



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**



**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO
SISTEMA DIGESTÓRIO E IDENTIFICAÇÃO POR ISÓTOPOS
ESTÁVEIS DE ROBALO PEVA E FLEXÁ SELVAGENS E DE
CATIVEIRO**

Márcia Regina Fragoso Machado

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO
SISTEMA DIGESTÓRIO E IDENTIFICAÇÃO POR ISÓTOPOS
ESTÁVEIS DE ROBALO PEVA E FLEXA SELVAGENS E DE
CATIVEIRO**

Aluna: **Márcia Regina Fragoso Machado**

Orientador: **Prof. Dr. Roberto Goitein**

Co-orientador: **Prof. Dr. Alexandre Azevedo**

**Tese apresentada ao Programa de Pós -
graduação em Aquicultura da UNESP –
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de
Doutor(a) em Aquicultura.**

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2011

M149c Machado, Márcia Regina Fragoso
Caracterização morfológica e bioquímica do sistema digestório e identificação por isótopos estáveis de robalo peva e flexa selvagens e de cativoiro/ Márcia Regina Fragoso Machado. – – Jaboticabal, 2011 x, 87 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2011

Orientador: Roberto Goitein

Banca examinadora: Rosangela Kiyoko Jomori Bonichelli, Leonardo Gomes da Silva, Helton Carlos Delicio, Antonio Fernando Gervásio Leonardo.

Bibliografia

1. Peixes marinhos 2. Aquicultura 3. Tecnologia marinha. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 639.32

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

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

(Albert Einstein)

*Aos meus pais, Ana e Mario Márcio,
Aos meus irmãos Alice e Márcio e a minha cunhada Carol, os quais amo
profundamente, que apesar da distância me deram muito carinho, incentivo e apoio nos
momentos mais difíceis e por terem “criado” e cuidado da minha filha, enquanto eu
encerrava mais uma etapa acadêmica da minha vida – o Doutorado.
E em especial a minha filha Analice pelo incentivo, amor, carinho, força, que soube
compreender o motivo da minha ausência e a distância entre nós e por ser a pessoa
mais importante na minha vida, sendo a razão de todo o meu esforço,*

Dedico.

AGRADECIMENTO

Ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Aqüicultura da Unesp, pela oportunidade de realização e conclusão do Doutorado.

Em especial ao meu Orientador, professor e amigo Dr. Roberto Goitein, por ter aceitado me orientar, mesmo sabendo que eu teria apenas 2 anos para concluir o doutoramento. Obrigada pela grande oportunidade, confiança, paciência, apoio, pelas inúmeras e importantes sugestões, pela orientação, incentivo, exemplo de profissional e principalmente pela atenção repassada.

Ao professor e amigo, Dr. Alexandre Azevedo, pelo convívio, colaboração, incentivo, apoio e confiança, por ter me apresentado o peixe robalo e ter me despertado o interesse em trabalhar com peixes marinhos, por ter cedido as dependências do Nupem/UFRJ para a realização do meu experimento, pelas sugestões na realização deste trabalho e por ter me apresentado muitas pessoas importantes nesta minha nova caminhada.

Ao professor e amigo, Dr. Leonardo Gomes da Silva, por ter auxiliado no experimento de proteômica e pela paciência.

Aos colegas de laboratório do Nupem/UFRJ, Helena, Vagner e Valderes, e Centro de Isótopos Estáveis/Unesp, Evandro e Cibele, pela amizade, dedicação e competência que auxiliaram nas análises e coletas dos materiais, sem eles essa tese não teria saído.

Ao professor Dr. Carlos Ducatti, pelo grande profissionalismo e por ter cedido o laboratório para análises das amostras.

Aos professores Dr. Claudinei Cruz e Dr. João Batista, que participaram da minha banca de qualificação e aos professores Dra. Rosangela Jomori, Dr. Leonardo Gomes da Silva, Dr. Helton Carlos Delicio e o pesquisador Dr. Antonio Fernando

Gervásio Leonardo, que participaram da minha banca de defesa, pela colaboração, correções e sugestões para a realização desse trabalho.

Ao pessoal do Apta/Pariquera-açu, em especial a Camila, que me auxiliou e cedeu os robalos peva para o meu experimento.

Ao professor Vinicius Cerqueira e a equipe do Laboratório de Peixes Marinhos, por terem me auxiliado e cedido os robalos flechas para o meu experimento.

Ao amigo Gustavo Franco, pela grande amizade, paciência e grande auxílio na parte estatística.

A professora Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini, Veralice Cappato e David, pela amizade, gentileza, paciência e disponibilidade em todos os momentos que precisei.

A minha “super” mãe Ana, pelo incentivo, apoio, paciência, educação e exemplo de mulher, mãe e avó, que cuidou muito bem da minha filha enquanto eu estive ausente nesses cinco anos entre mestrado e doutorado e fez o papel de avó e mãe ao mesmo tempo, por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, e que graças a ela que pude chegar até aqui e que me perdoe por dizer apenas muito Obrigada.

Aos amigos que fiz nessa caminhada durante o doutoramento, em especial: Professor Dr. Sidney Lianza, durante o tempo em que fiz parte da Papesca/Soltec, pela amizade, confiança, por ter me permitido representar a Papesca/Soltec em eventos Nacionais e Internacionais na área da Pesca e Aquicultura e por ser esse exemplo de profissional que é.

Ao professor Dr. Fernando Amorim, pela amizade, confiança, profissionalismo e por ter me dado a oportunidade de conhecer o ensino Politécnico e de compor o quadro de professores do Instituto Politécnico da UFRJ em Cabo Frio, no qual atualmente, além

de professora, sou coordenadora do curso técnico de Cultura Marítima, dizer Obrigada é pouco, e digo mais, que quando eu “crescer” quero ser igual a ele.

A todos os professores, amigos e colegas do Instituto Politécnico da UFRJ, em especial Renata, Rose, Márcia e Vinicius, pelos puxões de orelha nas horas em que pensei em desistir, amizade, incentivo e pelas “bebedeiras”! Aos novos e “antigos” professores do Curso de Cultura Marítima, que entenderam a minha ausência, para terminar o doutorado. Ao Amigo Franclin, pela amizade e por ter me emprestado o notebook para eu terminar de escrever minha tese, enquanto o meu havia me deixado na mão.

A amiga Munique Maia, pela grande amizade, apoio, incentivo, por ter cuidado dos meus cachorros enquanto estive fora e por ter emprestado o netbook quando eu precisei e pelos momentos de festas e descontração.

A todos os meus alunos do curso de Cultura Marítima do Instituto Politécnico da UFRJ, pelo grande carinho, apoio, incentivo e amizade e por cada momento passado que foram e continuam sendo especiais, desde alegria, grandes risadas até o estress.

E como não poderia esquecer, logicamente, quero agradecer aos pescadores que me auxiliaram na pesca dos robalos, e que foram meus professores e mestres durante as coletas, foi com eles que aprendi muitas coisas, principalmente pescar.

As minhas grandes amigas Fabíola e Dóris, pela grande amizade, momentos de descontração, apoio e super incentivo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o doutorado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos muito Obrigada.

ÍNDICE

LISTADE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
I. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	3
1. Gênero <i>Centropomus</i> como potencial para a aquicultura	7
2. Os robalos no litoral Norte Fluminense	8
3. Isótopos Estáveis Ambientais.....	9
4. Utilização de Proteômica na aquicultura.....	12
5. Caracterização da área de estudo.....	13
II. OBJETIVOS	15
III. RESULTADOS	16
IV. REFERÊNCIAS	17
Capítulo 1. Identificação alimentar do Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>) selvagem e de cativeiro, utilizando-se a técnica de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$).....	23
Resumo	24
Abstract.....	25
Introdução	26
Material e Métodos	28
Resultados	31
Discussão	33
Conclusões.....	34
Referências.....	35
Capítulo 2. Análise da expressão de proteínas hepáticas de Robalo flexa (<i>Centropomus undecimalis</i>) mediante variação nutricional	39
Resumo	40
Abstract.....	41
Introdução	42
Material e Métodos	43
Resultados	45
Discussão	48
Conclusões.....	49
Referências.....	49
Capítulo 3. Caracterização morfológica do tubo digestório de Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>) e Robalo flexa (<i>Centropomus undecimalis</i>)	51
Resumo	52
Abstract.....	54
Introdução	56
Material e Métodos	59
Resultados	60

Discussão	66
Conclusões	70
Referências.....	71
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
VI. ANEXO	76

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. Identificação alimentar do Robalo peva (*Centropomus parallelus*) selvagem e de cativeiro, utilizando-se a técnica de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$)

Tabela 1. Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ de músculo, osso, pele, fígado e material encontrado no estômago de robalos peva (*Centropomus parallelus*) coletados na natureza e cativeiro (média \pm desvio padrão)..... 31

Capítulo 2. Análise da expressão de proteínas hepáticas de Robalo flexa (*Centropomus undecimalis*) mediante variação nutricional

Tabela 1. Identificação dos spots encontrados no fígado de robalo flexa (*Centropomus undecimalis*), com seus pesos isoelétricos (pI) e peso molecular (MW em kDa) 46

Capítulo 3. Caracterização morfológica do tubo digestório de Robalo peva (*Centropomus parallelus*) e Robalo flexa (*Centropomus undecimalis*)

Tabela 1. Intensidade de secreção de mucosubstâncias pelas células caliciformes, ao longo do esôfago e intestino de Robalo peva (*Centropomus parallelus*) e Robalo flexa (*Centropomus undecimalis*), para cada uma das colorações histoquímicas utilizadas 63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>) e Robalo flexa (<i>Centropomus undecimalis</i>). Fonte:	8
Figura 3. Vista aérea da do litoral do Rio de Janeiro com os sítios de coleta do Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>) e Robalo flexa (<i>Centropomus undecimalis</i>), Barra de São João/ Casemiro de Abreu. Fonte: Google Earth (2009).....	15
Capítulo 1. Identificação alimentar do Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>) selvagem e de cativeiro, utilizando-se a técnica de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$)	
Figura 1. Regiões definidas a partir de valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, referentes a músculo, osso e pele de Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>) em ambiente natural e cativeiro	32
Capítulo 2. Análise da expressão de proteínas hepáticas de Robalo flexa (<i>Centropomus undecimalis</i>) mediante variação nutricional	
Figura 1. Gel de eletroforese bidimensional (2D) de amostras de fígado extraídos do Robalo flexa (<i>Centropomus undecimalis</i>).....	45
Capítulo 2. Caracterização morfológica do tubo digestório de Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>) e Robalo flexa (<i>Centropomus undecimalis</i>)	
Figura 1. Fotografia do sistema digestório do Robalo flexa (<i>Centropomus undecimalis</i>). Evidenciando: esôfago, estômago, cecos, intestino proximal, intestino médio e intestino distal.....	63
Figura 2. Fotomicrografias de cortes transversais do esôfago do Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>)	64
Figura 3. Fotomicrografia da transição do esôfago para o estômago cárdico do Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>)	65
Figura 4. Fotomicrografias de cortes transversais do estômago cárdico do Robalo flexa (<i>Centropomus undecimalis</i>)	65
Figura 5. Fotomicrografias de cortes transversais do estômago pilórico do Robalo flexa (<i>Centropomus undecimalis</i>)	65

Figura 6. Fotomicrografias de cortes transversais do intestino proximal do Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>).....	66
Figura 7. Fotomicrografias de cortes transversais do intestino médio do Robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i>).....	66

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO SISTEMA DIGESTÓRIO E IDENTIFICAÇÃO POR ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE ROBALO PEVA E FLEXA SELVAGENS E DE CATIVEIRO

RESUMO

Os recursos pesqueiros marinhos representam uma importante fonte de proteína e, além de alimento, é fonte de renda para milhares de pessoas, especialmente nos países em desenvolvimento. Muitos estoques pesqueiros naturais já se encontram em seu limite máximo de exploração, devido a isso houve um aumento considerável da produção de pescado pela aquicultura nos últimos anos. As maiores deficiências tecnológicas ainda residem no cultivo de peixes marinhos, que vem sendo um dos principais entraves à produção, área em que o país ainda está em fase embrionária. Dentre as espécies marinhas mais estudadas no Brasil destacamos o gênero *Centropomus* (robalo) que possui uma dificuldade do manejo de reprodutores em cativeiro e dificuldades em formular a ração para esses peixes, dificultando dessa forma a sua produção. Porém faltam estudos na área de morfologia, fisiologia e nutrição para as espécies marinhas. Dessa forma, foi realizado o presente trabalho com o objetivo de identificar os principais componentes alimentares de jovens de robalo peva (*Centropomus parallelus*) e robalo flexa (*Centropomus undecimalis*) por análises histológicas e histoquímicas do sistema digestório, determinação de isótopos estáveis e verificar, por meio de proteômica, quais as proteínas presentes no fígado são expressas na alteração da dieta desses peixes. Esse estudo pretende fornecer subsídios para o desenvolvimento de um pacote tecnológico para o cultivo de ambas as espécies, contribuindo na otimização da nutrição e gerando alternativas para tornar a piscicultura marinha uma atividade produtiva no país.

Palavras – chave: peixes marinhos, aquicultura, tecnologia marinha.

BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF DIGESTIVE SYSTEM AND IDENTIFICATION OF STABLE ISOTOPES OF FAT SNOOK AND BASS ARROW WILD AND CAPTIVITY

ABSTRACT

The marine fishery resources represent an important source of protein and, besides food, is a source of income for thousands of people, especially in developing countries. Many natural fish stocks are already at their limit of exploitation because of this there was a considerable increase in fish production through aquaculture in recent years. The major technological deficiencies still reside in the cultivation of marine fish, which has been a major constraint to production, the area where the country is still in its infancy. Among the most studied marine species in Brazil include the genus *Centropomus* (bass) that has a difficulty in handling of captive broodstock and difficulties in formulating the ration for these fishes, thus hindering their production. But lacks studies on morphology, physiology and nutrition for marine species. Thus, the present work was undertaken with the aim of identifying the major dietary constituents of young fat snook (*Centropomus parallelus*) and bass arrow (*Centropomus undecimalis*) by histological and histochemical digestive system, determination of stable isotopes and verify by using proteomics, which proteins are expressed in liver in changing the diet of these fish. This study aims to provide subsidies for the development of a technology package for cultivation of both species, contributing to the optimization of nutrition and generating alternatives to marine fish farming to become a productive activity in the country.

Key - words: marine fish, aquaculture, marine technology.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

I. CONSIDERAÇÕES GERAIS

No Brasil, a maioria dos estudos referentes à piscicultura está voltada para peixes de água doce, o que permitiu a crescente importância da piscicultura continental. Entretanto, o mesmo não ocorre em relação à piscicultura marinha que é uma atividade pouco disseminada.

Apesar do Brasil possuir excelentes condições naturais, peixes com extraordinário potencial para a aquicultura, como por exemplo, os do gênero *Centropomus* e abundância de recursos hídricos, são recentes os esforços para obtenção de dados que permitam a adequada orientação da produção comercial (FERRAZ et al., 2002).

A produção de algumas espécies de peixes marinhos no Brasil, ainda vem sendo realizada em nível experimental, não havendo registros de sua produção comercial, como exemplo destacamos os robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) e robalo peva (*Centropomus parallelus*) e o beijupirá (*Rachycentron canadum*) (CERQUEIRA, 2004). Alguns autores têm estudado as possibilidades de criação de linguado (*Paralichthys orbignyanus*) (SAMPAIO, 2008) e tainha (*Mugil platanus*) (SAMPAIO et al., 2001).

Os programas de piscicultura marinha em escala comercial têm sido desenvolvidos principalmente na Ásia (China, Taiwan, Filipinas, Indonésia, Japão), Europa (Espanha, Itália, Noruega, Portugal, França, Reino Unido, Dinamarca), América do Norte (Canadá e Estados Unidos) e América do Sul (Chile).

Dentre os gêneros mais cultivados destacamos os Salmonidae (salmão (*Salmo salar*) e truta (*Oncorhynchus mykiss*)), Moronidae (robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*)), Sparidae (pargos (*Pagrus pagrus*)), Mugilidae (tainhas (*Mugil platanus*)), Carangidae (pamos (*Trachinotus ssp.*) e olhete (*Seriola fasciata*)), Centropomidae (robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) e robalo peva (*Centropomus parallelus*)), entre outros (TUCKER, 1998).

Frente à complexidade apresentada para a exploração sustentável dos estoques pesqueiros, ações multidisciplinares estão sendo propostas como forma de abordagem e vão desde a gestão pública, passando pela educação para gestão compartilhada dos recursos naturais, pesquisas para o conhecimento básico da bioecologia das espécies, chegando à implantação de técnicas de produção em cativeiro.

O gênero *Centropomus* agrupa espécies de peixes tropicais e subtropicais. Na natureza são animais diádromos, eurihalinos, estenotérmicos e estuarino-dependentes, encontrados tanto no mar, como nas águas salobras e interiores, com movimentos sazonais entre a água doce e salgada e, quando ocorrem no mar, habitam regiões costeiras (RIVAS, 1986; ALVAREZ-LAJONCHÈRE et al., 1982). São peixes rústicos, migratórios e na natureza depende de estuários; ambiente imprescindível ao seu período reprodutivo e ciclo de vida (TEIXEIRA, 1997).

No Brasil, as espécies de maior importância econômica, encontrando em ambiente natural são robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) e robalo peva (*Centropomus parallelus*). Apesar da potencialidade do robalo, estudos ecofisiológicos, pesquisas dirigidas e tecnologias para sua criação são poucos encontrados na literatura.

Se considerarmos a extensão da costa brasileira e seus vastos recursos, as perspectivas para o desenvolvimento da piscicultura marinha são das mais promissoras. Segundo Cerqueira (2004), para que a produção seja incrementada, é necessário desenvolver tecnologia apropriada para a propagação artificial de nossas espécies, de modo a promover a oferta de alevinos e ao mesmo tempo desenvolver técnicas de cultivo intensivas.

No Brasil não há qualquer registro de produção significativa de peixes marinhos, através do cultivo (CERQUEIRA, 2002). Porém, há em algumas regiões do país, a engorda de jovens capturados no ambiente natural e cultivados em viveiros e ou

tanques-rede, no qual a qualidade da água é importante para o desenvolvimento do peixe, embora essas pesquisas são poucos estudados (SAMPAIO, 2008).

Dessa forma é necessário realizar estudos na área da nutrição, morfologia e fisiologia desses peixes, para produzi-los em cativeiro.

Com isso, o mecanismo da seleção de alimentos feita pelos peixes esta relacionado a diversos fatores não completamente estabelecidos, que podem variar de acordo com as condições ambientais e fase de desenvolvimento dos peixes (YAMAMOTO et al., 2003).

É também de fundamental importância o conhecimento da estrutura trófica do ecossistema, bem como do nível trófico ocupado pelas espécies, para nesse delineamento buscar subsídios para implementação de técnicas de cultivo que possa auxiliar no desenvolvimento do peixe. Sabe-se que os diferentes hábitos alimentares determinam diferenças anatômicas e fisiológicas acentuadas no sistema digestório, como resultado da adaptação aos mais variados tipos de alimentos (SILVA, 2007).

Considerando-se a grande diversidade das espécies de peixes e conseqüente diferenciação morfo-fisiológica, a nutrição de peixes apresenta-se como uma grande área de estudos, apresentando hábitos e comportamentos alimentares diversos. Apesar das investigações nesta área acumularem décadas de conhecimentos, muitos estudos vêm sendo realizados procurando relacionar as características estruturais, anatômicas e, ou, histológicas do sistema digestório dos peixes com seus hábitos e comportamentos alimentares, permitindo, inclusive, inferir a respeito da alimentação de espécies de valor comercial (SEIXAS FILHO, 2001).

Segundo Agostinho & Gomes (1997), o conhecimento hábito alimentar de um peixe, incluindo a dieta e atividade alimentar, fornece importantes subsídios para o

entendimento do funcionamento do ecossistema e pode auxiliar na aplicação de técnicas de manejo de populações naturais, ou quando se tem intenção de criá-lo em cativeiro.

2. Gênero *Centropomus* como potencial para a aquicultura

O Gênero *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis* são peixes de águas tropicais e subtropicais de ampla distribuição desde sul da Flórida (Golfo do México) até o sul do Brasil (Rio Grande do Sul) (RIVAS, 1986; CERQUEIRA, 2002; 2005).

No Brasil, esses peixes habitam ambientes estuarinos, lagunas e costeiros marinhos ao longo das regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste, onde os jovens se abrigam e se alimentam. Entram nos rios adaptando-se facilmente a águas salobras e doces e ocasionalmente penetram em lagoas hipersalinas (PATRONA, 1984; MENDONÇA, 2004).

Os robalos apresentam um grande potencial para aquicultura, apresentando características como: são de grande importância nas atividades pesqueiras, em especial na pesca artesanal e esportiva (SOLIGO, 2007) e sua carne é considerada de excelente qualidade organoléptica, alcançando alto preço nos mercados interno e externo.

São peixes carnívoros se alimentando principalmente de peixes, camarões e crustáceos, contudo, existe uma certa variação sazonal de alimentação pois parecem ser bastante oportunistas predando em função da disponibilidade do ambiente em que se encontram (PATRONA, 1984).

São indivíduos de sexo separado, sem dimorfismo sexual e apresentam o fenômeno da protândria, em que indivíduos machos sofrem uma regressão testicular com posterior desenvolvimento de ovários (GRIER & TAYLOR, 2001).

O robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) é o maior espécie da família, podendo alcançar 1,2m de comprimento total e 25kg, apresenta coloração acinzentada no dorso, com reflexos esverdeados, e ventre esbranquiçado; linha lateral formada por uma lista

longitudinal negra que se estende ao longo do corpo até o final da nadadeira caudal e tem uma maior importância econômica que o *Centropomus parallelus*, devido ao seu tamanho e rápido crescimento. Já o robalo peva (*Centropomus parallelus*) tem menor porte, e apresenta dorso cinza-esverdeado e flancos prateados (CARVALHO-FILHO, 1992). É mais abundante em rios e lagoas que *Centropomus undecimalis* (CASTAGNOLLI, 1992; CARVALHO-FILHO, 1999) (Fig.1).



Figura 1. Exemplos de (A) Robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) e (B) Robalo peva (*Centropomus parallelus*).

1. Os Robalos no Litoral Norte Fluminense

O valor de mercado do robalo é um dos mais elevados na região Norte Fluminense, chegando a custar de R\$15,00 a 30,00 kg dependendo a época do ano, e seu consumo faz parte da cultura culinária local. Em Casemiro de Abreu (foz do rio São João), a ocorrência dos robalos caiu sensivelmente nos últimos anos e têm sido também uma das preocupações da comunidade ribeirinha que inclusive relacionam o fato com a poluição e descaracterização do rio São João e a sobrepesca.

Trabalhos de preservação da espécie já vêm sendo feitos em partes do território nacional e na América, como o período de defeso no litoral e águas interiores do Espírito Santo e Bahia regulamentado pela portaria IBAMA nº49-N, que estabelece proibição para pesca, transporte e comercialização de robalos *Centropomus ssp.*, no período de 15 de maio a 31 de julho de todos os anos. Além do manejo de pesca, programas de reprodução artificial vêm sendo desenvolvidos em diversas regiões. Na Flórida, os *Centropomus undecimalis*, por exemplo, são criados experimentalmente para programas de repovoamento onde sua pesca comercial está proibida há anos, em favor da pesca esportiva (TUCKER, 2003).

Além do panorama da exploração sustentável dos estoques naturais, a possibilidade de exploração do gênero *Centropomus* em programas de piscicultura tem sido considerada pela comunidade científica, órgãos públicos e iniciativa privada. Neste sentido, muitos trabalhos zootécnicos e de biologia básica têm sido produzidos nos últimos anos muito embora não tenha se chegado ainda a um protocolo que viabilize a exploração comercial deste recurso.

Tomando como base a importância econômica dos robalos para a pesca artesanal e culinária destas localidades, sua valorização cultural, seu potencial como bioindicador de sanidade ambiental, e a ausência de estudos detalhados de sua fisiologia nutricional principalmente nestas regiões. Este estudo visa contribuir com a geração de conhecimentos referentes a fisiologia nutricional e de subsidiar o manejo sustentável deste recurso.

2. Isótopos Estáveis Ambientais

A metodologia de isótopos estáveis tem sido empregada em estudos de cadeia trófica e baseia-se na comparação da razão isotópica de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) do material em estudo com as fontes de carbono (energia) assimiladas, não

apenas ingeridas, e para identificar as complexas interações (elos) relacionadas ao fluxo de energia nos ecossistemas, por meio da razão dos isótopos de carbono $\delta^{13}\text{C}$ (COLE et al., 2002), bem como a estrutura trófica da rede alimentar por meio do posicionamento ou nível trófico dos consumidores, utilizando a razão isotópica de nitrogênio $\delta^{15}\text{N}$ (ADAMS & STERNER, 2000).

As taxas de ocorrência de isótopos estáveis em tecidos animais são uma combinação dos elementos ingeridos e dos processos de fracionamento em tecidos específicos e podem fornecer informações das dietas dos animais (DALERUM & ANGERBJORN, 2005). Além disso, oferecem a vantagem de integrar dietas em relação ao tempo, em contraste com a análise de conteúdo estomacal ou a observação direta da alimentação, refletindo em dietas de longo e curto prazo (GREY et al., 2001).

As variações naturais de isótopos estáveis também têm sido largamente utilizadas na determinação das fontes de energia que sustentam a produção pesqueira visando o uso racional dos estoques (DUFOUR & GERDEAUX, 2001).

Os estudos sobre cadeia alimentar, onde a fonte de energia é representada pela troca de carbono baseiam-se na comparação da composição isotópica do carbono no material em estudo com as suas possíveis fontes alimentares (PETERSON & FRY, 1987), a aplicação desta ferramenta metodológica pode auxiliar na identificação das fontes alimentares aproveitadas pelos peixes durante a criação.

O rastreamento da fonte alimentar assimilada por larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), durante o processo de transição alimentar de nauplios de artêmia para dieta formulada, foi possível, através de análises dos isótopos de C e N (JOMORI et al., 2008).

Muitos componentes que não são identificáveis nos estômagos dos peixes podem representar a fração menos digerível de sua dieta, dificultando a determinação sobre a

fonte de carbono original (FORSBERG et al., 1993). Nestes estudos, os isótopos de carbono podem ser utilizados como metodologia auxiliar, pois fornecem informações sobre o produto consumido e a proporção que é assimilada.

Os alimentos, ingeridos e metabolizados pelos animais, refletem características da sua composição isotópica nos tecidos dos indivíduos que os consumiram. A composição isotópica do tecido animal, ou das fezes, reflete as contribuições das fontes alimentares e sua determinação fornece informações sobre a proporção da contribuição das fontes na formação dos diferentes tecidos e órgãos (DE NIRO & EPSTEIN, 1978).

Qualquer alteração da composição isotópica no tecido depende da velocidade que os constituintes da dieta serão incorporados. A utilização de isótopos estáveis ambientais, bastante comum em estudos de ecologia, além de poder determinar fontes alimentares dos animais proporciona medida da localização de espécies em sua cadeia trófica pela assimilação de energia e fluxo de massa entre diferentes vias de um organismo (POST, 2002).

Grande parte dos estudos que utilizaram variação natural de $\delta^{13}\text{C}$ dos alimentos apresentaram questões ecológicas, enfocando a velocidade de troca do carbono tecidual a partir da ingestão de alimentos com razões isotópicas distintas, em função de migrações ou mudanças de níveis tróficos. Entretanto, a técnica de isótopos estáveis pode ser útil em estudos de fisiologia e nutrição animal, uma vez que as taxas de substituição do carbono tecidual podem ser influenciadas por fatores ambientais, nutricionais e sanitários (CARRIJO et al., 2000).

Outro método interessante revela a característica da dieta em termos de proteínas normais que a compõem.

3. Utilização de Proteômica na Aquicultura

A proteômica é uma nova ferramenta que pretende estudar a totalidade, ou um conjunto de proteínas no interior de uma célula em funcionamento normal, em tecidos parasitados ou submetida a tratamentos experimentais, ou seja, seguir as alterações e interações que ocorrem dentro de uma célula, no decorrer de um processo biológico.

Portanto, ao contrário do genoma, que é praticamente constante, o conjunto de proteínas expresso por um determinado organismo, ou seu proteoma, permite compreender os efeitos estruturais e funcionais causados por fatores ambientais, incluindo a nutrição (WILKINS et al., 1996).

Assim, o mesmo organismo pode apresentar diferentes proteomas, que são resultados da expressão de um conjunto de genes e das modificações pós-tradução das proteínas sintetizadas, em resposta a condições ambientais definidas (CELIS et al., 2000).

A análise de proteomas tem como objetivo identificar as proteínas expressas por uma célula em um dado momento.

A identificação de proteínas na escala proteômica, envolvendo dezenas, centenas ou mesmo milhares de proteínas, em função do estado fisiológico das células analisadas, poderá responder a questões fundamentais sobre os mecanismos biológicos muito mais rapidamente do que pela estratégia de análise de proteínas individuais.

O quadro global gerado pela análise de proteomas pode, por exemplo, permitir a construção de um mapa complexo de funções celulares, ao demonstrar como alterações em uma via de sinalização afetam outras vias, ou quantas proteínas de uma via de sinalização interagem com outra(s) via(s).

O método mais utilizado para a identificação inicial de um proteoma é a eletroforese bidimensional, 2D-GE, que separa centenas de polipeptídeos pelos seus

pontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (Mm), (O'CONNOR et al., 1998; CELIS et al., 2000). O pI e a Mm de cada banda no gel 2D podem ser determinados e a identificação de cada proteína pode ser obtida por espectrometria de massa (por análise de mapa peptídico após hidrólise) ou microssequenciamento e buscas por homologias em bancos de dados de seqüências.

A utilização da proteômica na investigação com peixes é recente, ainda que já existam alguns estudos na área da nutrição. Estes trabalhos permitiram já identificar múltiplas alterações metabólicas em resposta a fatores nutricionais, tais como a variação no conteúdo energético ou a inclusão de fontes de proteína vegetal nas dietas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (MARTIN et al., 2003; VILHELMSSON et al., 2004; KOLDITZ et al., 2008). Poucos trabalhos existentes focam essencialmente na variação do proteoma durante a ontogenia de peixes (FOCANT et al., 2003; LINK et al., 2006; SVEINSDÓTTIR et al., 2008).

De acordo com Conceição et al. (2009), para um futuro próximo avanços significativos na compreensão dos efeitos nutricionais no metabolismo de várias fases dos peixes poderão ser realizados através dessa nova ferramenta.

4. Caracterização da Área de Estudo

A área do estudo, está localizado, entre os municípios de Casemiro de Abreu-RJ e Cabo Frio-RJ, o Rio São João (Fig. 2) nasce na Serra do Sambê, nos contrafortes da Serra do Mar, a uma altitude de 740m, no município de Cachoeiras de Macacu, percorrendo a região no sentido oeste-leste, indo desaguar no Oceano Atlântico após 150 km de extensão. Tem como principais afluentes, pela margem direita, os Rios Gavião, do Ouro, Bacaxá, Capivari e Morto; os Córregos Salto d'Água e Cambucás, a Vala do Consórcio e o Rio Gargoá e, pela margem esquerda, os Rios Águas Claras,

Pireneus, Taquaruçu, da Bananeira, Maratuã, Aldeia Velha, da Lontra , Dourado e a Vala dos Medeiros.

No que concerne às características climáticas, na bacia do rio São João predomina o clima tropical quente úmido, com temperaturas médias variando de 18 a 24°C. Há uma influência, quase todo ano, da Massa Tropical Atlântica, o que mantém a estabilidade do tempo (QUINTELA & CUNHA, 1990).

Entretanto, a bacia hidrográfica do Rio São João, vem sofrendo diversas intervenções antrópicas ao longo dos anos. Entre as décadas de 50 e 80, o rio São João e alguns dos seus afluentes foram submetidos a diversas obras de retificação. Entre outros fatores de degradação, destaca-se a construção da represa Juturnaíba, a especulação imobiliária, a pesca predatória, o desmatamento de mangues e, por conseqüência, a destruição das áreas estuarinas; afetando diretamente o ambiente aquático e sua produtividade natural, causando a destruição de inúmeras áreas de criadouros e o habitat de várias espécies aquáticas.

De acordo com dados do IBAMA (1999), no período anterior à construção da represa Juturnaíba existia uma relevante atividade de pesca na bacia, predominando a captura do bagre, tainha, robalo e camarão. Tais modificações impostas ao ambiente estuarino prejudicam seu ponto de equilíbrio, e tem como conseqüência a alteração do padrão de variação de diversidade biológica. Isto faz com que o estudo deste ambiente, bem como suas variações, seja um dos importantes aspectos a serem considerados quando se têm a atenção voltada para populações submetidas a impactos de natureza antrópica (CASTRO, 1997).

A presença dos robalos ocorre com freqüência nessa bacia hidrográfica e, apesar de marinhos de águas costeiras, nos períodos de acasalamento, eles adentram os estuários e rios de água doce da cidade de Barra de São João (VANACOR & AOKI, 1997).

Diante do exposto e cientes do domínio da técnica da reprodução artificial e da capacidade de ingestão de rações comerciais por parte dos robalos, sabe-se que esse peixe passa a ser uma importante alternativa de renda para a região do Município de Casemiro de Abreu - RJ, atendendo, assim, aos programas de piscicultura em águas interiores e marinhas. É possível também, por meio da larvicultura e alevinagem dos robalos, efetuar repovoamentos em áreas degradadas (VANACOR et al., 1996).

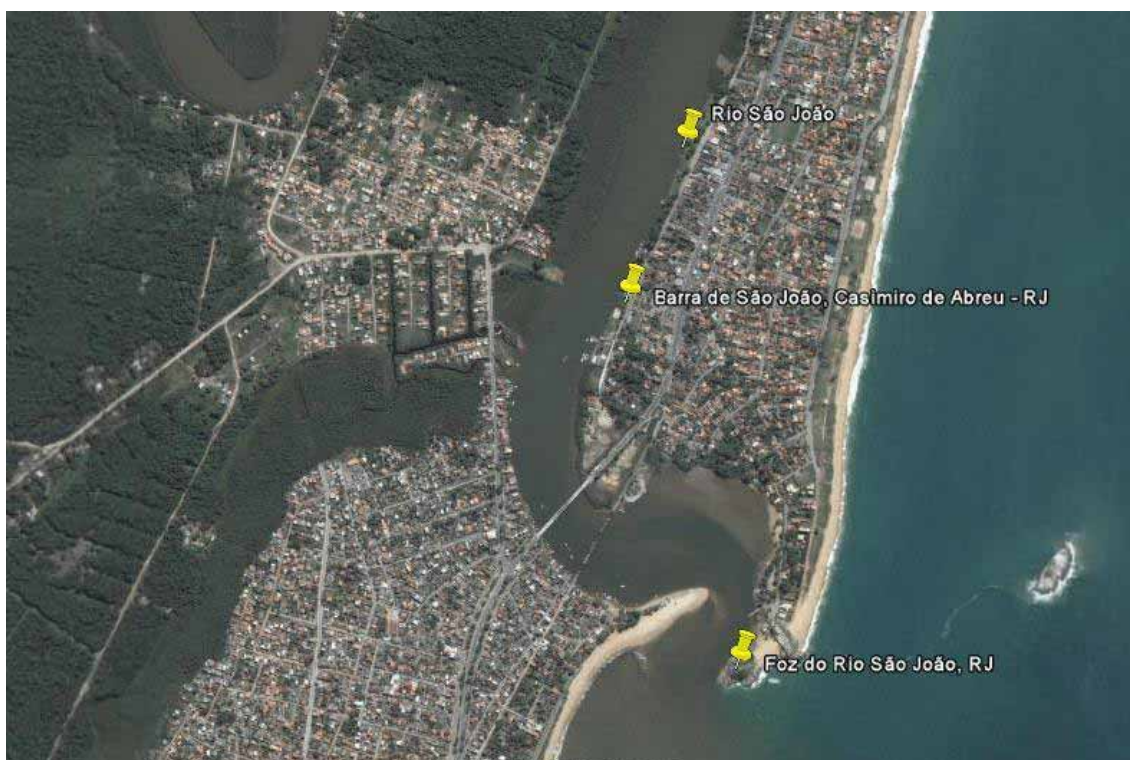


Figura 2. Vista aérea do litoral do Rio de Janeiro (RJ) com os sítios de coleta do Robalo peva (*Centropomus parallelus*) e Robalo flecha (*Centropomus undecimalis*), Barra de São João/Casemiro de Abreu. Fonte: Google Earth (2009).

II. OBJETIVOS

Para o desenvolvimento do trabalho, foram considerados os seguintes objetivos:

Objetivo Geral

Identificar a fonte alimentar de jovens de robalo peva (*Centropomus parallelus*) e robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) selvagens e de cativeiro, por meio de análises histológicas da mucosa do sistema digestório, determinação de isótopos estáveis e perfil das proteínas hepáticas.

Objetivos Específicos

- Identificar a fonte alimentar dos animais selvagens e em cativeiro e verificar nos diferentes tecidos (músculo, osso e pele), fígado e conteúdo estomacal, qual é o mais eficiente em incorporação, através de isótopos estáveis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.
- Verificar a expressão de proteína e suas alterações na dieta do robalo provenientes do ambiente natural e de cativeiro, por técnica de proteômica.
- Analisar histologicamente e histoquimicamente os tipos celulares da mucosa do trato digestório e relacioná- los com as funções exercidas;
- Relacionar os resultados obtidos com aspectos ecológicos e hábitos alimentares do Robalo peva (*Centropomus parallelus*) e Robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) criados em cativeiros e em ambiente natural.

III. RESULTADOS

As análises efetuadas resultaram na elaboração de artigos científicos apresentados separadamente, na forma de capítulos.

Capítulo 1. “Identificação alimentar do Robalo peva (*Centropomus parallelus*) selvagem e de cativeiro, utilizando-se a técnica de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$)”, teve o objetivo de identificar a fonte alimentar dos animais selvagens e em cativeiro e verificar nos diferentes tecidos (músculo, osso e pele), fígado e conteúdo estomacal, qual é o mais eficiente em incorporação, através de isótopos estáveis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

Capítulo 2. “Análise da expressão de proteínas hepáticas de Robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) mediante a variação nutricional”, teve o objetivo de verificar, por meio de proteômica, quais as proteínas presentes no fígado são expressas na alteração da dieta de *Centropomus undecimalis* que estão no ambiente natural e em cativeiro.

Capítulo 3. “Caracterização morfológica do tubo digestório de Robalo peva (*Centropomus parallelus*) e Robalo flecha (*Centropomus undecimalis*)”, buscou caracterizar histológica e histoquímicamente o sistema digestório de robalo peva (*Centropomus parallelus*) e robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) e descrever as possíveis alterações na secreção de mucopolissacarídeos pelas células mucosas ao longo do mesmo, como base para estudos histofisiológicos às necessidades nutricionais dos peixes.

IV. REFERÊNCIAS

ADAMS, T.S.; STERNER, R.W. The effect of dietary nitrogen content on trophic level ¹⁵N enrichment. **Limnology and Oceanography**, v.45, n.3, p.601-607. 2000.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L.C. **Ictiofauna de dois reservatórios do rio Iguaçu em diferentes fases de colonização: Segredo e Foz do Areia**. In: Agostinho, A.A.; Gomes, L.C. (Ed.). Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo. Maringá: Eduem, 1997. cap. 15, p. 275-292.

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; BAÉZ HIDALGO, M.; GOTERA, G.. Estudio de la biología pesquera del robalo de ley, *Centropomus undecimalis* (Bloch) (Pisces, Centropomidae), en Tunas de Zaza, Cuba. **Rev. Inv. Marinas**. n. 3, v.1. p. 159-200 , 1982.

CARRIJO, A.S.; PEZZATO, A.C.; DUCATTI, C. Avaliação do metabolismo nutricional em poedeiras pela técnica dos isótopos estáveis do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). **Rev. Bras. de Ciência Avícola**, v.2, p.209-218. 2000.

CARVALHO-FILHO, A. **Peixes: costa brasileira**. Editora Marca d'Água Ltda., 304 p., São Paulo, 1992.

CARVALHO-FILHO, A. **Peixes: costa brasileira**. São Paulo: Editora Merlo Ltda. 320p, 1999.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP. 189p, 1992.

CELIS J. E., KRUIHOFFER M., GROMOVA I., FREDERIKSEN C., OSTERGAARD M., THYKJAER T., GROMOV P., YU J., PÁLSDÓTTIR H., MAGNUSSON N. ORNTOFT T. F. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. **FEBS Lett.** n. 480 p. 2-16. 2000.

CERQUEIRA, V.R. **Cultivo do Robalo: aspectos da reprodução, larvicultura e engorda**. Florianópolis. Ed. do autor, 94p. 2002.

Cerqueira, V.R. **Cultivo do robalo-peva, *Centropomus parallelus***. In: Baldisserotto, B. e Gomes, L.C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Ed. UFSM. p.403-431, 2005.

COLE, J.J.; CARPENTER, S.R.; KITCHELL, J.F; PACE, M.L. Pathways of organic carbon utilization in small lakes: Results from a whole-lake ^{13}C addition and coupled model. **Lim. and Ocean.**, v.47, n.6, p. 1664-1675. 2002.

CONCEIÇÃO, E.C.DA; ARAGÃO, C.; RICHARD, N.; ENGROLA, S.; GAVAIA, P.; MIRA, S.; DIAS, J. Avanços recentes em nutrição de larvas de peixes. **Rev. Bras. de Zootecnia**, v.38, p.26-35, 2009.

DALERUM, F.; ANGERBJORN, A. Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. **Oecologia**, v.144, p.647-658. 2005.

DE NIRO, M.J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geo. et Cosm. Acta**, v.42, p.495-506. 1978.

DUFOUR, E; GERDEAUX, D. Contribution of stable isotopes to fish ecological studies. **Cybium**, v.25, n.4, p. 369-382. 2001.

FERRAZ, E. de M.; CERQUEIRA, V.R.; ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; CÂNDIDO, S. Indução da desova do robalo-peva, *Centropomus parallelus*, através de injeção e implante de LHRHa. **Bol. do Inst. de Pesca**. v.28, n.2. p.125-133. 2002.

FOCANT, B.; VANDEWALLE, P.; HURIAUX, F. Expression of myofibrillar proteins and parvalbumin isoforms during the development of a flatfish, the common sole *Solea solea* : comparison with the turbot *Scophthalmus maximus*. **Comp. Bioc. and Phys. Part B**, v.135, p.493-502, 2003.

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

GREY, J. JONES, R.I.; SLEEP, D. Seasonal changes in the importance of the sources of organic matter to the diet of zooplankton in Lock Ness, as indicated by stable isotope analysis. **Limnology and Oceanography**, v.46, n.3, p.505-513. 2001.

GRIER, H.J.; TAYLOR, R.G. Testicular maturation and regression in the common snook. **J. Fish Biol.**, 53: 521-542, 2001.

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

KOLDITZ, C.-I.; PABOEUF, P.; BORTHAIRE, M. Changes induced by dietary energy intake and divergent selection for muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), assessed by transcriptome and proteome analysis of the liver. **BMC Genomics**, v.9, p.506, 2008.

LINK, V.; CARVALHO, L.; CASTANON, I. Identification of regulators of germ layer morphogenesis using proteomics in zebrafish. **J. of Cell Science**, v.119, p.2073-2083, 2006.

MARTIN, S.A.M.; VILHELMSSON, O.; MEDALE, F. Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. **Bioc. Biop. Acta**, v.1651, p.17-29, 2003.

MENDONÇA, M.C. F. B. **Autoecologia do camorim, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792), (Peciformes: Centropomidae) em ambiente hipersalino em Galinhos, RN.** Brasil. São Carlos. UFSCar. Tese de Doutorado, 145p. 2004.

PATRONA, L. D. **Contribution à la biologie du "robalo" *Centropomus parallelus* (Pisces Centropomidae) du Sud-Est du Brésil: possibilités quacoles.** 175 f. Thèse (Doctorat de 3ème Cycle, Sciences et Techniques en Productions Animales) - Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 1984.

PETERSON, B.J.; FRY, B. Stable isotopes in ecosystem studies. **Annual Review on Ecol. and Syst.**, v.18, p.293-320. 1987.

POST, D.M. Using stable isotopes to estimate trophic position: Models, methods and assumptions. **Ecology**, v.83, n.3, p.703-718, 2002.

RIVAS, L.R. **Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*.** *Copeia*, v. 1, n. 3, p. 579-611, 1986.

ROJAS, J.C. Contribucion al conocimiento de la biologia de los robalos *Centropomus undecimalis* e *C. poeyl* em la Laguna de Terminos, Campeche, Mexico. *Bolm Inst. Oceanogr. Univ. Oriente*, n. 14, p. 51-70, 1975.

SAMPAIO, J.A de O. **Desempenho de linguados *Paralichthys orbignianus* em policultivos com tainhas *Mugil platanus* em viveiro de solo, no período de outono e inverno.** Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Aquicultura da Fundação Universidade do Rio Grande. 33p. 2008.

SAMPAIO, L.A.; BIANCHINI, A.; CERQUEIRA, V.R. Growth of juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignianus* cultured in different salinities. **J.Appl. Aquaculture**. v.11, n.1/2, p.67-75. 2001.

SILVA, S.A.A. **Dieta natural de *Brycon* sp. “Cristalino”- matrinxã no Parque Estadual Cristalino, região norte de Mato Grosso.** Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 102 p. 2007.

SOLIGO, T.A. **Primeiras experiências com a reprodução, larvicultura e desmame do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* no Brasil.** Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, 40p. 2007.

SVEINSDÓTTIR, H.; VILHELMSSON, O.; GUDMUNSDÓTTIR, Á. Proteome analysis of abundant proteins in two age groups of early Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. **Comp. Bioc. and Phys. Part D**, v.3, p.243-250, 2008.

TEIXEIRA, R.L. Distribution and feeding habits of the young common snook, *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae), in the shallow waters of a tropical Brazilian estuary. **Bol. do Museu de Biol. Mello Leitão**, Santa Teresa, 6: 35-46, 1997

TUCKER, J. W. Jr. **Marine Fish Culture.** Editora Kluwer Academic Publishers, Londres 1998, 750p.

VILHELMSSON, O.T.; MARTIN, S.A.M.; MEDALE, F. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **British Journal of Nutrition**, v.92, p.71-80, 2004.

YAMAMOTO, T.; SHIMA, T.; FURUITA, H.; SUZUKI, N. Effect of water temperature and short-term fasting on micronutrient self-selection by common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v.220, p.655-666. 2003.

WILKINS M.R., SANCHEZ J.C., GOOLEY A.A., APPEL R.D., HUMPHERY-SMITH I., HOCHSTRASSER D.F., WILLIAMS K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biot. Genetic** 13:19-50. 1996.

Capítulo 1

**Identificação alimentar do Robalo peva (*Centropomus parallelus*)
selvagem e de cativeiro, utilizando-se a técnica de isótopos estáveis de
carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$)**

IDENTIFICAÇÃO ALIMENTAR DO ROBALO PEVA (*Centropomus parallelus*) SELVAGEM E DE CATIVEIRO, UTILIZANDO-SE A TÉCNICA DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO ($\delta^{13}\text{C}$) E NITROGÊNIO ($\delta^{15}\text{N}$)

RESUMO

Informações sobre a dieta e a quantidade de carbono e nitrogênio que o animal assimila em seus tecidos através de análises de isótopos estáveis vem sendo tradicionalmente utilizados em peixes marinhos, porém para o gênero *Centropomus* há poucos estudos a respeito. Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo identificar a fonte alimentar dos animais selvagens e em cativeiro e verificar nos diferentes tecidos (músculo, osso e pele), fígado e conteúdo estomacal, qual é o mais eficiente em incorporação, através de isótopos estáveis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Comparando as amostras de músculo, osso, pele, fígado e conteúdo estomacal de *Centropomus parallelus* de ambientes coletados na natureza e em cativeiro, foi possível observar que os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ do osso, pele, fígado e conteúdo estomacal, não diferiram estatisticamente ($P>0,05$) entre os peixes de cativeiro e da natureza, apresentando médias semelhantes. O fígado e conteúdo estomacal também não diferiram ($P>0,05$) para os isótopos de $\delta^{15}\text{N}$ para ambos os locais de coletas. O músculo de *Centropomus parallelus* coletados em cativeiro mostrou-se mais rico em $\delta^{13}\text{C}$ (-21,02 ‰), quando comparados aos animais selvagens (-24,97‰) e estes apresentaram-se mais rico em $\delta^{15}\text{N}$ (12,42 ‰). Com base nestes resultados pode-se, supor que através de análises de isótopos estáveis, analisando músculo, osso, pele, fígado e conteúdo estomacal, pode-se diferenciar os peixes coletados na natureza dos animais coletados em cativeiro e que o músculo foi o tecido mais eficiente na identificação destes animais, pela variação entre os isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

Palavra-chave: músculo, pele, osso, fígado e conteúdo estomacal.

IDENTIFICATION OF FOOD fat snook (*Centropomus parallelus*) WILD AND CAPTIVITY, USING UP THE TECHNIQUE OF STABLE CARBON ISOTOPES ($\delta^{13}\text{C}$) AND NITROGEN ($\delta^{15}\text{N}$)

ABSTRACT

Information about diet and the amount of carbon and nitrogen assimilates the animal in their tissues through analysis of stable isotopes has been traditionally used in marine fish, but for the genus *Centropomus* there are few studies about it. Thus this study aimed to identify the source of food for wild animals in captivity, and check the different tissues (muscle, bone and skin), liver and stomach contents, which is more efficient at incorporation by stable isotope $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Compareid samples of muscle, bone, skin, liver and stomach contents of *Centropomus parallelus* environments collected in the wild and in captivity, we observed that the mean values of $\delta^{13}\text{C}$ bone, skin, liver and stomach contents , not statistically different ($P > 0.05$) between fish in captivity and nature, with similar means. The liver and stomach contents did not differ ($P > 0.05$) for the isotopes of $\delta^{15}\text{N}$ for both local collections. The muscle of *Centropomus parallelus* collected in captivity has proved more rich $\delta^{13}\text{C}$ (-21.02 ‰) compared to wild animals (-24.97 ‰) and these were more rich in $\delta^{15}\text{N}$ (12.42 ‰). Based on these results, we can suppose that through analysis of stable isotopes, analyzing muscle, bone, skin, liver and stomach contents, one can differentiate between fish collected from the wild animals in captivity and collected the muscle tissue was more effective in identifying these animals, the variation between the isotopes of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$.

Keyword: muscle, skin, bone, liver and stomach contents.

INTRODUÇÃO

Os robalos são espécies de interesse à aquicultura, devido as suas ótimas condições de cultivo, tais como: hábito gregário, resistência ao manejo e às variações dos parâmetros físico-químicos da água (AOKI, 1999), fácil adaptação a dietas inertes (BARBUIO, 1999) e capacidade de adaptar-se a ambientes de água doce, abrindo dessa forma novas perspectivas à aquicultura marinha.

Porém, são escassos os estudos referentes a fisiologia nutricional em robalos e em peixes marinhos (BORGES et al., 2010), sendo que este é de grande importância para saber a quantidade de nutrientes que poderemos oferecer a esses animais, para formular uma ração ideal que atinja o ótimo desenvolvimento e crescimento desses peixes, para torná-los favoráveis à produção.

De acordo com Cahu & Zambonino-Infante (2001) e Koven et al. (2001) a nutrição é considerada uma importante questão na produção da fase jovem de peixes marinhos.

Dessa forma, o conhecimento das fontes de energia utilizadas pelos peixes nas diferentes fases da vida é essencial para o estudo das relações tróficas e de seu papel no ecossistema. Compreender o que animal come e o quanto desses alimentos é assimilado em seus tecidos e órgãos (SOLIGO, 2007), para seu crescimento e o entendimento da bioecologia dos adultos (ZAVALA-CAMIN, 1996) é importante para estudos de conservação dos recursos pesqueiros, tanto para seu repovoamento, quanto para a produção em escala na aquicultura.

Em virtude da possibilidade de ocorrências de mudanças alimentares no ambiente natural, o estudo do regime alimentar de uma espécie, além de fundamental em pesquisas de auto-ecologia, informa também sobre a estrutura trófica do ecossistema no qual a espécie está inserida (BASILE-MARTINS, 1986).

De acordo com Silva (2007), quando se pretende estudar a alimentação de uma determinada espécie de peixe para sua criação racional, são necessários alguns conhecimentos básicos a respeito da sua anatomia, fisiologia, morfologia, comportamento e hábito alimentar na natureza. Entretanto, isto não tem ocorrido com as espécies de peixes marinhos, pois poucos são as informações sobre o comportamento dos *Centropomus* sp. na natureza e em cativeiro, o que tem dificultado os estudos de seu cultivo desde a fase larval até a fase adulta.

Recentemente tem sido desenvolvidos métodos de uso de isótopos estáveis para determinar a posição que uma espécie ocupa na cadeia trófica em determinado ambiente, além de poder determinar fontes alimentares dos animais (POST, 2002) e o uso desta ferramenta para o estudo de suas interações tróficas é crescente (GASTON & SUTHERS, 2004). Além disso, a relação entre os sinais isotópicos nos diferentes tecidos dos peixes de viveiro como *Sparus aurata* e *Salmo Salar* (DEMPSON & POWER, 2004; KENNEDY et al., 2005; SINNATAMBY et al., 2008) foi identificado.

Esse método, mais do que o da avaliação da dieta mediante o uso de conhecimento baseado na análise do conteúdo estomacal, revela o que o peixe tem assimilado e incorporado em sua própria constituição (BELL et al., 2007), o que torna mais definitiva sua característica nos nutrientes que retira do ambiente para sua própria vida.

Qualquer alteração da composição isotópica no tecido depende da velocidade que os constituintes da dieta serão incorporados.

Comparar exemplares provenientes de cultivo e de ambiente natural, possibilita verificar em quanto a administração de uma dieta mais artificial interfere no que o peixe realmente incorpora.

Para interpretar os dados isotópicos obtidos a partir de cada tecido, os mesmos devem ser considerados separadamente. Vários autores vêm estudando a análise de

isótopos estáveis no peixe inteiro e em diferentes tecidos como músculo (PINNEGAR et al., 2002), osso (HEDGES et al., 2004), otólitos de peixe (SOLOMON et al., 2006) e fígado (MOERI et al., 2003). Porém, estudos sobre a avaliação dos isótopos estáveis em tecidos são escassos em peixes marinhos (DEMPSON & POWER, 2004).

Alguns estudos têm mostrado que a análise da razão de isótopos estáveis pode ser uma ferramenta rápida para diferenciar os peixes selvagens de cativeiro, mesmo durante períodos de vários meses ou mais (MORRISON et al., 2007; SERRANO et al., 2007; BLANCO et al., 2009; LIMA, 2010).

O desenvolvimento de métodos de rastreabilidade para distinguir peixes da natureza e peixes de cativeiro pode ser uma excelente ferramenta de estudo, no entanto, pouco se sabe sobre a origem dos peixes de diferentes locais (TURCHINI, 2009). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar a fonte alimentar dos animais selvagens e em cativeiro e verificar nos diferentes tecidos (músculo, osso e pele), fígado e conteúdo estomacal, qual é o mais eficiente em incorporação, através de isótopos estáveis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Acondicionamento das Amostras

Foram utilizados 25 exemplares jovens de *Centropomus parallelus* com peso médio entre $157,5 \pm 110,0$ g e comprimento total de $23,6 \pm 5,6$ cm, coletados trimestralmente entre março a dezembro de 2010, no Rio São João, distrito de Barra de São João, pertencente ao Município de Casemiro de Abreu/RJ. Os peixes foram coletados com a ajuda de pescadores locais, por meio de pesca de caniço e rede de espera, com autorização do IBAMA (Anexo I).

Com o apoio técnico e logístico da Estação de Piscicultura da APTA - Pólo Regional do Vale do Ribeira, situada em Pariquera-açu/SP, foram capturados quinze exemplares de *Centropomus parallelus*, com peso médio de $268,1 \pm 183,9$ g e comprimento total de $26,9 \pm 8,8$ cm, provenientes de viveiro de terra localizado na mesma estação. Foram utilizadas para a captura, tarrafas com diferentes tamanhos de malhagens.

A alimentação dos peixes em cativeiro constituiu-se de ração comercial para peixes carnívoros, contendo 45% de PB (mín.), extrato etéreo 14% (mín.), fibra bruta 6% (máx.), cálcio 2,5% (máx.), fósforo 1% (mín.), cinzas 14% (máx.), vitamina C 300mg, com sinal isotópico de $\delta^{15}\text{N}$ 6,22‰ e $\delta^{13}\text{C}$ -23,40‰.

Os exemplares coletados foram eutanasiados por tratamento térmico em água com gelo, seguido do rompimento da coluna cervical. Após a obtenção do peso corpóreo (g) e do comprimento padrão (cm), ocorreu a imediata remoção do sistema digestório, e retirado um pedaço de 5 cm do tecido muscular (deste pedaço foi retirado a pele, músculo e osso), próximo a nadadeira caudal.

Análise de Isótopos Estáveis

A análise de isótopos estáveis de ^{13}C e ^{15}N foi realizada com medidas em espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS), no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências (CIE/IB), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu-SP. Fígado e fragmentos de mais ou menos 2 cm de cada região: músculo, pele e osso, foram secos em estufa, a 50°C, durante 48 horas.

Após serem retiradas da estufa, as amostras foram moídas em moinho criogênico (Spex 6700-230 Freezer/Mill Industries) à temperatura de -196°C, durante três minutos, em alta frequência, para a obtenção do material homogêneo de finíssima granulometria. As partículas resultantes foram então pesadas (50-60µg e 500-600µg para análise de

$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente), colocadas em cápsulas de estanho. A seguir, submetidas a combustão total sob fluxo contínuo de Hélio, a 1020°C , através do analisador elementar (EA 1108 – CHN Fisions Elemental Analyzer), acoplado ao espectrômetro de massa de razões isotópicas (Delta S - Finnigan Mat), com erro analítico de $0,2\%$ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e $0,3\%$ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$).

As razões isotópicas das amostras, analisadas em duplicata, foram expressas em delta per mil (‰) da razão isotópica da amostra em relação aos padrões internacionais Pee Dee Belemnite (PDB) e nitrogênio atmosférico (N_2) para os elementos carbono e nitrogênio, respectivamente, de acordo com a expressão:

$$\delta\text{‰ (amostra/padrão)} = [(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}})/R_{\text{padrão}}] \times 10^3$$

Onde:

R = representa a razão entre o isótopo mais pesado e o mais leve, em particular $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ da amostra e do padrão.

Análise estatística

Os resultados das composições isotópicas do músculo, pele, osso, fígado e do material do conteúdo estomacal dos exemplares de natureza e cativeiro foram analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon ($P < 0,05$). A análise dos dados foi realizada pelo aplicativo estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences versão 13.0).

RESULTADOS

Os resultados das amostras de músculo, osso, pele, fígado e conteúdo estomacal através da composição isotópica permitiram separar tanto os animais de cativeiro como os da natureza.

Os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ do osso, pele, fígado e conteúdo estomacal, não diferiram estatisticamente ($P>0,05$) entre os peixes de cativeiro e selvagens, apresentando médias semelhantes (Tabela 1). O fígado e conteúdo estomacal não diferiram estatisticamente ($P>0,05$) para os isótopos de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$, não sendo possível diferenciar a fonte de alimentação em ambos os locais de coletas.

Tabela 1. Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de músculo, osso, pele, fígado e material encontrado no estômago de robalos (*Centropomus parallelus*) coletados na natureza e cativeiro (média \pm desvio padrão).

	Natureza	Cativeiro	Natureza	Cativeiro
	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)		$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	
Músculo	-24,97 \pm 2,07 ^a	-21,02 \pm 1,44 ^b	12,42 \pm 1,68 ^a	10,04 \pm 1,14 ^b
Osso	-25,36 \pm 2,68 ^a	-23,39 \pm 2,40 ^a	12,41 \pm 0,53 ^a	9,51 \pm 1,29 ^b
Pele	-23,07 \pm 2,40 ^a	-22,39 \pm 2,32 ^a	11,98 \pm 1,64 ^a	9,69 \pm 2,12 ^b
Fígado	-26,62 \pm 2,70 ^a	-25,57 \pm 2,40 ^a	10,31 \pm 3,10 ^a	11,88 \pm 1,94 ^a
Conteúdo Estomacal	-23,67 \pm 1,34 ^a	-23,33 \pm 0,37 ^a	9,83 \pm 1,10 ^a	8,84 \pm 2,53 ^a

Médias seguidas da mesma letra na linha nas diferentes colunas não diferem estatisticamente ($P>0,05$).

O músculo de *Centropomus parallelus* coletados em cativeiro mostrou-se mais rico em $\delta^{13}\text{C}$ (-21,02 ‰), quando comparados aos animais da natureza (-24,97‰) e os animais coletados na natureza apresentaram-se mais rico em $\delta^{15}\text{N}$ para músculo (12,42‰).

Os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ variaram entre músculo, o osso e pele e nos diferentes locais de coletas ($P<0,05$). Os robalos peva coletados na natureza

apresentaram-se mais ricos em ^{15}N para os três tecidos estudados, sendo o músculo e o osso o mais enriquecido (Fig. 1).

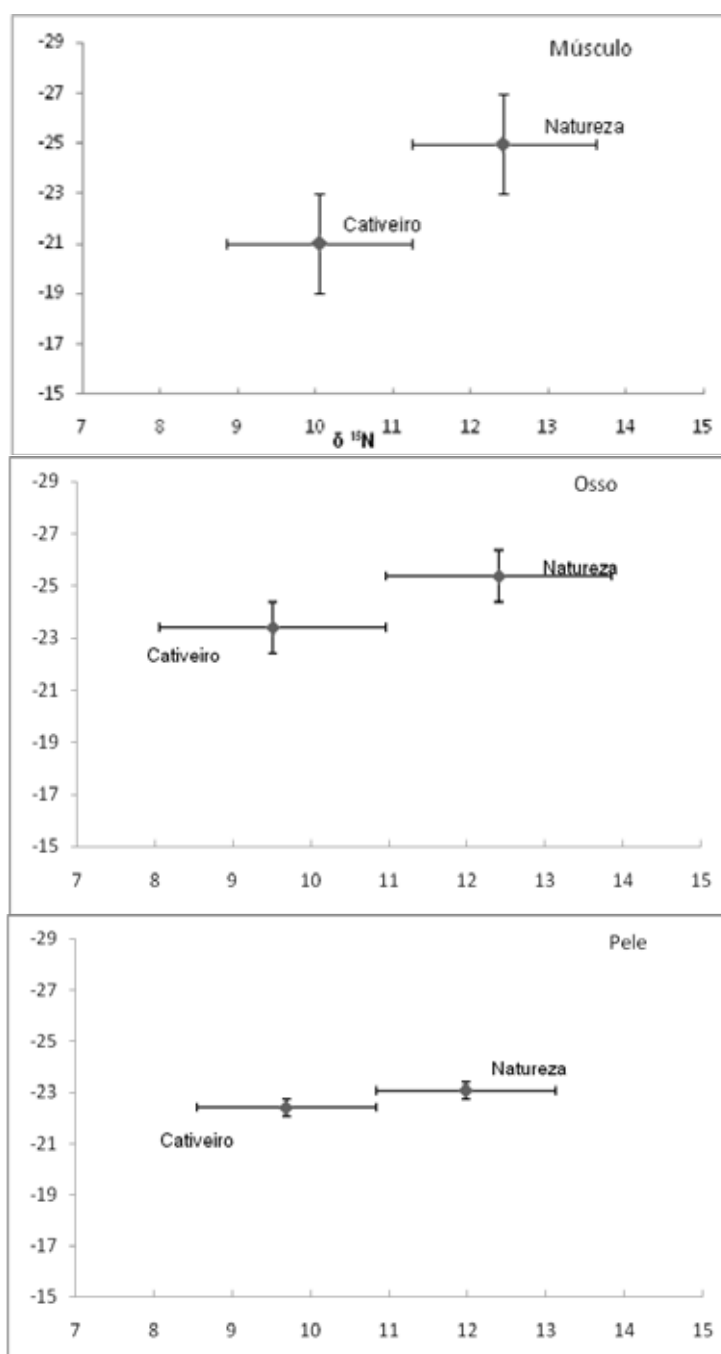


Figura 1. Regiões definidas a partir de valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ referentes: músculo, osso e pele de *Centropomus parallelus* criados em cativeiro e coletados na natureza.

DISCUSSÃO

Através das análises foi possível separar dois grupos com valores isotópicos distintos, caracterizando tanto os animais de cativeiro como os selvagens. Serrano et al. (2007) trabalhando com peixes selvagens e de cativeiro de dourada (*Sparus aurata*) conseguiram fazer a distinção entre peixes selvagens e de aquicultura, analisando vários tecidos (músculo, fígado, brânquias e gônadas), para valores tanto de $\delta^{13}\text{C}$ quanto de $\delta^{15}\text{N}$, como observado no presente trabalho para $\delta^{13}\text{C}$, músculo, e $\delta^{15}\text{N}$, músculo, osso e pele.

Comparando os valores de $\delta^{13}\text{C}$ com os de $\delta^{15}\text{N}$ de todos os tecidos, verifica-se que o nitrogênio é mais decisivo na definição dessas regiões para os animais selvagens. Isso era esperado, devido a posição trófica que esses peixes ocupam (carnívoros). A composição isotópica ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$) no tecido animal varia de acordo com a sua dieta, ou seja, depende da sazonalidade e dos locais onde os animais exploram suas fontes (SMITH et al., 1996).

No presente trabalho observou-se que as espécies coletadas na natureza apresentaram-se mais ricas em $\delta^{15}\text{N}$ para músculo, osso e pele e para as espécies em cativeiro mais pobre em $\delta^{13}\text{C}$ (-21,02 ‰) para o músculo, sugerindo que é possível observar diferenças entre as fontes alimentares nos dois ambientes de coletas. Bell et al. (2007) diferenciou os robalos europeu (*Dicentrarchus labrax*) selvagens dos cultivados através da análise de isótopos estáveis no músculo, também observou essa diferenciação.

Na natureza, os peixes são oportunistas e se alimentam das fontes energéticas disponíveis no local, enquanto que no cativeiro os peixes recebem fontes alimentares específicas. No caso do presente estudo os animais foram alimentados com ração comercial, a base de 45% de PB, com sinal isotópico de $\delta^{15}\text{N}$ 6,22‰ e $\delta^{13}\text{C}$ -23,40‰.

Diferentes tecidos podem refletir a composição isotópica de diferentes constituintes da dieta. Pele e osso estão relacionados com a atividade metabólica mais lenta, enquanto que o músculo é de maior atividade metabólica. No presente estudo observou-se que o músculo dos animais coletados na natureza e de cativeiro, é o tecido mais pobre em ^{13}C , considerado tecido de alta atividade metabólica. Resultados que diferiram dos demais autores: Blanco et al. (2009) analisaram escamas e músculo em três espécies de peixes do Mar Mediterrâneo e verificaram que a escama, tecido de menor atividade metabólica era mais rica em ^{13}C que o músculo de maior atividade metabólica. Lima (2010) analisando pele, músculo e osso, verificou que osso, seguido de pele é mais enriquecido em $\delta^{13}\text{C}$ que o músculo.

Observando a composição isotópica, os robalos peva da natureza apresentaram-se mais ricos em $\delta^{15}\text{N}$ que os animais de cativeiro, podendo separar os dois locais de coleta. Lima (2010) através de análise de $\delta^{15}\text{N}$ mostrou que através dos tecidos de pele, músculo e osso foi possível identificar e separar os dois tipos de bacalhau (do Atlântico e do Pacífico) dos demais peixes salgados. Turchini et al., (2009), observaram através da análise de isótopos estáveis diferenças entre bacalhau (Murray Cod) de cativeiro com o da natureza, Freddy (2008) estudando *Salmo salar* também verificou diferenças entre animais de cativeiro e da natureza através de análise de $\delta^{15}\text{N}$. A composição isotópica dos peixes analisados neste estudo refletem as variações naturais dos isótopos estáveis nos diferentes locais de coleta.

CONCLUSÃO

O músculo de *Centropomus parallelus* coletados em cativeiro mostrou-se mais rico em $\delta^{13}\text{C}$ (-21,02 ‰) e os animais coletados na natureza apresentou-se mais rico em $\delta^{15}\text{N}$ (12,42 ‰).

O músculo, pele e osso mostraram ricos em $\delta^{15}\text{N}$ para animais coletados na natureza.

O músculo foi o tecido que permitiu identificar e separar os animais selvagens e cativoiro.

REFERÊNCIAS

AOKI, P. C. M. **Tolerância térmica de juvenis de robalos *centropomus parallelus* poey, 1860 (pisces: centropomidae) em água doce.** 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Curso de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Espírito Santo, 1999.

BARBUIO, M. A. T. **Comparação do crescimento e composição corporal do robalo *centropomus parallelus* (poey, 1860) alimentados com uma dieta comercial e dietas experimentais seca e semi-úmida.** 1999, 57f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) Curso de Pós-graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BASILE-MARTINS, M.A. Alimentação do mandi, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Pimelodidae) de trechos do rio Jaguari e Piracicaba, São Paulo – Brasil. **Bol. do Ins. de Pesca**, v. 13, n. 1, p. 17- 29, 1986.

BELL, J.G.; PRESTON, T; HENDERSON, R.J.; STRACHAN, F.; BRON, J.E.; COOPER, K.; MORRISON, D.J. Discrimination of wild and cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using chemical and isotopic analyses. **J. of Agr. and Food Chemistry**, v. 55, p. 5934-5941, 2007.

BORGES, J.C.S.; PRESSINOTTI, L.N.; GOMES, V.; SILVA, J.M.C. Lipidic and proteic absorption in digestive tract of tropical fat snook (*Centropomus parallelus*, POEY 1860). **J. of Exp. Marine Biology and Ecology**. n. 386, p. 39–44, 2010.

BLANCO, A.; DEUDERO, S.; BOX, A. Muscle and scale isotopic offset of three fish species in the Mediterranean Sea: *Dentex dentex*, *Argyrosomus regius* and *Xyrichtys novacula*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 2321-2328, 2009.

CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, n.200, p.161-180, 2001.

DEMPSON, J.B.; POWER, M. Use of stable isotopes to distinguish farmed from wild Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 13, p. 176-184, 2004.

GASTON, T.F.; SUTHERS, I.M. Spatial variation in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of liver, muscle and bone in a rocky reef planktivorous fish: the relative contribution of sewage. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 304, p. 17-33, 2004.

HEDGES, R.E.M.; STEVENS, R.E.; RICHARDS, M.P. Bone as a stable isotope archive for local climatic information. **Quaternary Science Reviews**, v. 23, p. 959-965, 2004.

KENNEDY, B.P.; CHAMBERLAIN, C.P.; BLUM, J.D.; NISLOW, K.H.; FOLT, C.L. Comparing naturally occurring stable isotopes of nitrogen, carbon, and strontium as markers for the rearing locations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, n. 62, p. 48-57, 2005.

KOVEN, W.; KOLKOVSKI, S.; HADAS, H.; GAMSEZ, A.; TANGLES, A. Advances in development of microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata*: a review. **Aquaculture**, n.194, p.107-121, 2001.

LIMA, E.J.V.M.O. **Utilização de Isótopos Estáveis de ^{13}C e ^{15}N na identificação do bacalhau *Gadus* e outras espécies de peixes salgados**. 2010. 59 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal/SP. 2010.

MOERI, O.; STERNBERG, L.S.L.; RODICIO, L.P.; WALSH, P.J. Direct effects of ambient ammonia on the nitrogen isotope ratios of fish tissues. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 282, p. 61-66, 2003.

MORRISON, D.J.; PRESTON, T.; BRON, J.E.; HEMDERSON, R.J.; COOPER, K.; STRACHAN, F.; BELL, J.G. Authenticating production origin of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by chemical and isotopic fingerprinting. **Lipids**, v. 42, n. 6, p. 537-545, 2007.

PINNEGAR, J.K.; JENNINGS, S.; O'BRIEN, C.M.; POLUNIN, N.V.C. Long-term changes in the trophic level of the Celtic Sea fish community and fish market price distribution. **Journal of Applied Ecology**, v. 39, p. 377–390, 2002.

POST, D.M. Using stable isotopes to estimate trophic position: Models, methods and assumptions. **Ecology**, v.83, n.3, p.703-718, 2002.

SERRANO, R.; BLANES, M.A.; ORERO, L. Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues from the western Mediterranean. **Chemosphere**, v. 69, n. 7, p. 1075-1080, 2007.

SILVA, S.A.A. **Dieta natural de *Brycon* sp. “Cristalino”- matrinxã no Parque Estadual Cristalino, região norte de Mato Grosso**. 2007. 102p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

SINNATAMBY, R.N.; DEMPSON, J.B.; MICHAEL, P. A comparison of muscle- and scale-derived $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ across three life-history stages of Atlantic salmon, *Salmo salar*. **M. Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, n. 18.,v.22, p. 2773-2778, 2008.

SOLIGO, T.A. **Primeiras experiências com a reprodução, larvicultura e desmame do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* no Brasil**. 2007. 40p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, 2007.

SOLOMON, C.T.; WEBER, P.K.; CECH, J.J. Jr.; INGRAM, B.L.; CONRAD, M. E.; MACHAVARAM, M.V.; POGODINA, A.R.; FRANKLIN, R.L. Experimental

determination of the sources of otolith carbon and associated isotopic fractionation. **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, n. 63, p. 79 – 89, 2006.

ZAVALA-CAMIN, L.A. **Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes**. Maringá: Eduem, 1996.

Capítulo 2

Análise da expressão de proteínas hepáticas de *Centropomus undecimalis* mediante a variação nutricional

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HEPÁTICAS DE *Centropomus undecimalis* MEDIANTE A VARIAÇÃO NUTRICIONAL

RESUMO

A proteômica é uma ferramenta valiosa para a investigação da fisiologia, nutrição e patologia de peixes. Devido a escassez de estudo de proteômica no fígado de peixes marinhos e havendo o interesse de produção dos robalos (*Centropomus undecimalis*) em cativeiro, o presente trabalho teve o objetivo de verificar, através de proteômica, quais as proteínas presentes no fígado são expressas na alteração da dieta de *Centropomus undecimalis* que estão no ambiente natural e em cativeiro. As proteínas expressas em indivíduos coletados em cativeiro estavam na faixa de 12 a 25kDa variando pI de 4,56 a 7,96 e para indivíduos coletados na natureza, na faixa de 12 a 23kDa e pI de 5,21 a 6,45. A expressão de proteínas variou conforme a dieta de *Centropomus undecimalis* nos diferentes locais de coletas. Foram detectados 26 spots para os robalos cultivados em cativeiro e 32 spots para indivíduos coletados na natureza. Alterações na dieta indicam alterações na expressão de proteínas no fígado ligado ao metabolismo de robalo flecha.

Palavras-chave: expressão de proteínas, nutrição, fisiologia

ANALYSIS OF EXPRESSION OF PROTEIN LIVER *Centropomus undecimalis* THROUGH NUTRITIONAL VARIATION

ABSTRACT

Proteomics is a valuable tool for investigating the physiology, pathology and nutrition of fish. Due to shortages in the liver proteome study of marine fish and having the interest of producing snook (*Centropomus undecimalis*) in captivity, this study aimed to verify by proteomics, the proteins which are expressed in the liver change diet *Centropomus undecimalis* that are in the wild and in captivity. The expressed protein in individuals collected in captivity were in the range of 12 to 25kDa pI ranging from 4.56 to 7.96, and for individuals collected in nature, ranging from 12 to 23kDa and pI 5.21 to 6.45. The expression of proteins varied according to diet *Centropomus undecimalis* in different places of collection. We detected 26 spots for snook reared in captivity and 32 spots for individuals collected in nature. Changes in diet indicate changes in protein expression in the liver involved in the metabolism of bass arrow.

Keywords: protein expression, nutrition, physiology

INTRODUÇÃO

A utilização da proteômica em tecidos e órgãos de peixes é uma ferramenta nova, ainda mais se tratando em análises nutricionais em peixes marinhos.

O proteoma representa o conjunto de proteínas de uma célula em um organismo e vem sendo utilizado para determinar quantitativamente as condições ambientais ao qual o peixe está submetido e verificar na sua dieta, quais proteínas são expressas (PIÑEIRO et al., 2003).

A proteômica é uma ferramenta valiosa para a investigação da fisiologia, nutrição e patologia de peixes (LU et al., 2010).

Recentes avanços na eletroforese bidimensional de espectrometria de massa, e bioinformática têm melhorado significativamente as possibilidades para o mapeamento e caracterização de proteínas em fígado e tecido de peixes. Tal técnica permite a separação de proteínas baseadas em seus pontos isoelétricos e massas moleculares, e permite uma maior sensibilidade e visualização de mudanças na abundância de proteína em amostras diferentes (BRUNT et al, 2008, CHEN & HUANG, 2011).

Alterações no proteoma hepática foram mostrados em truta arco-íris, devido ao estado de alimentação (MARTIN et al., 2001) e ingredientes da dieta (MARTIN et al., 2003; VILHELMSSON et al., 2004). Nos dois últimos estudos, até alterações de 10 vezes na abundância de proteína foram observadas como resultado da inclusão de proteínas vegetais na dieta. Addis et al. (2010) analisou a proteína no músculo de dourada (*Sparus aurata*) cultivados em gaiolas flutuantes.

Devido a escassez de estudo de proteômica no fígado de peixes marinhos e havendo o interesse de produção dos robalos (*Centropomus undecimalis*) em cativeiro, o presente trabalho teve o objetivo de verificar, através de proteômica, quais as

proteínas presentes no fígado são expressas na alteração da dieta de *Centropomus undecimalis* selvagens e cativoiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Acondicionamento das Amostras

Foram coletados 3 exemplares jovens de *Centropomus undecimalis* com peso médio entre $157,5 \pm 110,0$ g e comprimento total de $23,6 \pm 5,6$ cm, coletados trimestralmente entre março a dezembro de 2010, no Rio São João, distrito de Barra de São João, pertencente ao Município de Casemiro de Abreu/RJ. Os peixes foram coletados com a ajuda de pescadores locais, por meio de pesca de caniço e rede de espera, com autorização do IBAMA (Anexo I).

Com o apoio técnico e logístico do Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), situada em Florianópolis/SC, de cada local foram capturados 3 exemplares de *Centropomus undecimalis*, com peso médio de $92,0 \pm 24,1$ g e comprimento total de $23,0 \pm 2,0$ cm. Foram utilizadas para a captura, rede com diferentes tamanhos de malhagem.

A alimentação dos peixes em cativoiro constituiu-se de ração comercial para peixes carnívoros, contendo 45% de PB (mín.), extrato etéreo 14% (mín.), fibra bruta 6% (máx.), cálcio 2,5% (máx.), fósforo 1% (mín.), cinzas 14% (máx.), vitamina C 300 mg.

Os exemplares coletados foram eutanasiados por tratamento térmico em água com gelo, seguido do rompimento da coluna cervical. Após a obtenção do peso corpóreo (g) e do comprimento padrão (cm), ocorreu a imediata remoção do fígado, para posterior análise.

Análise de Proteômica

Após coleta, amostras de fígados foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido, para posterior análise. As análises de proteômica foram realizadas no Laboratório de Química Analítica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NUPEM/UFRJ), campus de Macaé. Para descrevermos o perfil eletroforético das proteínas encontradas no fígado dos peixes selvagens e em cativeiro, foram realizados testes de eletroforese bidimensional com fígado de *Centropomus undecimalis*. Para análise de proteômica foram utilizados três indivíduos de *Centropomus undecimalis* de cada local, escolhidos aleatoriamente. O protocolo de extração de proteína seguiu a metodologia segundo Martin et al. (2001). O fígado foi congelado em nitrogênio líquido e foi macerado até se tornar um pó fino. As proteínas foram extraídas em um tampão de extração contendo 8M de uréia, chaps 4%, DTT 20 mM e IPG Buffer 0,5%. O material foi centrifugado a 4 °C, 50.000 X g por 20 min. O sobrenadante foi submetido a eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão, as proteínas extraídas do fígado foram submetidas à focalização isoeletrica em tiras de gel pré imobilizadas em um gradiente de pH de 4 -7, atingindo 35.000 Vh. Na segunda dimensão as tiras de gel foram aplicadas em um SDS – PAGE, 7,5% com padrão comercial de proteínas conhecidas a 40 mA, 250V durante 2h e aplicadas em um gel pré-fabricado de acrilamida, homogêneo na concentração de 12,5%. O gel foi revelado com nitrato de prata e posteriormente digitalizado. Foram analisados a massa molecular e o ponto isoeletrico dessas proteínas com auxílio do software, Imagem Master 2D Platinun versão 7 (versão free 30 dias).

RESULTADOS

A expressão de proteínas variou conforme a ração e a dieta natural de *Centropomus undecimalis* nos diferentes locais de coletas. Foram detectados 26 spots para os robalos cultivados em cativeiro e 32 spots para indivíduos selvagens. A região marcada indica a expressão de 10 spots dos robalos em cativeiro (spots de 1 a 8, 25 e 26) (Fig. 1).

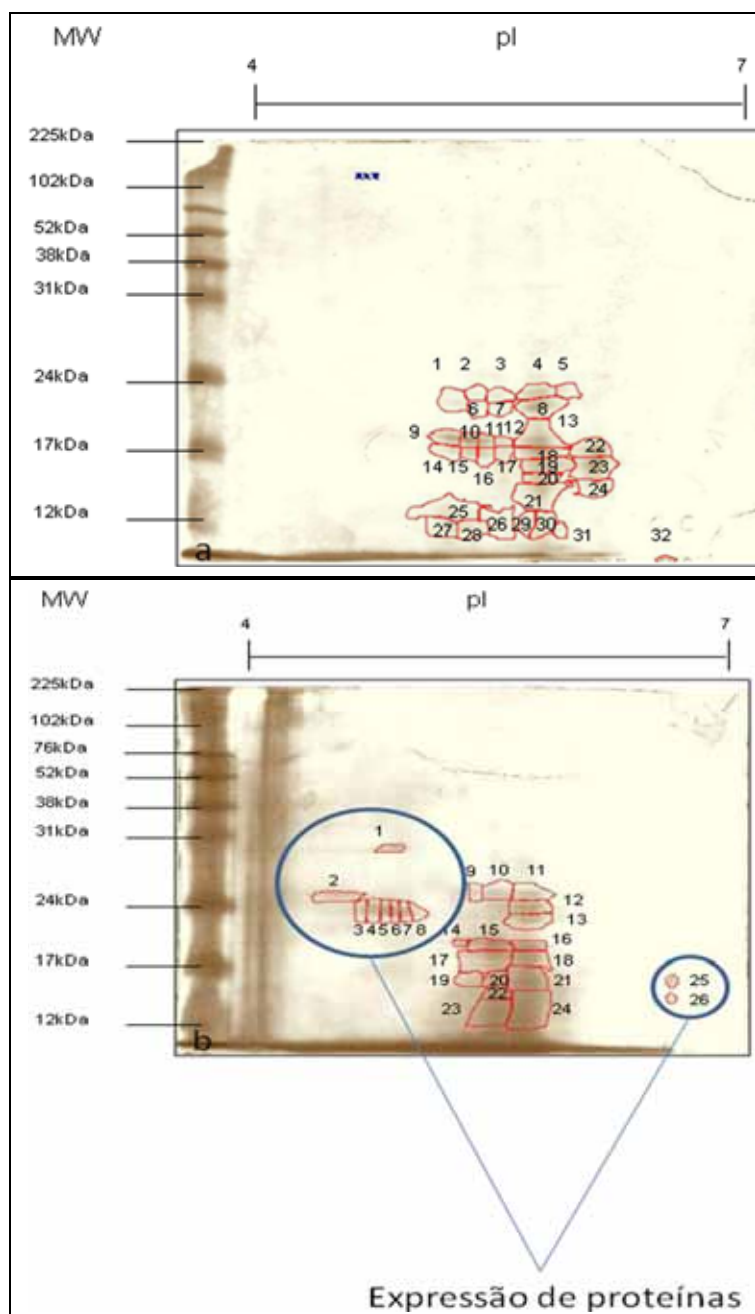


Fig. 1. Gel de eletroforese bidimensional (2D) de amostras de fígado extraídos do robalo flecha (*Centropomus undecimalis*). a) Robalo flecha coletado na natureza; b) robalo flecha cultivado em cativeiro. Marcadores de peso molecular são relatados à esquerda (MW) e peso isoelétrico, acima (pI).

O número de spots identificados no robalo peva selvagem é maior que o indivíduo cultivado em cativeiro, indicando que algumas proteínas deixaram de ser expressas neste indivíduo (apolipoproteínas (Apo A1-1 e A1-2)). As proteínas expressas em indivíduo coletados em cativeiro estavam na faixa de 12 a 25kDa variando pI de 4,56 a 7,96 e para indivíduos selvagens, na faixa de 12 a 23kDa e pI de 5,21 a 6,45 (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos spots encontrados em fígado de robalo peva (*Centropomus undecimalis*), com seus pesos isoelétricos (pI) e peso molecular (MW em kDa).

Robalo flecha (<i>Centropomus undecimalis</i>) Selvagens			Robalo flecha (<i>Centropomus undecimalis</i>) Cativeiro		
Spot	pI	MW (kDa)	Spot	pI	MW (kDa)
1	5,71	23	1	5,23	22
2	4,56	25	2	5,35	22
3	4,7	24	3	5,48	22
4	4,78	24	4	5,72	23
5	4,85	24	5	5,87	23
6	4,91	23	6	5,36	21
7	7,96	23	7	5,5	21
8	5,72	19	8	5,73	21
9	5,39	25	9	5,2	19
10	5,5	25	10	4,31	18
11	5,73	25	11	5,41	18
12	5,71	24	12	5,5	18
13	6,08	18	13	5,72	19
14	4,3	20	14	5,21	18
15	5,48	20	15	5,32	17
16	6,06	16	16	5,4	17
17	5,5	19	17	5,52	18
18	5,72	18	18	5,72	17
19	5,73	15	19	5,76	16
20	5,52	16	20	5,73	15
21	5,84	12	21	5,74	15
22	5,51	15	22	6,08	18
23	5,73	12	23	6,06	16
24	5,69	12	24	6,08	15
25	6,45	12	25	5,19	13
26	6,57	14	26	5,49	12
			27	5,19	12
			28	5,3	12
			29	5,65	13
			30	5,73	12
			31	5,84	12
			32	6,45	12

DISCUSSÃO

Recentes avanços na eletroforese bidimensional de espectrometria de massa e bioinformática têm melhorado significativamente as possibilidades para o mapeamento e caracterização de proteínas nas populações de peixes. Neste estudo, utilizou-se abordagem proteômica para a análise de proteínas expressas no fígado de *Centropomus undecimalis* (Robalo flecha) coletados na natureza e em cativeiro, durante a fase jovem.

No spot de 1 a 8 observa-se que as proteínas expressas em indivíduos coletados em cativeiro estavam na faixa de 19 a 25kDa variando pI de 4,56 a 7,96, podendo indicar que são proteínas NADH desidrogenase e distrofina Dp 260-1 que foram expressas no robalo peva. De acordo com Brunt et al. (2008) essa faixa molecular, indica a presença dessas proteínas no fígado.

Nos spots 25 e 26 observa-se proteínas expressas com peso molecular na faixa de 12 e 14 kDa e pI 6,45 e 6,57, respectivamente. Segundo Brunt et al.(2008) essa é a cadeia IV beta hemoglobina, porém não há dados disponíveis sobre a função desta proteína.

Os spots de 1 a 3, observados nos robalos flecha coletados na natureza, são duas proteínas relevantes no metabolismo dos peixes e que deixaram de ser expressas em robalos peva coletados em cativeiro, de acordo com o peso molecular apresentado no presente trabalho. Quando comparamos nossos resultados com o trabalho de Brunt et al. (2008), verificamos que esses dois spots podem ser proteínas denominadas como apolipoproteínas AI-1 e AI-2.

As apolipoproteínas exercem várias funções fisiológicas, além de solubilizar os lipídios circulantes, agem como co-fatores de enzimas ou ligantes de receptores na superfície celular. A proteína e os lipídios são nutrientes importantes na mobilização e

formação de tecido corporal, sendo os principais responsáveis pelo crescimento e ganho de peso nos peixes carnívoros (CYRINO et al., 2000).

Altos níveis de proteína geralmente causam um desbalanço na relação energia:proteína nas dietas, fazendo com que os peixes supram suas necessidades em energia a partir da elevação do consumo de alimento, piorando a conversão alimentar e reduzindo o ritmo de ganho de peso, com sérios prejuízos aos resultados. As reservas energéticas dos peixes são geralmente representadas por um acúmulo de gordura visceral.

Tais reservas em peixes não sexualmente maduros podem acontecer como acúmulo de gordura muscular, e são necessárias para crescimento e como reserva energética para o período de falta de alimento ou anorexia de inverno (WICKER & JOHNSON, 1987).

Segundo Da Silva et al. (2005), analisando soro de sangue de peixe parasitado, a ausência da apolipoproteína Apo A1-1, indica alteração no metabolismo de lipoproteínas acompanhado pelo acúmulo de gordura visceral no peritônio, como observado no presente estudo, no qual o robalo de cativo observou-se grande quantidade de gordura visceral.

A apolipoproteína Ap-1 e Ap-2 é encontrada como constituintes da HDL que participam no transporte de colesterol, este é o precursor dos hormônios ligados a reprodução, tais como estradiol e testosterona. Os animais que investem energia em crescimento deixam de investir em reprodução e vice-versa, modulando dessa forma sua fisiologia reprodutiva.

Deste modo, pesquisas sobre quais proteínas são expressas nas diferentes dietas para peixes marinhos são oportunas e necessárias, para se ter uma base na relação de proteína necessária para a formulação de uma ração específica para esta espécie.

CONCLUSÃO

Alterações na dieta indicam alterações na expressão de proteínas no fígado ligado ao metabolismo de robalo flecha.

REFERÊNCIAS

ADDIS, M.F.; CAPPUCINELLI, R.; TEDDE, V.; PAGNOZZI, D.; PORCU, M.C.; BONAGLINI, E.; Roggio, T.; Uzzau, S. Proteomic analysis of muscle tissue from gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) farmed in offshore floating cages. **Aquacult.** n. 309, p. 245–252. 2010.

BRUNT, J.; HANSEN, R.; JAMIESON, D.J.; AUSTIN, B. Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) serum after administration of probiotics in diets. **Vet. Immun. and Immunop.** n. 121, p. 199–205. 2008.

CHEN, H.B.; HUANG, H.Q. Proteomic analysis of methyl parathion-responsive proteins in *Sparus latus* liver. **Fish and Shellfish Immunol.** p. 1-7, Article in Press. 2011.

CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L; MARTINO, R.C. Retenção de proteína e energia em juvenis de "black bass" *micropterus salmoides*. **Sci. agric.** v. 57, n.4, 2000.

DA SILVA, L. GOMES ; AZEVEDO, J. S. ; SILVA-NETO, M. A. ; LIMA, N. R. DANSA-PETRETSKI, M. Effect of parasitism on plasma sex-specific proteins in *Cyphocarax gilbert* (Teleost, Curimatidae). **Parasit.**, v. 130, p. 653-659, 2005.

LU, X. J.; CHEN, J.; HUANG, Z. A.; SHI, Y. H.; WANG, F. Proteomic analysis on the alteration of protein expression in gills of ayu (*Plecoglossus altivelis*) associated with salinity change. **Comp. Bioch. and Physiol**, Part D. Article in Press. 2010.

MARTIN, S.A.M.; CASH, P.; BLANEY, S., HOULIHAN, D. F. Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation. **Fish Physiol Biochem** . n. 24, p. 259–270. 2001.

MARTIN, S. A. M.; VILHELMSSON, O.; MÉDALE, F.; WATT, P.; KAUSHIK, S.; HOULIHAN, D.F. Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. **Biochim Biophys Acta**. n. 165, p. 17–29. 2003.

PIÑEIRO, C.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; VAZQUEZ, A.; FIQUEIRAS, A.; GALLARDO, J.M. Proteomics as a tool for the investigation of seafood and other marine products. **J. of Proteome Research**, v.2, v.2, p.127-135, 2003.

VILHELMSSON, O. T.; MARTIN, S.A.M.; MÉDALE, F.; KAUSHIK, S. J. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Br J Nutr**, n. 92, p. 71–80. 2004.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SISTEMA

DIGESTÓRIO DE *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) e *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792)

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SISTEMA DIGESTÓRIO DE *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) e *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792)

RESUMO

Os robalos apresentam distribuição restrita as Américas e das doze espécies existentes, *Centropomus undecimalis* (robalo flecha) e *Centropomus parallelus* (robalo peva) são as mais comuns no Brasil. Embora esses peixes se apresente como adequado para o cultivo, ainda não obteve êxito neste ramo. Alguns autores atribuem esse insucesso devido ao escasso conhecimento sobre o desenvolvimento morfológico e funcional do sistema digestório, assim como o desconhecimento das exigências nutricionais da espécie. Este trabalho visa a caracterização histológica do tubo digestório como base para estudos histofisiológicos relacionados às necessidades nutricionais deste peixe. Observa-se que houve diferença na tonalidade das secreções entre as regiões do tubo, pois em cada localidade há estruturas particulares que desempenham funções específicas. No esôfago, as células mucosas, presentes no epitélio coraram-se positivamente tanto em PAS como em AB. No estômago, as células superficiais e mucosas presentes no epitélio e na lâmina própria respectivamente, apresentaram reações positivas em PAS e negativa em AB. As glândulas gástricas não apresentaram reação para ambas as técnicas. Células caliciformes presentes no intestino apresentaram similaridade na proporção entre os mucos sendo positivos tanto em PAS como em AB, com a ressalva de que nos intestinos médio e distal uma maior concentração destas foi encontrada, resultando em uma quantidade maior de secreções em comparação ao intestino proximal. No esôfago a reação positiva para ambas as técnicas, pode estar relacionado com a proteção do órgão contra lesões causadas pelo atrito do alimento, o que é de extrema importância para o robalo que se alimenta basicamente de presa viva. A secreção ácida pode auxiliar na aglutinação, agregando partículas de alimento e auxiliando sua passagem pelo trato. No estômago as células superficiais coradas positivamente em PAS indicam proteção a parede do órgão. Já as glândulas gástricas, caracterizam-se pelo processo digestivo intensivo, seu produto de secreção é provavelmente ácido e pepsinogênio, porém as técnicas não coraram o citoplasma dessas células. No intestino a reação positiva das células caliciformes, tanto em PAS como em AB principalmente nas regiões medial e distal pode estar relacionado com a lubrificação do tubo digestivo contra o atrito do bolo alimentar já desidratado

nessas regiões. Através dos resultados observados, conclui-se que o *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis* exibem as principais características do trato digestório de peixes carnívoros, como um estômago bem desenvolvido e um intestino relativamente curto. E estes resultados darão subsídios para futuros estudos sobre mecanismos da fisiologia digestiva e absorptiva desta espécie.

Palavras chaves: Ácido periódico-reativo de Schiff, Alcian Blue, esôfago, estômago, intestino.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF DIGESTIVE SYSTEM
Centropomus parallelus (Poey, 1860) and *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792)

ABSTRACT

The snook have restricted distribution in the Americas and the twelve existing species, *Centropomus undecimalis* (bass arrow) and *Centropomus parallelus* (fat snook) are most common in Brazil. Although these fish presents itself as suitable for farming has not succeeded in this branch. Some authors attribute this failure due to limited knowledge about the morphologic and functional development of the digestive system, as well as ignorance of the nutritional requirements of the species. This work aims to characterize the histology of the digestive tract as the basis for studies Histophysiological related to the nutritional needs of this fish. It is observed that there was a difference in tone between the regions of secretions from the tube, because in each locality for particular structures that perform specific functions. In the esophagus, the mucous cells present in the epithelium stained positively in both PAS and AB. In the stomach, and mucous surface cells present in the epithelium and lamina own, respectively, showed positive reactions to PAS and AB negative. The gastric glands showed no reaction to both techniques. Goblet cells in the intestine showed similarity in the ratio of the mucus was positive in both PAS and AB, with the exception that the middle and distal intestine in a higher concentration of these was found, resulting in an increased amount of secretions in comparison to the proximal intestine. In the esophagus positive reaction to both techniques, may be related to protecting the body against damage caused by the friction of food, which is of extreme importance for the bass that eat mostly live prey. Acid secretion may help in assemblage, adding particles of food and helping their passage through the tract. In the stomach surface cells positively stained in PAS indicate the protection wall of the organ. Since the gastric glands, characterized by intensive digestive process, your product is probably secretion and pepsinogen, but the techniques were not stained the cytoplasm of these cells. Positive reaction in the intestine, goblet cells, both PAS and AB mainly in medial and distal regions may be related to the lubrication of the gut against the friction of the bolus already dehydrated in these regions. Through the observed results, we conclude that the *Centropomus parallelus* and *Centropomus undecimalis* and exhibit the main features of the digestive tract of carnivorous fish, like a well-developed stomach and a relatively

short intestine. And these results will provide insights for future studies on mechanisms of digestive and absorptive physiology of this species.

Keywords: Periodic acid-Schiff, Alcian Blue, esophagus, stomach, intestine.

INTRODUÇÃO

Os robalos pevas e flechas (*Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis*, respectivamente) são peixes eurihalinos, carnívoros (alimentam-se de peixes, camarões e pequenos crustáceos na fase jovem e adulta), e oportunistas, se alimentando do que estiver disponível no ambiente em que se encontra. Pertencem à família Centropomidae, com ampla distribuição desde o sul da Flórida (Golfo do México) até o sul do Brasil (Rio Grande do Sul) (CERQUEIRA, 2005).

Os peixes adultos reproduzem preferencialmente na boca de rios e estuários e os indivíduos jovens se beneficiam das águas ricas dos manguezais e regiões estuarinas para se desenvolverem (TAYLOR et al., 2000, MENDONÇA, 2004). É um peixe que se adapta muito bem ao cativeiro, tanto os jovens quanto os adultos são muito resistentes às manipulações e variações dos parâmetros físico-químicos da água (PATRONA, 1984), além de aceitarem bem o consumo de rações.

O robalo é uma espécie de reconhecida importância ecológica e com um elevado potencial econômico na pesca artesanal, esportiva e na aquicultura (SOLIGO, 2007). Sua carne é considerada de alta qualidade organoléptica, o que lhes confere alto valor de mercado (CERQUEIRA, 2005). Devido ao seu alto valor comercial, indivíduos desta espécie estão sendo intensamente capturados, diminuindo, dessa forma, seus estoques em ambientes naturais (ALIAUME et al., 2000).

Portanto, é importante realizar pesquisas sobre o desenvolvimento morfofisiológico do sistema digestório dos peixes, para obter um conhecimento a respeito da sua dieta e produzi-lo na aquicultura.

Mendoza (1996) atribui o limitado êxito do cultivo intensivo de várias espécies de peixes ao escasso conhecimento sobre o desenvolvimento morfológico e funcional do sistema digestório, assim como ao desconhecimento das exigências nutricionais.

Dessa forma, estudos histológicos em peixes tem sido uma ferramenta que vem fornecendo inúmeras informações a respeito do trato gastrointestinal (CAL, 2006), e o conhecimento das características morfológicas, aliada ao conhecimento dos hábitos alimentares é essencial para a compreensão da fisiologia nutricional da espécie, podendo-se inferir as funções dos mesmos e determinar os processos de absorção dos nutrientes (SANTOS et al., 2007; BORGES et al., 2010), auxiliando, dessa forma, no planejamento de dietas adequadas para a criação e manejo de animais com potencial para piscicultura.

Além dos estudos histológicos, os estudos histoquímicos, que vem sendo realizados no sistema digestório dos peixes verificam a concentração de glicoproteínas produzidas pelas células dos mesmos, o que auxilia na compreensão de seu funcionamento.

Borges et al. (2010) realizando análises histológicas e histoquímicas, avaliaram a absorção de lipídios e proteínas no sistema digestório de *Centropomus parallelus*, porém trabalhos sobre morfologia, histologia, histoquímica e histofisiologia do sistema digestório de *Centropomus* são escassos.

A rusticidade de manejo confere aos robalos grande potencial para aquicultura, mas em contrapartida a carência de conhecimentos em aspectos nutricionais e fisiológicos da espécie, dificulta o processo de engorda do mesmo.

Desta forma, este trabalho, visa à caracterização histológica e histoquímica do sistema digestório de *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis* e descrição das possíveis alterações na secreção de mucosubstâncias pelas células mucosas ao longo do mesmo, como base para estudos histofisiológicos relacionados às necessidades nutricionais deste peixe.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Acondicionamento das Amostras

Foram utilizados 25 exemplares jovens de ambas as espécies, com peso médio entre $157,5 \pm 110,0\text{g}$; $150,9 \pm 44,8\text{g}$ e comprimento total de $23,6 \pm 5,6\text{cm}$; $24,8 \pm 2,5\text{cm}$ de *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis*, respectivamente, coletados trimestralmente entre março a dezembro de 2010, no Rio São João, distrito de Barra de São João, pertencente ao Município de Casemiro de Abreu/RJ. Os peixes foram coletados com a ajuda de pescadores locais, por meio de pesca de caniço e rede de espera, com autorização do IBAMA (Anexo I).

Com o apoio técnico e logístico da Estação de Piscicultura da APTA - Pólo Regional do Vale do Ribeira, situada em Pariqueira-açu/SP e Laboratório de Piscicultura Marinha (LAPMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), situada em Florianópolis/SC, de cada local foram capturados quinze exemplares de *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis*, respectivamente. Com peso médio de $268,1 \pm 183,9\text{g}$ e comprimento total de $26,9 \pm 8,8\text{ cm}$ para *Centropomus parallelus* e peso médio de $92,0 \pm 24,1\text{cm}$ e comprimento padrão de $23,0 \pm 2,0\text{cm}$ para *Centropomus undecimalis*, provenientes de viveiro de terra localizado nas mesmas estações. Foram utilizadas para a captura, tarrafas com diferentes tamanhos de malhagens.

A alimentação dos peixes em cativeiro constituiu-se de ração comercial para peixes carnívoros, contendo 45% de PB (mín.), extrato etéreo 14% (mín.), fibra bruta 6% (máx.), cálcio 2,5% (máx.), fósforo 1% (mín.), cinzas 14% (máx.), vitamina C 300 mg.

Os exemplares coletados foram eutanasiados por tratamento térmico em água com gelo, seguido do rompimento da coluna cervical. Após a obtenção do peso corpóreo (g) e do comprimento padrão (cm), ocorreu a imediata abertura na cavidade celomática para a retirada do sistema digestório.

Análise histológica e histoquímica do trato gastrointestinal

Os fragmentos de esôfago, estômago (cárdico, fúndico e pilórico) e intestino (proximal, médio e distal) dos exemplares de cativo e selvagens, foram lavados em solução salina a 0,9% e posteriormente fixados em solução de Bouin por 24h. Os tecidos foram desidratados em concentração crescente de etanol (70 a 100%), clarificados em xilol e incluídos em parafina paraplast (BEHMER et al., 1976). Os cortes semi-seriados de diferentes porções de esôfago, estômago e intestino (secções de 5µm) foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) para visualização geral dos tecidos e órgãos.

Para identificação de mucopolissacarídeos (glicoconjugados), os cortes foram submetidos às reações histoquímicas (BANCROFT & GAMBLE, 2002). Visando identificar células secretoras de glicoproteínas e detecção simultânea de mucopolissacarídeos neutros nas células caliciformes (corando glicoconjugados neutros), foi aplicada a técnica de ácido periódico-reativo de Schiff (PAS); para detectar os mucopolissacarídeos ácidos ricos em grupamentos sulfatados foi utilizado a técnica de Alcian Blue (AB) pH 1,0; e para detecção conjunta de mucopolissacarídeos ácidos e neutros, foi utilizada a reação combinada de ácido periódico-reativo de Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB) pH 1,0.

As lâminas histológicas confeccionadas foram analisadas em um microscópio de luz OLYMPUS modelo B X 51 e documentadas em formato digital no Laboratório de Morfologia do Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé (NUPEM/UFRJ), campus de Macaé/RJ.

RESULTADOS

O esôfago, estômago e o intestino dos robalos flecha (*Centropomus undecimalis*) e peva (*Centropomus parallelus*) tanto os da natureza como os de cativeiro, seguem a mesma organização histológica encontrada na maioria dos peixes com dieta carnívora.

O intestino representa quase 70% do comprimento total do tubo digestório de *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis*. Estas espécies possuem um esôfago curto que se conecta ao estômago, na região cárdica. Na região cranial do intestino, há o cecos pilóricos com quatro apêndices digitiformes. O intestino é curto e enrolado na cavidade abdominal, formando os três segmentos, sendo eles: o intestino proximal, que é ligado ao ceco pilórico, intestino médio e o intestino distal que é a parte final do último segmento terminando em um esfíncter (Fig. 1).

Histologicamente, a mucosa esofagiana possui um epitélio do tipo pavimentoso estratificado envolto por uma lâmina própria com numerosas papilas de tecido conjuntivo, o qual pode ser identificado dois tipos celulares: as mucosas e as claviformes. Nesse epitélio observou-se grande quantidade de glândulas mucosas, as quais se dispuseram de forma homogênea ao longo de todo o epitélio, apresentando reação positiva a combinação de ácido periódico-reativo de Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB), indicando presença de mucopolissacarídeos neutros e ácidos, respectivamente (Fig. 2A).

Observou-se a presença de células claviformes no epitélio do esôfago, tanto em animais selvagens como os de cativeiro, em alguns pontos se estendem entre as glândulas mucosas e atingem a superfície do epitélio, apresentando forte reação em HE (Fig. 2B).

A transição do esôfago para o estômago é claramente percebida por meio da mudança do epitélio estratificado pavimentoso para o epitélio simples cilíndrico (Fig.3).

Histologicamente é possível dividir o estômago em três regiões: a cárdica, a fúndica e a pilórica. De acordo com cada região, observou-se variação na quantidade de glândulas e as regiões analisadas apresentaram variações histológicas importantes para a sua identificação.

A região cárdica está localizada logo após a região de transição do esôfago-gástrico, possui uma mucosa continuamente revestida por um epitélio simples cilíndrico consistindo de células mucosas superficiais, membrana basal, lâmina própria e na submucosa observa-se muitas glândulas gástricas simples e tubulares, constituídas por células chamadas de oxintopépticas, secretoras de H^+ e Cl^- e pepsinogênio (Fig. 4A). Observou-se poucas células oxintopépticas na região fúndica e nenhuma na região pilórica. Observou-se uma forte reação positiva ao PAS apenas na superfície apical das células epiteliais nas três regiões do estômago, evidenciando secreções de mucopolissacarídeos neutros no epitélio.

A mucosa da região fúndica do estômago apresenta fossetas gástricas curtas que são revestidas por um epitélio simples cilíndrico que consiste exclusivamente de células secretoras de muco. É possível observar poucas células oxintopépticas (Fig. 4B).

Verificou-se que a região pilórica é similar ao intestino. Com presença de um epitélio simples cilíndrico e uma submucosa espessa e composta por um tecido conjuntivo ricamente vascularizado. A mucosa da região pilórica do estômago apresenta fossetas gástricas que são mais pronunciadas quando comparadas as regiões cárdica e fúndica. Observou-se uma reação positiva ao PAS na superfície apical das células epiteliais, na submucosa e veias, evidenciando a secreção regular de mucopolissacarídeos neutros, para a proteção da mucosa. Presença de macrófagos intraepiteliais em grandes quantidades no epitélio (Fig.5A). Externamente, o estômago é recoberto por uma serosa.

O intestino é curto, com epitélio intestinal sendo do tipo simples cilíndrico a prismático e com presenças de grandes quantidades de células caliciformes. Essas células apresentaram-se fortemente coradas tanto pelo método de PAS quanto AB, apresentando mucopolissacarídeos neutros e ácidos, respectivamente. A mucosa apresenta vilosidades e a parede intestinal é pouco espessa quando comparada a do estômago.

Histologicamente o intestino possui três regiões bem definidas: o proximal, o médio e o distal.

O intestino proximal, médio e distal, apresentaram diferenças histológicas. No intestino proximal a submucosa é constituída por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado que cora intensivamente em AB, observando claramente mucopolissacarídeos ácidos sulfatados (Fig. 5B).

Foram observados macrófagos e numerosos linfócitos intraepiteliais, em várias alturas do epitélio, ao longo de todo o intestino proximal (Fig. 6A e 6B).

Na mucosa intestinal ocorreu a presença de poucas células caliciformes (secretoras de muco) na porção proximal e média, aumentando em quantidade na porção distal (Tabela 1).

No intestino distal, as células caliciformes foram detectadas pela reação positiva ao PAS, evidenciando a produção de mucopolissacarídeos neutros (Fig. 7B).

Tabela 1. Intensidade de secreção de mucosubstâncias pelas células caliciformes, ao longo do intestino de *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis*, para cada uma das colorações histoquímicas utilizadas.

	Ácido Periódico - Reativo de Schiff (PAS)	Alcian Blue (AB) pH 1,0	PAS/AB pH 1,0
Intestino Proximal	(+) a (++)	(++) a (+++)	(+)
Intestino Médio	(++) a (+++)	(++) a (+++)	(+) a (++)
Intestino Distal	(+++)	(+++)	(+)

A reação positiva ao corante é representada pelo sinal “+” e reação negativa pelo sinal “-”; reação fraca ao corante é representada por (+), reação intermediária por (++) e reação intensa por (+++).



Fig. 1. Fotografia do sistema digestório de *Centropomus undecimalis*. Evidenciando: a) esôfago; b) estômago; c) cecos; d) intestino proximal; e) intestino médio; f) intestino distal.

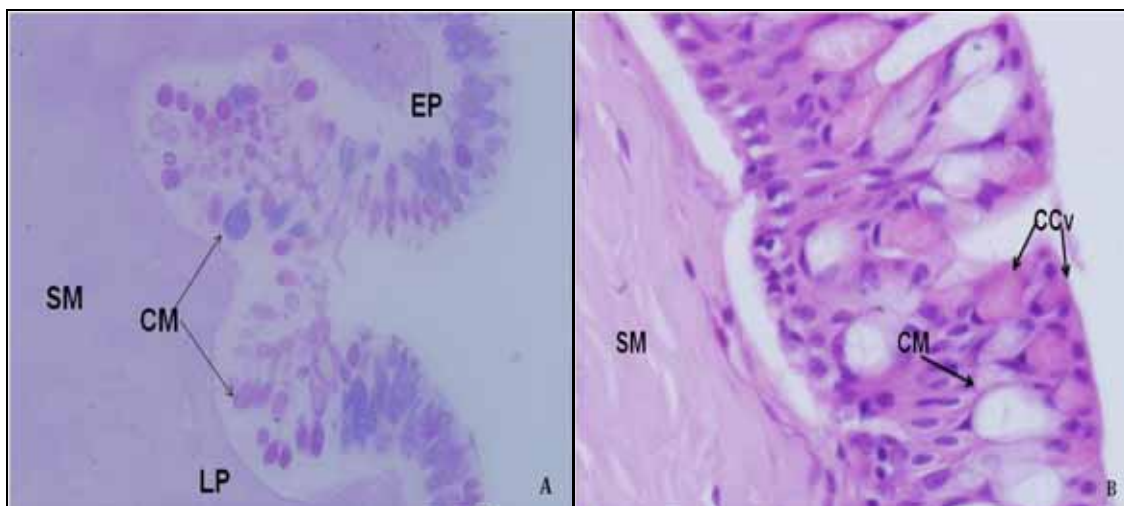


Fig. 2. (A) Fotomicrografias de cortes transversais do esôfago de *Centropomus parallelus*, evidenciando: o epitélio do tipo estratificado pavimentoso (EP), lâmina própria (LP), célula mucosa (CM) e submucosa (SM), corada com ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS) + Alcian Blue (AB). Aumento 40x. (B) Células claviformes (CCv) e célula mucosa (CM), corada em Hematoxilina-eosina (HE). Aumento 100x.

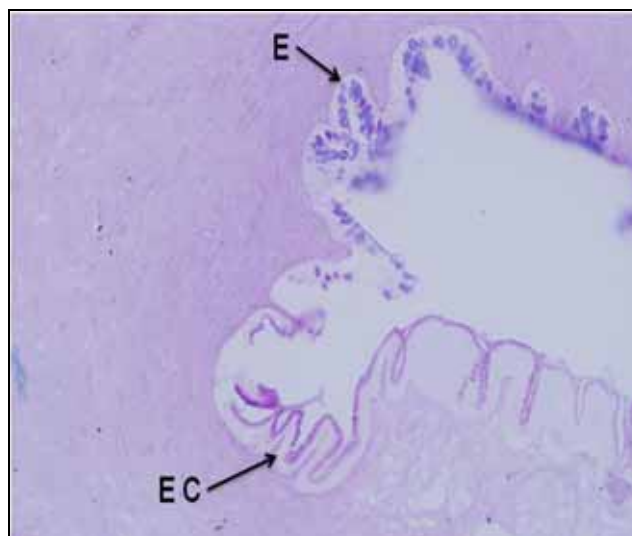


Fig. 3. Fotomicrografia da transição do esôfago para o estômago cárdico de *Centropomus parallelus*. Evidenciando: (E) células mucosas do esôfago (E) e célula apical do epitélio do estômago cárdico (EC), corada em ácido periódico reativo de Schiff (PAS) + alcian blue (AB). Aumento 20x.

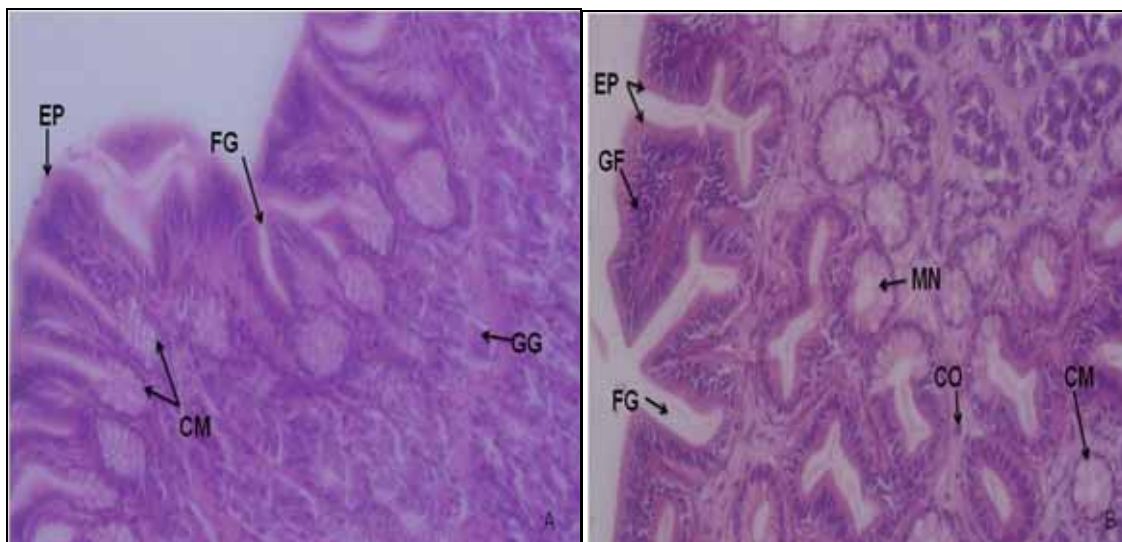


Fig. 4. (A) Fotomicrografia de cortes transversal do estômago cárdico de *Centropomus undecimalis*, evidenciando as glândulas gástricas (GG), célula mucosa (CM), fosseta gástrica (FG) e epitélio simples cilíndrico (EP). (B) Fotomicrografia do estômago fúndico de *Centropomus parallelus*, evidenciando as glândulas fundicas (GF), fosseta gástrica (FG), epitélio simples cilíndrico (EP), célula mucosa (CM), células mucosas do colo (MN) e célula oxintopépticas (OC), corada em hematoxilina - eosina (HE). Aumento 40x.

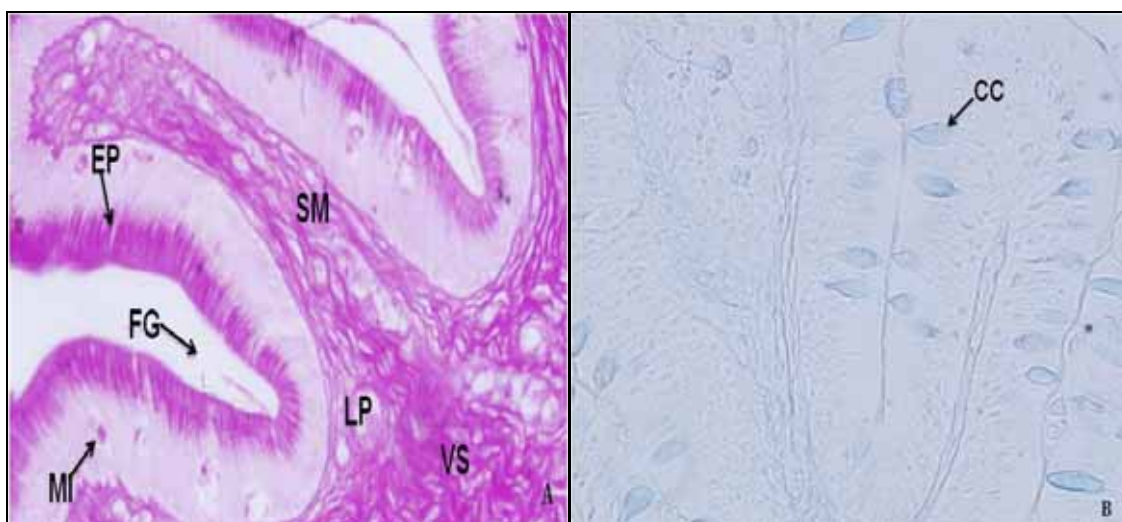


Fig 5. (A) Fotomicrografias de cortes transversais do estômago pilórico de *Centropomus undecimalis*, evidenciando: epitélio simples cilíndrico (EP), lâmina própria (LP), fosseta gástrica (FG), vasos sanguíneos (VS) e macrófago intraepitelial (MI), corados em ácido periódico-reativo de Schiff (PAS). (B) Fotomicrografia do intestino proximal de *Centropomus undecimalis*, evidenciando: as células caliciformes (CC), corada em alcian blue (AB). Aumento 40x.

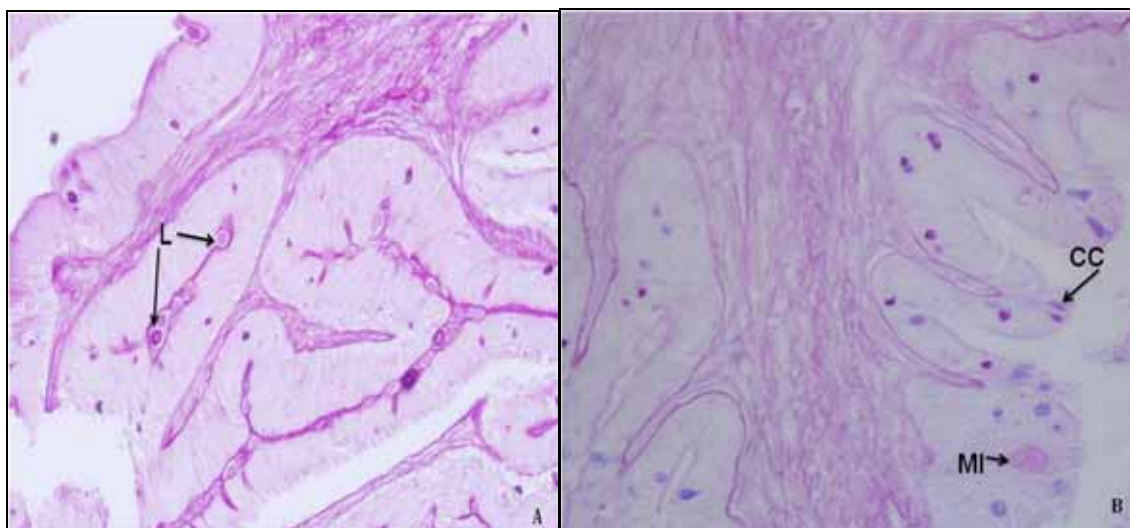


Fig. 6. (A) Fotomicrografia de corte transversal do intestino proximal de *Centropomus undecimalis*, evidenciando: a quantidade de linfócitos intraepiteliais (L), corados em ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS). (B) Fotomicrografia de corte transversal do intestino proximal de *Centropomus parallelus*, evidenciando: as células caliciformes (CC) e macrófago intraepitelial (MI), corada em ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS) + alcian blue (AB). Aumento 40x.

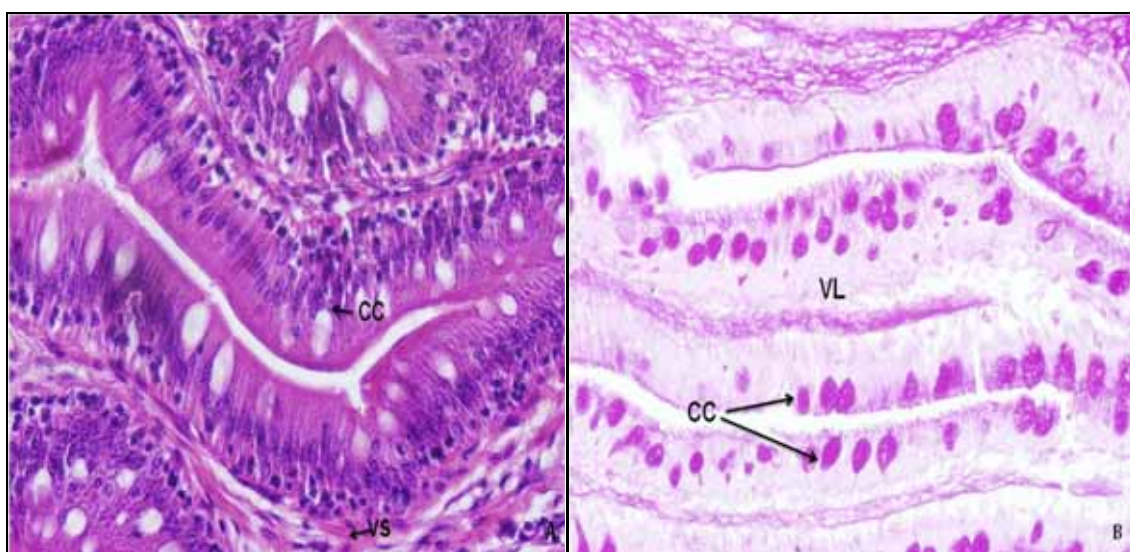


Fig. 7. (A) Fotomicrografia de cortes transversais do intestino médio de *Centropomus parallelus*. Evidenciando as células caliciformes (CC) e os vasos sanguíneos (VS), corado com hematoxilina-eosina (HE). (B) Fotomicrografia do intestino distal de *Centropomus undecimalis*. Evidenciando as células caliciformes (CC) e as vilosidades (VL), corados em ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS). Aumento 40x.

DISCUSSÃO

Em robalos, o esôfago apresenta-se como um órgão curto, semelhante ao encontrado em *Pseudoplatystoma coruscans* (CAL, 2006) e em *Pimelodus maculatus* (SANTOS et al., 2007). O epitélio do esôfago é do tipo pavimentoso estratificado com

presença de grande quantidade de glândulas mucosas e células claviformes, estas são células de defesa, do sistema de “alarme” do organismo, garantindo a proteção do esôfago contra abrasão e lesão no epitélio provocada pela passagem de alimentos. E como o robalo se alimenta de presas vivas, como camarões e outros peixes, a passagem desses alimentos é facilitada pelo muco produzido que lubrifica a parede do esôfago.

O estômago é o órgão do sistema digestório que mais chama atenção quando está cheio, ocupando mais da metade da cavidade abdominal, é dividido em cárdica, fúndica e pilórica. As regiões cárdica e fúndica possuem pregas espessas que têm a função de armazenar grande volume de alimento ingerido (MENIN & MIMURA, 1992). No presente estudo também foi possível confirmar a existência destas regiões, assim como uma túnica muscular bastante desenvolvida na região pilórica, que facilita o esvaziamento gástrico e a expulsão do alimento para o intestino anterior. Para Stroband & Van Der Veen (1981), as principais funções do estômago são o armazenamento de alimentos e a defesa contra microorganismos pela produção de ácido clorídrico, as quais iniciam a digestão no estômago (GARTNER & HIATT, 2007).

A mucosa do estômago apresentou-se revestida por epitélio simples cilíndrico composto de glândulas gástricas tubulares na lâmina própria. A superfície apical das células epiteliais nas três regiões do estômago apresentou forte reação ao PAS, evidenciando secreções de mucopolissacarídeos neutros no epitélio, conferindo a proteção da superfície mucosa. De acordo com Diaz et al. (2003), os mucopolissacarídeos secretados pelas células epiteliais parecem ser importantes para a proteção da parede do órgão e inibição contra microorganismos e ainda, estão envolvidos em digestão enzimática dos alimentos.

Os mucopolissacarídeos neutros, como encontrado no presente trabalho, podem desempenhar um efeito protetor à mucosa contra a alta acidez do conteúdo estomacal (WRIGHT, 1999).

No estômago dos robalos observaram-se grandes quantidades de glândulas gástricas, que são compostas por células oxintopépticas, secretoras de H^+ e Cl^- e pepsinogênio. De acordo com Rotta (2003) as características das glândulas gástricas variam conforme o hábito alimentar do peixe, sendo mais ramificadas e desenvolvidas nos peixes carnívoros, tal como se observam neste trabalho. Segundo Cal (2006), a maior quantidade das glândulas oxínticas pode estar relacionada a uma demanda maior na produção de secreção, capaz de digerir proteínas, uma vez que esse peixe se alimenta de presas vivas ou alimentos ricos em proteínas.

Alves & Tomé (1966) e Albrecht et al. (2001) estudando a histologia do trato digestório em *Scomberomus cavalla*, descrevem as glândulas gástricas como sendo pouco numerosas na região anterior (cárdica) diminuindo consideravelmente na região pilórica, porção próxima ao intestino, não ocorrendo ou apenas se observando resquícios de glândulas, resultados diferentes ao encontrado no presente trabalho, no qual observou-se grandes quantidades de glândulas gástricas na região cárdica, diminuindo em quantidade na fundica e não ocorrendo na região pilórica.

Os testes histoquímicos realizados no intestino de *Centropomus* revelaram a presença de glicoproteínas neutras e ácidas, produzidas pelas células epiteliais que podem proteger a mucosa do ácido contido no estômago. Souza et al. (2007), encontrou o mesmo resultado em *Pimelodus maculatus*.

A divisão do intestino adotada na metodologia do presente trabalho está de acordo com a divisão histofisiológica adotada por Stroband & Van Der Veen (1981), e nessas regiões foram observadas diferenças em relação à distribuição de células caliciformes,

O intestino é curto, típico de peixes carnívoros, com epitélio intestinal sendo do tipo simples cilíndrico a prismático e presenças de células caliciformes. De acordo com Gartner & Hiatt (2007), as células absorptivas possuem numerosos microvilos, onde se encontram várias enzimas. Estas células atuam na absorção de lipídios, aminoácidos e carboidratos.

Foram observadas grandes quantidades de células caliciformes no intestino distal. Mesmos resultados foram observados por Cardoso (2005), trabalhando com morfologia e ultraestrutura do *Notothenia rossii*. As células caliciformes produzem intensa lubrificação, o que pode estar associado ao pequeno tamanho do intestino. De acordo com Kierszenbaum (2008), as células caliciformes são células cilíndricas, produtoras de muco, distribuídas entre os enterócitos do epitélio intestinal, essas células contêm glicoproteínas e é liberado por exocitose, como observado no presente trabalho.

A abundância dessas células bem como seus produtos de secreção pode variar dependendo das condições ambientais (BURKHARDTHOLM et al., 1989). Diferentes mucopolissacarídeos têm sido correlacionados com as funções digestivas. A presença de mucopolissacarídeos ácidos, secretados pelas células caliciformes, indica uma função secretória para o epitélio intestinal. Além disso, as mucopolissacarídeos ácidos ricos em grupamentos sulfatados são inibidoras das proteases pépticas, previnem infecções bacterianas e protegem as mucosas de ações mecânicas que possam sofrer (ULIBARRIE, 1982). Mucopolissacarídeos neutros estão envolvidas na digestão e emulsificação do alimento ao quimo (CLARKE & WITCOMB, 1980). Além disso, é possível que não somente a quantidade, mas também a composição química do muco possa refletir a natureza do alimento ingerido (BURKHARDTHOLM et al., 1989). Essa possivelmente seria uma explicação para a intensidade de secreção de muco observadas nas células caliciformes, ao longo do intestino proximal a distal no presente trabalho.

Muitos linfócitos intraepiteliais foram encontrados infiltrados no espaço intercelular de todos os segmentos do intestino proximal. Esses linfócitos provavelmente têm função regulatória, suprimindo a resposta do sistema imune para antígenos intestinais e induzindo simultaneamente uma resposta imune na lâmina própria (PABST, 1987). Assim, o grande número de linfócitos na mucosa intestinal de peixes sugere a existência de um sistema imune local, o mucoso (ROMBOUT et al., 1989). Mesmos resultados foram encontrados para *Pseudoplatystoma coruscans* (CAL, 2006).

Foram encontrados macrófagos intraepiteliais ao longo do intestino proximal e médio, semelhantes ao descrito por Cal (2006). Foram encontrados macrófagos no estômago pilórico, o que pode indicar a existência de um processo celular que atua como barreira celular de defesa, atuando como um componente imunológico dessas regiões. De acordo com Cal (2006) a presença de macrófagos intraepiteliais pode sugerir o transporte e a degradação intraepitelial de proteínas.

CONCLUSÕES

O *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis* exibe as principais características do trato digestório de peixes carnívoros, como um esôfago e estômago desenvolvidos e um intestino relativamente curto.

Ambas as espécies não apresentaram diferenças histológicas e histoquímicas para exemplares de cativeiro e natureza.

As células caliciformes secretam, ao longo de toda a extensão do intestino, mucopolissacarídeos neutros e ácidos ricos em grupamento sulfatados.

REFERÊNCIAS

- ALIAUME, C., ZERBI, A., JOYEUX, J.C., MILLER, J.M. Growth of juvenile *Centropomus undecimalis* in a tropical island. **Environ. Biol. Fish.** n. 59, p. 299–308, 2000.
- ALBRECHT, M.P.; FERREIRA, M.F.N.; CARAMASCHI, E.P. Anatomical features and histology of the digestive tract of two related neotropical omnivorous fishes (Characiformes: Anostomidae). **J. of Fish Biology**, n.58, p.419-430, 2001.
- BANCROFT, J. D. GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques.** New York: Churchill Livingstone, 2002. 796 p.
- BEHMER, A.O. TOLOSA, E.M.C. FERITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** Editora EDART/EDUSP, 1976, 239p.
- BORGES, J.C.S.; PRESSINOTTI, L. N.; GOMES, V.; SILVA, J. R. M. C. Lipidic and protein absorption in digestive tract of tropical fat snook. **J. Experim. Mar. Biol. and Ecology.** n. 386, p. 39-44, 2010.
- CAL, J. A. **Histologia do trato digestório de surubim-pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* – Agassiz – 1829).** 2006. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Curso de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2006.
- CERQUEIRA, V.R. **Cultivo do robalo-peva, *Centropomus parallelus*.** In: Baldisserotto, B. e Gomes, L.C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: Ed. UFSM. p. 403-431, 2005.
- DIAZ, A. O.; GARCIA, 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: J. of Vet. Med.**, série C, n. 32, p. 341-346, 2003.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas Colorido de Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008.

MENDONÇA, M.C. F. B. **Autoecologia do camorim, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792), (Peciformes: Centropomidae) em ambiente hipersalino em Galinhos, RN. Brasil**. 2004. 145 p. São Carlos. UFSCar. Tese de Doutorado, 2004.

MENIN, E.; MIMURA, O.M. Anatomia funcional comparativa do estômago de três peixes Teleostei de hábito alimentar onívoro. **Rev. Ceres**, n. 39, v. 223, p. 233-260. 1992.

PATRONA, L. D. **Contribution à la biologie du "robalo" *Centropomus parallelus* (Pisces Centropomidae) du Sud-Est du Brésil: possibilités quacoles**. 175 f. Thèse (Doctorat de 3ème Cycle, Sciences et Techniques en Productions Animales) - Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 1984.

ROMBOUT, J.H.W.M.; VAN DER BERG, A.A. Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. **J. Fish Biol.**, n. 35, v. 1, p. 13-22, 1989.

SANTOS, C.M.; DUARTE, S.; SOUZA, T. G. L.; RIBEIRO, T. P.; SALES, A.; ARAÚJO, F.G. Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrintestinal de *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**. n. 97, v. 4, p. 411-417, 2007.

SOLIGO, T.A. **Primeiras experiências com a reprodução, larvicultura e desmame do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* no Brasil**. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, 2007. 40p.

STROBAND, H.W.J.; VAN DER VEEN. F.H. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grass carp *Ctenopharyngodon idella* VAL. **J. Exp. Zool.**, n. 218, p. 249-256, 1981.

TAYLOR, R.G.; WHITTINGTON, J.A.; GRIER, H. J.; CRABTREE, R.E. Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coasts of south Florida. **Fish Bull. Florida Marine Research Institute**, n. 98, p. 612-624, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O robalo peva e flecha (*Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis*, respectivamente) são espécies de grande importância devido ao seu alto valor de mercado, porém são poucos os estudos relacionados a fisiologia e morfologia a respeito da nutrição e sistema digestório desses peixes, para possivelmente criá-los em cativeiro.

Algumas ferramentas podem ser utilizadas para essa situação, como por exemplo, a utilização de isótopos estáveis e proteômica, para verificação da dieta. O estudo da histologia e histoquímica também é de grande importância para se conhecer o sistema digestório desses indivíduos.

No presente trabalho observou-se através de análise de isótopos estáveis, que o músculo de *Centropomus parallelus* coletados em cativeiro mostrou-se mais rico em $\delta^{13}\text{C}$ (-21,02 ‰), quando comparados aos animais da natureza (-24,97‰) e animais coletados na natureza apresentou-se mais rico em $\delta^{15}\text{N}$ (12,42 ‰), sendo o tecido mais eficiente na questão de incorporação dos nutrientes em relação a variação entre os isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

Realizando estudo de proteômica, observou-se que as proteínas presentes no fígado são expressas na alteração da dieta de *Centropomus undecimalis* de animais selvagens e cativeiro. A presença da suposta enzima NADH desidrogenase no fígado dos peixes de cativeiro indica que esses indivíduos possui um metabolismo mais ativo, como a razão é de mais fácil incorporação no músculo, e os animais de cativeiro apresentaram grande quantidade de gordura visceral, e ausência de apolipoproteínas A-1 e A-2, pode-se supor que os animais que investe energia em crescimento deixam de investir em reprodução e vice-versa, modulando dessa forma sua fisiologia reprodutiva.

Em relação ao sistema digestório observou-se grande quantidade de células caliciformes que secretam muco ao longo de toda a extensão do intestino, sendo mucopolissacarídeos neutros e ácidos ricos em grupamento sulfatados.

Esse estudo pretende fornecer subsídios para o desenvolvimento de um pacote tecnológico para o cultivo de ambas as espécies, contribuindo na otimização da nutrição e gerando alternativas para tornar a piscicultura marinha uma atividade produtiva no país.

O estudo do comportamento alimentar, avaliando a capacidade do robalo em balancear sua dieta de acordo com suas necessidades nutricionais e fase de desenvolvimento (alevino e adulto), por meio da livre escolha, sendo cativo ou no ambiente natural, pode trazer informações adicionais quanto às exigências nutricionais desta espécie, assim como, a correlação entre as fontes protéicas e energéticas provenientes da sua alimentação devem ser testados em estudos que busquem o desenvolvimento de dietas que promovam crescimento ótimo para a espécie, quando criada em cativeiro.

ANEXO