanase, amilase, celulase, protease e  $\beta$ -glucanase à dieta de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Porém, STONE et al. (2003b) ao usarem o complexo enzimático composto pelas enzimas  $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -xilanase, que são específicas para polissacarídeos não amiláceos, em rações para "Silver perch" (*Bidyanus bidyanus*), não observaram efeito sobre a digestibilidade aparente da matéria seca, energia ou proteína.

De acordo com COWIESON et al. (2006), o uso de enzimas inadequadas ou em concentrações excessivas pode causar perda de material endógeno, devido a uma interação direta com o trato gastrointestinal de aves. Da mesma forma, essa interação poderia resultar na diminuição da capacidade de absorção de nutrientes pelo trato digestivo de peixes, devido à lesão dos enterócitos, microvilosidades e ou outras estruturas relacionadas à absorção.

Segundo TENGJAROENKUL et al. (2000), a capacidade dos peixes de utilizar os nutrientes ingeridos depende da presença de enzimas em locais apropriados da parede e ao longo do lúmen do trato digestório. Geralmente, a distribuição e intensidade da atividade das enzimas intestinais ao longo do intestino variam com os hábitos alimentares e a morfologia intestinal (COCKSON & BOURNE, 1972; HOFER & SCHIEMER, 1981; KUZ'MINA, 1984; KUZ'MINA & SMIRNOVA, 1992; SABAPATHY & TEO, 1993).

O conhecimento da quantidade e especificidade de cada enzima presente no sistema digestório, assim como as condições em que ocorre a hidrólise são ferramentas importantes para prever o processo digestivo em peixes, assim como a digestibilidade de novos ingredientes e também a capacidade digestiva dos peixes (SMITH, 1980; GLASS et al., 1989). Assim, a determinação da atividade enzimática é de grande importância (HOFER & KÖCK, 1989), ajudando a elucidar problemas nutricionais relacionados à fisiologia desses animais.

Em alguns peixes, a maior parte da digestão ocorre no intestino. Um grande número de enzimas como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidases, amilases, lipases e quitinase são produzidas pelas células pancreáticas (SILVA & ANDERSON, 1995). PHILLIPS (1969) relatou que em peixes, tanto o estômago quanto a mucosa intestinal, o pâncreas e os cecos pilóricos são fontes de enzimas proteolíticas. A secreção dessas enzimas é mediada por estímulos neurais e hormonais, que geralmente provocam um aumento da secreção enzimática para a luz do tubo digestório. Entretanto, outros fatores de natureza química, distinta dos sinalizadores endógenos, podem estar relacionados ao estímulo de produção e/ou secreção das enzimas digestivas.

GISBERT et al. (1999) mencionaram a ocorrência de lipase no estômago de algumas espécies de peixes, mas destacaram que o sítio primário de hidrólise lipídica, para a maioria das espécies parece ser a porção anterior do intestino e os cecos pilóricos quando presentes. SMITH (1980) relatou que a digestão de lipídeos continua nas demais porções do intestino. Os padrões de distribuição da atividade lipolítica ao longo dos diversos segmentos do trato gastrintestinal de peixes juvenis e adultos, vêm sendo estudados e parecem divergir entre as espécies (CHAKRABARTI et al., 1995).

A digestão de carboidratos é realizada por uma série de enzimas, sendo a mais importante delas a  $\alpha$ -amilase, que ataca as ligações glicosídicas  $\alpha$  1-4, produzindo como produtos da reação uma variedade de oligossacarídeos (LOVELL, 1988). O aumento na produção de amilase pode ocorrer em resposta à presença de carboidratos ou de produtos de sua hidrólise no lúmen do trato gastrintestinal. A glicose pode influenciar diretamente a produção desta enzima pelo tecido pancreático, ou indiretamente, estimulando a liberação de insulina pelo pâncreas que atuará estimulando a produção de amilase (JOBILING, 1994).

HSU & WU (1979) relataram que as enzimas digestivas são indutivas e, portanto, as maiores atividades de carboidratases devem ser encontradas no trato digestório de herbívoros e as maiores atividades proteolíticas nos dos carnívoros. Além disso, verificaram que o hábito alimentar e a adaptação à composição da dieta podem estar refletidos no comprimento do trato gastrintestinal das espécies.

Os peixes, na tentativa de se adequarem às mudanças da dieta, também apresentam alguma capacidade de adaptação dos processos digestivos, tais como perfil e secreção enzimáticos, absorção e transporte de nutrientes (KAPOOR et al., 1975; HOFER, 1979a,b; BUDDINGTON et al., 1987, 1997), mas estas habilidades parecem variar entre espécies. Os carnívoros, por exemplo, parecem ter capacidade limitada de alterar sua função digestiva e de transporte de nutrientes de acordo com a composição da dieta, enquanto os onívoros exibem habilidade muito maior em modular sua fisiologia digestiva e absorviva (BUDDINGTON et al., 1987, 1997).

O gênero *Pseudoplatystoma* compreende as espécies de peixes conhecidas popularmente por surubim e são os maiores peixes da família *Pimelodidae*

(Siluriformes). Pode ser encontrado nas principais bacias hidrográficas da América do Sul: Amazônica, do Prata e do São Francisco (PETRERE, 1995). De hábito alimentar carnívoro, principalmente piscívoro, são espécies de peixes apreciados por apresentarem poucas espinhas em sua carne, podendo na natureza alcançar de 100 a 120 kg na natureza (SATO et al., 1988), embora o cachara somente atinja até 70 kg (LE BAIL et al., 2000).

Os surubins por apresentarem hábito alimentar carnívoro somente são criados com dietas artificiais contendo altos teores de proteína bruta. No entanto, existe a necessidade de utilização de dietas eficientes, de baixo custo, que atendam às habilidades digestivas das espécies e, ainda, que causem pouca poluição ambiental. Ainda, COELHO & CYRINO (2006) observaram custos de produção elevados para os surubins. Desta forma, estudos que visem viabilizar, técnica e economicamente, sua produção são de extrema importância.

BUITRAGO-SOÁREZ & BURR (2007) reclassificaram o gênero *Pseudoplatystoma*. O cachara conhecido por *P. fasciatum*, ficou restrito aos peixes encontrados nas Guianas e o cachara, encontrado na bacia do rio Paraná, passou a ser chamado de *P. reticulatum*. Como esta classificação é recente, os trabalhos disponíveis sobre esta espécie ainda são citados como *P. fasciatum*.

O cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* = *Pseudoplatystoma fasciatum reticulatum*, EIGENMANN & EIGENMANN, 1989) vem destacando-se entre os surubins. Segundo QUEIROZ et al. (2002), nos últimos anos, várias empresas têm investido no cultivo intensivo dessa espécie com resultados satisfatórios em função da otimização dos sistemas, e também do avanço tecnológico baseado no aumento do conhecimento sobre a biologia desta espécie, o que tem diminuído o esforço pesqueiro e possibilitado a manutenção dos estoques naturais.

Os resultados obtidos por RIBEIRO & MIRANDA (1997) mostraram que o surubim apresenta crescimento total aparentemente isométrico. Considerando-se todos os seus índices zootécnicos e características de rendimento de carcaça, esta espécie possui alto potencial para a produção comercial.

De acordo com CAVERO (2004), os custos cada vez mais altos das matérias primas tradicionais, utilizados na formulação de rações, têm aumentado o interesse no uso de enzimas exógenas em dietas e sua utilização é uma alternativa para aumentar a digestibilidade dos alimentos e o desempenho dos animais, o que pode auxiliar no desempenho produtivo de peixes carnívoros como o cachara.

A escolha das enzimas que devem ser adicionadas em dietas para peixes deve levar em consideração a produção endógena de enzima e a formulação da dieta. Atualmente, as rações comerciais brasileiras para peixes carnívoros contêm diversos ingredientes de origem vegetal e muito carboidrato (> 30%) para a adequada extrusão da dieta, assim considerou-se adequado o estudo das enzimas fitase, amilase e endo- $\beta$ -glucanase para melhorar o aproveitamento dos nutrientes das formulações.

Além disto, conhecer as alterações provocadas no perfil das enzimas digestivas endógenas e na morfologia do trato digestório, quando se adiciona enzimas exógenas a dieta, ajudará a conhecer a capacidade do cachara em se adaptar ao novo padrão dietético, fornecendo importantes informações sobre a capacidade digestiva e de absorção dos nutrientes desta espécie.

## **Objetivos**

Objetivou-se com este trabalho:

- Determinar os coeficientes de digestibilidade da proteína, amido, fósforo, cálcio e magnésio de dietas contendo diferentes níveis das enzimas amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase;
- Verificar o desempenho dos peixes, alterações na composição corporal e retenção de minerais dos mesmos quando alimentados com dietas contendo duas proporções de proteína de origem animal com a adição de fitase e amilase com endo- $\beta$ -glucanase;
- Observar o perfil da produção endógena de tripsina, quimotripsina, amilase, lípase e pepsina e na histologia do fígado, estômago, pâncreas e

de diferentes regiões do intestino de cacharas alimentados com dietas contendo duas proporções de proteína de origem animal com a adição de fitase e amilase com endo- $\beta$ -glucanase.

### Referências Bibliográficas

BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. Ed. CABI Publishing, Cambridge. 387 p. 2001.

BELLAVER, C. Utilização de melhoradores de desempenho na produção de suínos e de aves. Campo Grande, MS. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, v. 7, 2005, Campo Grande. **Anais...**Campo Grande: ABZ / UEMS / UFMS, Embrapa Pantanal, 2005.

BUCHANAN, J.; SARAC, H.Z.; POPPI, D.; COWAN, R.T. Effects of enzyme addition to canola meal in prawn diets. **Aquaculture**, v.151, p. 29-35, 1997.

BUDDINGTON, R. K.; CHEN, J. W. ; DIAMOND, J. M. Genetic and phenotypic adaptation of the intestinal nutrient transport to diet in fish. **Journal of Physiology**, v. 393, p. 261-281, 1987.

BUDDINGTON, R. K.; KROGDAHAL, Å; BAKKE-MCKELLEP, A. M. The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 161, Supl. 638, p. 67-80, 1997.

BUITRAGO-SUÁREZ, U. A.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 1512, p. 1-38, 2007.

CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F.; BUCHANAN, B. ; McCARTHY, I. A. Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon *Salmo salar* feed a diet

containing supplementary enzyme. **Aquaculture and Fish Management**, v. 25, n. 1, p. 37-46, 1994.

CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F.; McCARTHY, I. A. Feed utilization efficiencies of Atlantic salmon *Salmo salar* L. parr: effect of a single supplementary enzyme. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 2, p. 369-374, 1992.

CAVERO, B. A. S. **Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de Pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829)**. 2004. 79 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

CHAKRABARTI, I.; GANI, Md. A.; CHAKI, K. K.; SUR, R.; MISRA, K. K. Digestive enzymes in 11 freshwater teleosteous fish species in relation to food habit and niche segregation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112A, p. 167–177, 1995.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. Enzimas. In: **Bioquímica Ilustrada**, 2 ed. São Paulo: Artes médicas, 446 p., p. 53-66 , 1989.

COCKSON, A.; BOURNE, D. Enzymes in the digestive tract of two species of euryhaline fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 41A, p. 715–718, 1972.

COELHO, S. R. C.; CYRINO, J. E. P. Custos na produção intensiva de surubins em gaiolas. **Informações Econômicas**, SP, v. 36, n. 4, 2006.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Phytic acid and phytase: implications for proteins utilization by poltry. **Poultry Science**, v. 85, p. 878-885, 2006.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 45, n. 1, p. 101-108, 2004.

DABROWSKI, H.; GRUDNIEWSKI, C.; DABROWSKI, K. Artificial diet for common carp: effect of the addition of enzymes extracts. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 41, p.196-200, 1979.

EIGENMANN, C.H.; EIGENMANN, R.S. Preliminary notes on South American Nematognathi II. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 2, p. 28–56, 1889.

FIREMAN, F. A. T.; FIREMAN, A. K. B. A. T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 173-178, 1998.

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C.; FURUYA, V. R. B.; BARROS, M. M. Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alguns ingredientes pela tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus* (L.) (linhagem tailandesa). **Acta Scientiarum**, v. 23, n.2, p. 465-462, 2001.

GISBERT, E.; SARASQUETE, M. C.; WILLIOT, P.; CASTELLO-ORVAY, F. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. **Journal of Fish Biology**, v. 55, p. 596-616, 1999.

GLASS, H. J.; MACDONALD, N. L.; MORAN, R. M.; STARK, J. R. Digestion of protein in different marine species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 91B, n. 3, p. 607-611, 1989.

GRAHAM, H.; INBORR, J. Enzymes in monogastric feeding. **Agro Industry Hi-tech.**, v. 2, n. 1, p. 45-48, 1991.

HENN, J. D. **Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves**. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, 2002.

HOFER, R. The adaptation of the digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus*, and rudd, *Scardinus erythrophthalmus* L. 1. Amylase. **Journal of Fish Biology**, v. 14, p. 565-572, 1979a.

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

HOFER, R.; KÖCK, G. Method for quantitative determination of digestive enzymes in fish larvae. **Polish Archives Hydrobiology**, v. 36, n. 4, p. 439-441, 1989.

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

HSU, Y. L.; WU J. L. The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. **Bull Institute of Zoology, Academy of Sciences**. v. 18, p. 45-53, 1979.

HUGHES, K. P.; SOARES, J. H. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis*. **Aquaculture Nutrition**, v. 4, p. 133-140, 1998.

JACKSON, L. S.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization phytate phosphorus. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 27, n. 3, p. 309-313, 1996.

JOBLING, M. **Fish Bioenergetics**. London: Chapman; Hall, 309 p., 1994.

KAPOOR, B. G.; SMITH, H.; VERIGHINA, I. A. The alimentary canal and digestion in teleosts. **Advanced Marine Biology**, v. 13, p. 109-139, 1975.

KOLKOVSKI, S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. **Aquaculture**, v. 200, p. 181-201, 2001.

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A.; KISSIL, W. M.; GERTLER, A. The effects of exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 12, p. 203-209, 1993.

KUMAR, S.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; CHOUDHURY, D.; MUKHERJEE, S.C. Studies on digestibility and digestive enzyme activities in *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles: effect of microbial  $\alpha$ -amylase supplementation in non-gelatinized or gelatinized corn-based diet at two protein levels. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, p.209-220, 2006.

KUZ'MINA, V. V. Relative enzyme activity of the intestinal lumen and mucosa. **Journal of Ichthyology**, v. 24, p. 140–144, 1984.

KUZ'MINA, V. V.; SMIRNOVA, Y. G. Distribution of alkaline phosphatase activity along the length of the intestine of freshwater teleosts. **Journal of Ichthyology**, v. 32, p. 1–9, 1992.

LANARI, D.; D'AGARO., E.; TURRI, C. Use of nonlinear regression to evaluate the effects of phytase enzyme treatment of plant protein diets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 161, p. 345-356, 1998.

LE BAIL, P. Y.; KEITH P.; PLANQUETTE, P. **Atlas des poisons d'eau douce de Guyane** (tome 2, fascicule II). Publications scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 307p., 2000.

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Chapman e Hall, 288 p., 1988.

LUDKE, M. C. M. M.; LÓPEZ, J.; LUDKE, J. V. Fitase em dietas para suínos em crescimento: (I) impacto ambiental. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 97-102, 2002.

McCUAIG, L. W.; DAVIES, M. I.; MOTZOK, I. Intestinal alkaline phosphatase and phytase of chicks: effect of dietary magnesium, calcium, phosphorus and thyroactive casein. **Poultry Science**, v. 51, p. 526-530, 1972.

OGUNKOYA, A. E.; PAGE, G. I.; ADEWOLU, M. A.; BUREAU, D. P. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.254, p.466-475, 2006.

PETRERE, M. A pesca de água doce no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 19, n. 110, p. 28-33, 1995.

PHILLIPS, A. M. Jr. Nutrition, digestion and energy utilization. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (eds). **Fish Physiology**. Vol. I. Excretion, Ion Regulation, and Metabolism. p. 391-432, 1969.

QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. **A Embrapa e a aquicultura: demandas e prioridades de pesquisa**. (ed. Embrapa informações tecnológicas) Brasília, p. 40, 2002.

RIBEIRO, L. P.; MIRANDA, M. O. T. Rendimentos de processamento do surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. In: MIRANDA, M.O.T. (org). **Surubim (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 19)**. Belo Horizonte: IBAMA, p. 101- 111, 1997.

RODEHUTSCORD, M.; PFEFFER, E. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Water Science Technology**, v.31, n.10, p.143-147, 1995.

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

SATO, Y.; CARDOSO, E. L.; SALLUM, W. B. Reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) da bacia do São Francisco. In: ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA, 20., 1988, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Associação Mineira de Aquicultura, 1988.

SILVA, S. S.; ANDERSON, T. A. **Fish nutrition in aquaculture**. 1<sup>a</sup> ed. London: Chapman Hall, 319 p., 1995.

SMITH, L. S. Digestion in teleost fishes. In: **Lectures presented at the FAO/UNDP Training Course in fish feed technology, ACDP/REP/80/11**, p. 3-17, 1980.

STONE, D. A. J; ALIAN, D.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**. v.34, p.135-147, 2003a

STONE, D. A. J; ALIAN, D.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). IV. Can dietary enzymes increase digestible energy from wheat starch, wheat and dehulled lupin? **Aquaculture Research**. v.34, p.135-147, 2003b.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B. J.; CACECI, T.; SMITH, S. A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, p. 317-327, 2000.

VIELMA, J.; LALL, S. P.; KOSKELA, J.; SCHÖNER F.; MATTILA, P. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.63, n.3/4, p. 309-323, 1998.

**CAPÍTULO 2 – AÇÃO DA FITASE E DO COMPLEXO DE AMILASE COM ENDO- $\beta$ -GLUCANASE SOBRE OS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE DE MACRONUTRIENTES E ABSORÇÃO DE MINERAIS EM CACHARA (*Pseudoplatystoma reticulatum*)**

**Resumo** - O objetivo deste trabalho foi verificar a ação das enzimas amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase sobre os coeficientes de digestibilidade de macronutrientes e absorção de minerais em uma dieta para o cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*). Foram testados os efeitos de duas enzimas comerciais, sendo a primeira uma mistura de alfa-amilase e endo- $\beta$ -glucanase (AG) e a segunda fitase (Fi). Foi elaborada uma dieta básica para o cachara contendo 3,16% de EE, 35,87% de ENN, 42,76% de PB, 0,88% de fósforo total e 1% de óxido de cromo. Análises de variâncias foram realizadas em delineamento em blocos casualizados, com 16 tratamentos em esquema fatorial 4x4, correspondendo a quatro níveis de enzima fitase (0; 750; 1.500 e 2.500 UF kg<sup>-1</sup>) e a quatro níveis do complexo amilase mais endo- $\beta$ -glucanase (0; 50; 100; 150 mg kg<sup>-1</sup>), com três blocos para os dias diferentes de coleta. As adições de AG e Fi alteraram os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e minerais; no entanto, as mudanças foram dependentes dos níveis utilizados e houve interações significativas entre os níveis das enzimas estudadas. A associação de Fi (1.500 UF kg<sup>-1</sup>) e AG (100 mg kg<sup>-1</sup>) apresentou os melhores coeficientes de digestibilidade da proteína.

**Palavras-chave:** amido, proteína, cálcio, fósforo, magnésio

**Abstract** - This work aimed verify the amylase with endo- $\beta$ -glucanase, and phytase enzymes on the digestibility coefficients of macronutrients and minerals in a Barred sorubim diet (*Pseudoplatystoma reticulatum*). The effect of two commercial enzymes had been tested: an alpha-amylase mixture + endo- $\beta$ -glucanase and a phytase source. A basic diet for Barred sorubim was elaborated containing 3.16% of lipids, 35.87% of non-nitrogenated extract, 42.76% of crude protein, 0.88% of phosphorus total and 1% of chromium oxide. Analysis of variance was carried through in Randomized Blocks Delineation, 16 treatments, in a factorial 4x4 scheme, corresponding to the four phytase enzyme levels (0; 750; 1,500 and 2,500 UF kg<sup>-1</sup>) and the four levels of complex amylase with endo- $\beta$ -glucanase (0; 50; 100; 150 mg kg<sup>-1</sup>), with three blocks for the different collecting days. The addition of endo-  $\beta$ -glucanase and phytase modified the nutrients and minerals apparent digestibility coefficients values; however, the alterations were dependent on the levels used and interactions between the levels of studied enzymes occurrence. The amylase with endo- $\beta$ -glucanase complex association of 1,500 UF and 100 mg presented the best digestibility coefficients to protein.

**Keywords:** calcium, magnesium, phosphorus, protein, starch.

## Introdução

O uso de enzimas na nutrição tem sido uma prática comum na alimentação de aves e suínos (BEDFORD & PARTRIDGE, 2001). Para peixes, esta prática ainda não é tão comum, por dificuldades tecnológicas que envolvem os processos de peletização e extrusão, que chegam a elevadas temperaturas e pela baixa estabilidade das enzimas ao calor (MASCARELL & RYAN, 1997).

Os esforços para o desenvolvimento de enzimas termotolerantes ou protegidas só farão sentido se as mesmas provocarem melhoras no aproveitamento dos nutrientes pelos organismos aquáticos. Uma forma rápida de comprovar a eficiência destas enzimas em melhorar a disponibilidade de nutrientes são os testes de digestibilidade.

O uso de enzimas na alimentação pode melhorar a utilização de nutrientes e diminuir sua excreção no ambiente (LUDKE et al., 2002). GONÇALVES et al. (2004) avaliaram o efeito da fitase sobre os coeficientes de digestibilidade de alimentos vegetais para tilápia do Nilo e concluíram que os valores digestíveis da matéria seca, da proteína bruta e energia dependem do valor biológico dos alimentos, da concentração, da natureza do fitato e do nível de suplementação da enzima.

STONE et al. (2003) verificaram a possibilidade do uso de carboidratases ( $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -xilanase) para melhorar os coeficientes de digestibilidade do amido do trigo, do trigo integral e de isolado de lupin para *Bidyanus bidyanus*, e observaram interação entre as fontes e a quantidade de enzima para os coeficientes de digestibilidade do amido. Além disso, observaram que diferentes níveis de  $\alpha$ -amilase afetaram a digestibilidade da proteína, mas as enzimas que atuam sobre os polissacarídeos não amiláceos não tiveram efeito sobre os coeficientes de digestibilidade.

OLIVEIRA (2006) avaliou os efeitos da suplementação de dieta com um complexo enzimático contendo celulase, protease e amilase sobre a digestibilidade dos nutrientes, em juvenis de tilápia-do-Nilo. Verificou que a adição do complexo melhorou os coeficientes de digestibilidades aparentes da matéria seca, proteína bruta, energia bruta, amido, cálcio e fósforo. OGUNKOYA et al. (2006), ao estudarem a incorporação

de farelo de soja e um complexo enzimático contendo xilanase, amilase, celulase, protease e  $\beta$ -glucanase, à dieta de truta arco-íris, observaram efeito positivo sobre os coeficientes de digestibilidade aparente de matéria seca, proteína bruta, lipídio, fósforo e energia. LIN et al. (2007) também estudaram a adição de um complexo enzimático contendo protease,  $\beta$ -glucanase e xilanase, sobre os coeficientes de digestibilidade em híbridos de tilápia e não observaram efeito na digestibilidade aparente de proteína, lipídio e energia.

Poucos trabalhos foram desenvolvidos sobre o uso de enzimas exógenas em rações para peixes carnívoros neotropicais. O cachara, (*Pseudoplatystoma reticulatum* = *Pseudoplatystoma fasciatum reticulatum*, EIGENMANN & EIGENMANN, 1989) que é um peixe carnívoro, preferencialmente piscívoro, encontrado nas principais bacias hidrográficas da América do Sul: Amazônica e Prata (WELCOMME, 1985; PETRERE, 1995). Esta espécie pode ser um bom modelo para estudos que envolvam o uso de enzimas em dietas para peixes carnívoros, pois é facilmente encontrado em muitos países das Américas e tem sido criado, o que traz benefícios práticos dos resultados observados.

A fitase tem sido a principal enzima estudada em peixes. Ela atua sobre o principal fator antinutricional existente nos cereais, legumes e grãos de oleaginosas de origem vegetal, que é o ácido fítico ou fitato, um quelante de minerais como fósforo, cálcio, magnésio, ferro, manganês e zinco, além de se ligar a proteínas e aminoácidos, inativando enzimas digestivas (COWIESON et al., 2004).

Efeitos positivos sobre o aumento da digestibilidade de carboidratos, da energia e da matéria seca foram descritos quando se utilizou  $\alpha$ -amilase exógena em dietas para *Bidyanus bidyanus* (STONE et al., 2003). A amilase exógena tem como função diminuir a viscosidade da digesta, permitindo maior ação das outras enzimas, além de e tornar a glicose presente no amido prontamente disponível por aumentar a digestão do amido. Já as glucanases são específicas para polissacarídeos não amiláceos, que são um grupo complexo composto predominantemente por ligações de monômeros de hexoses e pentoses (STONE, 2003), melhorando o aproveitamento destes como fonte energética (BEDFORD & PARTRIDGE, 2001).

Objetivou-se com este trabalho verificar a ação das enzimas amilase, endo- $\beta$ -glucanase e fitase sobre os coeficientes de digestibilidade de macronutrientes e absorção de minerais em uma dieta para o cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*).

## Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido no Centro de Aquicultura, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos.

Os peixes foram mantidos em 48 aquários de alimentação de fibra de vidro com capacidade de 450 L, cada qual com 24 cacharas com aproximadamente  $70 \pm 20$  g. Estes aquários foram abastecidos continuamente com água proveniente de poço artesiano, com renovação contínua e temperatura em torno de 24 °C.

Os efeitos de duas enzimas comerciais (em pó) foram testados, sendo a primeira uma mistura de alfa-amilase (IUB No. 3.2.1.1; 200 KNU g<sup>-1</sup>) e endo- $\beta$ -glucanase (IUB No. 3.2.1.6; 350 FBG g<sup>-1</sup>) provenientes de *Bacillus amyloliquefaciens*; e a segunda uma fonte de fitase (IUB No. 3.1.3.26; 5.000 UF g<sup>-1</sup>) proveniente do fungo *Peniophora lycii*.

O esquema utilizado foi um fatorial 4x4, correspondendo ao uso de quantidades crescentes de amilase com endo- $\beta$ -glucanase (AG): 0; 50; 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup>; ou de fitase (Fi): 0; 750; 1.500 e 2.500 UF kg<sup>-1</sup>, totalizando 16 dietas.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDa) da fração protéica e do amido, bem como os coeficientes de absorção aparente (CAa) do fósforo, do cálcio e do magnésio foram determinados. Para isto, foi elaborada uma dieta básica para o cachara contendo, de acordo com GONÇALVES & CARNEIRO (2003), 3% de EE (extrato etéreo), 33,5% de ENN (extrativo não nitrogenado), 42% de PB (proteína bruta) e 1,0% de óxido de cromo (Tabela 1). As rações foram processadas em moinho de carne com a adição de 40% de água, sendo secas em estufa de ventilação forçada a 40°C.

Tabela 1 - Formulação e composição da dieta básica experimental utilizada no experimento de digestibilidade de nutrientes para juvenis de cachara.

Ingrediente	% de dieta
Farinha de peixe (60% PB)	14,2
Farinha de vísceras (60% PB)	3,0
Farinha de sangue (84% PB)	3,0
Farelo de soja (46% PB)	34,0
Concentrado protéico de soja (65% PB)	16,5
Glúten de milho (66% PB)	4,0
Amido de milho	15,0
Farelo de trigo	3,8
Quirela de arroz	4,0
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	1,0
Espaço para adição das enzimas ou caulim	0,5
Óxido crômico	1,0
<hr/>	
Composição calculada <sup>2</sup>	
Matéria seca (%)	92,34
Proteína bruta (%)	42,76
Extrato etéreo (%)	3,16
Fibra bruta (%)	3,43
Extativos não nitrogenados (%)	35,87
Matéria mineral (%)	7,11
Fósforo total (%)	0,88
Cálcio (%)	0,69
Energia bruta (kcal. kg <sup>-1</sup> )	4.062,96

<sup>1</sup>Cada 1% fornece: ácido fólico (2,00 mg); ácido pantotênico (40,00 mg) antioxidante (250,00 mg); colina (300,00 mg); cobre (20,00 mg); ferro (200,00 mg); iodo (10,00 mg); manganês (140,00 mg); selênio (0,30 mg); vit A (6.000,00 U I kg<sup>-1</sup>); Vit B (32,00 mg); Vit B12 (40,00 mg); Vit B2 (16,00 mg); Vit B6 (6,00 mg); Vit C (400,00 mg); Vit D3 (6000,00 U I kg<sup>-1</sup>); Vit E (100,00 UI kg<sup>-1</sup>); Vit K (12,00 mg); zinco (300,00 mg); niacina (200,00 mg); biotina (0,20 mg);

<sup>2</sup>Composição calculada a partir da análise de ingredientes dos alimentos.

Após serem alimentados por quatro dias com as dietas-teste, os alevinos de cachara foram transferidos para aquários de coleta de fezes. Para coleta de fezes foi utilizado o sistema de Guelph modificado (GONÇALVES & CARNEIRO, 2003). Este sistema consiste de aquários de fibra de vidro cilíndricos de fundo cônico, onde foram colocados registros de esfera e acoplados tubos cônico de 50 mL, onde ficaram depositadas as fezes dos peixes, após a decantação. Utilizou-se o óxido de cromo ( $Cr_2O_3$ ) como indicador, de acordo com a metodologia descrita por FURUKAWA & TSUKAHARA (1966).

As fezes foram coletadas em três dias de coletas, com intervalos de 20 minutos durante oito horas, para evitar a lixiviação de nutrientes, e transferidas para potes plásticos, sendo conservadas em congelador até completar-se a quantidade necessária para as análises.

As fezes e as rações foram secas em estufa de ventilação forçada por 48 horas a 55 °C. Posteriormente foram realizadas análises de sua composição centesimal segundo a AOAC (2000), sendo a proteína analisada pelo método de micro-kjeldahl, multiplicando-se o valor de nitrogênio por 6,25 e a energia avaliada em bomba calorimétrica do tipo Parr. Para determinação do amido foi utilizado o método descrito por HENDRIX (1993). A glicose liberada foi mensurada utilizando-se o kit enzimático de Glicose Pap Liquiform cat 84 da Labtest. Para a conversão de glicose em amido utilizou-se o fator de conversão 0,9.

Para determinação dos minerais e cromo, as amostras foram submetidos a uma digestão nítrico-perclórica de acordo com a metodologia descrita por FURUKAWA & TSUKAHARA (1966) e posteriormente as leituras de cálcio, magnésio e cromo foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica. Os teores de fósforo foram mensurados pelo método do vanadato-molibdato (SARRUGE & HAAG, 1974).

O coeficiente de digestibilidade aparente e o coeficiente de absorção aparente foram calculados pela fórmula:

$$y = 100 - 100 \times \left( \frac{\% Cr_2O_3 \text{ dieta}}{\% Cr_2O_3 \text{ fezes}} \right) \times \left( \frac{\% n \text{ fezes}}{\% n \text{ dieta}} \right)$$

Em que:

$y$  = Coeficiente de digestibilidade aparente ou o Coeficiente de absorção aparente;

%  $Cr_2O_3$  = Porcentagem de óxido de cromo;

%  $n$  = Porcentagem de nutriente (proteína, minerais ou amido).

Os dados experimentais foram analisados pelo programa SAS, versão 9.0. Em relação aos dados obtidos na digestibilidade, o teste de Cramer-von Mises (EVERITT, 1998) mostrou que todos os dados apresentaram tendência a normalidade. Análises de regressão foram realizadas para melhor compreensão dos resultados observados dentro de cada nível de enzima adicionado. A análise de variância foi realizada em delineamento em blocos casualizados, com 16 tratamentos, em esquema fatorial 4x4, correspondendo às quatro quantidades crescentes de Fi e quatro de AG, com três blocos controlando os dias diferentes de coleta.

## Resultados

Pela análise de variância não houve efeitos dos blocos em todas as variáveis estudadas, mas houve interação entre os efeitos das enzimas para os coeficientes de digestibilidade aparente (CDa) do amido, proteína e para os coeficientes de absorção aparente (CAa) do fósforo, cálcio e magnésio (Tabela 2).

As médias dos CDa do amido variaram de 52,97% a 77,46% (Tabela 3), sendo que a adição de enzimas não favoreceu a digestibilidade deste nutriente. A análise de regressão para esta variável mostrou que, quando não houve inclusão de Fi ou a inclusão foi de 750 ou 1.500 UF  $kg^{-1}$ , o CDa do amido apresentou comportamento linear, negativo no primeiro caso e positivo no segundo e terceiros níveis de inclusão das carboidratases. Com a adição de 2.500 UF  $kg^{-1}$  de dieta, a equação que melhor refletiu os dados encontrados foi quadrática. Com a ausência de AG, os resultados obtidos com as quantidades crescentes de Fi apresentaram comportamento cúbico.

Nos outros níveis de AG não ocorreu equação significativa que expressasse os resultados dos comportamentos observados para a adição de Fi.

Tabela 2 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) para os coeficientes de digestibilidade aparente do amido e da proteína e coeficientes de absorção aparente do fósforo, cálcio e magnésio.

Estatística	Valores de F para as variáveis				
	Amido	Proteína	Fósforo	Cálcio	Magnésio
Blocos	0,05ns	1,77ns	1,26ns	0,05ns	0,06ns
Amilase + endo- $\beta$ -glucanase (AG)	0,97ns	15,74**	21,72**	61,25**	93,56**
Fitase (Fi)	8,14**	8,55**	64,64**	15,54**	107,19**
Inter. AGxFi	5,84**	12,33**	19,88**	50,07**	48,67**
CV (%)	7,02	4,48	3,11	7,01	3,19

ns=não significativo ( $P>0,05$ ); \*\* significativo ( $P<0,01$ ).

Tabela 3 – Médias para os coeficientes de digestibilidade aparente do amido (%) para os níveis crescentes de inclusão de amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase.

Fitase (UF kg <sup>-1</sup> )	Amilase + endo- $\beta$ -glucanase (mg kg <sup>-1</sup> )			
	0	50	100	150
0	77,46Aa	67,57Aab	65,59Aab	62,17Ab
750	52,97Ba	61,01Aa	61,49Aa	66,31Aa
1.500	55,73Ba	61,70Aa	68,78Aa	63,49Aa
2.500	61,06Ba	58,06Aa	56,94Aa	66,29Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ).

A Tabela 4 apresenta as médias dos CDa da proteína no estudo da interação entre os efeitos das enzimas avaliadas. Os valores de CDa da proteína variaram de 60,21% a 87,71. Com a ausência de Fi, as quantidades crescentes de AG não influenciaram o CDa da proteína. Com a inclusão de 750 UF kg<sup>-1</sup> de dieta, a equação que melhor definiu os resultados da adição de AG foi quadrática e quando os níveis foram de 1.500 e 2.500 UF kg<sup>-1</sup> de dieta, o comportamento encontrado foi cúbico. Para os efeitos de Fi, observou-se que, ao não adicionar AG ou utilizar-se 150 mg kg<sup>-1</sup> de dieta, as equações que melhor descreveram foram quadráticas; quando utilizou-se 50 ou 100 mg de AG kg<sup>-1</sup> de dieta, as equações foram cúbicas.

Tabela 4 - Médias para os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína (%) para os níveis crescentes de inclusão de amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase.

Fitase (UF kg <sup>-1</sup> )	Amilase + endo- $\beta$ -glucanase (mg kg <sup>-1</sup> )			
	0	50	100	150
0	80,77Aa	78,88Aa	79,37ABa	74,78Aa
750	66,52Ba	75,95Aa	75,13Ba	70,20Aa
1.500	68,51Bb	75,63Ab	87,71Aa	67,58Ab
2.500	80,67Aa	60,21Bb	78,32ABa	73,61Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

As médias de CAa do fósforo no estudo da interação entre os efeitos das enzimas avaliadas encontram-se na Tabela 5. Os valores de CAa estiveram entre e 51,31% a 72,99%, mostrando grandes variações. Em relação ao uso de AG, observou-se que as equações que melhor expressaram os resultados foram quadráticas, quando se usou zero, 1.500 ou 2.500 UF kg<sup>-1</sup> de dieta; quando se adicionou 750 UF kg<sup>-1</sup> de dieta, a melhor equação foi cúbica. Para os níveis de Fi, a equação foi quadrática quando não houve inclusão de AG, o mesmo ocorrendo quando se utilizou 150 mg de AG kg<sup>-1</sup> de dieta. As equações foram cúbicas para o uso de 50 e 100 mg de AG kg<sup>-1</sup>.

Tabela 5 - Médias para os coeficientes de absorção aparente do fósforo (%) para os níveis crescentes de inclusão de amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase.

Fitase (UF kg <sup>-1</sup> )	Amilase + endo- $\beta$ -glucanase (mg kg <sup>-1</sup> )			
	0	50	100	150
0	61,5BCbc	55,72Bc	63,56Bb	71,87ABa
750	56,46Cb	65,28Aa	51,31Cb	64,36Ca
1.500	63,18Bb	71,35Aa	71,25Aa	66,16BCab
2.500	69,75Aa	68,15Aa	67,82ABa	72,99Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

No caso dos CAa do cálcio para a interação significativa entre as enzimas avaliadas, as médias variaram de 18,53% a 49,08% (Tabela 6). Na Tabela 7, encontram-se os valores médios do CAa do magnésio, os quais variaram de 40,60% a 70,03%. As análises de regressões mostraram que, em todos os casos, as equações que melhor demonstram o comportamento dos resultados dos CAa do cálcio e do magnésio foram cúbicas.

Tabela 6 - Médias para os coeficientes de absorção aparente do cálcio (%) para os níveis crescentes de inclusão de amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase.

Fitase (UF kg <sup>-1</sup> )	Amilase + endo- $\beta$ -glucanase (mg kg <sup>-1</sup> )			
	0	50	100	150
0	49,08Aa	31,91ABb	42,13ABa	18,53Cc
750	21,04Cc	28,82Bb	36,78BCa	31,68Bab
1.500	33,09Bb	38,35Ab	48,45Aa	19,26Cc
2.500	28,68Bb	34,59ABab	34,15Cab	40,18Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 7 - Médias para os coeficientes de absorção aparente do magnésio para os níveis crescentes de inclusão de amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase.

Fitase (UF kg <sup>-1</sup> )	Amilase + endo- $\beta$ -glucanase (mg kg <sup>-1</sup> )			
	0	50	100	150
0	58,04Bb	70,03Aa	60,53Ab	61,19Bb
750	40,66Cc	66,35Aa	51,34Bb	65,71ABa
1.500	67,82Aa	69,65Aa	64,65Aa	69,17Aa
2.500	64,53Aa	56,45Bb	40,60Cc	61,41Ba

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

## Discussão

A absorção dos nutrientes tem sido pouco estudada em peixes. Estudos mostraram que o uso de enzimas causa diferenças na digestibilidade dos nutrientes (SMITS & ANNISON, 1996; SIMON, 1998; FARHANGI & CARTER, 2007). Neste estudo, as análises de regressão e as interações significativas entre as enzimas avaliadas, em todos os parâmetros avaliados, demonstram a complexidade entre as enzimas e destas com a dieta. Isto pode estar relacionado com a adição das enzimas na dieta, ou com a degradação das enzimas exógenas pelas enzimas endógenas (BEDFORD & PARTRIGDE, 2001) e também pela competição por transportadores específicos (COELHO & MOREIRA, 2001).

Os resultados de diminuição dos CDa do amido com o uso de carboidratases e com ausência de fitase foram distintos dos apresentados por OLIVEIRA (2006), que utilizou um complexo enzimático contendo celulase, protease e amilase para tilápia do Nilo, e por STONE et al. (2003) que estudaram os efeitos da  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -xilanase na digestibilidade de ingredientes para "silver perch", que observaram aumento dos CDa aparente do amido com o uso das carboidratases.

O uso das enzimas amilase e endo- $\beta$ -glucanase aumentam a presença de glicose prontamente disponível no trato digestivo (STONE, 2003); no entanto, esta

maior disponibilidade não significa que seja absorvida. Os peixes, de forma geral, aproveitam melhor os carboidratos complexos do que os açúcares simples (STONE, 2003), o que, associado ao curto trato digestório dos peixes carnívoros, compromete ainda mais a sua absorção. O aproveitamento do amido depende da presença de outras enzimas no trato digestório além da amilase. Isto pode ter promovido a presença de polissacarídeos e glicose nas fezes, que, em última análise, provocaram os decréscimos dos CDa médios do amido com a elevação nos níveis de carboidratase nas dietas. MAENZ (2001) sugeriu que o uso de fitase pode melhorar a ação das carboidratases, provavelmente pela liberação de íons que são co-fatores destas enzimas; no entanto, isto não foi observado neste estudo.

A adição de AG em dietas contendo zero ou a concentração de 750 UF kg<sup>-1</sup>, não promoveu alterações nos CDa da proteína. Este nível pode não ter sido suficiente para diminuir a viscosidade da dieta e facilitar a ação das proteases. O uso de endo-β-glucanase pode liberar nutrientes como proteínas, lipídeos e amido que estavam ligados à parede das células, tal como descrito por CHESSON (1993); isto pode ter resultado no aumento das médias dos CDa da proteína, principalmente no tratamento com 1.500 UF e 100 mg de carboidratase kg<sup>-1</sup> de dieta.

Os resultados de CDa da proteína com o uso de Fi (1.500 UF kg<sup>-1</sup> de dieta) mostraram alterações com o acréscimo do nível de carboidratases, obtendo-se a melhor média para a dieta contendo 100 mg de amilase mais endo-β-glucanase. A interação significativa entre os efeitos destas enzimas não deixa claro como elas agem. DENSTADLI et al. (2006) estudaram a adição de diferentes níveis de ácido fítico sobre a digestibilidade em salmão e observaram que os maiores níveis deste fator antinutricional (10,0 e 20,7 g de ácido fítico kg<sup>-1</sup>) aumentavam a digestibilidade do N e diminuíam a de lipídeos, mas as diferenças foram tão pequenas que os autores consideraram que a relação de dose resposta entre os níveis de ácido fítico e digestibilidade de N, lipídio e amido também não foram claras.

Poucos são os estudos envolvendo a digestibilidade e a exigência de minerais em peixes tropicais. Até o momento, não há nenhuma referência sobre o gênero *Pseudoplatystoma* envolvendo estudos com minerais, o que dificulta o entendimento

dos resultados observados. Para peixes sabe-se que alguns minerais são exigidos em pequenas quantidades e as exigências podem ser atendidas pela quantidade presente na água que é absorvida através das brânquias, principalmente o cálcio, magnésio, sódio, potássio, ferro, zinco, cobre e selênio (NRC, 1993).

Observou-se aumento nos CAa do fósforo, nos juvenis de cachara, tanto com a adição de fitase, quanto com a adição de amilase e endo- $\beta$ -glucanase. Vários estudos mostraram os efeitos do uso da fitase sobre a melhora desta variável (RODEHUTSCORD & PFEFFER, 1995; GONÇALVES et al., 2004; LIEBERT & PORTZ, 2007; LEE et al., 2008). Assim, para peixes carnívoros como o cachara, as características do trato possibilitaram a ação desta enzima e a absorção deste mineral.

Segundo MAENZ (2001), os complexos do fitato com o terminal carboxílico da proteína e/ou com minerais possuem a capacidade de prejudicar a ação das enzimas digestivas pela ligação de minerais que seriam co-fatores, pela formação de complexo do fitato com a enzima ou por inibir a ação da tripsina. Segundo este autor, vários são os fatores que podem afetar a ação da fitase durante a passagem pelo intestino, que vão desde a concentração de minerais nas dietas, o pH do trato digestório, a manipulação das dietas e o tamanho do trato digestório.

As equações de regressão entre os níveis de enzimas usados nas dietas e os resultados de CAa do fósforo, cálcio e magnésio, que apresentaram comportamento cúbico, podem ter ocorrido devido às reações entre estes minerais ou outros nutrientes das dietas como fibras. Além disto, a absorção dos elementos pode ser influenciada pela ingestão de água, que é realizada para balancear a perda por osmose através das brânquias e da pele (EVANS, 1993), o que fornece ao corpo cálcio, potássio, magnésio sódio, além dos minerais provenientes da dieta.

O excesso de cálcio dietético pode formar um complexo insolúvel com o fósforo, ocasionando diminuição da absorção do cálcio. Com esta facilidade, a relação cálcio/fósforo para peixes é considerada 1:2, conforme HEPHER (1988). Os peixes não podem absorver eficientemente o fósforo dissolvido no meio aquático. Sua deficiência leva a uma redução na taxa de crescimento, redução na eficiência alimentar e baixa mineralização óssea (NRC, 1993).

## Conclusões

As adições de amilase com endo-  $\beta$ -glucanase e fitase nas dietas para juvenis de cachara alteraram os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e de absorção dos minerais. As alterações foram dependentes dos níveis de enzimas utilizados e houve interações entre as quantidades de enzimas estudadas. Outros estudos deverão ser conduzidos para melhor entendimento das interações observadas, mas a associação de 1.500 UF kg<sup>-1</sup> com 100 mg kg<sup>-1</sup> do complexo amilase mais endo- $\beta$ -glucanase apresentou os melhores coeficientes de digestibilidade da proteína.

## Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento (Proc. n. 07/00605-9) e bolsa concedida (Proc. n. 06/04146-6); Piscicultura Piraí pelos peixes doados e a DSM pela doação das enzimas.

## Referências Bibliográficas

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th. v. II., 2000.

BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. Ed. CABI Publishing, Cambridge. 387 p. 2001.

CHESSON, A. Feed enzymes. **Animal Feed Science; Technology**, v. 45, p. 65-79, 1993.

COELHO, T.H.; MOREIRA, A.L. **Fisiologia das membranas celulares**. Texto de apoio. Porto, 2001, 29 p. visto em 02 de novembro de 2009. [http://fisiologia.med.up.pt/Textos\\_Apoio/Membranas/Membranas.pdf](http://fisiologia.med.up.pt/Textos_Apoio/Membranas/Membranas.pdf)

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 45, n. 1, p. 101-108, 2004.

DENSTADLI, V.; STOREBAKKEN, T.; KROGDAHL, Å., SAHLSTRØM, S.; SKREDE, A. Feed intake, growth, feed conversion, digestibility, enzyme activities and intestinal structure in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed graded levels of phytic acid. **Aquaculture**, v. 256, p. 365–376, 2006.

EIGENMANN, C.H.; EIGENMANN, R.S. Preliminary notes on South American Nematognathi II. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 2, p. 28–56, 1889.

EVANS, D.H. Osmotic and ionic regulation. In: Evans, D.H. \_Ed., **The Physiology of Fishes**. CRC Press, London, p. 315–342. 1993

EVERITT, B. S. **The Cambridge Dictionary of Statistics**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998, 360p.

FARHANGI, M.; CARTER, C.G. Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 28, p. 1274-1282, 2007.

FURUKAWA, A.; TSUKAHARA, H. On the acid digestion method for the determination of Chromic Oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. **Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries**, v. 32, n. 6, p. 502-506, 1966.

GONÇALVES, E. G.; CARNEIRO, D. J. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia de alguns ingredientes utilizados em dietas para o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 779-786, 2003.

GONÇALVES, G. S.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. B.; HISANO, H.; FREIRE E. S.; FERRARI, J. E. C. Digestibilidade aparente e suplementação de fitase em alimentos vegetais para tilápia do Nilo. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 3, p. 313-321, 2004.

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

HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes**. Cambridge: *Cambridge University Press*, 386p., 1988.

LEE, K. J.; DANG, T. M.; LIM, S. J.; KO, G. Y.; EO, J.; OH, D. H. Improved apparent digestibility coefficient of protein and phosphorus by supplementation of microbial phytase in diets containing cottonseed and soybean meal for juvenile olive flounder". **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, September, 2008 by Minh Anh Pham, **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**. FindArticles.com. 07 August, 2009. <[http://findarticles.com/p/articles/mi\\_6917/is\\_9\\_21/ai\\_n29464649/](http://findarticles.com/p/articles/mi_6917/is_9_21/ai_n29464649/)>

LIEBERT, F.; PORTZ, L. Different sources of microbial phytase in plant based low phosphorus diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* may provide different effects on phytate degradation. **Aquaculture**, v. 267, p. 292-299. 2007.

LIN, S.; MAI, K.; TAN, B. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 1645-1653, 2007.

LUDKE, M. C. M. M.; LOPEZ, J.; LUDKE, J. V. Fitase em dietas para suínos em crescimento: (I) impacto ambiental. **Ciência Rural**, v.32, n. 1, p. 97-102, 2002.

MAENZ, D. D. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. p. 61–84 in: **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. M. R. Bedford and G. G. Partridge, ed. CABI Publishing, New York, NY, 2001.

MASCARELL, J.; RYAN, M. Technical aspects of enzyme utilization: Dry vs liquid enzymes. In: MORAND-FEHR P. (Ed.). **Feed manufacturing in Southern Europe: New challenges** . Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 1997 p.161-174.

**NRC- Nutrient Requirements of Fish**. 8 ed. Washington, DC: National Research Council. 1993, 114 p..

OGUNKOYA, A. E.; PAGE, G. I.; ADEWOLU, M. A.; BUREAU, D. P. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 254, p. 466-475, 2006.

OLIVEIRA, G. R. **Digestibilidade de nutrientes em dieta com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

PETREIRE, M. A pesca de água doce no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 19, n. 110, p. 28-33, 1995.

RODEHUTSCORD, M.; PFEFFER, E. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Water Science Technology**, v. 31, n. 10, p.143–7, 1995.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 56 p., 1974.

SIMON, O. The mode of action of NSP hydrolyzing enzymes in the gastrointestinal tract. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 7, p.115-123, 1998.

SMITS, C. H. M.; ANNISON G. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition - towards a physiologically valid approach to their determination (Review). **World's Poultry Science Journal**, v. 52, p. 203-221, 1996.

STONE, D. A. J. Dietary carbohydrate utilization by fish. **Reviews in fisheries Science**, v.11, n. 4, p. 337-369, 2003.

STONE, D. A. J.; ALLAN, G. L.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). IV. Can dietary enzymes increase digestible energy from wheat starch, wheat and dehulled lupin? **Aquaculture Research**, v.34, p.135-147, 2003.

WELCOMME, R. L. River fisheries. **Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO**, Roma, 1985, 330 p.

### **CAPÍTULO 3 - CRESCIMENTO E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE JUVENIS DE CACHARA (*Pseudoplatystoma reticulatum*) COM DIETAS CONTENDO FITASE E AMILASE COM ENDO- $\beta$ -GLUCANASE.**

**Resumo** - O presente trabalho teve o objetivo de estudar o desempenho de cacharas alimentados com oito dietas contendo duas proporções de proteína de origem animal e diferentes combinações de fitase e carboidratases. O ensaio foi realizado em 32 tanques de 450 L, com densidade de doze peixes por aquário. Os peixes foram alimentados por 70 dias, com duas dietas com distintas formulações, usando os mesmos ingredientes, e mesma composição de nutrientes. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados com oito tratamentos em esquema fatorial 2x4, correspondendo a dois tipos de dieta (R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal) e a quatro quantidades de enzima (sem enzima; AG: 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase; Fi: 2.500 UF kg<sup>-1</sup>; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup>), com quatro repetições. Foram avaliados os índices zootécnicos, composição de carcaça e retenção de minerais. Os efeitos das enzimas avaliadas sobre o desempenho, composição corporal, retenção de minerais e de nutrientes do cachara, dependem da dieta em que são empregadas. O cachara exige uma dieta com alto teor de proteína de origem animal. A adição das enzimas não foi adequada para melhorar o aproveitamento da dieta R30, mas foi eficiente para promover melhores resultados quando se utilizou dieta R60. A adição de enzimas alterou a mineralização das vértebras e o teor de lipídeos da carcaça quando foram adicionadas em R60. O uso de enzimas amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase mostraram-se promissores.

**Palavras-chave:** enzimas exógenas, desempenho, mineral.

**Abstract** - The aim of this essay was analyze the performance of Barred sorubim fed on eight diets containing two proportions of animal-origin protein and different combinations of phytase and carbohydratases. The experiment was carried out in 32 tanks of 450 L each, 12 fishes per tank density. The fishes were fed for 70 days on two diets with different formulations but the same ingredients and the same composition of nutrients. A statistical design used of blocks with eight treatments in a 2x4 factorial scheme was used, corresponding two kinds of feed (R30: feed with 30% of animal-origin protein; R60: feed with 60% of animal-origin protein) and four quantities of enzyme (no enzyme; 150 mg of the amylase + endo- $\beta$ -glucanase complex; 2.500 U of phytase  $\text{kg}^{-1}$ ; 100 mg of the amylase whith endo- $\beta$ -glucanase complex plus 1.500 U of phytase  $\text{kg}^{-1}$ ) with four replications. The development, carcass composition and mineral retention were analyzed. The Barred sorobim demands high animal-origem protein in the diets. The addition of enzymes was not enought to improve the exploitation of the R30 diet, but it was efficient to promote better resulted on R60. The enzyme addition in R60 modified the mineral retention and lipídeos of the carcass. The enzyme use amylase with endo- $\beta$ -glucanase and fitase had revealed promising.

**Keywords:** exogenous enzymes, performance, mineral retention.

## Introdução

O gênero *Pseudoplatystoma* compreende as espécies de peixes conhecidas por surubins e estão entre os maiores peixes da família Pimelodidae, ordem Siluriformes. Pode ser encontrado nas principais bacias hidrográficas da América do Sul: Amazônica, do Prata e do São Francisco (WELCOMME, 1985; PETRERE, 1995). De hábito alimentar carnívoro, principalmente piscívoro, são espécies de peixes apreciadas por apresentarem poucos espinhos intramusculares em sua carne, podendo alcançar de 100 a 120 kg na natureza (SATO et al., 1988), sendo que o cachara pode pesar até 70 kg (LE BAIL et al., 2000).

O cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum* (igual à *Pseudoplatystoma fasciatum reticulatum*, EIGENMANN & EIGENMANN, 1989) é uma das principais espécies produzidas em todo o território nacional. Segundo QUEIROZ et al. (2002), durante os últimos anos, várias empresas têm investido no cultivo intensivo dessa espécie com resultados satisfatórios em função da melhoria dos sistemas e do avanço tecnológico baseado no aumento do conhecimento sobre a biologia desta espécie. Isto tem diminuído o esforço pesqueiro e possibilitado a manutenção dos estoques naturais. Por apresentarem o hábito alimentar carnívoro, é cultivado com dietas formuladas contendo altos teores de proteína bruta. Entretanto, há necessidade de utilização de dietas eficientes, de baixo custo, que atendam à capacidade digestiva da espécie e, ainda, que causem pouca poluição ambiental.

A adição das enzimas na alimentação pode melhorar a utilização de nutrientes e diminuir a excreção dos mesmos no ambiente (LUDKLE et al., 2002). As enzimas são utilizadas na inativação de fatores antinutricionais, visando aumentar o valor nutricional dos alimentos por meio da transformação de componentes complexos em nutrientes absorvíveis. A adição de enzimas em dietas para monogástricos é uma prática comum para aves e suínos, mostrando-se vantajosa na maioria dos casos (BELLAVÉR, 2005).

De acordo com sua finalidade, as enzimas usadas em rações para monogástricos podem dividir-se em dois tipos: enzimas destinadas a complementar quantitativamente as próprias enzimas digestivas endógenas dos animais e enzimas

que esses animais não são capazes de sintetizar como a  $\beta$ -glucanases, pentosanases e  $\alpha$ -galactosidases (HENN, 2002).

A principal enzima estudada para dietas de organismos aquáticos é a fitase. Esta enzima tem como principal finalidade a ação sobre o ácido fítico, que é um dos fatores antinutricionais mais potentes existentes nas plantas. O ácido fítico ou fitato encontrado nos cereais, legumes e grãos de oleaginosas, é um quelante de minerais como fósforo, cálcio, magnésio, ferro, manganês e zinco, além de se ligar a proteínas e aminoácidos inativando enzimas digestivas (COWIESON et al., 2004). Cerca de 70% do fósforo dos ingredientes vegetais utilizados em rações para peixes encontram-se na forma de fósforo fítico (McCUAIG et al., 1972).

Os peixes não possuem fitase endógena para hidrolisar o fitato e destruir o seu efeito antinutricional, liberar o fósforo e maximizar a capacidade digestiva destes animais, capacitando-os a utilizar de forma eficaz os nutrientes (VIELMA et al., 1998). Por isso, os estudos sobre a utilização de fitase exógena, que melhora a disponibilidade do fósforo e também dos aminoácidos (McCUAIG et al., 1972) são importantes.

A adição de carboidratases foi descrita para *Salmo salar* (CARTER et al., 1994), larvas de *Sparus aurata* (KOLKOVSKI et al., 1993) e *Bidyanus bydyanus* (STONE et al., 2003). Foram descritos efeitos positivos pelo aumento da digestibilidade do carboidrato, da energia e da matéria seca quando se utilizou  $\alpha$ -amilase exógena (STONE et al., 2003). A amilase exógena tem como função diminuir a viscosidade da digesta e tornar a glicose presente no amido prontamente disponível, permitindo maior ação das outras enzimas e maior digestão do amido. Já as glucanases são específicas para polissacarídeos não amiláceos, melhorando o aproveitamento destes como fonte energética e diminuindo a viscosidade da dieta (BEDFORD et al., 2001).

Desta forma, o uso de fitase, amilase e endo- $\beta$ -glucanase em dietas para o cachara pode melhorar a eficiência das dietas e diminuir a poluição ambiental. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos das enzimas fitase, amilase com endo- $\beta$ -glucanase sobre as variáveis de desempenho e a composição corporal dos peixes alimentados com oito dietas, contendo duas proporções de proteína de origem animal e

diferentes combinações de fitase e carboidratases, bem como a influência destas dietas sobre a retenção de minerais e de nutrientes.

## Material e Métodos

### *Ensaio de desempenho, composição corporal e retenção de minerais.*

O ensaio de desempenho foi desenvolvido no Centro de Aquicultura da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos. Os animais foram mantidos em 32 aquários de fibra de vidro com capacidade de 450 L, abastecimento contínuo de água de poço artesiano, sendo 12 peixes por aquário, separados em quatro classes de peso iniciais: 130 a 170 g; 180 a 210 g; 215 a 250 g e 255 a 300 g. As unidades experimentais foram cobertas com lona plástica preta, sendo descobertas somente para a limpeza, realizada diariamente.

Duas dietas foram formuladas, usando os mesmos ingredientes (R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal), e mesma composição de nutrientes, às quais foram adicionadas enzimas. Dois produtos comerciais foram testados: uma mistura de alfa-amilase (IUB No. 3.2.1.1; 200 KNU g<sup>-1</sup>) e de endo-β-glucanase (IUB No. 3.2.1.6; 350 FBG g<sup>-1</sup>) provenientes do *Bacillus amyloliquefaciens*; e a fitase (IUB No. 3.1.3.26; 5.000 UF g<sup>-1</sup>) proveniente do fungo *Peniophora lycii*. As enzimas exógenas foram testadas isoladamente (AG: 150 mg do complexo amilase e endo-β-glucanase kg<sup>-1</sup>; Fi: 2.500 UF kg<sup>-1</sup>) ou em associação (AGF: 100 mg do complexo amilase com endo-β-glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup>) e comparadas com as dietas sem adição de enzimas.

As oito dietas (Tabela 1) foram processadas em máquina de moer carne com a adição de 40% de água e secas em estufa de ventilação forçada a 40°C, para que se evitasse a perda na atividade das enzimas.

Tabela 1- Fórmulas e composição das dietas experimentais.

Ingrediente (%)	Dietas							
	R30	R30Fi	R30AG	R30AGF	R60	R60Fi	R60AG	R60AGF
Farinha de peixe (60% PB)	14,2	14,2	14,2	14,2	35,9	35,9	35,9	35,9
Farinha de vísceras (60% PB)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Farinha de sangue (84% PB)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Farelo de soja (46% PB)	34,0	34,0	34,0	34,0	12,4	12,4	12,4	12,4
Concentrado proteico de soja (65% PB)	16,5	16,5	16,5	16,5	11,4	11,4	11,4	11,4
Glúten de milho (66% PB)	4,1	4,1	4,1	4,1	1,8	1,8	1,8	1,8
Amido de milho	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Farelo de trigo	3,8	3,8	3,8	3,8	15,7	15,7	15,7	15,7
Quirela de arroz	2,9	2,9	2,9	2,9	4,0	4,0	4,0	4,0
Óleo degomado de soja	2,0	2,0	2,0	2,0	-	-	-	-
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Caulim	5,45	5,40	5,435	5,43	1,75	1,70	1,635	1,62
Vitamina C	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Fitase	-	0,05	-	0,03	-	0,05	-	0,03
Amilase+endo- $\beta$ -glucanase	-	-	0,015	0,01	-	-	0,015	0,01
Composição calculada <sup>2</sup> :								
Matéria seca (%)	93,53	93,53	93,53	93,53	93,28	93,28	93,28	93,28
Proteína bruta (%)	42,58	42,58	42,58	42,58	42,76	42,76	42,76	42,76
Extrato etéreo (%)	5,11	5,11	5,11	5,11	5,13	5,13	5,13	5,13
ENN (%)	35,39	35,39	35,39	35,39	32,10	32,10	32,10	32,10
Fibra bruta (%)	3,40	3,40	3,40	3,40	2,73	2,73	2,73	2,73
Matéria mineral (%)	7,08	7,08	7,08	7,08	10,56	10,56	10,56	10,56
Cálcio (%)	0,69	0,69	0,69	0,69	1,29	1,29	1,29	1,29
Fósforo (%)	0,88	0,88	0,88	0,88	1,47	1,47	1,47	1,47
Energia bruta (kcal kg <sup>-1</sup> )	4025	4025	4025	4025	3993	3993	3993	3993

R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal; AG: 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase kg<sup>-1</sup>; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup>; Fi: 2.500 UF kg<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup> Cada 1% fornece: ácido fólico (2,00 mg); ácido pantotênico (40,00 mg) antioxidante (250,00 mg); colina (300,00 mg); cobre (20,00 mg); ferro (200,00 mg); iodo (10,00 mg); manganês (140,00 mg); selênio (0,30 mg); vit A (6.000,00 U I kg<sup>-1</sup>); Vit B (32,00 mg); Vit B12 (40,00 mg); Vit B2 (16,00 mg); Vit B6 (6,00 mg); Vit C (400,00 mg); Vit D3 (6000,00 U I kg<sup>-1</sup>); Vit E (100,00 UI kg<sup>-1</sup>); Vit K (12,00 mg); zinco (300,00 mg); niacina (200,00 mg); biotina (0,20 mg);

<sup>2</sup> Composição calculada a partir da análise de ingredientes dos alimentos.

Os animais foram alimentados até aparente saciedade, com as oito dietas por 70 dias, três vezes ao dia (8; 14 e 23 horas), sendo a principal alimentação no período noturno.

No estudo de desempenho foram avaliados: peso, comprimento final, relação peso-comprimento, ganho em peso, consumo aparente por peixe e as taxas de eficiência proteica (TEP = ganho em peso<sub>(g)</sub>/proteína ingerida<sub>(g)</sub>) e de crescimento específico (TCE = 100x(ln peso final<sub>(g)</sub>-ln peso inicial<sub>(g)</sub>)/tempo).

Para os estudos de composição corporal foram abatidos cinco juvenis de cada bloco de peso no início do ensaio de desempenho e dois peixes de cada parcela experimental ao final do período experimental. Após jejum de 24 horas, os animais foram anestesiados por imersão em gelo, abatidos e, em seguida, congelados e moídos. O material foi seco à 55°C em estufa de circulação forçada por 72 horas para ser utilizado nas análises de umidade, proteína bruta, lipídeos, cinzas e de energia bruta (AOAC, 2000). Na avaliação da eficiência de retenção de proteína (ERP) e da energia (ERE) das dietas, realizada para cada parcela, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$ER = 100 \times (N_{FC} \times P_F - N_{IC} \times P_I) / C_N$$

Onde:

N<sub>FC</sub>: médias de proteína ou energia final na carcaça.

N<sub>IC</sub>: médias de teor de proteína ou energia inicial na carcaça.

C<sub>N</sub>: média de consumo de proteína ou energia.

P<sub>I</sub>; P<sub>F</sub>: médias de peso vivo inicial ou peso vivo final respectivamente.

No estudo de retenção de minerais, dois peixes de cada parcela foram abatidos ao final do período experimental. Os animais foram anestesiados por imersão em gelo, abatidos, congelados e posteriormente autoclavados (102°C, 5 min.) para a retirada da espinha vertebral. As 10 primeiras vértebras flutuantes da espinha foram limpas, secas a 105°C e trituradas para análise de cálcio, fósforo, magnésio, manganês e zinco.

### *Análises físico-químicas*

A qualidade da água foi monitorada. A temperatura da água foi medida diariamente, e aos 7; 22; 37; 52 e 67 dias de experimentação foram realizadas análises de condutividade, oxigênio; alcalinidade total e fósforo total. Para isto os tanques não foram sifonados no dia anterior, e a limpeza do dia somente era realizada após a coleta. A condutividade da água foi mensurada utilizando-se condutivímetro Corning CD55 e o oxigênio foi avaliado com oxímetro digital (YSI-55). Já a alcalinidade total e fósforo total foram determinados como descrito por TAVARES (1995). Durante o período experimental, as médias das variáveis de qualidade da água foram: temperatura  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , alcalinidade  $127,5 \pm 7,20 \text{ mg L}^{-1}$ , condutividade  $150 \pm 10 \mu\text{S cm}^{-1}$ , pH  $6,2 \pm 1,0$  e oxigênio dissolvido  $6,0 \pm 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Com as dietas foram realizadas análises da composição bromatológica dos ingredientes utilizados. Os teores de proteína, umidade, matéria seca, cinzas e energia das carcaças foram analisados segundo a AOAC (2000). As análises foram realizadas em duplicatas no Centro de Aquicultura da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos.

As quantidades de ácido fítico presente nas dietas R30 e R60 foram determinadas segundo método descrito por THOMPSON & ERDMAN (1982), obtendo-se o fósforo fítico. O fósforo fítico foi determinado colorimetricamente, após digestão das amostras, com ácido nítrico e ácido perclórico (4:1; v:v), (CHEN et al., 1956). Esta análise foi realizada em triplicata no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UEL -Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

As determinações das concentrações de minerais da coluna vertebral dos juvenis de cachara foram realizadas após digestão da amostra com ácido nítrico e ácido perclórico 2:1 (v:v). A concentração de cálcio, magnésio, manganês e zinco foram determinados por meio de leituras em absorção atômica. O teor de fósforo foi determinado pelo método vanadato-molibdato (SARRUGE & HAAG, 1974), em duplicata na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, no Laboratório Central.

#### *Análise estatística dos resultados*

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados com oito tratamentos em esquema fatorial 2x4, correspondendo a duas proporções de proteína de origem animal na dieta (30 e 60%) e a quatro quantidades de enzima (sem enzima; AG; Fi e AGF), utilizando quatro repetições (em blocos para peso iniciais). A análise estatística do fósforo total da água foi realizada no mesmo esquema anteriormente descrito, mas com parcelas no tempo. Os dados foram submetidos à análise de variância, após teste de normalidade Cramer-von Mises (EVERITT, 1998), e utilizou-se o teste de Tukey para comparação das médias ( $P < 0,05$ ).

## **Resultados e Discussão**

A avaliação estatística dos dados de fósforo total na água das caixas experimentais (Tabela 2) mostrou que ocorreu efeito significativo do uso das enzimas. O uso de AG nas dietas favoreceu a menor média de fósforo na água, comparando-se com aquela contendo Fi; mas as médias não diferiram significativamente daqueles tratamentos em que foram utilizados AGF ou sem adição de enzima. As diferenças de fósforo na água mostraram que a adição de enzimas que diminuem a viscosidade da dieta (AG) acarretou diminuição dos teores de fósforo; no entanto, a adição de Fi não se mostrou benéfica para este parâmetro. Por outro lado, Al et al. (2007) observaram uma diminuição significativa do fósforo total na água quando adicionaram fitase à dieta, mas não ocorreu diferença para fósforo solúvel.

BARUAH et al. (2004) apontaram os benefícios do uso da fitase sobre a diminuição da poluição ambiental. Isto não foi observado neste estudo, provavelmente devido às diferenças de dietas utilizadas, a própria atuação das fitases sobre o ácido fítico, as espécies de peixes e as condições de cultivo. Os resultados contraditórios obtidos no presente estudo podem ser atribuídos às diferenças nas condições de cultivo utilizadas, formulação das dietas, atuação das fitases sobre o ácido fítico e a espécie de peixes.

Tabela 2 – Médias de fósforo total da água para tipos de dietas e enzimas e valores de F da análise de variância.

Médias para:	Fósforo Total ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Dieta com 30% de proteína de origem animal (R30)	197,96
Dieta com 60% de proteína de origem animal (R60)	273,22
Amilase + endo- $\beta$ -glucanase (AG)	215,53 b
Amilase + endo- $\beta$ -glucanase + fitase (AGF)	235,07 ab
Fitase (Fi)	261,22 a
Sem enzima	230,55 ab
Valores de F para:	
Bloco (BL)	1,26 ns
Tipo de dieta (R)	78,08 **
Período (P)	111,96 **
Enzimas (Ez)	4,98 **
R x Ez	1,30 ns
R x P	9,12 **
Ez x P	1,01 ns
R x Ez x P	0,57 ns

ns=não significativo ( $P>0,05$ ); \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey ( $P<0,01$ )

O tempo e o tipo de proteína na dieta influenciaram significativamente os resultados de fósforo na água, observando-se interação para estas duas variáveis (Tabela 3). A diferença da concentração de fósforo total da água foi decorrência do crescimento dos animais e, conseqüentemente, do aumento de consumo de dieta e excreção, sugerindo que durante o período experimental ocorreu um aumento significativo na liberação de fósforo total na água, com médias superiores para as rações com maior porcentagem de ingredientes de origem animal, com exceção da primeira coleta.

As dietas R30 e R60 apresentaram  $87,24 \pm 6,64$  e  $103,23 \pm 4,96$  mg de ácido fítico por  $100 \text{ g}^{-1}$  de dieta, respectivamente. Apesar da diferença da proporção dos ingredientes utilizados, não se observam grande alteração neste fator antinutricional entre as duas dietas utilizadas, provavelmente devido ao fato da dieta de maior proporção de proteína de origem animal conter alta porcentagem de farelo de trigo, que é um alimento rico neste fator antinutricional (HELSEBY et al., 2000).

Tabela 3 - Médias de fósforo total na água na interação entre tipo de dieta e do período em que foram realizadas as análises, onde R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal.

Período de coleta	R30 (µg/L)	R60 (µg/L)
Aos 7 dias de experimento	115,53 a E	119,71 a E
Aos 22 dias de experimento	145,99 b D	194,60 a D
Aos 37 dias de experimento	183,67 b C	236,34 a C
Aos 52 dias de experimento	236,98 b B	377,33 a B
Aos 67 dias de experimento	307,64 b A	438,15 a A

Letras diferentes mostram diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (maiúsculas nas colunas e minúscula nas linhas).

Em vários momentos, verificou-se que os animais mudavam de comportamento subitamente, deixando de alimentar-se. Não foi possível associar este comportamento a nenhum tipo de manejo, alteração de qualidade de água, nem a nenhum dos tratamentos. Por fim, o período experimental foi de apenas 70 dias, pois percebeu-se que nos blocos de peso maiores, a grande biomassa já poderia começar a ser um fator limitante.

A análise estatística dos índices zootécnicos (Tabela 4) mostrou que não ocorreu efeito de blocos sobre os resultados de ganho em peso, taxas de eficiência protéica e de crescimento específico. Observou-se efeito significativo do teor de proteína de origem animal das rações (R60 ou R30) sobre todas as variáveis de desempenho dos animais. De outra forma, o uso de enzimas somente influenciou sobre o comprimento padrão final dos peixes. O menor coeficiente de variação (7,94%), normalmente encontrado para esta variável, pode explicar o efeito significativo do uso de enzimas sobre esta variável.

As maiores médias de comprimento padrão final dos peixes foram observados nos animais que consumiram R60 ou que continha na sua formulação AGF (Tabela 4). Este mesmo padrão de resposta favorecendo peixes que consumiram a dieta R60 foi observado com as variáveis ganho em peso, taxa de eficiência protéica, consumo, e taxa de crescimento específico (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de F, coeficientes de variação e médias para desempenho de juvenis de cachara.

Médias para:	Peso Final (g)	Comprimento final (cm)	Relação peso-comprimento	Ganho em peso (g)	Consumo aparente (g)	Taxa eficiência proteica	Taxa crescimento específico (% dia <sup>-1</sup> )
Dieta com 30% de proteína de origem animal (R30)	241,75	27,36 b	8,71	24,09 b	213,66 b	0,23 a	0,07 b
Dieta com 60% de proteína de origem animal (R60)	340,79	29,89 a	11,15	106,59 a	248,05 a	0,91 b	0,23 a
Amilase + endo-β-glucanase (AG)	289,56	28,48 ab	9,97	65,90	230,97	0,62	0,16
Amilase + endo-β-glucanase + fitase (AGF)	306,34	29,24 a	10,19	80,30	230,67	0,68	0,18
Fitase (F)	288,47	28,50 ab	9,94	60,11	233,12	0,52	0,12
Sem enzima	280,70	28,28 b	9,62	55,04	228,67	0,47	0,13
Valores de F para:							
Bloco (BL)	29,67**	46,69**	24,10**	0,22 ns	4,18*	0,17ns	0,95 ns
Tipo de dieta (R)	117,07**	101,41**	107,38**	34,01**	15,02**	31,72**	26,99**
Enzimas (Ez)	1,32ns	2,74*	0,96ns	0,57ns	0,04ns	0,63ns	0,58ns
R x Ez	2,75*	2,31ns	3,12*	1,45ns	1,26ns	0,29ns	1,55ns
CV (%)	28,61	7,94	21,58	57,18	10,17	55,11	54,43

ns=não significativo (P>0,05); \*significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (P<0,05);

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey (P<0,01).

Os peixes que consumiram a dieta R60 tiveram média de ganho em peso muito superior aos que se alimentaram com a R30 (Tabela 4). O coeficiente de variação desta variável foi elevado, pois alguns peixes da parcela chegaram a perder peso durante o período experimental e outras dobraram a biomassa. Esta alta variação pode ter contribuído para a não observância de efeito das enzimas sobre as variáveis que envolveram o ganho em peso.

As médias de taxa de eficiência protéica, consumo por peixe e taxa de crescimento específico apresentaram o mesmo comportamento, sugerindo que o uso de enzimas não favoreceu nenhum tratamento, mas a utilização da dieta R60 forneceu médias significativamente superiores (Tabela 4).

Interações entre tipo de proteína da dieta e o uso de enzimas foram observadas para peso final (Figura 1) e relação peso-comprimento (Figura 2). Os resultados médios de peso final foram sempre favorecidos pela dieta R60. A adição de enzimas quando se utilizou R30 não promoveu nenhum acréscimo ao peso final; no entanto, as adições de Fi e AGF em R60 causaram aumento significativo desta variável, quando comparado com a R60 sem adição de enzimas. Para a relação peso-comprimento a adição de AGF em R60 promoveu uma melhora significativa quando comparado com R60 sem enzimas.

Al et al. (2007) verificaram que a adição de fitase não afetou a taxa de crescimento específico e taxa de eficiência alimentar em *Lateolabrax japonicus*; porém, a de xilanase e do complexo que incluía celulase, pentonase e glucanase aumentaram significativamente estas variáveis. CARTER et al. (1992, 1994) investigaram o efeito de amilase dietética e mistura de enzimas pancreáticas dietéticas em dietas de juvenis de salmão (*Salmo salar*) e não observaram efeitos sobre o crescimento ou utilização de proteína quando a amilase dietética foi usada, mas ocorreu efeitos positivos no crescimento e utilização de proteína quando as enzimas pancreáticas foram utilizadas.

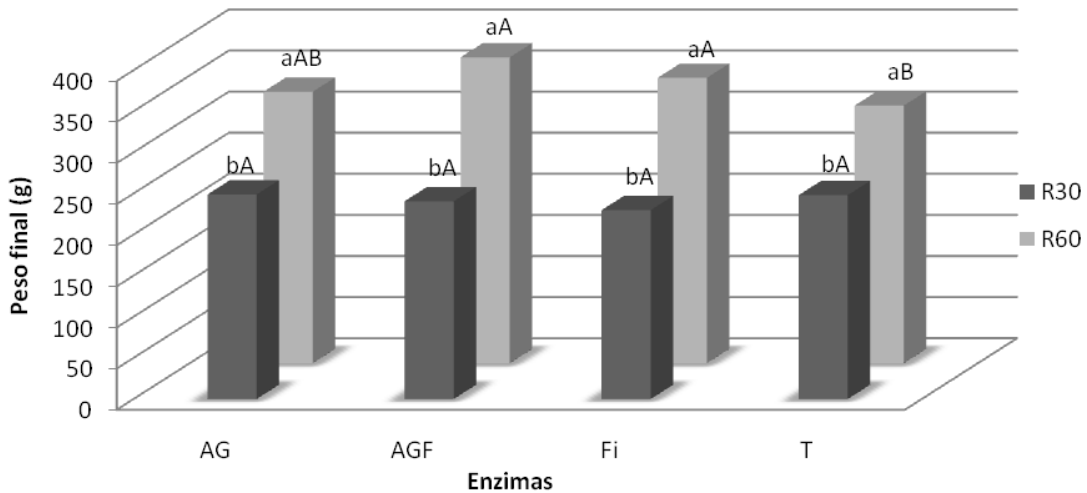


Figura 1 - Médias de peso final de juvenis de cachara na interação entre tipo de dieta e das enzimas (onde R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal; AG: 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase  $\text{kg}^{-1}$ ; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF  $\text{kg}^{-1}$ ; Fi: 2.500 UF  $\text{kg}^{-1}$  e T: sem adição de enzimas. Letras diferentes mostram diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; maiúsculas nas linhas e minúscula nas colunas).

Ao estudar os efeitos da adição de amilase, lipase e protease, isoladamente, na dieta de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*), CAVERO (2004) não encontrou efeito significativo sobre o crescimento, enquanto que, o uso combinado de 0,1% de lipase + protease apresentou um efeito positivo.

A adição simultânea de enzimas exógenas (celulase, protease e amilase) em dietas para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi benéfica até o nível de 0,05%, e permitiu um maior aproveitamento de seu conteúdo protéico e energético (OLIVEIRA, 2006). A tilápia possui um bom aproveitamento dos aminoácidos e polissacarídeos livres; sendo assim, supõem-se que a suplementação de rações com complexo enzimático tenha papel importante no maior aproveitamento energético e proteico, expressos nas consideráveis frações de polissacarídeos não-amiláceos e amido presentes em ingredientes de origem vegetal, como milho e farelo de soja,

respectivamente. O mesmo aproveitamento dos carboidratos deve ter ocorrido nos animais deste estudo, pois apesar dos coeficientes de variação, foi possível verificar o efeito das carboidratases sobre o peso final e comprimento final quando se utilizou a dieta R60.

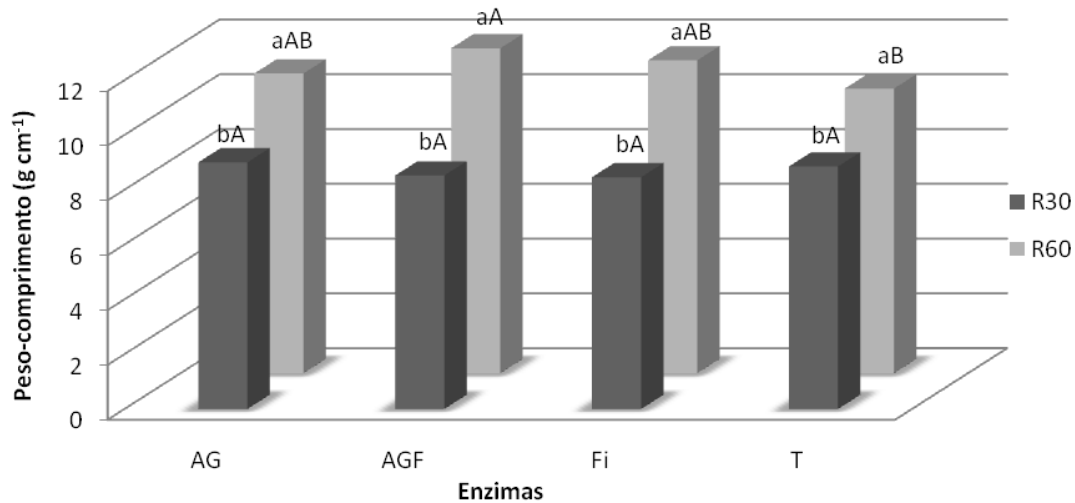


Figura 2 - Médias da relação peso-comprimento dos juvenis de cachara na interação entre tipo de dieta e das enzimas (onde R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal; AG: 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase  $\text{kg}^{-1}$ ; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF  $\text{kg}^{-1}$ ; Fi: 2.500 UF  $\text{kg}^{-1}$  e T: sem adição de enzimas. Letras diferentes mostram diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; maiúsculas nas linhas e minúscula nas colunas).

USMANI & JAFRI (2002) observaram o efeito do ácido fítico e encontraram médias de ganho em peso mais elevadas e melhores taxas de crescimento específico, eficiência de retenção de proteína e conversão alimentar para carpas indianas (*Cirrhinus mrigala*) alimentadas com a dieta controle, que não continham ácido fítico.

Maiores médias de ganho em peso e retenção de minerais na carcaça e adequada disponibilidade dos macrominerais para a truta arco-íris (*Oncorhynchus*

*mykiss*) foram obtidos por RODEHUTSCORD & PFEFFER (1995); LANARI et al. (1998) e VIELMA et al. (1998), com a suplementação entre 1000 a 1500 UF kg<sup>-1</sup> de dieta, em relação à dieta sem a suplementação de fitase.

JACKSON et al. (1996) concluíram que para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), a utilização de 500 UF kg<sup>-1</sup> foi suficiente para permitir adequado desempenho. O estudo com o cachara demonstrou claramente que a quantidade de fitase necessária para que haja uma resposta dos índices de desempenho pode variar com a dieta e com o uso ou não de outra enzima, uma vez que, dietas contendo 2.500 UF kg<sup>-1</sup> (Fi) apresentaram resultados inferiores ou iguais à dieta contendo 100 mg de AG kg<sup>-1</sup> mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup> (AGF).

A maioria dos trabalhos sobre o uso de enzimas em dietas para peixes encontrados na literatura é com larvas de peixes. KOLKOVSKI & TANDLER (2000), utilizando microdieta suplementada com pancreatina suína na alimentação de larvas de *Sparus aurata*, verificaram uma melhora significativa no crescimento quando comparadas com larvas alimentadas com microdietas sem adição de pancreatina (ambos combinados com *Artemia* viva). TESSER et al. (2006) demonstraram que larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a partir de 7,0 mg de peso, podem passar pela transição alimentar sem detrimento da sobrevivência final, quando alimentadas com dieta suplementada com a enzima pancreatina.

KOLKOVSKI et al. (1997; 2000), trabalhando com larvas de *Dicentrarchus labrax* e *Perca flavensis*, respectivamente, não encontraram efeitos da suplementação de enzimas exógenas com pancreatina suína sobre o crescimento e a sobrevivência dos animais. É possível que a quantidade de enzimas ativas provenientes da dieta não tenha sido suficiente para promover algum efeito sobre o desempenho produtivo daqueles animais ou realmente aquelas espécies não respondem à suplementação de enzimas exógenas. Segundo DABROWSKI et al. (1979), a suplementação enzimática em dietas pode acarretar uma pré-hidrólise dos componentes da dieta antes mesmo do oferecimento aos peixes. STONE et al. (2003), ao relatarem aumento na quantidade de açúcares na dieta suplementada comparada com a dieta sem suplementação, confirmaram essa suposição.

Os resultados da análise estatística dos valores de composição corporal e índices de eficiência de retenção dos nutrientes da dieta encontram-se na Tabela 5. Não foram observadas diferenças significativas para os resultados de proteína, umidade e cinzas na carcaça.

Efeitos significativos do tipo de dieta sobre os valores médios de energia da carcaça, ERP e ERE foram observados (Tabela 5), o que demonstrou a superioridade das médias de R60 frente às de R30. Para as médias do nível lipídico corporal, observou-se interação para o tipo de dieta e enzimas utilizada (Figura 3).

USMANI & JAFRI (2002) observaram o efeito do ácido fítico na composição da carcaça do *Cirrhinus mrigala*. Estes autores observaram que o teor de proteína bruta e lipídeos declinaram significativamente nos peixes que consumiram dieta contendo o ácido fítico, mas as porcentagens de umidade e de cinzas nestes peixes eram significativamente mais altas do que peixes que receberam dieta controle.

Na Figura 3 pode observar-se que, quando utilizou-se a dieta R30, não foi observado o efeito das enzimas; mas quando os peixes consumiram R60, o uso das enzimas (AGF e Fi) aumentou o teor de lipídeos da carcaça; e o uso de fitase, associada ou não a carboidratases aumentou os teores de lipídeos dos peixes que receberam R60. Isto demonstra que, as dietas R30 apesar de terem os mesmos níveis de nutrientes que as dietas R60, apresentaram disponibilização muito baixa dos mesmos, e que a glicose excedente pelo uso das enzimas, neste tipo de dieta, não foi suficiente para alterar a deposição de lipídeos.

As médias da retenção de minerais nas vértebras de cachara (zinco, magnésio, cálcio, fósforo e manganês) e a análise estatística são apresentadas na Tabela 6. Não foi observado efeito significativo para retenção de zinco. Em relação ao cálcio e ao magnésio observou-se interação (Figuras 4 e 5 respectivamente), entre o tipo de dieta e as enzimas. Neste caso, a fitase teve efeitos diferentes em relação às dietas utilizadas, sendo que ocorreu diminuição da retenção de cálcio e magnésio quando utilizou-se a dieta R60, comparado com a R30. Não há explicação definitiva para o fato de que a adição de fitase ( $2.500 \text{ UF kg}^{-1}$ ) em R60 causou diminuição de cálcio e de magnésio, mas o uso de AG e AGF não provocou alterações destes nutrientes em R30 e R60.

Tabela 5 – Valores de F, coeficientes de variação e médias da composição corporal e dos índices de eficiência de retenção de nutrientes em juvenis de cachara.

Médias para:	PB (%)	EE (%)	Energia (kcal)	Umidade <sup>1</sup> (%)	Cinzas (%)	ERP <sup>2</sup> (%)	ERE <sup>3</sup> (%)
Dieta com 30% de proteína de origem animal (R30)	72,57	9,86	4810,52 b	75,46	16,39	28,24 b	5,96 b
Dieta com 60% de proteína de origem animal (R60)	71,74	11,48	4999,72 a	74,98	15,89	78,67 a	48,31 a
Amilase + endo-β-glucanase (AG)	71,74	11,16	4926,76	75,03	16,68	56,59	29,85
Amilase + endo-β-glucanase + fitase (AGF)	70,76	12,18	4968,49	74,89	15,41	60,26	35,80
Fitase (Fi)	72,60	11,60	4994,56	75,23	16,03	48,98	26,49
Sem enzima	73,52	7,75	4730,67	75,71	16,45	48,00	16,41
Valores de F para:							
Bloco (BL)	0,42ns	0,09ns	0,06ns	0,77ns	1,09ns	0,99ns	8,42**
Tipo de dieta (R)	0,78ns	3,11ns	5,02*	0,81ns	0,13ns	31,31**	42,46**
Enzimas (Ez)	1,51ns	4,51*	1,92ns	0,43ns	0,16ns	0,42ns	1,11ns
R x En	2,20ns	5,47**	0,56ns	0,54ns	0,50ns	0,91ns	1,40ns
CV (%)	3,45	22,52	4,55	1,90	22,74	44,45	70,28

<sup>ns</sup> = não significativo (P>0,05)

\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (P<0,05)

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey (P<0,01)

<sup>1</sup> com base na matéria seca original; <sup>2</sup> Eficiência de retenção de proteína; <sup>3</sup> Eficiência de retenção de energia.

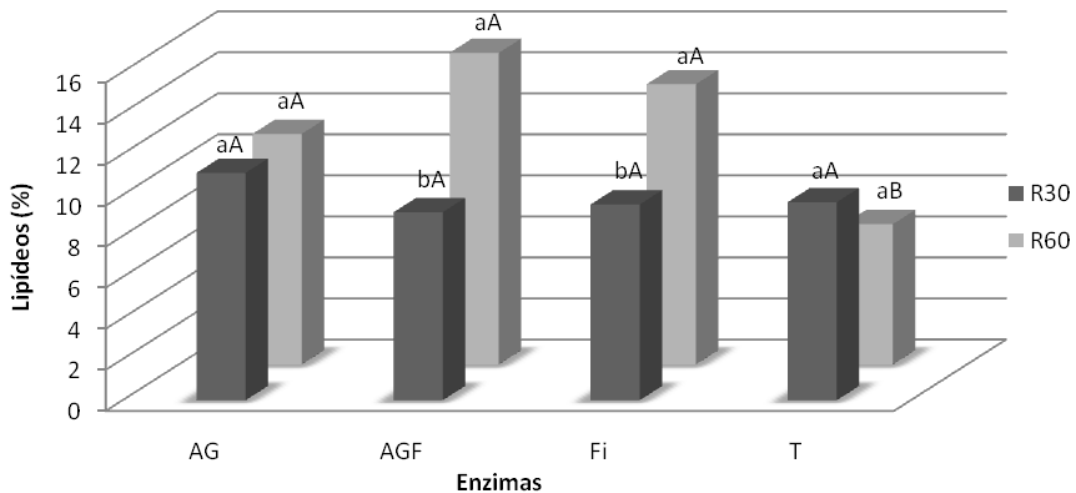


Figura 3 - Porcentagem de lipídeos corporais de juvenis de cachara na interação entre tipo de dieta e de enzimas (onde R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal; AG: 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase  $\text{kg}^{-1}$ ; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF  $\text{kg}^{-1}$ ; Fi: 2.500 UF  $\text{kg}^{-1}$  e T: sem adição de enzimas. Letras diferentes mostram diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; maiúsculas nas linhas e minúscula nas colunas).

Uma possível explicação seria o fato de que a dieta de origem animal possui um elevado conteúdo de fósforo e cálcio, o que poderia ter dificultado a sua absorção devido à propriedade de se complexarem, tal como descrito por BEDFORD et al. (2001). Outra possibilidade seria a de que este peixe possa ter utilizado o cálcio da água e o seu elevado conteúdo acarrete diminuição da atividade de fitase.

HUGHES & SOARES (1998), avaliando rações com diferentes níveis de inclusão de fitase para alevinos de “striped bass” (*Morone saxatilis*), observaram que a inclusão

de 2.400 UF kg<sup>-1</sup> melhorou a retenção de minerais nos ossos e aumentou a concentração de fósforo sérico. Para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), JACKSON et al. (1996) avaliaram a inclusão de 0; 500; 1.000, 2.000 e 4.000 UF kg<sup>-1</sup> de dieta e concluíram que a utilização de 500 UF kg<sup>-1</sup> foi suficiente para deposição de fósforo nos ossos. FURUYA et al. (2001), em trabalho realizado com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de 9 a 40g de peso vivo, avaliaram a inclusão de 0; 500; 1.500 e 3.000 UF kg<sup>-1</sup> de dieta e observaram que além do melhor desempenho, os peixes que receberam a dieta com 500 UF kg<sup>-1</sup> apresentaram maior retenção de minerais (cálcio, fósforo, ferro, zinco e magnésio).

Tabela 6 – Valores de F, coeficientes de variação e médias de retenção de minerais na coluna vertebral do juvenil de cachara.

Médias para:	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Mg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Ca ( $\text{mg g}^{-1}$ )	P ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Mn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Dieta com 30% de proteína de origem animal (R30)	145,07	95,77	5,86	9,46 a	89,66a
Dieta com 60% de proteína de origem animal (R60)	109,48	87,91	5,39	8,08 b	66,70b
Amilase + endo- $\beta$ -glucanase (AG)	113,60	85,79	5,44	9,05 ab	73,73
Amilase + endo- $\beta$ -glucanase + fitase (AGF)	138,83	103,61	6,39	10,04 a	84,32
Fitase (Fi)	129,81	88,93	5,18	8,53 ab	75,69
Sem enzima	126,86	89,02	5,49	7,44 b	78,97
Valores de F para:					
Bloco (BL)	0,31ns	2,16ns	2,41 ns	3,09 ns	1,17 ns
Tipo de dieta (R)	2,67ns	0,79ns	1,09 ns	8,98 **	4,68 *
Enzimas (Ez)	0,25ns	0,81ns	1,35 ns	5,30 **	0,19 ns
R x Ez	0,27ns	4,42*	3,42 *	1,17 ns	1,95 ns
CV (%)	45,40	25,37	20,76	13,79	35,20

ns=não significativo ( $P>0,05$ )

\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ )

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey ( $P<0,01$ ).

Para a retenção de fósforo, observou-se o efeito das dietas e das enzimas, sendo que a utilização da dieta R30 promoveu sua maior retenção. A utilização de amilase mais fitase favoreceu a maior retenção do fósforo, quando comparado com a dieta sem enzima (Tabela 6), sugerindo que a diminuição da viscosidade da digesta proporciona um efeito benéfico na absorção do fósforo tal como descrito por BEDFORD et al. (2001). O manganês teve sua retenção aumentada com o fornecimento da dieta R30, mas não foi observado efeito da utilização das enzimas sobre a retenção deste mineral (Tabela 6 e Figura 5).

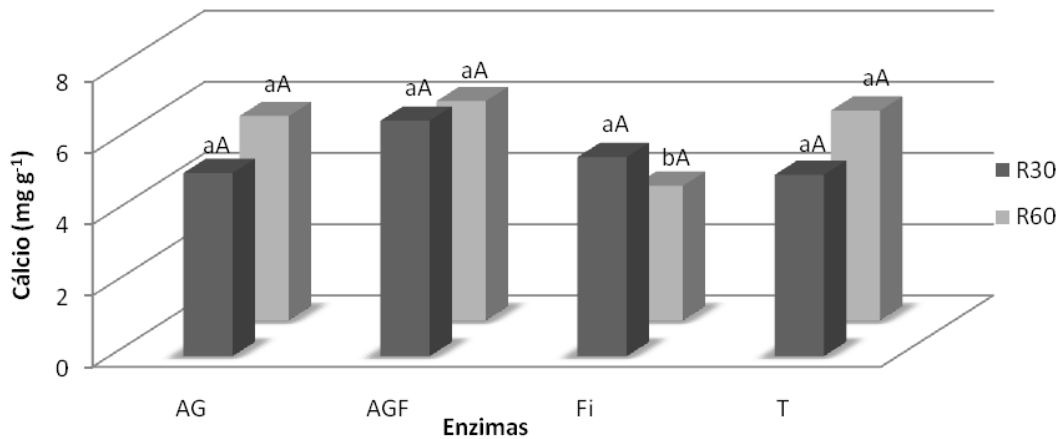


Figura 4 - Médias de cálcio retido na coluna vertebral de juvenis de cachara, na interação entre tipo de dieta e de enzimas (onde R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal; AG: 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase kg<sup>-1</sup>; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup>; Fi: 2.500 UF kg<sup>-1</sup> e T: sem adição de enzimas. Letras diferentes mostram diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; maiúsculas nas linhas e minúscula nas colunas).

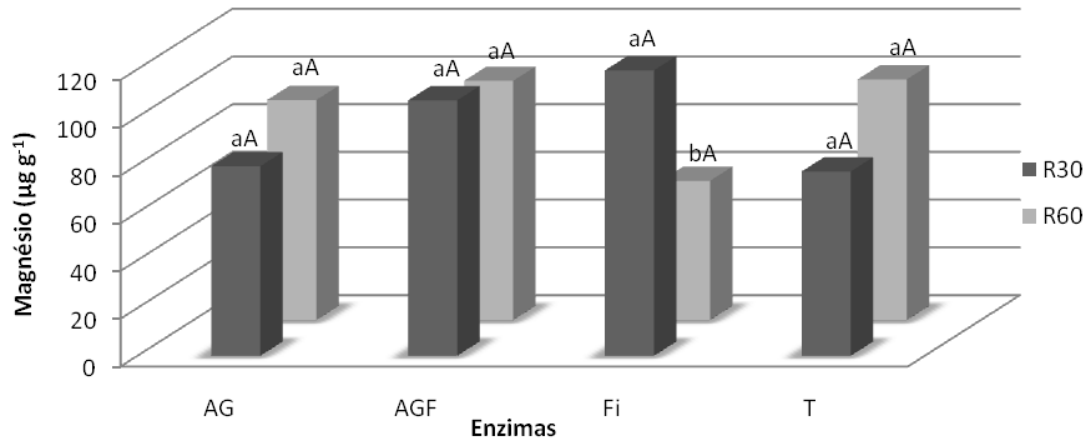


Figura 5 - Médias de magnésio retido na coluna vertebral de juvenis de cachara, na interação entre tipo de dieta e de enzimas (onde R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal; AG: 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase  $\text{kg}^{-1}$ ; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF  $\text{kg}^{-1}$ ; Fi: 2.500 UF  $\text{kg}^{-1}$  e T: sem adição de enzimas. Letras diferentes mostram diferença significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; maiúsculas nas linhas e minúscula nas colunas).

## Conclusão

Os efeitos das enzimas fitase e amilase com endo- $\beta$ -glucanase sobre o desempenho, composição corporal, retenção de minerais e de nutrientes do cachara dependem da dieta em que são empregadas. O cachara exige uma dieta com alto teor de proteína de origem animal. A adição das enzimas não foi adequada para melhorar o aproveitamento da dieta com 30% do teor de proteína de origem animal (R30), mas foi eficiente para promover melhores resultados quando se utilizou dieta com 60% do teor de proteína de origem animal (R60). A adição de enzimas alterou a mineralização das vértebras e o teor de lipídeos da carcaça quando foram adicionadas em R60. O uso de enzimas amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase mostraram-se promissores.

## **Agradecimentos**

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento (Proc. n. 07/00605-9) e bolsa concedida (Proc. n. 06/04146-6); a Dra. Adelaide Beleia da Universidade Estadual de Londrina pelas análises de fitato; a Piscicultura Piraí pela doação dos peixes e a DSM pela doação das enzimas.

## **Referências Bibliográficas**

AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, W.; XU, W.; TAN, B.; ZHANG, C.; LI, H. Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A – Molecular and integrative physiology, v. 147, n. 2, p. 502–508, 2007.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th. v. II., 2000.

BARUAH, K.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; DEBNATH, D. Dietary Phytase: An ideal approach for a cost effective and low-polluting aquafeed. **NAGA, WorldFish Center Quarterly**, v. 27, n. 3; 4, 2004.

BEDFORD, M. R.; GARY G.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. Ed. CABI Publishing, 406 p., 2001.

BELLAVER, C. Utilização de melhoradores de desempenho na produção de suínos e de aves. Campo Grande, MS. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, v. 7, 2005, Campo Grande. **Anais...**Campo Grande: ABZ / UEMS /UFMS, Embrapa Pantanal, 2005.

CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F.; McCARTHY, I. A. Feed utilization efficiencies of Atlantic salmon *Salmo salar* L. parr: effect of a single supplementary enzyme. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 2, p. 369-374, 1992.

CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F.; BUCHANAN, B.; McCARTHY, I. A. Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon *Salmo salar* feed a diet containing supplementary enzyme. **Aquaculture and Fish Management**, v. 25, n. 1, p. 37-46, 1994.

CAVERO, B. A. S. **Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de Pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829)**. 2004. 79 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

CHEN, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v.28, n.11, p.1756-1758, 1956.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 45, n. 1, p. 101-108, 2004.

DABROWSKI, H.; GRUDNIEWSKI, C.; DABROWSKI, K. Artificial diet for common carp: effect of the addition of enzymes extracts. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 41, p. 196-200, 1979.

EIGENMANN, C.H.; EIGENMANN, R.S. Preliminary notes on South American Nematognathi II. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 2, p. 28–56, 1889.

EVERITT, B. S. **The Cambridge Dictionary of Statistics**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998, 360p.

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C.; FURUYA, V. R. B.; BARROS, M. M. Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alguns

ingredientes pela tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) (linhagem tailandesa). **Acta Scientiarum**, v. 23(2), p. 465-462, 2001.

HELSEBY, N. A.; ZHU, S.; PEARSON, A. E.; TINGLE, M. D.; FERGUSON, L. R. Antimutagenic effects of wheat bran diet through modification of xenobiotic metabolising enzymes. **Mutation Research**, v. 454, p. 77-88, 2000.

HENN, J. D. **Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves**. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, 2002.

HUGHES, K. P.; SOARES, J. H. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis*. **Aquaculture Nutrition**, v. 4, p.133-140, 1998.

JACKSON, L. S.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization phytate phosphorus. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 27, n. 3, p. 309-313, 1996.

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, p. 11-15, 2000.

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A.; IZQUIERDO, M. S. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Aquaculture**, v. 148, p. 313–322, 1997.

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A.; KISSIL, W. M.; GERTLER, A. The effects of exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 12, p. 203-209, 1993.

KOLKOVSKI, S.; YACKEY, C.; CZESNY, S.; DABROWSKI, S. The effect of microdiet supplementation of dietary enzymes and a hormone on growth and enzyme activity in yellow perch juveniles. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, p. 130-134, 2000.

LANARI, D.; D'AGARO., E.; TURRI, C. Use of nonlinear regression to evaluate the effects of phytase enzyme treatment of plant protein diets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 161, p. 345-356, 1998.

LE BAIL, P. Y.; KEITH P.; PLANQUETTE, P. **Atlas des poisons d'eau douce de Guyane** (tome 2, fascicule II). Publications Scientifiques du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 307 p., 2000.

LUDKE, M. C. M. M.; LOPEZ, J.; LUDKE, J. V. Fitase em dietas para suínos em crescimento:(I) impacto ambiental. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 97-102, 2002.

McCUAIG, L. W.; DAVIES, M. I.; MOTZOK, I. Intestinal alkaline phosphatase and phytase of chicks: effect of dietary magnesium, calcium, phosphorus and thyroactive casein. **Poultry Science**, v. 51, p. 526-530, 1972.

OLIVEIRA, G. R. **Digestibilidade de nutrientes em dieta com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

PETREIRE, M. A pesca de água doce no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 19, n. 110, p. 28-33, 1995.

QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. **A Embrapa e a aqüicultura: demandas e prioridades de pesquisa**. ed. Embrapa informações tecnológicas, Brasília, 40p., 2002.

RODEHUTSCORD, M.; PFEFFER, E. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Water Science Technology**, v.31, n.10, p.143-147, 1995.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 56 p., 1974.

SATO, Y.; CARDOSO, E. L.; SALLUM, W. B. Reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) da bacia do São Francisco. In: **Resumos do Encontro Anual de Aquicultura**, v. 6, p. 20, 1988.

STONE, D. A. J; ALIAN, D.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). IV. Can dietary enzymes increase digestible energy from wheat starch, wheat and dehulled lupin? **Aquaculture Research**. v.34, p.135-147, 2003.

TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada a aquicultura**. Jaboticabal: FUNEP. 70p, 1995.

TESSER, M. B.; FLORES-QUINTANA, C. I.; CARNEIRO, D. J.; PIZAURO, J. M.; PORTELLA, M. C. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura do pacu. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2211-2218, 2006.

THOMPSON, D. B.; ERDMAN, J. W. Phytic acid determination in soybeans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47(2), p. 513-517, 1982.

USMANI, N.; JAFRI, A. K. Influence of dietary phytic acid on the growth, conversion efficiency, and carcass composition of mrigal *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) fry. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 33, p. 199-204, 2002.

VIELMA, J.; LALL, S. P.; KOSKELA, J.; SCHÖNER F.; MATTILA, P. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.63, n.3/4, p. 309-323, 1998.

WELCOMME, R. L. River fisheries. **Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO**, Roma, 1985, 330p.

#### **CAPÍTULO 4 – PERFIL DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DE JUVENIS DE CACHARA (*Pseudoplatystoma reticulatum*) ALIMENTADOS COM ENZIMAS EXÓGENAS E DIFERENTES PROPORÇÕES DE PROTEÍNA DE ORIGEM ANIMAL**

**Resumo** - O objetivo do presente trabalho foi estudar as alterações na produção de enzimas digestivas endógenas causadas pela mudança na composição da dieta e ou pela adição de enzimas exógenas amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase. O ensaio foi realizado em 32 tanques de 450 L, com densidade de doze peixes por aquário. Os peixes foram alimentados por 70 dias, com duas dietas de distintas formulações, usando os mesmos ingredientes (R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal), e mesma composição de nutrientes. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados com oito tratamentos em esquema fatorial 2x4, correspondendo a dois tipos de dieta e a quatro quantidades de enzima (sem enzima; 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase; 2.500 UF kg<sup>-1</sup>; 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup>), com quatro repetições. Ao final do período experimental, oito peixes de cada tratamento foram utilizados para avaliar as atividades de amilase, lipase, pepsina, tripsina e quimotripsina. Observou-se que o tipo de dieta influenciou significativamente a produção de tripsina, quimotripsina, pepsina e lipase, enquanto que o uso de enzimas exógenas alterou significativamente a produção de amilase e tripsina pancreática, mostrando que o tipo de dieta e/ou a adição de enzimas exógenas alterou a quantidade de enzimas digestivas do cachara. As dietas com maior teor de proteína de origem animal aumentaram os níveis de enzimas proteolíticas pancreáticas e da lipase. O aumento da atividade de enzimas digestivas mostrou que a adição das enzimas exógenas fitase, amilase e endo- $\beta$ -glucanase possuem um papel importante na nutrição de peixes carnívoros, no aumento do aproveitamento da proteína e dos carboidratos.

**Palavras-chave:** enzima endógena, enzima digestiva, peixe carnívoro, enzima exógena.

**Abstract** - The present work aimed study the alterations on endogenous digestive enzyme production caused by changes in the diet composition and by amylase with endo- $\beta$ -glucanase and phytase exogenous enzymes addition. The experiment was carried out in 32 tanks of 450 L each, with density of twelve fish in each aquarium. The fish were fed per 70 days, with two diets with distinct formulations, using the same ingredients (R30: feed with 30% animal origin protein; R60: feed with 60% of animal origin protein), and same nutrient composition. The delineation used was the randomized block with eight treatments in a factorial 2x4 scheme, corresponding to the two feed types and the four enzyme amounts (without enzyme; 150 mg of amylase with endo- $\beta$ -glucanase complex; 2,500 U of phytase  $\text{kg}^{-1}$ ; 100 mg of amylase with endo- $\beta$ -glucanase complex plus 1,500 U of phytase  $\text{kg}^{-1}$ ), with four replications. At the end of the experimental period eight fish of each treatment were used to evaluate the amylase, lipase, pepsin, trypsin and chymotrypsin activities. It was observed that the feed type influenced significantly the trypsin, chymotrypsin, pepsin and lipase production, whereas the exogenous enzymes used modified significantly amylase and pancreatic trypsin production, showing that the diet type and/or the exogenous enzymes addition modified the Barred sorubim digestive enzymes amount. The diets with higher animal origin protein increased the pancreatic proteolytic enzymes and lipase levels, demonstrating to be more adjusted to these enzymes production for this fish species. The increased activity of digestive enzymes showed that the addition of phytase, amylase and endo- $\beta$ -glucanase exogenous enzymes has an important role in the carnivorous fish nutrition, in the increase of the protein, and in the carbohydrate exploitation.

**Keywords:** endogenous enzymes, digestive enzyme, carnivorous fish, exogenous enzyme.

## Introdução

O crescimento dos peixes depende da digestão e da absorção de nutrientes, bem como das interações metabólicas e seus ajustes (HARDY, 2002). A capacidade digestiva pode ser definida como a habilidade do animal em secretar enzimas no trato digestório, capazes de hidrolisar os polímeros presentes nos alimentos até seus respectivos monômeros, sendo que os níveis destas enzimas são influenciados pelos níveis dos nutrientes presentes no alimento ingerido (LUNDSTEDT et al., 2004).

Os peixes, na tentativa de se adequarem às mudanças da dieta apresentam potencial de adaptação dos seus processos digestivos, tais como perfil e secreção enzimáticos, absorção e transporte de nutrientes (KAPOOR et al., 1975; HOFER, 1979a,b; BUDDINGTON et al., 1987, 1997), mas estas habilidades parecem variar entre espécies. Os carnívoros, por exemplo, parecem ter uma capacidade limitada em alterar sua função digestiva e de transporte de nutrientes de acordo com a composição da dieta, enquanto os onívoros exibem uma habilidade muito maior em modular sua fisiologia digestiva e absorviva (BUDDINGTON et al., 1987,1997).

Estudos relacionando as alterações dos níveis enzimáticos causadas por diferenças da composição da dieta são escassos (KAWAI & IKEDA 1972; FAL'GE & SHPANNKHOF 1976; SPANNHOF & PLANTIKOW 1983; TAKII et al., 1985; UYS et al., 1987; FOUNTOULAKI et al., 2005).

Atualmente, existe uma grande preocupação com o déficit de proteína de origem animal para as rações de peixes (BARUAH et al., 2004). Assim, vários estudos têm sido desenvolvidos para melhorar o aproveitamento dos alimentos vegetais e para substituição da farinha de peixe por produtos de origem vegetal (REFSTIE, 2007). Uma das formas de melhorar-se o aproveitamento dos nutrientes das dietas é a adição de enzimas exógenas, que são utilizadas visando destruir fatores antinutricionais e aumentar o valor nutricional dos alimentos por meio da transformação de componentes complexos em nutrientes absorvíveis. Alguns destes estudos foram com carpa comum (DABROWSKI et al., 1979), *Salmo salar* (CARTER et al., 1992, 1994), larvas de *Sparus aurata* (KOLKOVSKI et al., 1993; KOLKOVSKI & TANDLER, 2000), *Oncorhynchus*

*mykiss* (RODEHUTSCORD & PFEFFER, 1995; VIELMA et al., 1998), *Ictalurus punctatus* (JACKSON et al., 1996), *Morone saxatilis* (HUGHES & SOARES, 1998), juvenis de *Labeo rohita* (GHOSH et al., 2001), *Bidyanus bidyanus* (STONE et al., 2003), *Arapaima gigas* (CAVERO, 2004), tambaqui (NUNES et al., 2006), *Oreochromis niloticus* (OLIVEIRA, 2006) e *Cichla sp.* (SOARES et al., 2008) realizados com a adição de diferentes enzimas exógenas e os resultados obtidos são controversos.

A fitase é a principal enzima exógena estudada para alimentação de peixes e tem como principal finalidade, a ação sobre o ácido fítico (inositolhexafosfato), que é um fator antinutricional, capaz de quelar os minerais, cálcio, magnésio, ferro e o zinco, além de ligar-se a proteínas e aminoácidos (COWIESON et al., 2004). A  $\alpha$ -amilase hidrolisa as ligações glicosídicas  $\alpha$  1-4, liberando oligossacarídeos (LOVELL, 1988). Já as glucanases são específicas para polissacarídeos não amiláceos, que são um grupo complexo composto predominantemente por ligações de monômeros de hexoses e pentoses (STONE, 2003). A adição destas enzimas em dietas para peixes carnívoros pode vir a favorecer a digestão dos nutrientes; no entanto não se conhece as respostas endógenas de produção enzimática com o uso das mesmas.

O surubim cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* = *Pseudoplatystoma fasciatum reticulatum*, EIGENMANN & EIGENMANN, 1989) encontrado nas bacias do Prata e Amazonas (BUITRAGO-SUÁREZ & BURR, 2007) é um peixe preferencialmente piscívoro, e uma das espécies em destaque dentro da criação de surubins. Mas até o momento, não se conhece a capacidade desta espécie em modular a produção de enzimas em função de alterações da dieta.

Conhecer os efeitos da dieta sobre as variáveis que afetam diretamente a digestão pode levar à melhor compreensão dos resultados de desempenho, bem como direcionar as formulações para a capacidade do peixe em digerir e absorver. O objetivo do presente trabalho foi estudar as alterações na produção de enzimas digestivas endógenas causadas pela mudança na composição da dieta e ou pela adição de enzimas exógenas amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase.

## Material e Métodos

### *Manejo dos animais e tratamentos*

Os peixes, *P. reticulatum*, foram mantidos em 32 aquários de fibra de vidro com capacidade de 450 L, e abastecimento contínuo de água de poço artesiano, com temperatura em torno de 26°C, utilizando 12 peixes por aquário. Todo o lote foi separado por quatro classes de peso inicial: 130 a 170 g; 180 a 210 g; 215 a 250 g e 255 a 300 g.

As unidades experimentais foram cobertas com lona plástica preta, sendo descobertas somente para a sua limpeza, que era realizada diariamente. A renovação da água foi contínua, sendo que a temperatura manteve-se em 26±3°C, a alcalinidade em 127,5 ± 7,20 mg.L<sup>-1</sup>, a condutividade de 150 ± 10 µS.cm<sup>-1</sup>, o pH de 6,2 ± 1,0 e oxigênio dissolvido de 6,0 ± 1,0 mg.L<sup>-1</sup> durante o período experimental.

Para a formulação das rações foram realizadas análises da composição bromatológica dos ingredientes utilizados, segundo a AOAC (2000). As análises foram realizadas em duplicatas Centro de Aquicultura, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos.

Dois dietas foram formuladas, usando os mesmos ingredientes (R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal), e mesma composição de nutrientes, as quais foram utilizadas para adição das enzimas. Dois produtos comerciais: uma mistura de alfa-amilase (IUB No. 3.2.1.1; 200 KNU g<sup>-1</sup>) e de endo-β-glucanase (IUB No. 3.2.1.6; 350 FBG g<sup>-1</sup>) provenientes do *Bacillus amyloliquefaciens*; ou a fitase (IUB No. 3.1.3.26; 5.000 UF g<sup>-1</sup>) proveniente do fungo *Peniophora lycii* foram avaliados. As enzimas exógenas foram testadas isoladamente (AG = 150 mg do complexo amilase e endo-β-glucanase kg<sup>-1</sup>; Fi = 2.500 UF kg<sup>-1</sup>) ou em associação (AGF = 100 mg do complexo amilase com endo-β-glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup> de dieta) e comparadas com as dietas sem adição de enzimas.

As oito dietas (Tabela 1) foram processadas em máquina de moer carne com a adição de 40% de água e secas em estufa de ventilação forçada a 40°C, para que se evitasse a perda na atividade das enzimas.

Tabela 1- Fórmulas e composição das dietas experimentais.

Ingrediente (%)	Dietas							
	R30	R30Fi	R30AG	R30AGF	R60	R60Fi	R60AG	R60AGF
Farinha de peixe (60% PB)	14,2	14,2	14,2	14,2	35,9	35,9	35,9	35,9
Farinha de vísceras (60% PB)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Farinha de sangue (84% PB)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Farelo de soja (46% PB)	34,0	34,0	34,0	34,0	12,4	12,4	12,4	12,4
Concentrado proteico de soja (65% PB)	16,5	16,5	16,5	16,5	11,4	11,4	11,4	11,4
Glúten de milho (66% PB)	4,1	4,1	4,1	4,1	1,8	1,8	1,8	1,8
Amido de milho	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Farelo de trigo	3,8	3,8	3,8	3,8	15,7	15,7	15,7	15,7
Quirela de arroz	2,9	2,9	2,9	2,9	4,0	4,0	4,0	4,0
Óleo degomado de soja	2,0	2,0	2,0	2,0	-	-	-	-
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Caulim	5,45	5,40	5,435	5,43	1,75	1,70	1,635	1,62
Vitamina C	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Fitase	-	0,05	-	0,03	-	0,05	-	0,03
Amilase+endo-β-glucanase	-	-	0,015	0,01	-	-	0,015	0,01
Composição calculada <sup>2</sup> :								
Matéria seca (%)	93,53	93,53	93,53	93,53	93,28	93,28	93,28	93,28
Proteína bruta (%)	42,58	42,58	42,58	42,58	42,76	42,76	42,76	42,76
Extrato etéreo (%)	5,11	5,11	5,11	5,11	5,13	5,13	5,13	5,13
ENN (%)	35,39	35,39	35,39	35,39	32,10	32,10	32,10	32,10
Fibra bruta (%)	3,40	3,40	3,40	3,40	2,73	2,73	2,73	2,73
Matéria mineral (%)	7,08	7,08	7,08	7,08	10,56	10,56	10,56	10,56
Cálcio (%)	0,69	0,69	0,69	0,69	1,29	1,29	1,29	1,29
Fósforo (%)	0,88	0,88	0,88	0,88	1,47	1,47	1,47	1,47
Energia bruta (kcal kg <sup>-1</sup> )	4025	4025	4025	4025	3993	3993	3993	3993

R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal; AG: 150 mg do complexo amilase e endo-β-glucanase kg<sup>-1</sup>; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo-β-glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup>; Fi: 2.500 UF kg<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup> Cada 1% fornece: ácido fólico (2,00 mg); ácido pantotênico (40,00 mg) antioxidante (250,00 mg); colina (300,00 mg); cobre (20,00 mg); ferro (200,00 mg); iodo (10,00 mg); manganês (140,00 mg); selênio (0,30 mg); vit A (6.000,00 U I kg<sup>-1</sup>); Vit B (32,00 mg); Vit B12 (40,00 mg); Vit B2 (16,00 mg); Vit B6 (6,00 mg); Vit C (400,00 mg); Vit D3 (6000,00 U I kg<sup>-1</sup>); Vit E (100,00 UI kg<sup>-1</sup>); Vit K (12,00 mg); zinco (300,00 mg); niacina (200,00 mg); biotina (0,20 mg);

<sup>2</sup>Composição calculada a partir da análise de ingredientes dos alimentos.

Os animais foram alimentados até aparente saciedade com as diferentes dietas por 70 dias, três vezes ao dia, sendo a principal alimentação no período noturno.

*Atividade das enzimas digestivas endógenas.*

Oito peixes de cada tratamento foram anestesiados (n=64), por imersão em água com gelo e o pâncreas e o estômago foram retirados, embalados em lâmina de alumínio, congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -78°C. Todas as análises foram realizadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, no Laboratório de Laboratório de Enzimologia Aplicada do Departamento de Tecnologia.

Os tecidos do pâncreas e estômago foram homogeneizados individualmente, em um homogeneizador marca OMNI modelo GLH 500, por três pulsos de trinta segundos. Para a homogeneização do pâncreas utilizou-se tampão Tris.HCl 500 mM, pH 8,0 contendo CaCl<sub>2</sub> 50 mM, numa proporção de 1:10 (peso:volume), dividido em duas porções. Na porção destinada à análise de lipase, adicionou-se 50% de glicerol e 1,5 mM de ditiotrietol. Na homogeneização do estômago, o tampão Tris.HCl foi substituído por água destilada gelada. Os extratos brutos foram centrifugados a 7000 G (10000 rpm) por 10 minutos, sob refrigeração a 4°C, depois filtrados em lã de vidro, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -78°C, até as determinações.

Em cada determinação foram incluídos controles sem adição de enzima, para se estimar a hidrólise espontânea do substrato. As determinações foram feitas em triplicata, sendo que as velocidades iniciais permaneceram constantes durante a reação, com menos de 5% do substrato sendo hidrolisado.

✓ Pepsina

A atividade de pepsina nas amostras de estômago foi determinada de acordo com a metodologia proposta por ANSON (1938), descrito no WORTHINGTON ENZYME MANUAL (1972). O extrato enzimático foi acidificado com HCl 0,3 N (10:1 v:v). A reação foi iniciada pela adição de hemoglobina bovina 2,5% em HCl 60 mM, no meio de reação

a 25 °C. Após 10 minutos, foram adicionados 5,0 mL de ácido tricloroacético para interromper a reação, que foi deixada em banho por mais cinco minutos para a precipitação da proteína. Após filtragem em papel Watman 42, foi realizada a leitura da absorbância em 280 nm (UV), utilizando-se cubeta de quartzo. Uma unidade (U) de enzima foi definida como sendo 1 nmol de tirosina liberada por minuto por % de peso vivo, nas condições do teste.

#### ✓ Lípase

A atividade da lipase foi determinada continuamente a 37°C, em meio de reação contendo concentrações finais de p-nitrofenilpalmitato 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 150 mM, taurodeoxicolato de sódio 1,98 mM, Triton X 100 1,27 mg, goma arábica 0,63 mg e excesso de colipase de cachara, obtida segundo BROCKMAN (1981), em um volume final de 1,5 mL.

A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação. A liberação do produto foi determinada continuamente através da formação do íon p-nitrofenolato (coeficiente de absorção =  $1,32 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), em 410 nm, durante 120 segundos, em um espectrofotômetro Hitachi U-200, equipado com célula termostatizável com variação de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Um branco para cada amostra foi analisado simultaneamente pela adição do extrato, nas mesmas condições, só que sem a presença do substrato, para eliminar o efeito do surgimento de outros compostos cuja absorbância se dá no mesmo comprimento de onda. Uma unidade de atividade enzimática de lipase foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de p-nitrofenolato por % de peso vivo.

#### ✓ Tripsina

A atividade de tripsina foi determinada segundo KAKADE et al. (1974). A ativação do tripsinogênio foi efetuada em tampão Tris.HCl 50mM contendo CaCl<sub>2</sub> 50mM, pH 8,2. Em cada dosagem, o extrato diluído de cada um dos segmentos foi incubado com 4,5 unidades de enteroquinase suína (SIGMA). Após 30 minutos de incubação à 25°C, uma alíquota de 0,4 mL do meio de reação obtido foi utilizada para a

determinação da atividade de tripsina. A reação sempre foi iniciada pela adição de 1 mL do substrato N-alfa-benzoil-DL-arginina-para-nitroanilida (BAPNA) ao meio de reação. Após cinco minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de ácido acético 30% (v/v). A absorbância foi determinada a 410 nm. Uma unidade (U) de enzima foi definida como sendo 1 nmol de p-nitroanilida liberada por % de peso vivo.

✓ Quimotripsina

A atividade de quimotripsina foi determinada segundo ERLANGER et al. (1966), a 25°C. A ativação do quimotripsinogênio foi efetuada como descrito para o tripsinogênio, em tampão Tris.HCl 0,2M contendo  $\text{CaCl}_2$  0.05M, pH 7,6. A reação foi iniciada pela adição de 1 mL do substrato glutaril-L-fenilalanina-4-nitroanilida (GAPNA), ao meio de reação. Após 45 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido acético 30% (v/v). Uma unidade (U) de enzima foi definida como sendo 1 nmol de p-nitroanilida liberada por minuto por % de peso vivo.

✓ Amilase

A atividade de  $\alpha$ -amilase foi determinada segundo BERNFELD (1955). As condições dos ensaios foram: tampão fosfato 20 mM, pH 6,9, contendo NaCl 7 mM e amido solúvel 1%, em um volume de final de 1 mL. Após cinco minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Após homogeneização, as amostras foram colocadas em banho-maria em ebulição, por cinco minutos, resfriadas e diluídas com 10 mL de água destilada. Após agitação, a absorbância foi determinada a 530 nm. Uma unidade de atividade enzimática de amilase pancreática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de maltose por % de peso vivo.

*Análise estatística*

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados com oito tratamentos em esquema fatorial 2x4, correspondendo a duas proporções de proteína de origem animal

na dieta e a quatro quantidades de enzimas, utilizando quatro blocos para peso. Os dados foram submetidos à análise de variância, após teste de normalidade, Cramer-Von Mises de acordo com EVERITT (1998), e utilizou-se o teste de Tukey para comparação das médias ( $P < 0,05$ ).

## **Resultados e Discussão**

Os resultados médios das atividades das enzimas digestivas estudadas e a análise de variância encontram-se na Tabela 2. Observou-se que o tipo de dieta influenciou significativamente a produção de tripsina, quimotripsina, pepsina e lipase, enquanto que o uso de enzimas alterou significativamente a produção endógena de amilase e tripsina.

O uso da dieta R60 provocou um aumento da produção média de tripsina, quimotripsina e lipase, enquanto a atividade da pepsina diminuiu com a dieta R60. A adição de AG ou AGF parece não ter tido efeito sobre a produção de amilase endógena. No entanto, a adição de Fi provocou uma maior produção de amilase endógena, quando comparado com os animais que consumiram dietas com ausência de enzimas (Tabela 2).

A adição de AG ou Fi acarretou no aumento da produção de tripsina, quando comparado com os animais que não consumiram enzimas, enquanto que o uso de AGF não diferiu significativamente dos demais tratamentos para esta variável.

Na tentativa de se adequarem às mudanças da dieta, os peixes apresentam habilidade de adaptação dos seus processos digestivos, tais como perfil e secreção enzimáticos, absorção e transporte de nutrientes (KAPOOR et al., 1975; HOFER, 1979a,b; BUDDINGTON et al., 1987, 1997), embora estas habilidades variem entre as espécies. Os carnívoros parecem ter uma capacidade limitada em alterar sua função digestiva e de transporte de nutrientes de acordo com a composição da dieta, enquanto os onívoros exibem uma habilidade muito maior (BUDDINGTON et al., 1987,1997).

Tabela 2 – Produção de enzimas digestivas endógenas (unidade por % de peso vivo) de juvenis de cachara alimentados com diferentes teores de proteína de origem animal e com a adição de enzimas exógenas.

Médias para:	Amilase	Tripsina	Quimotripsina	Pepsina	Lipase
Dieta com 30% de proteína de origem animal (R30)	18998,00	5966,77 B	30,75 B	340,54 A	142,07 B
Dieta com 60% de proteína de origem animal (R60)	21878,52	8620,68 A	52,71 A	271,59 B	224,00 A
150 mg. kg <sup>-1</sup> de amilase e endo-β-glucanase (AG)	23922,11 AB	8518,94 A	50,43	310,74	212,26
100 mg kg <sup>-1</sup> de amilase com endo-β-glucanase + 1.500 UF kg <sup>-1</sup> (AGF)	17981,80 AB	6577,71 AB	42,89	259,91	158,25
2.500 UF kg <sup>-1</sup> (Fi)	24671,42 A	8596,23 A	39,93	333,87	203,46
Sem enzima	15177,71 B	5482,61 B	33,65	319,75	158,00
Valores de F (Prob.) para:					
Bloco (BL)	4,94**	1,75 <sup>ns</sup>	2,49 <sup>ns</sup>	0,33 <sup>ns</sup>	0,58 <sup>ns</sup>
Tipo de dieta (R)	1,21 <sup>ns</sup>	8,57**	9,84 **	5,92 *	5,26*
Enzimas (Ez)	3,10*	2,83*	1,03 <sup>ns</sup>	1,24 <sup>ns</sup>	0,66 <sup>ns</sup>
R x Ez	0,82 <sup>ns</sup>	1,58 <sup>ns</sup>	0,85 <sup>ns</sup>	1,86 <sup>ns</sup>	1,65 <sup>ns</sup>
CV (%)	45,62	45,45	60,36	34,14	70,46

ns=não significativo (P>0,05)

\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (P<0,05)

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey (P<0,01).

O cachara, mesmo sendo um peixe carnívoro, apresentou a capacidade de modular a produção das enzimas pancreáticas e da pepsina. Estes resultados diferem dos encontrados por LUNDSTEDT et al. (2004) para pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), que observaram as enzimas digestivas mostrando-se constitutivas, uma vez que não ocorreu alterações na atividade das mesmas, em partes distintas do intestino com os diferentes teores de proteína. É importante salientar que no estudo de LUNDSTEDT et al. (2004) com pintado, foi realizado utilizando-se o estômago e lúmen intestinal e não o tecido alvo produtor de enzimas. Além disso, não havia um tratamento sem adição de proteína para que comprovasse que mesmo sem a presença deste nutriente a enzima continuaria a ser expressa.

Peixes carnívoros são conhecidos por não serem tão hábeis em aproveitar carboidratos como os onívoros e herbívoros (DABROWSKI & GUDERLEY, 2002; KROGDHAL et al., 2005). O aumento na produção de amilase pode ocorrer em resposta à presença de carboidratos ou de produtos de sua hidrólise no lúmen do trato gastrintestinal. A glicose pode influenciar diretamente a produção da amilase pelo tecido pancreático, ou indiretamente, estimulando a liberação de insulina pelo pâncreas que atuará estimulando a produção de amilase (JOBILING, 1994).

O efeito do tipo de dieta sobre a produção de amilase não foi observado, provavelmente pelas duas rações apresentarem uma composição muito semelhante nos teores de carboidratos. O uso de AGF nas dietas não foi suficiente para inibir a produção endógena de amilase; pelo contrário, apresentou tendência de aumento. LI et al. (2009) observaram aumento na produção endógena de amilase no intestino de tilápias alimentadas com dietas contendo enzima para carboidratos não amiláceos e ou fitase, quando comparados com peixes alimentados com dieta sem a adição das mesmas.

Neste estudo, observou-se que a adição de Fi estimulou um aumento da síntese de amilase endógena, quando comparado com o tratamento isento de enzimas, o que pode ocasionar um melhor aproveitamento do amido como fonte energética. MAENZ (2001) sugeriu que o uso de fitase melhora a ação das carboidratases, provavelmente

pela liberação de íons que são co-fatores destas enzimas. Além disso, foi verificado que o ácido fítico diminui a ação da  $\alpha$ -amilase in vitro, sugerindo que a fitase adicionada destrói o seu efeito antinutricional (CAWLEY & MITCHELL, 1968; SHARMA et al., 1978).

PHILLIPS (1969) afirmou que em peixes, tanto o estômago quanto a mucosa intestinal, o pâncreas e os cecos pilóricos são fontes de enzimas proteolíticas. A secreção dessas enzimas é mediada por estímulos neurais e hormonais, que geralmente provocam um aumento da secreção enzimática para a luz do tubo digestório. Entretanto, outros fatores de natureza química, distinta dos sinalizadores endógenos, podem estar relacionados ao estímulo de produção e ou secreção das enzimas digestivas.

Neste estudo, a alteração da quantidade de proteína de origem animal causou uma alteração na produção de pepsina, que pode ser uma característica intrínseca a esta espécie de peixe, uma vez que a atividade da pepsina é pouco alterada pelo teor da proteína da dieta, de acordo com ZAMBONINO INFANTE & CAHU, (2007). LUNDSTEDT et al. (2004) não observaram alterações na produção de proteases totais no estômago de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) alimentados com diferentes teores de proteína bruta. Para o cachara, a adição das enzimas não foi suficiente para promover alterações significativas na produção de pepsina. No entanto, um aumento da atividade de proteases totais foi observado por LI et al. (2009), no estômago de juvenis de tilápias alimentadas com dietas contendo fitase e ou enzimas para carboidratos não amiláceos, quando comparados com peixes alimentados com dieta sem a adição das mesmas.

Alterações da produção de tripsina nas larvas dos peixes são controladas pelo nível de colecistocinina (CCK) (KUROKAWA et al., 2000), que por sua vez é regulado indiretamente e positivamente pelo nível dietético da proteína e pelo comprimento da cadeia (CAHU et al., 2004). Assim, as maiores produções de tripsina e quimotripsina nos juvenis de cachara que consumiram R60 podem estar relacionadas com o reconhecimento dos substratos pelas enzimas e com a composição das dietas que estimularam a transcrição das mesmas.

A adição das enzimas exógenas, principalmente de 2.500 UF, causou um aumento na produção de tripsina. Isto deve estar relacionado com a liberação das proteínas ligadas ao fitato, ou aumento ao reconhecimento das proteínas íntegras no intestino, com conseqüente aumento da liberação de CCK, estimulando assim a síntese do tripsinogênio.

Outra possibilidade que não pode ser descartada seria a diminuição da viscosidade da dieta. SINGH & KRIKORIAN (1982) observaram que a atividade da tripsina in vitro diminuiu em até 46% com a presença de fitato. Por outro lado, SAJJADI & CARTER (2004) não observaram o efeito da adição de fitase e de fitato sobre a atividade da tripsina em um estudo com salmão (*Salmo salar* L.). Estes autores afirmaram que a concentração de 1% de fitato utilizada pode não ter sido suficiente e usam a citação de SELLE et al. (2000) de que apesar do fitato inibir a ação das enzimas digestivas, o assunto ainda não foi devidamente solucionado. No estudo com tilápias, NWANNA (2007) observou aumento nas atividades de amilase, proteases e lipase no intestino de juvenis alimentados com diferentes níveis de fitase, quando comparados com outros que receberam uma dieta sem a adição desta enzima.

Em larvas, a atividade de lipase raramente se altera em função da mudança da proteína na dieta, mas sim, em função do teor de lipídeos e de fosfolipídeos da dieta (ZAMBONINO INFANTE & CAHU, 2007). Apesar da semelhança entre os teores de extrato etéreo das duas rações, a dieta R60 provocou um aumento na atividade desta enzima, provavelmente em função da fonte de fosforolipídeos que é a farinha de peixe. FOUNTOULAKI et al. (2005) verificaram que os resultados encontrados indicavam que as atividades das enzimas digestivas foram afetadas pela composição da dieta, principalmente pelos níveis de carboidratos e lipídeos.

Não foi observado efeito significativo para a adição das enzimas sobre a atividade da lipase, talvez em decorrência do alto coeficiente de variação para esta variável (70,46 %), embora tenha ocorrido diferença significativa para o tipo de dieta. Estudos mostraram que a viscosidade pode impedir a difusão e transporte de lipase, de óleos e da bile (SMITS & ANNISON, 1996), além de inibir a diluição de lipase e nutrientes (ANNISON et al. 1996). Neste estudo, a adição das enzimas que diminuem a

viscosidade da dieta, ou de fitase que libera minerais, não alterou a produção endógena da lipase. LI et al. (2007) estudaram a adição dos íons cobre, ferro e zinco em dietas para juvenis de tilápia e comprovaram que estes íons aumentam a produção de lipase e amilase. LI et al. (2009) não observaram alterações na produção de lipase em tilápias alimentadas com dietas contendo fitase ou enzimas para carboidratos não amiláceos, e sugeriram que os minerais liberados pela atuação destas enzimas não foram suficientes para aumentar a atividade das enzimas endógenas. Ainda não se tem uma explicação definitiva para esses comportamentos. Parece razoável admitir que as enzimas exógenas utilizadas não exerceram nenhuma influência na produção de lipase nos peixes.

## **Conclusões**

As dietas com maior teor de proteína de origem animal aumentaram os níveis de enzimas proteolíticas pancreáticas e de lipase. As enzimas exógenas fitase, amilase e endo- $\beta$ -glucanase possuem papel importante na nutrição de peixes carnívoros melhorando o aproveitamento da proteína e dos carboidratos por estimularem a produção das enzimas digestivas endógenas. Os níveis de enzimas digestivas do cachara dependem do tipo de dieta e/ou da adição de enzimas exógenas.

## **Agradecimentos**

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento (Proc. n. 07/00605-9) e bolsa concedida (Proc. n. 06/04146-6); a Piscicultura Piraí pelos peixes doados; ao Frigorífico Mar & Terra pela doação de material biológico; e a DSM pela doação das enzimas.

## Referências Bibliográficas

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th. v. II., 2000.

ANNISON, G.; HUGHES, R. J.; CHOCT, M. Effects of enzyme supplementation on the nutritive value of dehulled lupins. **British Poultry Science**, v. 37, p. 157-172, 1996.

ANSON, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. **Journal of Genetics and Physiology**, v. 22, n. 1, p. 79-89, 1938.

BARUAH, K.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; DEBNATH, D. Dietary Phytase: An ideal approach for a cost effective and low-polluting aquafeed. **NAGA, WorldFish Center Quarterly**, v. 27, n. 3; 4, 2004.

BERNFELD, P. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . In: COLOWIC; S. B.; KAPPLAN, N. O. (Ed.). **Methods in Enzymology**. New York. Academic Press, v. 1, p. 149-153. 1955.

BROCKMAN, H. L. Triglyceride lipase from porcine pancreas. In: BOYER, P. D. (Ed.) **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, v. 71, p.619-627, 1981.

BUDDINGTON, R. K.; CHEN, J. W.; DIAMOND, J. M. Genetic and phenotypic adaptation of the intestinal nutrient transport to iet in fish. **Journal of Physiology**, v. 393, p. 261-281, 1987.

BUDDINGTON, R. K.; KROGDAHAL, Å; BAKKE-MCKELLEP, A. M. The intestine of carnivorous fish; structure and functions and the relations with diet. **Acta Physiological Scandinavica**, v. 161, Supl. 638, p. 67-80, 1997.

BUITRAGO-SUÁREZ, U. A.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 1512, p. 1-38, 2007.

CAHU, C.; RONNESTAD, I.; GRANGIER, V.; ZAMBONINO INFANTE, J. L. Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin, **Aquaculture**, v. 238, p. 295–308, 2004.

CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F.; BUCHANAN, B.; McCARTHY, I. A. Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon *Salmo salar* feed a diet containing supplementary enzyme. **Aquaculture and Fish Management**, v. 25, n. 1, p. 37-46, 1994.

CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F.; McCARTHY, I. A. Feed utilization efficiencies of Atlantic salmon *Salmo salar* L. parr: effect of a single supplementary enzyme. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 2, p. 369-374, 1992.

CAVERO, B. A. S. **Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de Pirarucu**, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829). 2004. 79 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CAWLEY, R. W.; MITCHELL, T. A. Inhibition of wheat alpha-amylase by bran phytic acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 106–108, 1968.

COWIESON, A.J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M.R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 45, n. 1, p. 101-108, 2004.

DABROWSKI, K.; GUDERLEY, H. Intermediary metabolism. In: HALVER, J. E.; HARDY, R.W. **Fish Nutrition**. Elsevier Science, Academic Press, 3rd ed. p. 309-365, 2002.

DABROWSKA, H.; GRUDNIEWSKI, C.; DABROWSKI, K. Artificial diet for common carp: effect of the addition of enzymes extracts. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 41, p. 196-200, 1979.

EIGENMANN, C.H.; EIGENMANN, R.S. Preliminary notes on South American Nematognathi II. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 2, p. 28–56, 1889.

ERLANGER, B. F.; EDEL, F.; COOPER, A. G. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 115, p. 206–210, 1966.

EVERITT, B. S. **The Cambridge Dictionary of Statistics**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998, 360p.

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

FOUNTOULAKI, E.; ALEXIS, M. N.; NENGAS, I.; VENOU, B. Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 13, p. 1243–1251, 2005.

GHOSH, K.; CHAKRABORTY, K.; SEN, S. K.; RAY, A. K. Effect of thermostable bacterial  $\alpha$ -amylase on growth and feed utilization in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. **Israeli Journal of Aquaculture/Bamidgeh**, v. 53, p. 101–109, 2001.

HARDY, R.W. **Fish Nutrition**. Elsevier Science, Academic Press, 3rd ed. p. 309–365, 2002.

HOFER, R. The adaptation of the digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus*, and rudd, *Scardinius erythrophthalmus* L. 1. Amylase. **Journal of Fish Biology**, v.14, p.565–572, 1979a.

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

HUGHES, K. P.; SOARES, J. H. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v.4, p.133-140, 1998.

JACKSON, L. S.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization phytate phosphorus. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 27, n. 3, p. 309-313, 1996.

JOBLING, M. **Fish Bioenergetics**. London: Chapman; Hall, 309 pp., 1994.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 357-352, 1974.

KAPOOR, B. G.; SMITH, H.; VERIGHINA, I. A. The alimentary canal and digestion in teleosts. **Advances in Marine Biology**, v. 13 p. 109-139, 1975.

KAWAI, S.; IKEDA, S. Studies on digestive enzymes of fishes-II. Effect of Dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 38, p. 265-270, 1972.

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, p. 11-15, 2000.

KOLKOVSKI, S.; TANDLER, A.; KISSIL, W.M.; GERTLER, A. The effects of exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry** v.12, p.203-209, 1993.

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

KUROKAWA, T.; SUZUKI, T.; ANDOH, T. Development of cholecystinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **General and Comparative Endocrinology**, 120, p. 8–16, 2000.

LI, J. S.; LI, J. L.; WU, T. T. Effects of non-starch polysaccharides enzyme, phytase and citric acid on activities of endogenous digestive enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*). **Aquaculture Nutrition**, v.15, p. 415-420, 2009.

LI, J. S., LI, J. L.; WU, T. T. The effects of copper, iron and zinc on digestive enzyme activity in the hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) *Oreochromis aureus* (Steindachner). **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 1788–1798, 2007.

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Chapman e Hall, 288 p., 1988.

LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma coruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137B, p. 331-339, 2004.

MAENZ, D. D. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds. p. 61–84 in: **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. M. R. Bedford and G. G. Partridge, ed. CABI Publishing, New York, NY, 2001.

NUNES, E. S. S.; CAVERO, B. A.; PEREIRA FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, 2006.

NWANNA, L. C. Effect of dietary phytase on growth, enzyme activities and phosphorus load of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Engineering and Applied Sciences**. v. 2, n. 6, p.972-975, 2007.

OLIVEIRA, G. R. **Digestibilidade de nutrientes em dieta com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 90 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

PHILLIPS, A. M. Jr. Nutrition, digestion and energy utilization. In: HOAR, W. S. e RANDALL, D. J. (eds). **Fish Physiology**. Vol. I. Excretion, Ion Regulation, and Metabolism. p. 391-432, 1969.

REFSTIE, S. Soybean in Aquafeeds. In: **Proceedings of the Fourth Workshop for Harvesting the benefits of grain in Aquaculture feeds**, v. 13, p. 32-41, 2007.

RODEHUTSCORD, M.; PFEFFER, E. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Water Science Technology**, v. 31, n. 10, p.143-147, 1995.

SAJJADI, M.; CARTER, C. G. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). **Aquaculture Nutrition** v. 10, p. 135-142, 2004.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V.; CALDWELL, R. A.; BRYDEN, W. L. Phytate and phytase: Consequences for protein utilisation. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 255–278, 2000.

SHARMA, C. B.; GOEL, M.; IRSHAD M. Myoinositol hexaphosphate as a potential inhibitor of  $\alpha$ -amylases. **Phytochemistry** v. 17, p. 201–204, 1978.

SINGH, M.; KRIKORIAN, A. D. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, p. 799-800, 1982.

SMITS, C. H. M.; ANNISON G. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition - towards a physiologically valid approach to their determination (Review). **World's Poultry Science Journal**, v. 52, p. 203-221, 1996.

SOARES, E. C.; PEREIRA FILHO, M.; ROUBACH, R.; SILVA, R. C. S. E. Protease exógena em dietas para juvenis de tucunaré-paca (*Cichla* sp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, pp. 971-976, 2008.

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

STONE, D. A. J. Dietary carbohydrate utilization by fish. **Reviews in fisheries Science**, v.11, n. 4, p. 337-369, 2003.

STONE, D. A. J; ALIAN, D.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). IV. Can dietary enzymes increase digestible energy from wheat starch, wheat and dehulled lupin? **Aquaculture Research**. v.34, p.135-147, 2003.

TAKII, K.; SHIMENO, S.; TAKEDA, M. Changes in digestive enzyme activities in eel after feeding. **Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Science**, v. 51, p. 2027-2031, 1985.

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

VIELMA, J.; LALL, S. P.; KOSKELA, J.; SCHÖNER F.; MATTILA, P. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.63, n.3/4, p. 309-323, 1998.

**WORTHINGTON ENZYME MANUAL**. Worthington Biochemical Corp., Freehold, N. J. 100-101, 1972.

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

**CAPÍTULO 5 – HISTOLOGIA DO TRATO DIGESTÓRIO DE JUVENIS DE CACHARA (*Pseudoplatystoma reticulatum*) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO ENZIMAS EXÓGENAS E DIFERENTES PROPORÇÕES DE PROTEÍNA DE ORIGEM ANIMAL.**

**Resumo** - O objetivo do trabalho foi estudar as alterações histológicas no trato digestório e em glândulas anexas, causadas pela mudança na proporção de proteína de origem animal da dieta e ou pela adição de enzimas exógenas: amilase com endo- $\beta$ -glucanase e fitase. Os peixes foram alimentados por 70 dias, com duas dietas com distintas formulações, usando os mesmos ingredientes (R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal), mesma composição de nutrientes e quatro quantidades de enzima (sem enzima; 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase  $\text{kg}^{-1}$  (AG); 2.500 UF  $\text{kg}^{-1}$  (Fi); 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF  $\text{kg}^{-1}$  (AGF)), totalizando oito tratamentos. Ao final do período experimental foram coletados o fígado, pâncreas, estômago e intestino de quatro peixes de cada tratamento para avaliação histológica. Observou-se que as alterações observadas no fígado em função das diferentes dietas e da adição de enzimas podem ter tido influência do processamento das amostras. As dietas influenciaram a secreção das mucinas nas regiões cárdica e pilórica, mas a adição das enzimas influenciou a produção de glicoproteínas de modo diferente em cada dieta. A observação das reações EOF e HE não possibilitaram a detecção do efeito das enzimas exógenas avaliadas, nem mesmo da alteração da porcentagem de proteína de origem animal sobre a produção de zimogênio no pâncreas. As enzimas exógenas parecem agir de modo diferente sobre porções distintas do trato digestório e ainda estimulam a produção de mucinas ácidas e neutras de formas diferentes dependendo da dieta.

**Palavras-chave:** fígado, histologia, intestino, pâncreas, peixe carnívoro.

**Abstract** - This work aimed study the histologic alterations in the digestive tract and in the adjacent glandules caused by the change of animal-protein proportion in the diet and or by amylase with endo- $\beta$ -glucanase and phytase exogenous enzymes addition. The fishes were feed by 70 days, using two diets having different formulas, using the same ingredients (R30: diet using 30% of animal-protein and R60: diet using 60% animal-protein) and the same nutrients composition, with four amounts of enzyme (control, without enzyme; 150mg of AG kg<sup>-1</sup> (AG); 2,500 UF kg<sup>-1</sup> (Fi); 100mg of AG kg<sup>-1</sup>; + 1,500 UF kg<sup>-1</sup> (AGF)), totalizing eight treatments. In the end of the experimental period, liver, pancreas, stomach and guts were collected from four fishes in each treatment to the histologic evaluation. It was observed that the alterations observed in the liver can have had influence of the processing of the samples. The diets influenced the mucinous secretions in the cardiac and pyloric regions, but the enzymes addition influenced in a different way in each diet; the EOF and HE reactions observations did not possibility the evaluated exogenous enzymes effect, neither in the animal-protein percentage alteration under the zimogens production in the pancreas. The exogenous enzymes fell like act in a different way under distinct portions of the digestive tract and still stimulate acid and neutral mucinous production in a different way depending the diet.

**Keywords:** carnivorous fish, guts, histology, liver, pancreas.

## Introdução

Os custos cada vez mais altos das matérias primas tradicionais, utilizadas na formulação de rações têm aumentado o interesse no uso de enzimas exógenas em dietas (CAVERO, 2004). Esta utilização é uma alternativa para destruir fatores antinutricionais, aumentar a digestibilidade dos alimentos e o desempenho dos animais. A fitase é a principal enzima estudada em dietas para peixes e tem como principal finalidade a ação sobre o ácido fítico (inositolhexafosfato), que é um fator antinutricional, capaz de quelar os minerais como cálcio, magnésio, ferro e o zinco, além de ligar-se a proteínas e aminoácidos (COWIESON et al., 2004). A  $\alpha$ -amilase hidrolisa as ligações glicosídicas  $\alpha$  1-4, liberando oligossacarídeos (LOVELL, 1988). Já as glucanases são específicas para polissacarídeos não amiláceos, que são um grupo complexo composto predominantemente por ligações de monômeros de hexoses e pentoses (STONE, 2003).

O uso destas enzimas deve promover aumento dos nutrientes disponíveis aos animais, desencadeando processos metabólicos os quais poderão ter reflexo sobre o armazenamento de energia (glicogênio e lipídeos no fígado) e produção de enzimas pelo pâncreas e de mucinas no trato digestivo.

Conhecer os efeitos de alterações nas dietas sobre as variáveis histológicas que afetam diretamente a digestão, tanto pelo uso de ingredientes mais baratos como pelo uso de enzimas exógenas, pode gerar informações que direcionem melhor as formulações e a saúde dos peixes. De forma geral, informações sobre possíveis adaptações histológicas dos peixes às variações nos nutrientes da dieta, que possam realmente ter importância para a alimentação de espécies de interesse à aquicultura ainda são escassas (LUNDSTEDT, 2003).

O cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum* = *Pseudoplatystoma fasciatum reticulatum*, EIGENMANN & EIGENMANN, 1989) é uma das principais espécies produzidas no território brasileiro, destacando-se entre os surubins, por seu maior valor econômico e importância comercial. Segundo QUEIROZ et al. (2002), durante os últimos anos, várias empresas têm investido no cultivo intensivo dessa espécie obtendo

resultados satisfatórios, com otimização dos sistemas produtivos e avanço tecnológico baseado no aumento do conhecimento sobre a biologia desta espécie, o que tem diminuído o esforço pesqueiro e possibilitado a manutenção dos estoques naturais. Por apresentarem o hábito alimentar carnívoro, somente são criados com dietas artificiais contendo altos teores de proteína bruta. No entanto, atualmente existe uma necessidade premente de utilização de dietas eficientes, de baixo custo, que atendam às habilidades digestivas das espécies e, ainda, reduzir o impacto ambiental. Vários estudos têm sido desenvolvidos para melhorar o aproveitamento dos alimentos vegetais e substituição da farinha de peixe por produtos de origem vegetal (REFSTIE, 2007).

O objetivo do presente trabalho foi estudar as alterações no fígado, produção de zimogênio pelo pâncreas e de mucinas no trato digestório causadas pela mudança na proporção de proteína de origem animal e ou pela adição de enzimas exógenas amilase com endo- $\beta$ -glucanase e ou fitase.

## **Material e Métodos**

### *Manejo dos animais e tratamentos*

Os peixes, *P. reticulatum*, foram mantidos em 32 aquários de fibra de vidro com capacidade de 450 L, sendo 12 peixes por aquário, separados em quatro classes de peso iniciais: 130 a 170 g; 180 a 210 g; 215 a 250 g e 255 a 300 g.

As unidades experimentais foram cobertas com lona plástica preta, sendo descobertas somente para a sua limpeza, que era realizada diariamente. A renovação da água foi contínua, sendo que a temperatura foi de  $26 \pm 3^\circ\text{C}$ , a alcalinidade em  $127,5 \pm 7,20 \text{ mg.L}^{-1}$ , a condutividade de  $150 \pm 10 \mu\text{S.cm}^{-1}$ , o pH de  $6,2 \pm 1,0$  e oxigênio dissolvido de  $6,0 \pm 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  durante o período experimental.

A composição bromatológica dos ingredientes utilizados para formulação das rações foi determinada segundo a AOAC (2000), no Centro de Aquicultura da UNESP –

Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos.

Duas dietas foram formuladas, usando os mesmos ingredientes (R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal), e mesma composição de nutrientes, e foram utilizadas para adição das enzimas. Dois produtos comerciais: uma mistura de alfa-amilase (IUB No. 3.2.1.1; 200 KNU g<sup>-1</sup>) e de endo-β-glucanase (IUB No. 3.2.1.6; 350 FBG g<sup>-1</sup>) provenientes do *Bacillus amyloliquefaciens*; e a fitase (IUB No. 3.1.3.26; 5.000 UF g<sup>-1</sup>) proveniente do fungo *Peniophora lycii* foram avaliados. As enzimas exógenas foram testadas isoladamente (AG = 150 mg do complexo amilase e endo-β-glucanase kg<sup>-1</sup>; Fi = 2.500 UF kg<sup>-1</sup>) ou em associação (AGF = 100 mg do complexo amilase com endo-β-glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup> de dieta) e comparadas nas dietas sem adição de enzimas.

As oito dietas (Tabela 1) foram processadas em máquina de moer carne com a adição de 40% de água e secas em estufa de ventilação forçada a 40°C, para que se evitasse a perda na atividade das enzimas.

Os animais foram alimentados até aparente saciedade, com as diferentes dietas por 70 dias, três vezes ao dia (8; 14 e 23 horas), sendo a principal alimentação no período noturno. Ao final deste período, quatro peixes de cada tratamento (n=32) foram imersos em banho com gelo, pesados e abatidos, tomando-se o cuidado de amostrar animais com pesos intermediários dentro do tanque.

### *Análises histológicas*

No final de 70 dias de alimentação, os peixes permaneceram em jejum de 24 horas e foram utilizados para a retirada de amostras do fígado, pâncreas, estômago e intestinos. Para a coleta de amostras, as regiões intestinais foram divididas e denominadas: intestino proximal (IP), intestino médio (IM) e intestino distal ou reto (R), conforme descrito por CAL (2006), para o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*).

Tabela 1 Fórmulas e composição das dietas experimentais.

Ingrediente (%)	Dietas							
	R30	R30Fi	R30AG	R30AGF	R60	R60Fi	R60AG	R60AGF
Farinha de peixe (60% PB)	14,2	14,2	14,2	14,2	35,9	35,9	35,9	35,9
Farinha de vísceras (60% PB)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Farinha de sangue (84% PB)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Farelo de soja (46% PB)	34,0	34,0	34,0	34,0	12,4	12,4	12,4	12,4
Concentrado proteico de soja (65% PB)	16,5	16,5	16,5	16,5	11,4	11,4	11,4	11,4
Glúten de milho (66% PB)	4,1	4,1	4,1	4,1	1,8	1,8	1,8	1,8
Amido de milho	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Farelo de trigo	3,8	3,8	3,8	3,8	15,7	15,7	15,7	15,7
Quirela de arroz	2,9	2,9	2,9	2,9	4,0	4,0	4,0	4,0
Óleo degomado de soja	2,0	2,0	2,0	2,0	-	-	-	-
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Caulim	5,45	5,40	5,435	5,43	1,75	1,70	1,635	1,62
Vitamina C	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Fitase	-	0,05	-	0,03	-	0,05	-	0,03
Amilase+endo-β-glucanase	-	-	0,015	0,01	-	-	0,015	0,01
Composição calculada <sup>2</sup> :								
Matéria seca (%)	93,53	93,53	93,53	93,53	93,28	93,28	93,28	93,28
Proteína bruta (%)	42,58	42,58	42,58	42,58	42,76	42,76	42,76	42,76
Extrato etéreo (%)	5,11	5,11	5,11	5,11	5,13	5,13	5,13	5,13
ENN (%)	35,39	35,39	35,39	35,39	32,10	32,10	32,10	32,10
Fibra bruta (%)	3,40	3,40	3,40	3,40	2,73	2,73	2,73	2,73
Matéria mineral (%)	7,08	7,08	7,08	7,08	10,56	10,56	10,56	10,56
Cálcio (%)	0,69	0,69	0,69	0,69	1,29	1,29	1,29	1,29
Fósforo (%)	0,88	0,88	0,88	0,88	1,47	1,47	1,47	1,47
Energia bruta (kcal kg <sup>-1</sup> )	4025	4025	4025	4025	3993	3993	3993	3993

R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal; AG: 150 mg do complexo amilase e endo-β-glucanase kg<sup>-1</sup>; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo-β-glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup>; Fi: 2.500 UF kg<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup> Cada 1% fornece: ácido fólico (2,00 mg); ácido pantotênico (40,00 mg) antioxidante (250,00 mg); colina (300,00 mg); cobre (20,00 mg); ferro (200,00 mg); iodo (10,00 mg); manganês (140,00 mg); selênio (0,30 mg); vit A (6.000,00 U I kg<sup>-1</sup>); Vit B (32,00 mg); Vit B12 (40,00 mg); Vit B2 (16,00 mg); Vit B6 (6,00 mg); Vit C (400,00 mg); Vit D3 (6000,00 U I kg<sup>-1</sup>); Vit E (100,00 UI kg<sup>-1</sup>); Vit K (12,00 mg); zinco (300,00 mg); niacina (200,00 mg); biotina (0,20 mg);

<sup>2</sup>Composição calculada a partir da análise de ingredientes dos alimentos.

As amostras foram fixadas em solução de Bouin por 24 horas. Após a fixação, procedeu-se à lavagem em álcool 70% para a retirada do fixador, desidratação em série alcoólica crescente (70 a 100%), diafanização em xilol e inclusão em parafina

plástica (Histosec, Merck®). Cortes de cada amostra de cada peixe foram obtidos em micrótomo automático (Leica-RM2155, Germany) com cinco µm de espessura. A seguir, foram realizadas as colorações: hematoxilina-eosina (HE) em todos os órgãos; reação em Ácido Periódico de Schiff (PAS) no estômago, fígado e intestino; reação em Alcian Blue pH 2,5 (AB) e reação PAS mais AB no intestino e EOF (eosina-orange-fucsina) no pâncreas, conforme descrito por BANCROFT & GAMBLE (2002). Os cortes histológicos foram analisados e fotomicrografados em fotomicroscópio Leica-DM35. As análises foram realizadas no Setor de Técnicas Morfológicas (STM) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Unesp-Jaboticabal e no Laboratório de Histopatologia do Instituto Butantã em São Paulo.

## **Resultados e Discussão**

### *Pâncreas*

Entre o fígado e o estômago podem ser visualizadas a vesícula biliar e uma massa irregular esbranquiçada, considerado o pâncreas compacto do cachara. SOUZA et al. (2001) também relataram a existência de um pâncreas compacto no *Pseudoplatystoma coruscans*. Essa estrutura foi confirmada pelas observações histológicas, que revelaram as células pancreáticas e um grande número de grânulos de zimogênio. Tal quantidade de grânulos de zimogênio foi responsável pelas altas atividades das enzimas descritas no Capítulo 4 (Tabela 2).

O pâncreas de cachara (Figura 1) é composto por uma cápsula de tecido conjuntivo denso que emite septos para o interior do órgão formando uma espécie de trabéculas, com a presença de pequenos vasos sanguíneos. Também foi observada a presença de conduto pancreático revestido por um epitélio colunar simples com núcleo na base da célula. Nestas trabéculas se organizam os ácinos do pâncreas endócrino e exócrino. As células que compõem o exócrino são acidófilas com núcleo basófilo. O endócrino é composto por células com citoplasma claro e núcleo central levemente

basófilo. As observações confirmam as descritas por FLORES QUINTANA & PORTELLA (2003) para esta espécie.

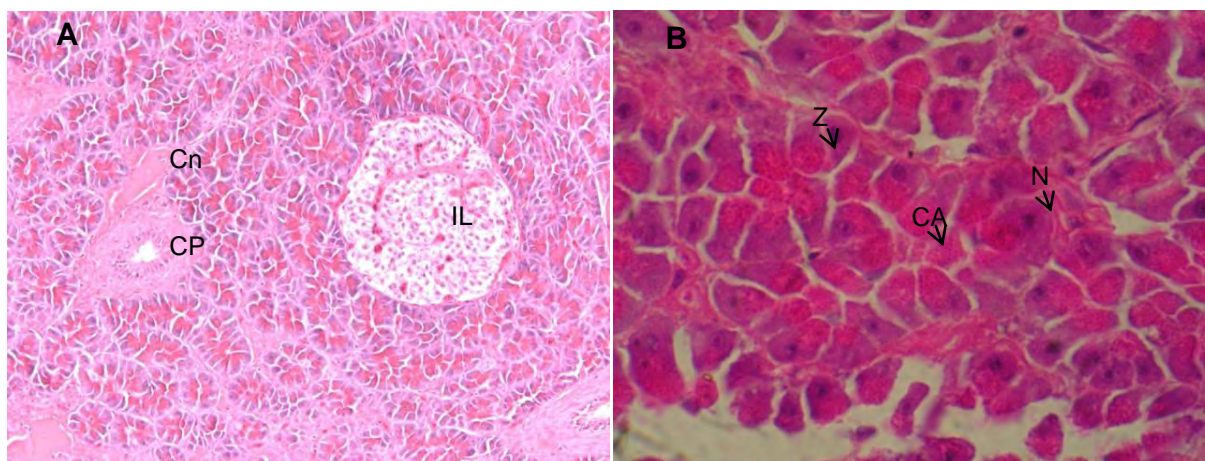


Figura 1. Pâncreas compacto de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*). **A:** HE, 200x; **B:** EOF, 1000 x. Observar ilhotas de Langerhans (IL) que compõem o pâncreas endócrino; grânulos de zimogênio em vermelho (Z); núcleo basófilo (N); células centro acinosas (CA); conducto pancreático (CP); Canalículo (Cn).

Vários autores descrevem que o uso de produtos de origens vegetais, como a soja, provoca um aumento da atividade secretora do pâncreas (RACKIS, 1974; GRANT et al., 2000; KROGDAHL et al., 2003), aumentando o volume das células (RUNSEY, 1978; CARRATORE et al., 1997) e a diminuição dos grânulos de zimogênios (BOONYARATPALIN et al., 1998). Apesar das alterações encontradas na produção endógena de enzimas pancreáticas (Capítulo 4), as técnicas de HE e EOF não possibilitaram detectar o efeito das enzimas exógenas avaliadas nem mesmo da alteração de porcentagem de proteína de origem animal, sobre a morfologia do pâncreas exógeno e produção de zimogênio.

### *Fígado*

A avaliação macroscópica do fígado, localizado sobre a região cefálica do estômago, não demonstrou diferenças entre os diferentes tratamentos.

Histologicamente, o fígado do cachara apresenta grande número de capilares sinusóides. Os hepatócitos estão organizados ao longo dos capilares sinusóides, a partir das ramificações dos vasos centrais, dispostos como trabéculas, observando-se a ocorrência de grupos de seis a oito células. Foi possível observar a presença de tecido pancreático entremeado ao tecido hepático, principalmente próximo a veia central.

Os peixes que consumiram a dieta R60 apresentaram hepatócitos levemente arredondados com citoplasma claro e núcleo central, sem uma organização cordonal bem definida (Figura 2A). Por outro lado a adição de AG à dieta R60 acarretou o aparecimento de regiões com organização cordonal e acúmulo de pigmento em tom amarelo dentro dos hepatócitos e pequenas regiões com intensa formação deste material (Figura 2B), sendo provavelmente bile (HIBIYA, 1982). Nos peixes que receberam o tratamento R60Fi observou-se congestão nos capilares e menores quantidades de pigmento produzido (Figura 2C), quando comparado com peixes que consumiram R60AG. Com a adição de AGF à dieta R60, foram observados poucos vacúolos, e a organização do tecido ficou mais bem definida, tanto a disposição dos hepatócitos quanto a dos capilares sinusóides (Figura 2D).

O desarranjo em forma de cordão dos hepatócitos pode ser causado pelo aporte excessivo de proteína na dieta que, segundo GAYÃO (2009), causa efeito deletério pela sobrecarga dos capilares. Não foram encontrados estudos com a adição de enzimas que melhorassem a organização cordonal, que poderia estar relacionada ao melhor balanceamento das dietas.

Segundo KIERSZENBAUM (2008), a bile contribui para a absorção de gorduras no lúmen intestinal e para detoxicação do organismo, o que poderia indicar um melhor aproveitamento da fração lipídica da dieta nos tratamentos R60AG e R60Fi. Essa admissão é suportada pelos dados de composição corporal, observados no Capítulo 3 – Figura 3. No entanto, bile é usualmente invisível em condições fisiológicas normais, sendo seu aparecimento em fígado corado por HE, caracterizado como um sinal de degeneração (HIBIYA, 1982).

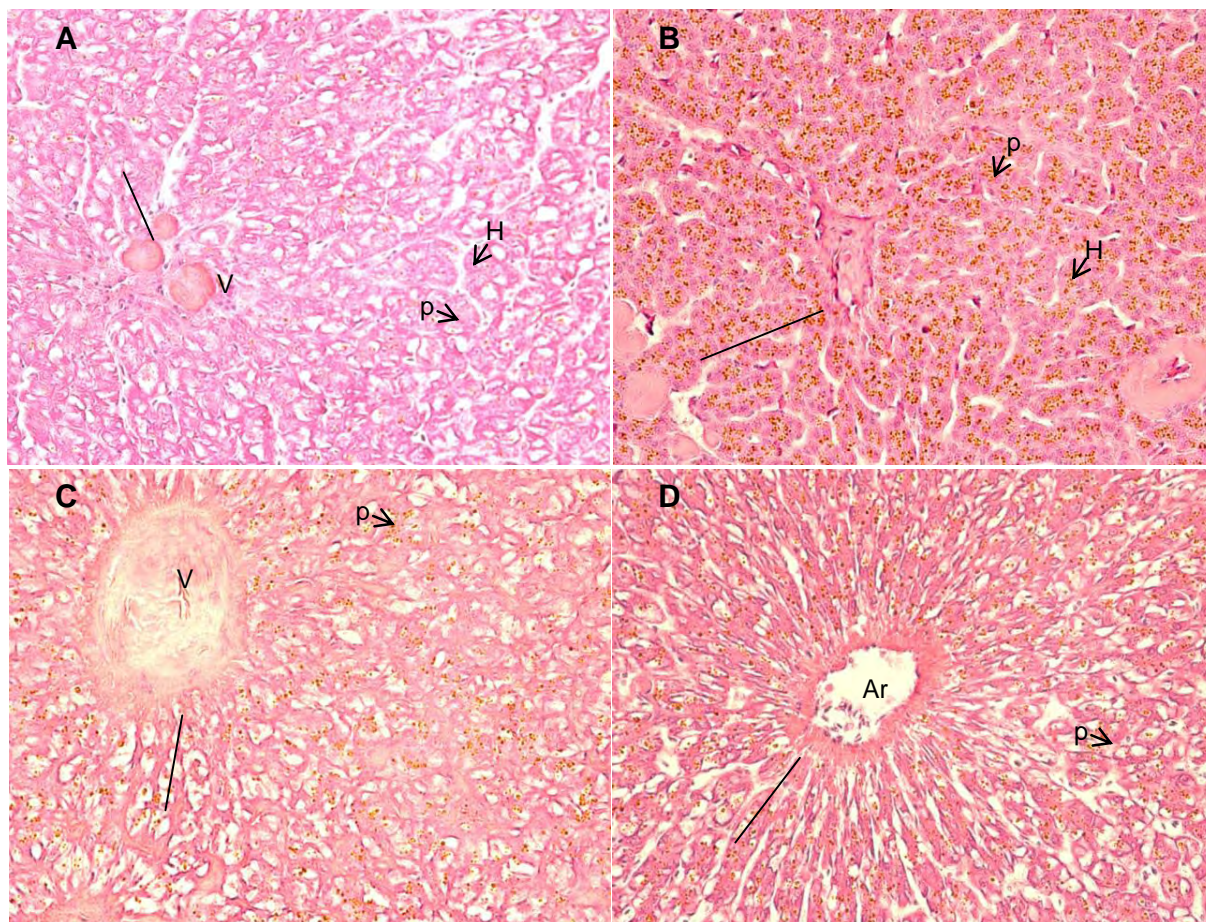


Figura 2 - Fígado de juvenil de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) alimentado com: **A:** R60. **B:** R60AG. **C:** R60Fi. **D:** R60AGF. Observar hepatócitos (H); pigmento (p); organização cordonal (traço); veia (V). HE-400x.

No tratamento R30, ocorreu aumento dos capilares sinusóides e os hepatócitos tornaram-se vacuolizados (Figura 3A) quando comparados com os de peixes que consumiram R60. Nos peixes do tratamento R30AG, ocorreu hipertrofia dos hepatócitos vacuolizados, com deslocamento do núcleo para a periferia, fusão de células (Figura 2B). Para os peixes que consumiram dieta R30Fi, observou-se a presença de vacúolos (Figura 3C), mas em menor intensidade que as encontradas nos animais que consumiram R30 e R30AG, observando-se também a presença de bile parada nos canais sinusóides. Nos peixes que receberam dieta R30AGF, o aumento aparente das células não foi tão expressivo, o núcleo não se deslocou tanto e o tecido

apresentou-se melhor organizado (Figura 3D), quando comparados com os peixes que receberam apenas R30.

A presença de vacuolizações citoplasmáticas indica a existência de regiões com prováveis concentrações de lipídios e glicogênio ou a combinação de ambos (Figura 3). OSTASZEWSA et al. (2005) também observaram maiores estoques de lipídios nos hepatócitos, em seu estudo com o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com dietas à base de soja. CARRATORE et al. (1997), em um estudo com o udo de farinha de soja para tilápia, verificaram um aumento da vacuolização e uma provável aumento na permeabilidade vascular pelo uso de soja. Isto também foi observado neste estudo, com a adição de maiores quantidades farelo de soja e concentrado protéico de soja à dieta R30.

CABALLERO et al. (1999) mostraram que tanto a quantidade como a qualidade de proteína causam alterações no núcleo dos hepatócitos. Modificações estruturais no núcleo são utilizadas como um reflexo de patologia nutricional (MOSCONI-BAC, 1987). Neste estudo tais alterações não foram observadas.

Apesar da ausência de trabalhos mostrando o efeito deletério da fitase sobre o fígado de peixes, MATSUI et al. (2000) e MATOS et al. (2008) mostraram em suínos, que altos níveis de fitase em rações não provocavam um efeito tóxico. Da mesma forma em peixes, o efeito do uso de carboidratases sobre a histologia do fígado também tem sido pouco explorado. A maior vacuolização observada neste estudo com o uso de carboidratase, principalmente com o uso da dieta com baixo teor de proteína de origem animal coincide com KUMAR et al. (2005), os quais também observaram vacuolização moderada em fígado de *Labeo rohita* alimentados com uma dieta experimental contendo amilase ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

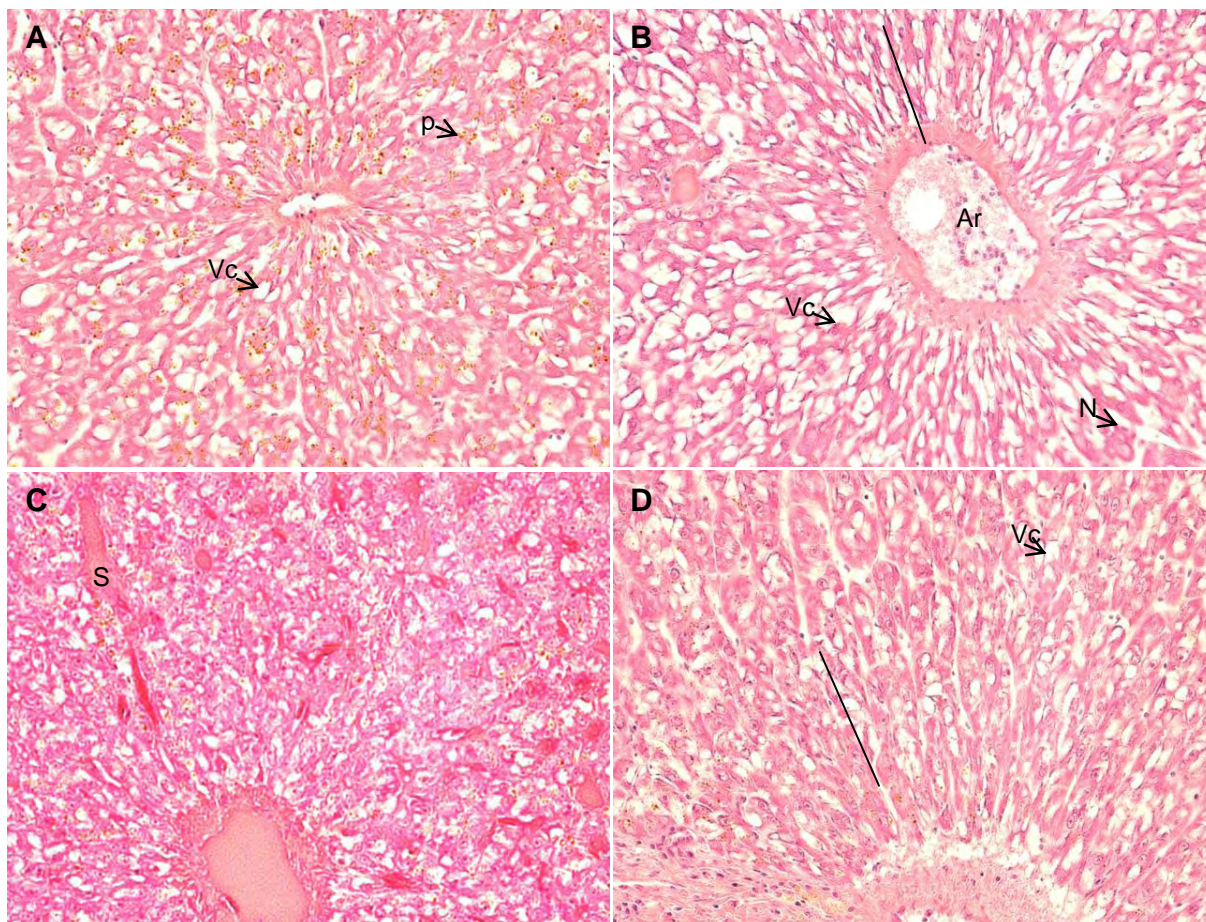


Figura 3 - Fígado de juvenil de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) alimentado com **A:** R30. **B:** R30AG. **C:** R30Fi. **D:** R30AGF. Observar hepatócitos (H); pigmentos (p); organização cordonal (traço); veia (V); canal sinusóide (S); artéria (Ar); vacúolo (Vc); núcleo periférico (N). HE-400x

Alterações morfológicas no fígado podem ser provocadas por substâncias químicas, drogas e até mesmo pela alimentação, que são os principais responsáveis por adaptações, lesões e até de morte celular (HIBIYA, 1982; HONORATO, 2008). Neste estudo, as alterações observadas e descritas podem ter tido influência do processamento das amostras, uma vez que não foram observadas alterações macroscópicas que seriam esperadas com o grau de lesões.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da análise de PAS do fígado dos cacharas alimentados com as dietas dos diferentes tratamentos. Reação positiva foi observada para todos os tratamentos, sendo que o tratamento com maior intensidade de reação foi o R30AGF, sugerindo maior quantidade de grânulos de glicogênio no interior dos hepatócitos. Uma intensidade fraca ocorreu no tratamento R30Fi, e intensidade média ocorreram nos demais tratamentos. Isto demonstra que as enzimas exógenas avaliadas tiveram ação diferente em cada dieta e que isto pode ter refletido sobre a atividade metabólica no fígado. As diferenças observadas podem estar relacionadas à digestibilidade das dietas, ao tempo de trânsito gastrintestinal e conseqüentemente, à disponibilidade de glicose.

Tabela 2 – Histoquímica (PAS) do fígado e estômago de juvenis de cachara com as dietas experimentais.

Tratamento	Fígado	Estômago		
		Cárdia	Fundo	Piloro
R60	++	+++	+++	+++
R60AG	++	+++	+++	+++
R60Fi	+	+++	+++	+++
R60AGF	++	++	++	++
R30	++	++	+++	++
R30AG	++	++	+++	++
R30Fi	++	++	+++	++
R30AGF	+++	+++	+++	+++

Intensidade de reação: (+) fraco; (++) médio; e forte (+++);

R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% teor de proteína de origem animal; AG: 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase kg<sup>-1</sup>; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup>; Fi: 2.500 UF kg<sup>-1</sup>.

Peixes carnívoros são conhecidos pela inabilidade de aproveitar glicose. Altos níveis de carboidratos nas dietas podem aumentar a incidência de doenças e a suscetibilidade a infecções (KUMAR et al., 2005). Altos níveis de carboidratos causam alterações histológicas no fígado (TAN et al., 2007), com danos intracelulares como um excesso de deposição de glicogênio (BAEVERFJORD, 1992) e redução da capacidade de desintoxicação de minerais (DIXON & HILTON, 1981; HILTON & HODSON, 1983;

HITON, 1989). Desta forma, a adição de AG e AGF nas dietas favoreceu a disponibilidade de glicose, mas ocorreu aproveitamento diferente em função da dieta.

De forma geral, pode-se constatar que as alterações histológicas no fígado do cachara mostraram que as dietas com menor proporção de proteína de origem animal não foram benéficas.

### *Estômago*

O estômago do cachara constitui-se em um órgão em forma de J, e pode ser caracterizado por três regiões: cárdica, fúndica e pilórica. Mostrou-se pregueado, apresentando grande elasticidade e distendendo-se muito na presença de alimento. A túnica mucosa consiste em epitélio colunar simples com núcleo basal, lâmina própria e glândulas gástricas oxintopéticas.

Nos peixes que receberam a dieta R60, observou-se na cárdia, grande quantidade de glândulas gástricas e epitélio com células secretoras de muco, (Figura 4A), a submucosa era espessa e a camada muscular também, mas com três camadas de tecido muscular. A região fúndica revelou-se composta por pregas gástricas com a presença de muitas glândulas gástricas, sendo mantidos os padrões da submucosa e da muscular (Figura 4B). Na região do piloro ocorreu diminuição da altura das pregas e ausência das glândulas gástricas. Observações semelhantes foram verificadas para o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) por CAL (2006); para tilápia (*Oncorhynchus mykiss*) por OSTOS-GARRIDO et al. (1993) e para anchova (*Engraulis anchoita*) por DIAZ et al. (2003).

Não foram observadas alterações nas três regiões do estômago dos peixes alimentados com a dieta R60AG. Nos peixes alimentados com R60Fi, não foi encontrado alterações na região quando comparado com os peixes que consumiram dieta R60, mas na região cárdica observou-se a presença de pequenas pregas e na região fúndica as pregas estavam mais baixas e com aumento de glândulas gástricas. As mesmas alterações foram observadas nos peixes que consumiram R60 com AGF.

Observou-se que os peixes alimentados com R30 apresentaram as regiões cárdicas e pilóricas tais como o descrito para os peixes que consumiram R60. Mas, na região fúndica, houve uma diminuição do número de glândulas gástricas e as vilosidades eram aparentemente mais altas, quando comparadas com os animais que consumiram R60Fi e R60AGF.

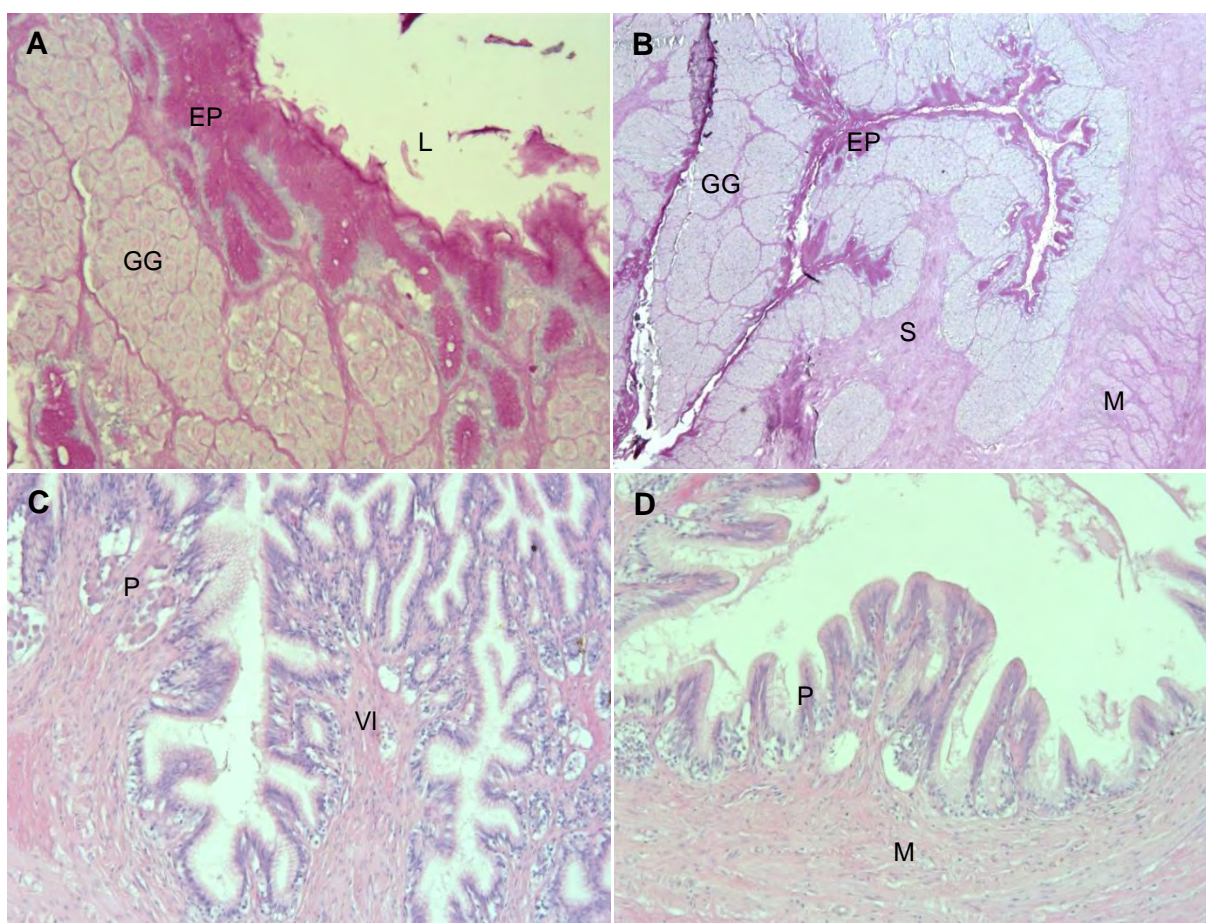


Figura 4 - Estômago de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*). **A:** região cárdica (PAS, 200x); **B:** região fúndica (PAS, 50x); **C:** região pilórica de peixe alimentado com R30AG (HE, 200x); **D:** região pilórica de peixe alimentado com R30 (HE, 200x). Observar: lúmen (L); camada muscular (M); camada submucosa (S); glândulas gástricas (GG), pregas gástricas (P); vilosidades (VI).

O consumo de R30AG provocou alterações na região fúndica, com aparente aumento do tamanho das pregas gástricas, quando comparada com os peixes que ingeriram R30. Observou-se também uma alteração na região do piloro (Figura 4C), com um aumento no número e na altura das pregas, quando comparada com a de peixes que consumiram R60 e R30 (Figura 4D).

A adição de Fi na dieta R30 apresentou, na região cárdica, o mesmo padrão dos peixes alimentados com R60, a região fúndica manteve-se semelhante à dos peixes alimentados com R30, e a região pilórica apresentou-se semelhante a dos animais que consumiram R30AG.

Nos peixes que consumiram R30AGF, a região cárdica apresentou-se tal como descrito para R60, mas a região fúndica apresentou-se com menor número de glândulas gástricas, pouco pregueada, e com pregas aparentemente mais baixas, quando comparada com as dos outros tratamentos. Na região pilórica, as pregas eram mais baixas quando comparadas com os outros tratamentos que incluíram maior teor de proteína de origem vegetal (R30; R30AG e R30Fi).

A Tabela 2 mostra a análise histoquímica das diferentes regiões do estômago de cachara para os diferentes tratamentos. A reação foi positiva para os tratamentos e intensa, com exceção dos tratamentos R60 com AGF (para as três regiões), R30, R30AG e R30Fi para as regiões cárdicas e pilóricas.

Os mucossacarídeos neutros observados pela reação de PAS estão relacionados com proteção da parede do órgão e inibição de microorganismos e ainda, estão envolvidos em digestão enzimática, funções absorptivas e lubrificação do trato digestório (DIAZ et al. 2003). As dietas influenciaram a secreção das mucinas nas regiões cárdica e pilórica, mas a adição das enzimas influenciou, de modo diferente, em cada dieta. Sendo que a adição de AGF diminuiu a produção de muco quando adicionada em R60 e aumento em R30. Não há estudos com peixes que demonstrem os efeitos de enzimas exógenas sobre a produção de mucos no estômago. Segundo SANIOTO (2008), a regulação de secreção mucina pelas células superficiais da mucosa gástrica ainda não está perfeitamente esclarecida, mas parece que o principal

estímulo é vagal colinérgico, desencadeado por irritação da mucosa gástrica pelo alimento, durante o processo digestivo.

Presume-se que a ocorrência das glicoproteínas pode fornecer os cofactores requeridos para a degradação enzimática do alimento. As glicoproteínas neutras secretadas pelo epitélio do estômago foram relacionadas à absorção de substratos facilmente digeríveis, tais como dissacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta (GRAU et al., 1992; EZEASOR & STOKOE, 1980) sugerindo que consumo das dietas, que causaram reações mais intensas, principalmente na região do fundo, poderia apresentar vantagens nutricionais.

### *Intestino*

O intestino de cachara é relativamente curto e retilíneo, característico de espécies carnívoras. Não foi observado nenhum padrão de enrolamento que sugerisse um arranjo-padrão das circunvoluções das alças intestinais, em função dos tratamentos. Não foram observados cecos pilóricos em cachara.

Na análise histológica, o intestino anterior do cachara apresentou-se formado por serosa composta por duas camadas: uma longitudinal externa e outra circular interna. Abaixo da camada muscular, a submucosa era composta por tecido conjuntivo denso. Da submucosa partiam feixes de tecido conjuntivo que dividiam e sustentavam vilosidades ao longo das pregas. A mucosa era composta por epitélio cúbico ciliado formando a região do glicocálix. O epitélio variava de cúbico a cilíndrico.

Estudos realizados por vários pesquisadores (AL-HUSSAINI, 1946, 1947; TYLER, 1973; KAPOOR et al., 1975; MARTIN & BLABER, 1984; ANDERSON, 1986; MURRAY et al., 1994a,b) com teleósteos têm relacionado alterações na morfologia do intestino e na produção de muco por influência da dieta, confirmando nossa suposição de que a dieta influencia tanto o número como o tipo de célula encontrada.

Os resultados obtidos mostram que ocorreram diferenças morfológicas no intestino anterior dos juvenis de cachara entre os tratamentos. Os peixes que consumiram dieta R60 apresentaram, no intestino anterior, muitas vacuolizações, mas

sem a formação de ramificações, as quais surgiram nos peixes alimentados com as dietas R60AG e R60AGF, R30 e R30Fi (Figura 5A). Aumento aparente da altura das vilosidades foi observado em peixes com a dieta R60AG quando comparado com R60. O tratamento R60AGF apresentou intestino anterior mais ramificado e com menor vacuolização do que todos os outros tratamentos. O consumo da dieta R30 provocou uma diminuição aparente da altura das vilosidades e uma menor vacuolização quando comparado com R60. Aumento da vacuolização foi observado no intestino anterior dos animais alimentados com R30AG e R30GF, quando comparado com os peixes que consumiram R60.

Em relação ao intestino médio, observou-se que as camadas serosas e submucosas eram iguais ao descrito para o intestino anterior; contudo, observou-se, de modo geral, uma diminuição das subdivisões das vilosidades e da altura das mesmas, e aumento da vacuolização, quando comparado com o intestino anterior.

No intestino posterior as camadas, serosa e submucosa, seguiram os mesmos padrões descritos para o intestino anterior, mas com aparentes diminuições da vacuolização, na altura das vilosidades e nas subdivisões das mesmas. Não foram observadas diferenças em função da mudança de dieta e de uso de enzimas exógenas nas rações para esta região.

A disposição histológica para o *Pseudoplatystoma reticulatum* foi similar ao *Pseudoplatystoma coruscans* descrito por CAL (2006), e do híbrido *P. reticulatum x P. coruscan* descrito por FLORES QUINTANA et al. (1997).

O conhecimento sobre a função e os valores de diagnóstico para a secreção de glicoconjugados para peixes ainda é limitado. Mucos secretados lubrificam o epitélio e o alimento ingerido, a fim de ajudar a passagem do alimento, proteger o epitélio de possíveis ferimentos, controle osmótico e transporte de diferentes íons (EZEASOR & STOKOE, 1980; ALLEN, 1981; MARTIN & BLABER, 1984; ANDERSON, 1986; CHAKRABARTI & SINHA, 1987; PARK & KIM, 2001; PODKOWA & GONIAKOWSKA-WITALINSKA, 2003). Muco também tem sido associado com a adesão de partículas (FRIEDLAND, 1985; TIBBETTS, 1997; EIRAS-STOFELLA & CHARVET- ALMEIDA,

1998) e a extração de nutrientes de alimentos vegetais consumidos pelos peixes (TIBBETTS, 1997).

A Tabela 3 mostra os resultados das reações histoquímicas para as diferentes porções do intestino dos juvenis de cachara. Observou-se reação positiva para a produção de mucinas ácidas (AB – Figura 5B) e neutras (PAS- Figura 5C) e a ausência de mucinas conjugadas (APS+AB – Figura 5D), sendo que, de modo geral, houve uma intensidade de reação superior para as mucinas ácidas.

Os peixes possuem células que produzem duas ou mais glicoproteínas, que podem estar em diferentes estágios de maturação (REIFEL & TRAVILL, 1978). Assim, a presença de células caliciformes que reagiram positivamente ao alcian blue que produzem mucopolissacarídeos ácidos e também reagiram ao PAS (polissacarídeos neutros) indicam, segundo ABDULHADI (2005), que estes resultados dependem do grau de maturação das células caliciformes. No presente estudo, a presença de células com esta característica não foram observadas (Figura 5D).

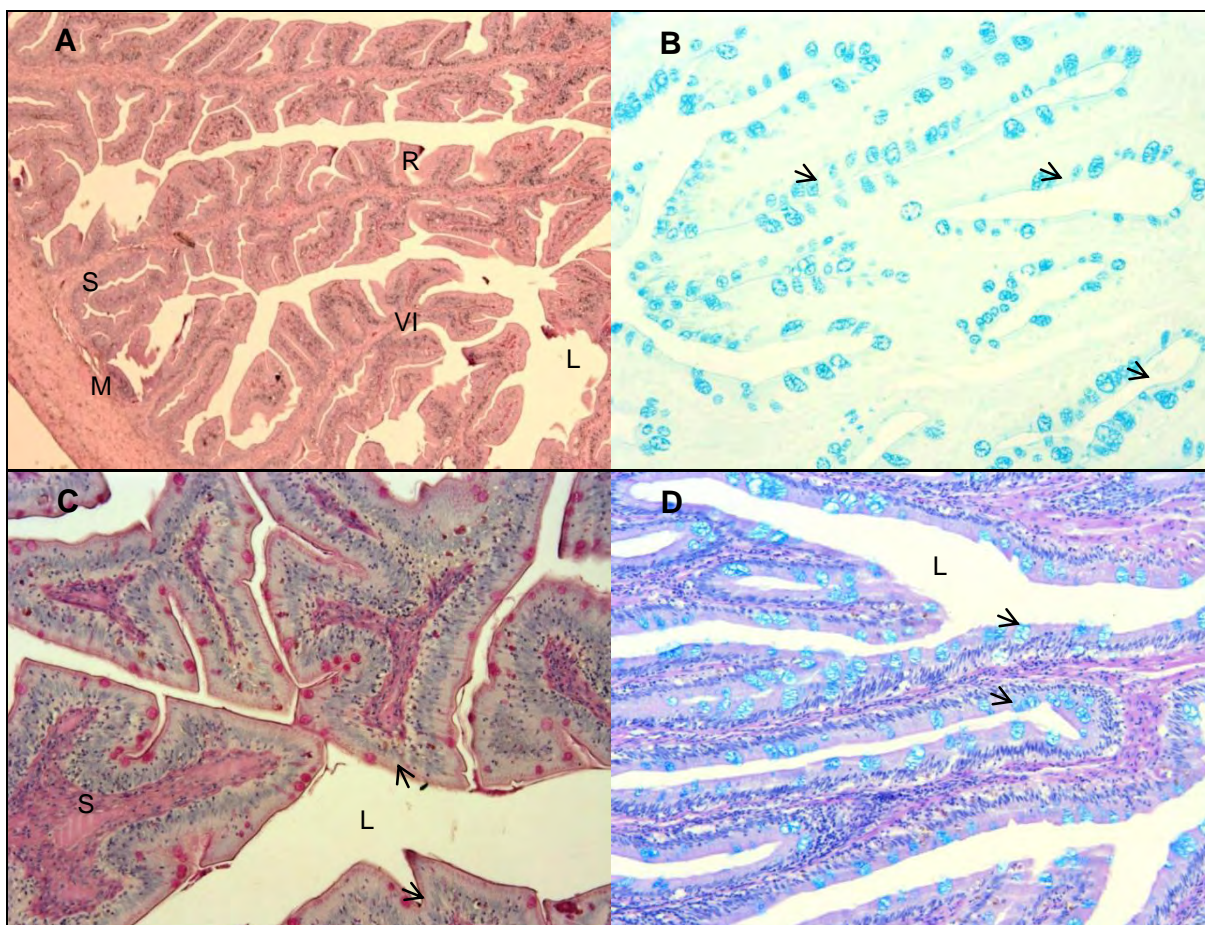


Figura 5 - Intestino de cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) **A**: intestino anterior com formação de ramificações (HE, 100x) **B**: intestino médio com células caliciformes produtoras de mucinas ácidas (AB, 200x); **C**: intestino posterior com células caliciformes produtoras de mucinas neutras (PAS, 200x); **D** intestino médio com células caliciformes produtoras de mucinas ácidas e ausência de glicoconjugados (PAS+AB, 200x). Observar: lúmen (L); submucosa (S); camada muscular (M), vilosidades (VI); Ramificações das vilosidades (R); células produtoras de muco (seta).

O padrão de produção de muco foi alterado na parte do intestino estudada, pela proporção de proteína de origem animal utilizada na dieta e a presença de enzimas exógenas. As enzimas exógenas parecem agir de modo diferente sobre porções distintas do trato digestório, e ainda estimular a produção de mucinas ácidas e neutras de formas diferentes, dependendo da dieta.

Glicoproteínas ácidas inibem a degradação da glicoproteína pelas proteases e pela adesão de bactérias (NEUHAUS et al., 2007), amplificam as propriedades de viscosidade e adesividade do muco (RUBENSTEIN & KOEHL, 1977), ajudando na absorção de água, moléculas solúveis e alimento particulado (TIBBETTS, 1997). Conseqüentemente, as

Tabela 3 - Histoquímica do intestino de juvenis de cachara com as dietas experimentais.

Tratamento	PAS			AB			PAS + AB		
	Anterior	Médio	Posterior	Anterior	Médio	Posterior	Anterior	Médio	Posterior
R60	+	+	+	+	++	++	-	-	-
R60AG	+	++	++	+	+++	+++	-	-	-
R60Fi	+	+	+	+	++	++	-	-	-
R60AGF	+	+	+	+	+++	++	-	-	-
R30	++	++	+	+	++	++	-	-	-
R30AG	+	+	+	+	++	++	-	-	-
R30Fi	+	+++	++	+	+	++	-	-	-
R30AGF	+	+	++	+	++	++	-	-	-

Intensidade de reação: - (negativo); (+) fraco; (++) médio; e forte (+++);

R30: dieta com 30% do teor de proteína de origem animal; R60: dieta com 60% do teor de proteína de origem animal; AG: 150 mg do complexo amilase e endo- $\beta$ -glucanase kg<sup>-1</sup>; AGF: 100 mg do complexo amilase com endo- $\beta$ -glucanase mais 1.500 UF kg<sup>-1</sup>; Fi: 2.500 UF kg<sup>-1</sup>.

mucinas ácidas podem ser secretadas após a secreção enzimática para evitar degradação de glicoproteínas, evitando danos mecânicos, químicos e enzimáticos. MANJAKASY et al. (2009) inferiram que as mucinas ácidas facilitariam a absorção de proteínas em peixes sem estômago. No presente estudo, a maior produção de mucinas ácidas nos tratamentos envolvendo amilase com endo- $\beta$ -glucanase na região média do intestino pode ser um indicativo de melhor aproveitamento protéico destas dietas. Assim, a melhora de coeficientes de digestibilidade aparente da proteína com o uso de carbohidratases, tal como descrito por STONE et al. (2003a,b), pode ter como um dos mecanismos, o aumento da secreção de mucinas ácidas.

Mucosubstâncias neutras combinadas com fosfatase alcalina têm sido consideradas importantes na digestão e emulsificação do alimento no quimo (CLARKE & WITCOMB, 1980). GRAU et al. (1992) sugeriram que a presença de mucinas neutras podem indicar função absorptiva. Também poderiam providenciar cofatores para requeridos pelas enzimas digestivas (ANDERSON, 1986). No presente estudo, os padrões de reação de PAS no intestino mostraram que as regiões com capacidade absorptiva variaram pouco, sendo que com o uso de dietas R30 e R60, não houve alterações de produção de muco nas três regiões avaliadas. Isto pode estar relacionado com o tamanho do trato digestório, que nos carnívoros é curto, sendo necessário ele todo estar apto a absorção de nutrientes. A atuação das enzimas exógenas sobre a produção deste tipo de secreção foi de difícil interpretação.

## **Conclusões**

Nas condições de realização do trabalho, pode-se concluir que: 1) as alterações observadas no fígado em função das diferentes dietas e da adição de enzimas podem ter tido influência do processamento das amostras 2) as dietas influenciaram a secreção das mucinas nas regiões cárdica e pilórica, mas a adição das enzimas influenciou a produção de glicoproteínas de modo diferente em cada dieta; 3) a observação das reações EOF e HE não possibilitaram a detecção do efeito das enzimas exógenas avaliadas, nem mesmo da alteração de porcentagem de proteína de origem animal sobre a produção de zimogênio no pâncreas; 4) as enzimas exógenas parecem agir de modos diferentes sobre porções distintas do trato digestório e ainda estimular a produção de mucinas ácidas e neutras de formas diferentes dependendo da dieta.

## Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento (Proc. n. 07/00605-9) e bolsa concedida (Proc. n. 06/04146-6); a Piscicultura Piraí pelos peixes doados; a Dra Marcia Rita Fernandes Machado e a DSM pela doação das enzimas.

## Referências Bibliográficas

ABDULHADI, H.A.A. Some comparative histological studies on alimentary tract of tilapia fish (*Tilapia spilurus*) and sea bream (*Mylio cuvieri*). **Egyptian Journal of Aquatic Research**. v. 31, p. 387-397, 2005.

AL-HUSSAINI, A.H. The anatomy and histology of the alimentary tract of the bottom-feeder *Mulloidides auriflamma* (Forsk.). **Journal of Morphology**., v. 78, p. 121-154, 1946.

AL-HUSSIANI, A.H. The feeding habit and the morphology of the alimentary tract of some teleosts living in the neighbourhood of the Marine Biological Station, Ghardaqa, Red Sea. Publications. **Marine Biological Station Al Ghardaqa**, v.5, p. 4-61, 1947.

ALLEN, A. Structure and function of gastrointestinal mucus. In: JOHNSON L.R (Ed). **Physiology of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, 1981, p. 617- 639.

ANDERSON, T.A. Histological and cytological structure of the gastrointestinal tract of the luderick, *Girella tricuspidata* (Pisces, Kyphosidae) in relation to diet. **Journal of Morphology**, v.190, p. 109-119, 1986.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th. v. II., 2000.

BAEVERFJORD G. **Digestible and indigestible carbohydrates in rainbow trout diets**. 1992. 116f. Tese - Norwegian College of Veterinary Medicine, 1992.

BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 5<sup>o</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002, p.796.

BOONYARATPALIN, M.; SURANEIRANAT, P.; TUNPIBAL, T. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*. **Aquaculture**, v. 161, p. 67-78, 1998.

CABALLERO, M.J.; LÓPEZ-CALERO, G.; SOCORRO, J.; ROO, F.J.; IZQUIERDO, M.S.; FERNÁNDEZ A.J. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v.179, p.277–290, 1999.

CAL, J. A. **Histologia do trato digestório de surubim-pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* – Agassiz - 1929)**. 2006, 87f. Dissertação – Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2006.

CARRATORE, C. R.; PEZZATO, L.E. ; BARROS, M.M.; VICENTINI, C. A.. Alterações anátomo-patológicas resultantes do arraçamento de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com farinha de soja. **Revista Unimar**, v. 19, n. 3, p. 871-879, 1997.

CAVERO, B. A. S. **Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de Pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829)**. 2004, 79 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

CHAKRABARTI, P.; SINHA, G.M. Mucosal surface of the alimentary canal in *Mystus vittatus* (Bloch.): A scanning electron microscopic study. **Proceedings of the Indian National Science Academy Part B**, v. 53: p. 317-322, 1987.

CLARKE, A.J.; WITCOMB, D.M. A study of the histology and morphology of the digestive tract of the common eel (*Anguilla anguilla*). **Journal of Fish Biology**, v.16, p. 159–170, 1980.

COWIESON, A.J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M.R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 45, n. 1, p. 101-108, 2004.

DIAZ, A. O.; GARCÍA, A. M.; DEVINCENTI, C. V.; GOLDEMBERG, A. L. Morphological and histochemical characterization of the mucosa of the digestive tract in *Engraulis anchoita*. *Anatomia, Histologia, Embryologia*: **Journal of Veterinary Medicine, Série C**, v.32 p.341-346. 2003.

DIXON DG; HILTON JW. Influence of available dietary carbohydrate content on tolerance of waterborne copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of fish biology**,v.19, p. 509-517, 1981.

EIGENMANN, C.H.; EIGENMANN, R.S. Preliminary notes on South American Nematognathi II. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 2, p. 28–56, 1889.

EIRAS-STOFELLA, D.R.; CHARVET-ALMEIDA, P. Ultrastructure (SEM) of the gills of *Prochilodus scrofa* Steindachner (Pisces, Teleostei). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, p. 279-287, 1998.

EZEASOR, D.N.; STOKOE, W.M. A cytochemical, light and electron microscopic study of the eosinophilic granule cells in the gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, v.17, p. 619-634, 1980.

FLORES QUINTANA, C.I.; PORTELLA, M.C. Histological analysis of juvenile *Pseudoplatystoma fasciatum* digestive system. In: WORLD AQUACULTURE SOCIETY, 2003, Salvador, Bahia, Brasil **Abstracts**.

FLOREZ QUINTANA, C.I.; PEREYRA, L.A.; DOMITROVIC, H.A.; ROUX, J.P.; SAMPIETRO, J.C. Estructura histológica del aparato digestivo de surubi (*Pseudoplatystoma coruscans* y *Pseudoplatystoma fasciatum*) (Pisces, Siluriformes) **Actas Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE II**, v.4, p. 17-20, 1997.

FRIEDLAND, K.D. Functional morphology of the branchial basket structures associated with feeding in the Atlantic Nenhaden, *Brevoortia tyrannus* (Pisces : Clupeidae). **Copeia**, v.4, p. 1018-1027, 1985.

GAYÃO, A. L. B. **Nutrição e reversão sexual de tilápia do Nilo: parâmetros produtivos e estrutura do fígado**. 2009, 100f. Tese (Doutorado) – Centro de Aquicultura da Unesp, CAUNESP, Jaboticabal, 2009.

GRANT, G.; ALONSO, R.; EDWARDS, J.E.; MURRAY, S. Dietary soya beans and kidney beans stimulate secretion of cholecystokinin and pancreatic digestive enzymes in 400-day-old hooded-lister rats but only soybeans induce growth of the pancreas. **Pancreas**, v. 20, p.305-312, 2000.

GRAU, A.; CRESPO, S.; SARASQUETE, M.C; GONZALEZ DE CANALES, M.L. The digestive tract of the amberjack *Seriola dumerili*. Risso: a light and scanning electron microscope study. **Journal of Fish Biology**, v. 41, p. 287-303, 1992.

HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. Kodansha Ltd.: Tokyo, 1982, p.147.

HILTON, JW; HODSON, PV. Effect of increased dietary carbohydrate on selenium metabolism and toxicity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Nutrition**, v.113, p.1241-1248, 1983.

HILTON, JW. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. **Aquaculture**, v.79, p. 233-244, 1989.

HONORATO, C. A. **Efeito da extrusão em dietas com baixo e alto nível de carboidrato e lipídio sobre o desempenho de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** 2008, Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, 2008.

KAPOOR, B. G.; SMITH, H.; VERIGHINA, I. A. The alimentary canal and digestion in teleosts. **Advances in Marine Biology**, v. 13 p. 109-139, 1975.

KIERSZENBAUM A. L. **Histologia e biologia celular**: Uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elsevier Editora. 2008, 677 p.

KROGDAHL, A.; BAKKE-MCKELLEP, A.M.; BAEVERFJORD, G. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) **Aquaculture Nutrition**, v.9, p. 361-371, 2003.

KUMAR, S.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; CHOUDHURY, D.; YENGGOKPAM, S.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles, **Fish and Shellfish Immunology**, v.19, p. 331-344, 2005.

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Chapman e Hall, 288 p., 1988.

LUNDSTEDT, L. M. **Aspectos adaptativos dos processos digestivo e metabólico de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia**. 2003, 140f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, 2003.

MARTIN, T.J.; BLABER, S.J.M.. Morphology and histology of the alimentary tracts of Ambassidae (Cuvier) (Teleostei) in relation to feeding. **Journal of Morphology**, v. 182, p. 295-305, 1984.

MATOS, M.P.C; MIGUEL, M.P.; MOURA, V.M.B.D.; SOBESTIANSKY, J.; BRITO, L.A.B. Avaliação histológica de fígado, rim, tireóide, paratireóide e osso de suíno em terminação submetidos a diferentes dietas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 1128-1137, 2008.

MATSUI, T.; NAKAGAWA, Y.; TAMURA, A.; WATANABE, C.; FUJITA, K.; NAKAJIMA, T.; YANO, H. Efficacy of yeast phytase in improving phosphorus bioavailability in a corn-soybean meal-based diet for growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 94–99, 2000.

MANJAKASY, J.M.; DAY, R.D.; KEMP, A.; TIBBETTS, I.R. Functional morphology of digestion in the stomachless, piscivorous needlefishes *Tylosurus gaviatoides* and *Strogylura leirua ferox* (Relestei: Beloniformes). **Journal of morphology**, v. 270, p. 1155-1165, 2009.

MOSCONI-BAC, N., Hepatic disturbances induced by artificial feed in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during the first year of life. **Aquaculture**, v. 153, p. 251–261, 1987.

MURRAY, H.M.; WRIGHT, G.M.; GOFF, G.P. A study of the posterior esophagus in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, and the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferruginea*: morphological evidence for pregastric digestion? **Canadian Journal of Zoology**, v.72, p. 1191–1198, 1994a.

MURRAY, H. M.; WRIGHT, G.M.; GOFF, G.P. A comparative histological and histochemical study of the stomach from three species of pleuronectids, the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferruginea*, and the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, p. 1199–1210, 1994b.

NEUHAUS, M.; VAN DER MAREL, N.; CASPARI, W.; MEYER, M.; ENSS, L.; STEINHAGEN, D. Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the

common carp *Cyprinus carpio* L., with special consideration of mucin glycoproteins. **Journal of fish biology**, v. 70, p.1523–1534, 2007.

OSTASZEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; PALACIOS, M. E.; OLEJNICZAK, M.; WIECZOREK, M. Growth and morphological changes in digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. **Aquaculture**, v. 245, p. 273-286, 2005.

OSTOS GARRIDO, M.V.; NUÑEZ TORRES, M.I.; ABAURREA EQUISOAIN, M.A. Histological, histochemical and ultrastructural analysis of the gastric mucosa in *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 115, p. 121–132, 1993.

PARK, J.Y.; KIM, I.S. Histology and mucin histochemistry of the gastrointestinal tract of the mud loach, in relation to respiration. **Journal of Fish Biology**, v. 58, p.861-872, 2001.

PODKOWA, D.; GONIAKOWSKA-WITALINSKA, L. Morphology of the air-breathing stomach of the catfish *Hypostomus plecostomus*. **Journal of Morphology**, v.257, p. 147-163, 2003.

QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. **A Embrapa e a aqüicultura: demandas e prioridades de pesquisa**. Brasília: Ed. Embrapa Informações Tecnológicas, 2002, p. 40.

RACKIS, J.J. Biological and physiological factors in soybeans. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.41, p.161-174, 1974.

REFSTIE, S. Soybean in Aquafeeds. In: FOURTH WORKSHOP FOR HARVESTING THE BENEFITS OF GRAIN IN AQUACULTURE FEEDS, **Proceedings** v. 13, p. 32-41, 2007.

REIFEL, G.W.; TRAVILL, A.A. Structure and carbohydrates histochemistry of stomach in eight species of teleosts. **Journal of Morphology**, v.158 p. 155-168, 1978.

RUBENSTEIN, D.J.; KOEHL, M.A.R. The mechanisms of filter feeding: Some theoretical considerations. **American Naturalist**, v.111, p.981-994, 1977.

RUNSEY, G.L. Recent advances in nutrition of salmonids. **Journal of Nutrition**, v.2, p.21-26, 1978.

SANIOTO, S.M.L. Secreções do sistema gastrointestinal. In: AIRES, M.M. (Ed) **Fisiologia**. São Paulo: Editora Guanabara Kooogan S.A. 2008. p. 827-874.

SOUZA, S.; MENIN, E.; JUAREZ LOPEZ, O.; FONSECA, C. Corpúsculos gustativos na cavidade bucofaringia em alevinos de surubim relacionados com a sua capacidade para selecionar alimento. In: XXXVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Piracicaba, **Anais**.... 2001.

STONE, D. A. J. Dietary carbohydrate utilization by fish. Reviews in fisheries **Science**, v.11, n. 4, p. 337-369, 2003.

STONE, D. A. J; ALIAN, D.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. **Aquaculture Research**. v.34, p.135-147, 2003a

STONE, D. A. J; ALIAN, D.; ANDERSON, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). IV. Can dietary enzymes increase digestible energy from wheat starch, wheat and dehulled lupin? **Aquaculture Research**. v.34, p.135-147, 2003b.

TAN, Q.; XIE, S.; ZHU, X.; LEI, W.; YANG, Y. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid rations on growth and feed utilization in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, p. 605-610, 2007.

TIBBETTS, I.R. The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhamphus sclerolepis* krefftii. **Journal of Fish Biology**, v. 50 p.809-820, 1997.

TYLER, A.V. Alimentary tract morphology of selected North Atlantic fishes in relation to food habits. **Fisheries Research Board of Canada Technical Report** Nos. p. v.361, p. 1-23, 1973.

**ANEXO**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

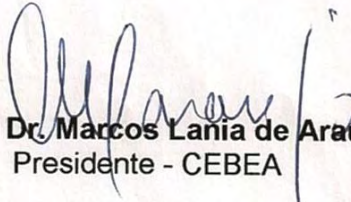


## CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 009741-07 do trabalho de pesquisa intitulado “**Utilização de enzimas em dietas para juvenis da cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*)**”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Dalton José Carneiro, está de acordo, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião extraordinária de 01 de junho de 2007.

Jaboticabal, 04 de junho de 2007.

  
Prof. Dr. Marcos Lania de Araújo  
Presidente - CEBEA

  
Med. Vet. Maria Alice de Campos  
Secretária - CEBEA