

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS
LABORATÓRIO DE ZOOTECNIA E NUTRIÇÃO ANIMAL

SHAYTNER CAMPOS DUARTE

**Atividade amilolítica e proteolítica nas fases iniciais de cultivo de
Acará-disco (*Symphysodon sp.*)**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO DE 2013

SHAYTNER CAMPOS DUARTE

**Atividade amilolítica e proteolítica nas fases iniciais de cultivo de
Acará-disco (*Symphysodon sp.*)**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de Produção e Nutrição Animal.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Dalcio Ricardo de Andrade

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO DE 2013

SHAYTNER CAMPOS DUARTE

**Atividade amilolítica e proteolítica nas fases iniciais de cultivo de
Acará-disco (*Symphysodon sp.*)**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de Produção e Nutrição Animal.

Aprovada em 28 de Março de 2013.

Prof. Dalcio Ricardo de Andrade (D. Sc. Morfologia) – UENF
(ORIENTADOR)

Prof. Eduardo Shimoda (D. Sc. Ciência Animal) – UCAM

Prof. Jorge Hernandez Fernandez (D. Sc. Biologia Celular Estrutural) – UENF

Prof. Manuel Vazquez Vidal Junior (D. Sc. Zootecnia) – UENF

Prof. Pedro Pierro Mendonça (D. Sc. Ciência Animal) – IFES

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa por todos os momentos juntos, pela confiança nos momentos de mudança em nossas vidas e por ser meu referencial na vida acadêmica.

À minha querida mãe, Leuder de Sousa Campos e meu pai Romulo Moreira Duarte.

Aos meus sogros: Maria Fatima Alves Guimarães e Enock Guimarães Filho.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pelas condições que permitiram a realização dos trabalhos;

Ao LZNA e ao LQFPP que me permitiram desenvolver a Tese de doutorado;

A FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudo durante esses meses de doutorado;

Ao meu professor e orientador, Dalcio Ricardo de Andrade e aos outros professores que também me ajudaram muito no desenvolvimento do trabalho: Manuel Vazquez Vidal Junior, Jorge Hernandez Fernandez, Eduardo Shimoda.

Aos amigos: Luiz Eckhardt, Melissa Paes Petrucci, Pedro Pierro Mendonça, Marcella Radael, Carlos Frederico da Silva Paes, Douglas da Cruz Mattos, Leonardo Demier, Willian Tonini, Andre Veloso.

Aos colegas que durante mais esta caminhada de alguma forma me apoiaram.

RESUMO

A pesquisa em nutrição de larvas e juvenis da espécie *Symphysodon aequifasciatus* o “Acará Disco” é necessária para identificar o período mais adequado para iniciar a alimentação exógena as larvas produzidas em cativeiro. O monitoramento e a observação das mudanças fisiológicas e o acompanhamento do desenvolvimento inicial dos peixes favorece de uma forma geral toda a cadeia produtiva de peixes. As informações sobre o padrão de desenvolvimento de enzimas digestivas pancreáticas, suas secreções no duodeno e atividades nos conteúdos intestinais são importantes para a projeção e implementação de estratégias nutricionais e dietéticas para melhorar a utilização de nutrientes pelos animais. Porém, essas informações não são suficientes para promover melhor desempenho de peixes, uma vez que outros fatores também promovem mudanças na fisiologia da digestão e na velocidade das reações metabólicas. Portanto, é necessário um conhecimento maior sobre a relação existente entre atividade enzimática e o ambiente. Um modelo padronizado de determinação enzimática em peixes permitirá verificar e quantificar a atividade enzimática digestiva inicial e determinar os efeitos no crescimento e ganho de peso de larvas. Várias metodologias podem ser utilizadas para a verificação e quantificação da atividade da amilase e da protease, contudo uma das mais encontradas na literatura é a de análise enzimática colorimétrica, utilizando-se kits enzimáticos comerciais “ajustados” e leitura em espectrofotômetro colorimétrico de microplacas, para as amostras obtidas da extração de sobrenadante enzimático do sistema digestório de larvas e juvenis. Foram utilizadas larvas de 25, 35, 45, 60 e 90 dias após-eclosão (DAE). Para a extração enzimática utilizou-se: Proteoblock (inibidor de protease), EDTA (150 mM), solução tampão TRIS (50 mM) pH 8,0, após a centrifugação obteve-se a enzima no sobrenadante. Os testes bioquímicos colorimétricos foram feitos variando a concentração de amido entre: 4 µg/mL a 28 µg/mL de amido, iodo 50µL, TRIS, e enzima 3µL. Nos experimentos, as reações duraram 8 (oito) minutos a 26°C. A leitura dos resultados foi aferida em espectrofotômetro colorimétrico de microplaca, com comprimento de onda a 670nm em duplicata. Para analisar os dados utilizou-se a representação gráfica da regressão linear dos valores encontrados, o modelo gráfico da Equação Michaelis-Menten, e o modelo Gráfico de Lineweaver-Burke (duplo-reverso). A taxa de crescimento específico (TCE) observada no período experimental foi de 3,75%, os valores totais para atividade enzimática da amilase expressos em U/µg proteína/min⁻¹ foram respectivamente: 38,32U, 19,61U, 39,40U, 18,24U e 26,20U para 25DAE, 35DAE, 45DAE, 65DAE e 90DAE. Para a Tripsina e quimiotripsina os valores encontrados e expressos em U(mmol/min) foram respectivamente: 0,041U, 0,076U, 0,183U, 0,177U, 0,290U e 0,040U, 0,080U, 0,340U, 0,191, 0,201U.

Palavras-chave: Nutrição de peixes, larvicultura, digestão, intestino, enzimas.

ABSTRACT

The research in nutrition of larvae and juveniles of the species *Symphysodon aequifasciatus* "Acará Disco" is justified because it is necessary to identify the best time to supply power to exogenous viable larvae produced in captivity. Monitoring and observation of physiological changes and monitoring of fish development favors in general the entire productive chain of fish. Information about the pattern of development of digestive pancreatic enzymes secretions into the duodenum and activities in intestinal contents are important to designing and implementing strategies to improve nutrition and dietary nutrient utilization by animals. However, this information is not enough to promote as better performance of fish, since changes in temperature promotes the digestion physiology and metabolic processes. Therefore, we need a greater knowledge about the relationship between enzymatic activity and the environment. A standardized model for determining enzyme in fish will verify and quantify the initial digestive enzyme activity and determine the effects on growth and weight gain of larvae. Several methods can be used to verify and quantify the activity of amylase and protease, yet one of the most in the literature and is widely used by researchers to enzymatic colorimetric analysis, using a commercial enzymatic kits "set" and read on a spectrophotometer colorimetric microplate, for samples obtained from the supernatant enzymatic extraction of digestive system of larvae and juveniles. Larvae were used 25, 35, 45, 60 and 90 days after hatching (DAH). For extraction was used: Proteoblock (protease inhibitor), EDTA (150 mM), TRIS buffer (50 mM) pH 8.0 after centrifugation was obtained the enzyme in the supernatant. The colorimetric biochemical tests were made varying between starch concentration: 4 mg / mL to 28 mg / ml starch-iodine 50mL, TRIS, and 3 μ L enzyme. In the experiments the reactions lasted eight (8) minutes at 26 ° C. The reading of the results was assessed in colorimetric microplate spectrophotometer with a wavelength of 670nm in duplicate. To analyze the data we used the graphical representation of the linear regression of the values found, the graphical model of the Michaelis-Menten equation, and the model graph Lineweaver-Burke. The specific growth rate observed during the experimental period was 3,75%, the total values for amylase enzyme activity expressed in U/ μ g proteína/min⁻¹ were respectively: 38,32U, 19,61U, 39,40U, 18,24U e 26,20U for 25DAE, 35DAE, 45DAE, 65DAE e 90DAE. Trypsin and chymotrypsin for the values found and expressed as U (mmol / min) were: 0,041U, 0,076U, 0,183U, 0,177U,0,290U e 0,040U, 0,080U, 0,340U, 0,191, 0,201U.

Keywords: Fish nutrition, hatchery, digestion, bowel, enzyme.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA IN VITRO, EM GEL E PERFIL ENZIMÁTICO EM ELETROFORESE.

Tabela 1. Médias de peso do peixe, do intestino, e valores de quantificação de proteína.....	77
Tabela 2. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 4 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de peixes de 25 DAE.....	78
Tabela 3. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 4 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de peixes de 35 DAE.....	80
Tabela 4. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 4 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino proximal de peixes de 45 DAE.....	81
Tabela 5. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 4 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino distal de peixes de 45 DAE.....	81
Tabela 6. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 7 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino proximal de peixes de 65 DAE.....	83
Tabela 7. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 7 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino distal de peixes de 65 DAE.....	83
Tabela 8. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 7 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino proximal de peixes de 90 DAE.....	85
Tabela 9. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 7 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino distal de peixes de 90 DAE.....	86
Tabela 10. Valores de X e Y no gráfico de Lineweaver-Burk.....	88
Tabela 11. Valores de Km e Velocidade máxima para 4 idades experimentais.....	88

Tabela 12. Médias dos valores de unidades (U) de amilase e concentração de proteína..... 88

Tabela 13. Valores encontrados para a atividade da amilase em diversos trabalhos publicados nos últimos 10 anos..... 94

CAPITULO II: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA (Tripsina e Quimiotripsina) *IN VITRO*, EM GEL E PERFIL ENZIMÁTICO EM ELETROFORESE.

Tabela 1. Médias de peso do peixe, do intestino, e valores de quantificação de proteína..... 108

Tabela 2. Valores de ABS para 25 (DAE) observados durante o período experimental..... 108

Tabela 3. Valores de ABS para 35(DAE) observados durante o período experimental..... 109

Tabela 4. Valores de ABS para 45 (DAE) observados durante o período experimental para intestino proximal e distal..... 110

Tabela 5. Valores de ABS para 65 (DAE) observados durante o período experimental para intestino proximal e distal..... 111

Tabela 6. Valores de ABS para 90 (DAE) observados durante o período experimental para intestino proximal e distal..... 114

Tabela 7. Valores médios de Δ ABS utilizando BTEE 1mM..... 116

Tabela 8. Valores de ABS para 25 (DAE) observados durante o período experimental..... 117

Tabela 9. Valores de ABS para 35 (DAE) observados durante o período experimental..... 118

Tabela 10. Valores de ABS para 45 (DAE) observados durante o periodo experimental para intestino proximal e distal..... 119

Tabela 11. Valores de ABS aos 65 (DAE) observados durante o periodo experimental para intestino proximal e distal..... 122

Tabela 12. Valores de ABS aos 90 (DAE) observados durante o período experimental para intestino proximal e distal..... 124

Tabela 13. Valores médios de Δ ABS utilizando TAME 1mM e atividade em U por idade e subdivisão experimental..... 126

130

Tabela 14. Valores encontrados para a atividade da tripsina na literatura	
Tabela 15. Valores encontrados para a atividade da quimiotripsina na literatura.....	131

CAPITULO III: NUTRIÇÃO DE PEIXES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA: ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA DAS PUBLICAÇÕES MUNDIAIS E BRASILEIRAS NA BASE SCOPUS.

Table 1. Search criteria and refine of the researches in Scopus database.....	140
Table 2. Publications per year and total, at the world and in Brazil, using the searching terms and the research refine tools....	141
Table 3. The “top 10” authors by term and search refining.....	142
Table 4. Leading journals by numbers of publications in the total and in Brazil using the search term “Fish nutrition” and refining the research in the area “agriculture”.....	148
Table 5. Number of publications by institution, in total SCOPE data and from Brazil.....	149

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Produção dos 10 principais países produtores de rações balanceadas em 2005.....	30
Figura 2. Produção de ração e produção aquícola brasileira.....	31
Figura 3. Distribuição do consumo de ração no ano de 2010.....	33
Figura 4. Trato digestório de Acará-disco (<i>Symphysodon sp.</i>) e suas divisão experimentais.....	45
Figura 5. Características morfológicas do acará-disco.....	53

CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA IN VITRO, EM GEL E PERFIL ENZIMÁTICO EM ELETROFORESE

Figura 1. Acará-disco (<i>Sympysodon sp.</i>) 45 DAE (A); acará-disco 65 DAE (B); acará-disco 90 DAE (C e D).....	71
Figura 2. Intestino de Acará-disco 35 DAE (A); intestino acará-disco 45 DAE (B); intestino acará-disco 90 DAE (C e D).....	72
Figura 3. Equipamentos utilizados na extração e análise dos experimentos. Pipetas (A); Leitor de microplacas (B); placas de reação (C); Picodrop (D).....	73
Figura 4. Representação gráfica do modelo da cinética de Michaelis-Menten.....	75
Figura 5. Crescimento médio em dias após eclosão (DAE).....	77
Figura 6. Análise do desenvolvimento do intestino proximal: peso médio em dias após eclosão (DAE).....	78
Figura 7. Análise do desenvolvimento do intestino distal: peso médio em dias após eclosão (DAE).....	78
Figura 8. Gráfico da atividade enzimática x concentração de amido($\mu\text{g/mL}$) e valores de R^2 para 4 concentrações de amido em peixes de 25 DAE.....	79
Figura 9. Gráfico Lineweaver-Burke, valor de K_m e V_{max} . $X(-0,07)$ e $Y(10,5)$	79
Figura 10. Gráfico da atividade enzimática x concentração de amido ($\mu\text{g/mL}$) e valores de R^2 para 4 concentrações de amido em peixes de 35 DAE.....	80
Figura 11. Gráfico Lineweaver-Burke, valor de K_m e V_{max} . $X(-0,11)$ e $Y(14,3)$ 35 DAE.....	80
Figura 12. Gráfico da atividade enzimática x concentração de amido($\mu\text{g/mL}$) e valores de R^2 para 4 concentrações de amido, intestino proximal de peixes aos 45 DAE (A); Intestino distal de peixes aos 45 DAE (B).....	82
Figura 13. Gráfico Lineweaver-Burke, valor de K_m e V_{max} . $X(-0,09)$ e $Y(15,96)$ 45 DAE proximal (A); Gráfico Lineweaver-Burke, valor de K_m e V_{max} . $X(-0,05)$ e $Y(5,89)$ 45 DAE distal (B).	82

Figura 14. Gráfico da atividade enzimática x concentração de amido($\mu\text{g/mL}$) e valores de R^2 para 5 concentrações de amido, intestino proximal de peixes aos 65 DAE (A); Intestino distal de peixes aos 65 DAE (B).....	84
Figura 15. Gráfico Lineweaver-Burke, valor de K_m e V_{max} . $X(-0,02)$ e $Y(3,64)$ 65 DAE proximal (A); Gráfico Lineweaver-Burke, valor de K_m e V_{max} . $X(-0,02)$ e $Y(2,88)$ 65 DAE distal (B).....	85
Figura 16. Gráfico da atividade enzimática x concentração de amido($\mu\text{g/mL}$) e valores de R^2 para 7 concentrações de amido, intestino proximal de peixes aos 90 DAE (A); Intestino distal de peixes aos 90 DAE (B).....	86
Figura 17. Gráfico Lineweaver-Burke, valor de K_m e V_{max} . $X(-0,03)$ e $Y(6,05)$ 90 DAE proximal (A); Gráfico Lineweaver-Burke, valor de K_m e V_{max} . $X(-0,03)$ e $Y(3,76)$ 90 DAE distal (B).	87
Figura 18. Variação da amilase em $\text{U}/\mu\text{g}$ de proteína em função da idade do Acará disco.....	89
Figura 19. Atividade de amilase em gel SDS-PAGE de acará-disco durante os primeiros 90 dias após-eclosão. Os valores de M correspondem ao marcador molecular de baixo peso padrão (Thermo Scientific: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder).....	90
Figura 20. Perfil enzimático em gel SDS-PAGE de acará-disco durante os primeiros 90 dias após-eclosão corado com Coomassie Blue. (Bio-Rad Standards, Broad Range).....	90
Figura 21. Perfil enzimático em gel SDS-PAGE de acará-disco durante os primeiros 90 dias após-eclosão corado com prata. (Thermo Scientific: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder).....	91
Figura 22. Demonstrativo da atividade amilolítica encontrada no intestino proximal e intestino distal nas diferentes idades experimentais.....	93

CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA (Tripsina e Quimiotripsina) *IN VITRO* E ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR ELETROFORESE

Figura 1. Gráfico da atividade enzimática (1mMBTEE) ABS x tempo, e valores de R^2 em peixes de 25 DAE.....	109
Figura 2. Médias das variações da absorbância ABS (A). Gráfico da atividade enzimática (1mMBTEE) ABS x tempo (B), e valores de R^2 em peixes de 35 DAE.....	110
Figura 3. Gráfico da atividade enzimática (1mMBTEE) ABS x tempo em peixes de 45 (DAE). Os valores de R^2 para o intestino proximal e de para o intestino distal.....	111
Figura 4. Médias das variações da absorbância ABS 65 (DAE) intestino proximal (A).....	112
Figura 5. Gráfico da atividade enzimática (1mMBTEE) ABS x tempo em peixes de 65 (DAE) (B). Os valores de R^2 para o intestino proximal.....	112
Figura 6. Médias das variações da absorbância ABS 65 (DAE) intestino distal.....	113
Figura 7. Gráfico da atividade enzimática (1mM BTEE) ABS x tempo em peixes de 65 (DAE). Os valores de R^2 para o intestino distal.....	113
Figura 8. Médias das variações da absorbância ABS 65 (DAE) intestino proximal.....	114
Figura 9. Gráfico da atividade enzimática (1mM BTEE) ABS x tempo em peixes de 90 (DAE). Os valores de R^2 para o intestino proximal.....	114
Figura 10. Médias das variações da absorbância ABS 90 (DAE) intestino distal.....	115
Figura 11. Gráfico da atividade enzimática (1mM BTEE) ABS x tempo em peixes de 90 (DAE). Os valores de R^2 para o intestino distal.....	115
Figura 12. Valores médios da Δ ABS nas 5 idades e subdivisões experimentais.....	116

Figura 13. Valores da atividade de quimiotripsina em U(μ mol/min) para as 5 idades e subdivisões experimentais do acará-disco.....	117
Figura 14. Médias das variações da absorbância ABS 25 (DAE)..	118
Figura 15. Gráfico da atividade enzimática (1mM TAME) ABS x tempo, e valores de R^2 em peixes de 25 DAE.....	118
Figura 16. Médias das variações da absorbância ABS 35 (DAE)..	119
Figura 17. Gráfico da atividade enzimática (1mM TAME) ABS x tempo, e valores de R^2 em peixes de 35 DAE.....	119
Figura 18. Médias das variações da absorbância ABS 45 (DAE) intestino proximal.....	120
Figura 19. Gráfico da atividade enzimática (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 45 (DAE). Os valores de R^2 para o intestino proximal.....	120
Figura 20. Médias das variações da absorbância ABS 45 (DAE) intestino distal.....	121
Figura 21. Gráfico da atividade enzimática (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 45 (DAE). Os valores de R^2 para o intestino distal.....	121
Figura 22. Médias das variações da absorbância ABS 65 (DAE) intestino proximal.....	122
Figura 23. Gráfico da atividade enzimática (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 65 (DAE). Os valores de R^2 para o intestino proximal.....	122
Figura 24. Médias das variações da absorbância ABS 65 (DAE) intestino distal.....	123
Figura 25. Gráfico da atividade enzimática (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 65 (DAE). E valores de R^2 para o intestino proximal.....	123
Figura 26. Médias das variações da absorbância ABS 90 (DAE) intestino proximal.....	124

Figura 27. Gráfico da atividade enzimática (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 90 (DAE). Os valores de R^2 para o intestino proximal.....	125
Figura 28. Médias das variações da absorbância ABS 90 (DAE) intestino proximal.....	125
Figura 29. Gráfico da atividade enzimática (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 90 (DAE). Os valores de R^2 para o intestino proximal.....	125
Figura 30. Valores médios da Δ ABS nas 5 idades e subdivisões experimentais.....	126
Figura 31. Valores da atividade de tripsina em U(μ mol/min) para as 5 idades e subdivisões experimentais do acará-disco.....	127
Figura 32. Gel de atividade de proteases serínicas pH 8,0 para tripsina e quimiotripsina.....	127
Figura 33. Gel de atividade de proteases cisteínicas ou proteases ácidas pH 4,0 (pepsina).....	128

CAPÍTULO III: NUTRIÇÃO DE PEIXES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA: ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA DAS PUBLICAÇÕES MUNDIAIS E BRASILEIRAS NA BASE SCOPUS.

Figure 1. Publication growth rate, worldwide and in Brazil, at the period from 1999 to 2010, expressed by the linearized angular coefficient.....	150
Figure 2. Participation of (%) Brazilian articles in relation to the worldwide (A); Position of the Brazilian publication in relation to other countries (B); Proportion of Brazilian authors publishing in English (C).....	151
Figure 3. Publication growth rate (%), worldwide and in Brazil (A); Concentration range of publication by the main authors (B).....	152
Figure 4. Concentration range of publication by knowledge area.....	153

Figure 5. Concentration range of publication of the "top 10" journals (A); Concentration range of publication by institution, worldwide and in Brazil (B)..... 154

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	OBJETIVOS	23
3.	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	A Nutrição Animal como Ciência.....	24
3.2	Nutrição Animal com Foco na Nutrição de Peixes.....	25
3.3	Principais Alimentos Utilizados em Nutrição Animal.....	27
3.4	Alimentação e Nutrição de Peixes.....	27
3.5	A Ração: importância na nutrição, produção, mercado e limitações.....	29
3.5.1	Limitações na formulação e fabricação de rações.....	32
3.6	Fisiologia da Digestão: digestibilidade e absorção de nutrientes...	33
3.7	Larvicultura.....	36
3.8	Digestão.....	40
3.9	Enzimas Digestivas.....	42
3.9.1	Amilase.....	42
3.9.2	Protease.....	43
3.9.3	Enzimas digestivas em peixes.....	44
3.10	Funções das Proteínas.....	46
3.11	Regulação do Metabolismo.....	46
3.12	Proteína Requerida para Peixes.....	47
3.13	Fatores que influenciam a necessidade de proteína nos peixes....	48
3.14	Considerações Gerais sobre os Ciclídeos.....	52
3.15	O Acará Disco (<i>Symphysodon sp</i>).....	53
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
5	CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA <i>IN VITRO</i>, EM GEL E PERFIL ENZIMÁTICO EM ELETROFORESE	67
5.1	Abstract.....	67
5.2	Resumo.....	67
5.3	Introdução.....	68
5.4	Material e Métodos.....	70
5.4.1	Obtenção do material.....	70

5.4.2	Dosagem de proteínas.....	73
5.4.3	Detecção da atividade enzimática amilolítica <i>in vitro</i> de larvas de acará-disco (<i>Symphysodon sp.</i>).....	74
5.4.5	Visualização do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	75
5.4.6	Detecção de atividade amilolítica em gel.....	76
5.5	Resultados.....	76
5.5.1	Alterações morfométricas, peso e crescimento.....	76
5.5.2	Atividade amilolítica.....	78
5.5.3	Zimograma e atividade em gel "SDS-PAGE".....	89
5.6	Discussão.....	91
5.7	Conclusão.....	95
	Referências Bibliográficas.....	96
6.	CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA (Tripsina e Quimiotripsina) <i>IN VITRO</i>, EM GEL E PERFIL ENZIMÁTICO EM ELETROFORESE	101
6.1	Abstract.....	101
6.2	Resumo.....	101
6.3	Introdução.....	102
6.4	Material e Métodos.....	103
6.4.1	Obtenção do material.....	104
6.4.2	Dosagem de proteínas.....	105
6.4.3	Detecção da atividade enzimática proteolítica da tripsina e quimiotripsina de larvas de acará-disco (<i>Symphysodon sp.</i>) <i>in vitro</i>	105
6.4.5	Visualização do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	106
6.4.6	Detecção de atividade proteolítica serínica e sisteínica em gel.....	107
6.5	Resultados.....	107
6.5.1	Atividade da Quimiotripsina.....	108
6.5.2	Atividade da Tripsina.....	117
6.6	Discussão.....	128
6.7	Conclusão.....	131

6.8	Referências Bibliográficas.....	132
7.	CAPÍTULO III: NUTRIÇÃO DE PEIXES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA: ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA DAS PUBLICAÇÕES MUNDIAIS E BRASILEIRAS NA BASE SCOPUS.....	135
7.1	Abstract.....	135
7.2	Resumo.....	136
7.3	Introduction.....	137
7.4	Material and Methods.....	140
7.5	Results.....	141
7.6	Discussion.....	142
7.7	Conclusions.....	145
7.8	References.....	146
	Apêndice A.....	148
	Apêndice B.....	149
	Apêndice C.....	150
	Apêndice D.....	151
	Apêndice E.....	152
	Apêndice F.....	153
	Apêndice G.....	154

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 027/2013

Duarte, Shaytner Campos

Atividade amilolítica e proteolítica as fases iniciais de cultivo de Acará-disco (*Symphysodon* sp.) / Shaytner Campos Duarte. – 2013. 154 f.

Orientador: Dalcio Ricardo de Andrade.

Tese (Doutorado - Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Nutrição de peixes 2. Larvicultura 3. Digestão 4. Intestino 5. Enzimas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 639.3

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura pode ser definida como o processo de produção em cativeiro de organismos com habitats predominantemente aquático como peixes, camarões e rãs, entre outros. Devido ao grande potencial hídrico do Brasil e da grande diversidade de espécies de peixes pouco exploradas, e com potencial zootécnico não conhecido, pode-se dizer que o sucesso da aquicultura nacional está associado ao conhecimento das características morfo-fisiológicas e comportamentais das espécies (PEZZATO, 1997).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, FAO (2006), no ano de 2005, a aquicultura como um todo teve um crescimento de 5,2%, alcançando o valor de 63 milhões de toneladas, dos quais 30,3 milhões são de peixes. Por outro lado, a pesca extrativista apresentou uma produção de 94,6 milhões de toneladas, representando queda de 1,2%, em relação ao ano anterior. No total, produziu-se 157,6 milhões de toneladas de pescado, dos quais aproximadamente 40% foram provenientes da aquicultura (FAO, 2010).

A aquicultura brasileira é responsável por 10,4% da produção aquícola da América Latina. A produção de peixes ornamentais é uma modalidade da aquicultura em plena expansão nas últimas décadas (CHAPMAN *et al.*, 1997).

Desde que rompeu as fronteiras geográficas da China, seu país de origem, a criação de peixes ornamentais em cativeiro tem passado por várias modificações e incrementos, culminado com a constituição de um mercado que movimentava cerca de três bilhões de dólares por ano (FAO, 2000) e uma indústria mundial que chega a quinze bilhões de dólares ano. Singapura é, de longe, o maior exportador de peixes ornamentais do mundo, seguido por Hong Kong, Japão, Malásia, República Tcheca, Filipinas e Sri Lanka (FAO, 2000).

O Brasil já foi um grande exportador de peixes ornamentais, provenientes do extrativismo, principalmente na década de setenta, quando segundo Vidal Junior (2002) chegou-se a mais de trinta milhões de dólares por ano. Entretanto, a partir da década de oitenta, a exportação declinou até se estagnar na década de noventa, próxima a quatro milhões de dólares e, decrescendo no ano dois mil para pouco mais de três milhões de dólares por ano (IBAMA 2004).

No Brasil, a produção de peixes ornamentais é recente, quando comparada a outros países, iniciando na década 40. O estado de Minas Gerais destaca-se como centro de produção do Brasil, com diversas variedades e/ou espécies. Entretanto, o Brasil participa com apenas 6,5% das importações pelo mercado norte-americano, indicando a necessidade de maior apoio e incentivo à atividade, tendo em vista o grande potencial nacional (PEZZATO & SCORVO FILHO, 2000).

Com o aumento do interesse no cultivo de diversas espécies de peixes, faz-se necessário também o incremento de pesquisas para o desenvolvimento de sistemas de cultivo e manejo adequados. O manejo alimentar de peixes é de grande importância para o êxito da atividade, pois, independentemente da fase de crescimento, modifica o desempenho do peixe, uma vez que está diretamente relacionado à frequência e forma de arração, influenciando a utilização da ração pelos mesmos (SCORVO FILHO, 1988).

Estudando níveis de proteínas em dietas de peixes, Zuanon (2006), constata que são escassas as informações até mesmo sobre exigências dos componentes de maior importância na dieta, que são a proteína e energia, para a maioria das espécies.

Um dos problemas enfrentados pelos produtores de peixes de corte e de peixes ornamentais é a grande mortalidade que se verifica nos estágios iniciais de desenvolvimento desses animais. Uma das causas dessa mortalidade é a dificuldade de se fornecer alimento a estes organismos de forma adequada, o que demonstra ser necessário um melhor conhecimento sobre a fisiologia, ontogenia e hábitos alimentares dos peixes (CONCEIÇÃO *et al.*, 2003a).

A mortalidade nas fases iniciais é geralmente causada por problemas alimentares, nutricionais como erro no manejo alimentar e incapacidade de digerir e absorver o alimento, predação e variações físico-químicas da água. Informações relacionadas aos desenvolvimentos morfológico e morfométrico, nos padrões de crescimento, comportamento de peixes e de ativação de enzimas digestivas são fundamentais para compreender as mudanças das exigências fisiológicas de cada espécie e os fatores que afetam o desenvolvimento das espécies de peixes de corte e ornamental (ROTTA, 2003; CONCEIÇÃO *et al.*, 2003a).

A pesquisa em nutrição de larvas e juvenis de peixes da família Cichlidae se justifica, por ser necessária para identificar o melhor momento para fornecimento de alimentação exógena para as larvas viáveis produzidas

em cativeiro. O monitoramento e a observação das mudanças fisiológicas e o acompanhamento do desenvolvimento inicial dos peixes favorece de uma forma geral toda a cadeia produtiva de peixes.

2. OBJETIVO

Avaliar a capacidade digestiva enzimática de larvas e juvenis de Acará-disco (*Symphysodon* sp).

Específicos

- Verificar a atividade enzimática amilolítica e proteolítica digestiva nas fases iniciais de desenvolvimento do acará-disco;
- Quantificar a atividade enzimática amilolítica digestiva nas fases iniciais de desenvolvimento do acará-disco;
- Quantificar a atividade enzimática proteolítica (tripsina e quimiotripsina) digestiva nas fases iniciais de desenvolvimento do acará-disco;
- Caracterizar o perfil enzimático digestivo do acará-disco.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Nutrição Animal Como Ciência

A principal finalidade da nutrição animal é a produção, a um mínimo custo atrelado (atendendo ao princípio da economia), primordialmente, a princípios estabelecidos que não venham prejudicar a sociedade. Pois, cada vez mais é consenso de que a aplicação da nutrição animal deve obedecer a regras bem definidas e baseadas em pressupostos que são: a ecologia (sustentabilidade ambiental), a qualidade (aceitabilidade e segurança alimentar) e a responsabilidade (proteção humana, animal e ética). A associação dos fatores que coordenam a ação dos profissionais da nutrição depende do grau de importância que a produção de alimentos de origem animal assume em determinado país ou região. Em países onde existe grande escassez de alimentos, os fatores ecológicos de qualidade e responsabilidade assumem de forma nítida um papel secundário (ANDRIGUETTO *et al*, 1990).

Na alimentação animal, procura-se o máximo de eficácia, com o máximo retorno. Para isso é necessário um manejo adequado, uma alimentação adequada e uma ótima absorção dos nutrientes para que o animal cresça e produza em perfeitas condições nutricionais.

A avaliação de alimentos e a nutrição dos animais têm sido alvo de linhas de pesquisa desenvolvidas nos programas de Pós-graduação em Produção e Ciência Animal no Brasil. Devido ao grande número de publicações e teses realizadas nessas linhas, as disciplinas relacionadas a "Avaliação de Alimentos" e "Exigências Nutricionais para Monogástricos" tem sido parte da grade curricular na maioria dos programas. Dessa forma, grande parte dos profissionais que trabalham em universidades, instituições de pesquisas ou em empresas privadas têm sua formação voltada para essas linhas de investigação (BELLAVAR, 2005a).

A nutrição tem sido estudada por mais de 200 anos. Em 1779, Adair Crawford foi um dos pioneiros do ramo da calorimetria e da experimentação animal. Em 1783, Antoine Lavoisier e Pierre Laplace realizaram uma série de experiências excepcionais, considerado como a fundação da bioenergética e nutrição moderna. Eles observaram que o calor produzido por uma cobaia

poderia ser medido pela quantidade de gelo que derretia e que o calor produzido poderia estar relacionado com a troca respiratória de forma quantitativa. Lavoisier era, assim, o primeiro a reconhecer o verdadeiro papel de oxigênio na geração de calor por animais. Lavoisier contribuiu para o estudo da energia e respiração em animais, mas não ficou limitado a elucidação da relação entre a respiração e a produção de calor, mas também incluídos vários aspectos do metabolismo energético dos animais (JOBILING, 1995).

Nutricionistas que trabalharam na Estação Agrícola Experimental Weende na Alemanha, no século XIX, reconheceram que componentes de alimentos que faziam uma contribuição significativa para o abastecimento energético do animal poderiam ser caracterizado em três classes de compostos: proteínas, gorduras, e carboidratos. A estequiometria da oxidação destas classes de compostos permitiu o cálculo da energia libertada na forma de calor a partir medições de trocas gasosas, consumo de oxigênio e de carbono na produção de dióxido de carbono, juntamente com medidas de excreção de nitrogênio urinário. Este método de medição da produção de calor é referido como calorimetria indireta ou respirometria (SMITH, 1982).

Em 1914, alguns pesquisadores começaram a aplicar os princípios da bioenergética para a piscicultura. Desde então, tem havido várias centenas de relatos sobre estudos em nutrição para várias espécies de peixes.

3.2. Nutrição Animal com Foco na Nutrição de Peixes

Segundo Baldisserotto (2009b) pode-se definir o sucesso do manejo nutricional na piscicultura em quatro questões práticas: O que fornecer? Relaciona-se ao tipo de alimento oferecido, incluindo seus atributos qualitativos, que influenciam diretamente na digestibilidade das dietas. Quanto fornecer? Refere-se à quantidade de dieta oferecida de forma a garantir o desempenho animal associado com a viabilidade econômica dos sistemas criatórios. Quando alimentar? É o número de refeições diárias oferecidas aos peixes. Tem muita relação com o sistema de criação e principalmente com a densidade de estocagem de peixes (DE). Como alimentar? A forma como o alimento será ofertado, manualmente, mecanicamente ou pelo uso de sistemas automatizados.

Segundo Kubitzka (1998), o correto fornecimento de rações proporciona: maximizar o crescimento dos peixes e o número de safras anuais; melhora da eficiência alimentar; aumento da densidade de peixes; melhora da tolerância a manejos e doenças; diminuição de resíduos excretados (N e P); melhora na performance reprodutiva.

Um aspecto importante no manejo nutricional de peixes é que a dieta oferecida é um fator que contribui para a funcionalidade do trato digestório dos animais e, portanto, influencia na capacidade de aproveitamento. A relação da dieta com o hábito alimentar natural do peixe é fator decisivo no manejo de sistemas intensivos. Peixes bem adaptados ao cultivo, como a tilápia, podem aproveitar tanto o alimento natural dos viveiros, bem como dietas balanceadas (PEZZATO & BARROS, 2005).

A digestão nos peixes não se inicia pela boca, que serve basicamente para apreensão e imobilização do alimento, já que a maioria dos peixes não mastiga suas presas. Os peixes não possuem saliva, apenas algumas espécies apresentam substâncias que auxiliam na formação do bolo alimentar. Nas espécies filtradoras (aquelas que aproveitam alimento natural), os rastros branquiais desempenham um importante papel na nutrição (RANDALL *et al*, 2000).

Nas espécies de peixes que possuem estômago, o mesmo serve para iniciar a digestão dos alimentos, principalmente a fração protéica, pela presença do ácido clorídrico e da enzima protease ácida ou pepsina. Este órgão está presente normalmente em espécies carnívoras (BALDISSEROTTO, 2002).

Segundo Rotta (2003), o intestino possui função digestiva e de absorção dos alimentos consumidos. Espécies não carnívoras normalmente possuem intestinos mais compridos. Na porção anterior do intestino dos peixes atuam as principais enzimas relacionadas à digestão (amilase, tripsina, quimiotripsina, maltase, lipase, carboxipeptidases), sendo a porção posterior mais relacionada à absorção de nutrientes. Em algumas espécies existem estruturas que auxiliam na digestão por apresentar maior área em contato com os alimentos – os chamados cecos pilóricos.

Existe relação entre a composição do alimento, hábito alimentar, atividade de enzimas digestivas e composição da carcaça de peixes criados em

confinamento, com alimentação controlada (EUSÉBIO & COLOSO, 2002; DEGUARA *et al*, 2003). Do ponto de vista fisiológico, o período considerado mais crítico na digestão dos peixes é a fase de transição entre o estágio larval e juvenil, pois se modifica a alimentação (alimento vivo para ração).

3.3. Principais Alimentos Utilizados em Nutrição de Peixes

O crescimento da aquicultura como agroindústria e a intensificação de estratégias de produção condicionaram a busca por ingredientes de alta qualidade que permitam a formulação e o processamento de dietas nutricionalmente completas e economicamente viáveis, maximizando a produção de pescado e minimizando o impacto ambiental de sistemas de produção. A composição química de ingredientes para rações, tanto de origem animal como vegetal, varia principalmente com respeito ao conteúdo de aminoácidos (BELLAVÉR, 2005a).

Os nutrientes são formados por elementos ou substâncias químicas que oferecem suporte para as fases do animal, como: reprodução ou manutenção dos processos vitais. Essas substâncias são aproveitadas como fontes de energia metabólica e como matéria-prima, que gera a formação e reparação corporal, mantendo suas funções (ANDRIGUETTO *et al*, 1990).

3.4 Alimentação e Nutrição de Peixes

Há uma estreita relação de interdependência entre a nutrição, o habitat e a organização do aparelho digestivo, a qual se manifesta especialmente por adaptações e modificações. Essas são variações morfológicas provocadas pela ação de fatores do ambiente sobre o organismo, podendo ser de caráter permanente, produzidas na evolução filogenética, como no caso das adaptações, ou de caráter temporário, produzidas no ciclo ontogenético do indivíduo (desenvolvimento do indivíduo desde a fecundação até a maturidade reprodutiva), chamadas de modificações. A dieta é um dos fatores que confere aos órgãos do aparelho digestivo características funcionais, anatômicas e morfométricas próprias para cada regime alimentar (ROTA, 2003).

Estudos nutricionais de peixes ornamentais são escassos em comparação com os de peixes de corte (SHIM & CHUA, 1986; SHIM, 1988). Portanto, a alimentação desses peixes tem como base recomendações de resultados obtidos com peixes de maior interesse comercial. Além disso, o número de espécies cultivadas é muito grande e os hábitos alimentares são variados (FABREGAT *et al.*, 2006).

Durante o desenvolvimento larval dos peixes, tanto nas espécies herbívoras como nas carnívoras, passam por uma mudança no hábito alimentar, que inicialmente é planctônico, alimentando-se primeiramente de fitoplâncton, depois de zooplâncton (ROTTA, 2003).

Desta forma, as exigências nutricionais para as diversas fases de vida e melhoria no desempenho de várias das espécies ainda são informações a serem pesquisadas (MORO *et al.*, 2010).

A proteína é geralmente o nutriente mais caro da dieta de qualquer animal e, principalmente na piscicultura, afeta diretamente o custo de produção, uma vez que os peixes necessitam de maiores níveis deste nutriente na dieta que outros animais. Isto, somado ao fato de os custos de alimentação corresponderem de 50 a 70% dos custos totais de produção, torna indispensável estudos relativos à exigência protéica de peixes cultivados. A exigência protéica de uma espécie de peixe representa a quantidade mínima de uma mistura de aminoácidos que leva à obtenção do máximo crescimento possível. É influenciada por vários fatores, incluindo a fonte protéica, relação proteína: energia da dieta, tamanho e idade do peixe e temperatura ambiente (SEIXAS, 1999).

O aumento no teor de proteína da dieta, geralmente aumenta o desempenho produtivo do peixe. Porém, níveis de proteína acima do ótimo exigido resultam em desaminação excessiva e catabolismo protéico, causando aumento da excreção branquial de nitrogênio amoniacal, que terá efeito tóxico ao peixe. Com altos níveis na dieta, a proteína é utilizada tanto para crescimento quanto para satisfação das exigências energéticas. Assim, a substituição parcial da proteína por fontes de energia mais baratas, como carboidratos e lipídios, pode resultar em economia de proteína (AZEVEDO *et al.*, 1998; MOURA, *et al.*, 2007; MORO, *et al.* 2010).

Zuanon (2006), testando dietas com níveis de proteína bruta entre 34% e 46%, não verificou diferenças no desempenho produtivo do acará-bandeira, exceto na taxa de eficiência protéica, indicando que a exigência protéica da espécie pode ser inferior aos níveis avaliados.

Alimentar adequadamente os peixes significa prover condições para que eles tenham acesso aos nutrientes necessários ao seu crescimento e reprodução. Para isso, deve-se fornecer alimentos que possam ser capturados pelos peixes e, posteriormente, ser digeridos até gerarem moléculas que possam ser absorvidas pela parede intestinal (CONCEIÇÃO, *et al.*, 2003b; DABROWSKI, *et al.*, 1989).

Assim, no caso de pós-larvas e até de alevinos, o alimento deve ser fornecido, várias vezes ao dia, de forma a se obter o melhor desempenho zootécnico. A ração deve ser em pó e até mesmo finamente pulverizada, dependendo do tamanho da boca das pós-larvas. Nessa fase, podem ingerir até mais de 10% do peso vivo diariamente, e o resultado terá influência direta no desempenho produtivo e reprodutivo dos peixes (FERREIRA & SILVA, 2004).

Não basta alimentar bem os peixes, a alimentação deve ter custo compatível com a finalidade do cultivo. O manejo alimentar depende, principalmente, do tamanho dos peixes, da dimensão dos tanques, viveiros, aquários e do sistema de manejo utilizado (se intensiva, ou semi-intensiva), do comportamento alimentar da espécie cultivada, também da temperatura e da qualidade da água (KUBITZA, 2000; SANTOS, 2007).

3.5. A Ração: importância na nutrição, produção, mercado e limitações.

A indústria de alimentação animal é uma das que mais cresce em todo mundo, impulsionada pelas preocupações com a segurança alimentar. De acordo com a IFIF (Internacional Feed Industry Federation – Federação Internacional das Indústrias de Alimentação Animal), a produção mundial de rações vem crescendo a níveis recordes, produzindo aproximadamente 614 milhões de toneladas (IFIF, 2010). A produção brasileira de alimentos balanceados para nutrição animal é a terceira maior do mundo, apresentando acentuado crescimento nos últimos anos (SINDIRAÇÕES, 2009).

No Brasil, o setor de fabricação de alimentos para nutrição animal sofreu grandes mudanças a partir da década de 1980, saltando de uma produção de 5 milhões de toneladas para mais de 47 milhões de toneladas de ração em 2005 conforme figura 1, chegando a 61 milhões em 2009 (CUTAIT, 2009). As empresas do setor adaptaram-se às novas tecnologias, e buscam constantemente o aperfeiçoamento dos sistemas de produção e otimização da utilização dos recursos produtivos.

A demanda por ração para peixes em 2010 foi de 345 mil toneladas e crescimento de 15%. Já o consumo da carcinicultura incrementou 5% e consumiu 84 mil toneladas de rações. O consumo de organismos aquáticos alcança 7 kg/capita e a aquicultura já representa 25% da produção de 1,2 milhões de toneladas de peixes, crustáceos, moluscos e outros organismos aquáticos (SINDIRAÇÕES, 2009).

A produção brasileira pode alcançar 2 milhões de toneladas, alavancada pelo clima favorável, disponibilidade de água doce, extensão litorânea e milhões de hectares de áreas alagadas e reservatórios. O vigoroso e gradual desenvolvimento da aquicultura compensará a diminuição do extrativismo na aquicultura (SINDIRAÇÕES, 2011).

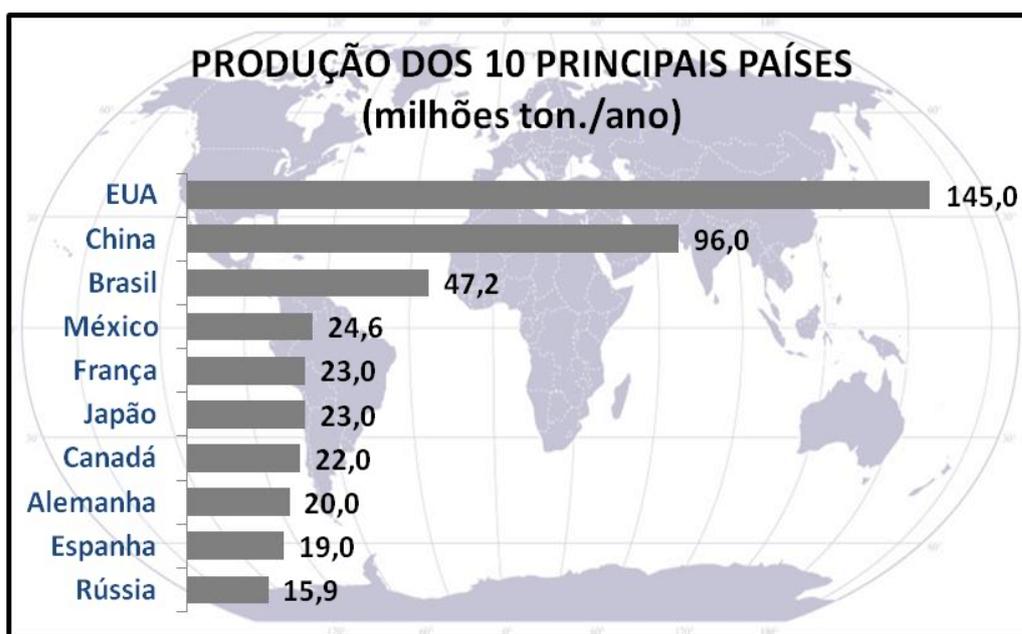


Figura 1. Produção dos 10 principais países produtores de rações balanceadas em 2005. (Fonte: Adaptado de SINDIRAÇÕES, 2007).

O Ministério da Pesca e Aquicultura estabeleceu meta de aumentar consumo de pescado para 12 kg/capita. A estimativa do Sindirações era de produzir 400 mil toneladas de rações para peixes e camarões, um crescimento de 14% em 2011 conforme mostra a figura 2.

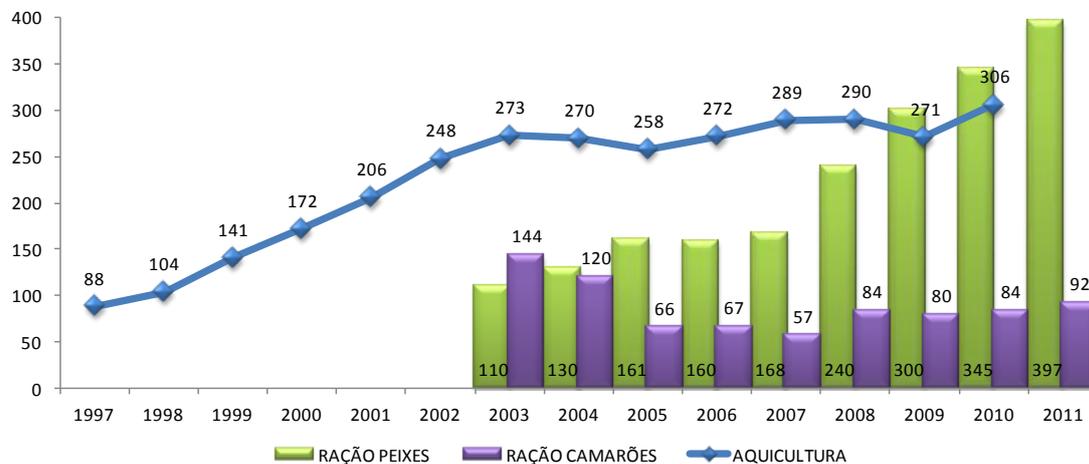


Figura 2. Produção de ração e produção aquícola brasileira.

Fonte: adaptado de Sindirações (produção de rações); 1997 a 2002 (dados não disponíveis para rações); Fonte: FAO (produção aquícola) 2008.

Dentro da composição nutricional das farinhas é importante ter em mente a ordem de limitação dos aminoácidos o que irá auxiliar na formulação das dietas. Wang & Castanon (1997) e Wang & Parsons (1998a) estabeleceram a ordem de limitação de aminoácidos. Muitos dos agrupamentos de farinhas têm sido feitos com base na proteína, sendo questionável a utilização de apenas uma variável para classificação (proteína). A composição das farinhas é bastante variável e por isso, agrupá-las quanto às suas características multivariadas, permite uma melhor classificação. A análise de clusters feita por Bellaver *et al.* 2000; Bicudo *et al.*, 2010, confirmam que esse método permite uma melhor categorização das farinhas.

Pesquisas de diversos autores têm descrito grupos distintos de categorias de farinhas utilizadas em ração animal. Esta variabilidade se deve a vários efeitos entre os quais, o tamanho das partículas, os níveis de substituição na ração referência, as metodologias para estimar a digestibilidade/biodisponibilidade, a origem e composição das farinhas (WANG & PARSONS, 1998b; BELLAVER *et al.*, 2005b), o processamento (ALBERNAZ, 2000; Pezzato *et al.*, 2009).

3.5.1 Limitações na formulação e fabricação de rações

A qualidade das matérias primas para fabricação de rações é um dos fatores a serem observados para que se obtenha melhores desempenhos na produção animal. Embora os custos e as facilidades para analisar cada ingrediente, tornem a rotina de análise difícil de ser implementada, é preciso ter em mente que os fatores antinutricionais, bactérias (Salmonelas, Coli), príons (agentes infecciosos) responsáveis pelas encefalopatias espongiformes, cheiro, cor, sabor podem afetar a qualidade final dos rações produzidas. Está se tornando cada vez mais importante para o comércio internacional a rastreabilidade de ingredientes usados no sistema produtivo, a qual determina quais os ingredientes que podem e os que não podem ser utilizados (BELLAVÉR, 2005a).

No caso dos subprodutos de abatedouros alguns pontos são importantes: contaminação bacteriana; peroxidação das gorduras; presença de poliaminas; encefalopatia espongiforme bovina; composição e digestibilidade dos aminoácidos e da energia (BELLAVÉR, 2001).

Um dos gargalos da piscicultura é a dependência da farinha e do óleo de peixe, subprodutos da pesca que são as principais fontes de proteína e ácidos graxos essenciais na alimentação dos peixes cultivados. Como a produção mundial de farinha e óleo de peixe encontra-se no limite máximo, o futuro do cultivo de peixes carnívoros, portanto, dependerá da substituição desses ingredientes (CAVALLI & FERREIRA, 2010).

Outro fator limitante no desenvolvimento de rações mais especializadas para a aquicultura é a pequena participação no mercado consumidor que é de aproximadamente 1% do consumo nacional quando classificado por espécies figura 3.

Mesmo tendo uma produção crescente de pescado e para a indústria de rações, a aquicultura brasileira tem pouca representatividade, o que leva a uma menor taxa de pesquisas e desenvolvimento de tecnologias para superar os agentes limitantes para um melhor desempenho na aquicultura como um todo, e em especial na piscicultura.

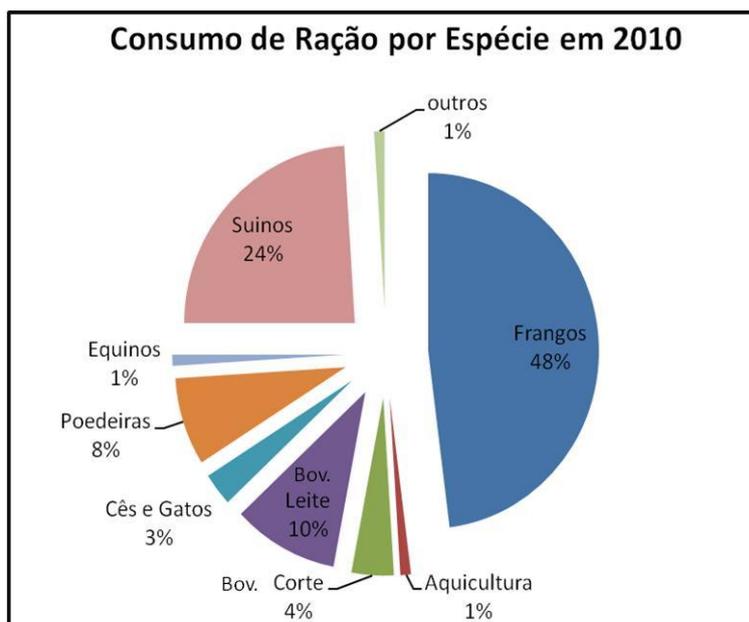


Figura 3. Distribuição por espécies, do consumo de ração no ano de 2010.
Fonte: Adaptado de Sindirações, 2011.

3.6. Fisiologia da Digestão: digestibilidade e absorção de nutrientes

Sabe-se que a digestibilidade e a disponibilidade de nutrientes permitem um melhor ou pior aproveitamento da dieta. Isso influencia o equilíbrio nutricional animal, determina maior resistência a doenças e responde por maior produtividade em sistemas intensivos. Desta forma, deve-se questionar o valor nutritivo dos alimentos que compõem as rações utilizadas nos sistemas intensivos de produção, visando à confecção de rações balanceadas de alta qualidade, para a aplicação de boas práticas de manejo (PEZZATO *et al.*, 2009).

Segundo Hepher (1988), a digestão do alimento depende de três fatores principais: o diâmetro das partículas que constituem o alimento ingerido, pelos quais se torna susceptível à ação das enzimas digestivas, a atividade dessas enzimas e o tempo de exposição do alimento ao sistema digestório.

Sem dados precisos de digestibilidade, os nutricionistas de peixes arriscam-se em superdosagens que podem elevar o custo de produção ou em uma subdosagem, que pode reduzir a taxa de crescimento e outras medidas de desempenho do peixe. Utilizar ingredientes altamente digestíveis é especialmente importante em condições de cultivo de alta densidade. Onde o acúmulo de alimentos não digeridos eutrofisa a água, aumentando o custo de

tratamento da mesma, além de aumentar a chance de ocorrer doenças nos peixes, o que pode ocasionar alta mortalidade (ALBERNAZ, 2000).

A absorção de proteínas ocorre em boa parte na forma de aminoácidos, esta absorção ocorre normalmente na membrana apical dos enterócitos dos peixes, processo semelhante ao da maioria dos mamíferos. Um dos fatores limitantes quanto a suplementação de aminoácidos nas dietas para peixes é a condição de que o mecanismo de absorção e transporte é comum a alguns grupos de aminoácidos. A presença de grandes quantidades de um determinado aminoácido poderá inibir a absorção de outro, pois o primeiro irá ocupar todos os transportadores específicos, o que dificultará a absorção do outro aminoácido de interesse (BALDISSEROTTO, 2009b).

Segundo Baldisserotto, (2009b) em alguns teleósteos, a absorção de peptídeos é mais rápida que a absorção dos mesmos aminoácidos na forma livre, o que pode caracterizar que o fornecimento de AA de forma livre não seriam necessariamente a resposta para uma suplementação de uma ração ou dieta deficitária naqueles AA específicos.

Alguns autores relataram que peixes alimentados com rações balanceadas com aminoácidos livres obtiveram desempenho zootécnico inferior aos alimentados com rações balanceadas a base de proteínas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2003a; BICUDO *et al.*, 2010).

O uso de ingredientes de origem vegetal, como sementes de leguminosas, tortas de sementes oleaginosas, farelos, concentrados proteicos e tubérculos, entre outros, como alimentos para peixes, é limitado devido à presença de uma grande variedade de substâncias antinutricionais. Dentre algumas mais relevantes estão taninos, saponinas, lectinas, fitoestrógenos, alcalóides, compostos antigênicos, gossipol, cianogênios, mimosina, ácidos graxos ciclopropenos, canavanina, antivitaminas, ésteres, glicosinolatos, inibidores de proteases, fitatos, oligossacarídeos e polissacarídeos não-amiláceos (PNAs) (FRANCIS *et al.*, 2001).

Os fatores anti-nutricionais não são tóxicos para os animais, mas sua presença no alimento pode resultar em crescimento reduzido, conversão alimentar ruim, alterações hormonais e esporádicas lesões nos órgãos (HENN, 2002).

O alto custo dos alimentos protéicos, associado ao uso excessivo de fontes nitrogenadas em dietas para peixes, exige reavaliação urgente e mais precisa da

qualidade e do nível de proteína a ser utilizado em formulações comerciais (LI & ROBINSON, 1998). Dentre os inúmeros produtos de origem vegetal, considerados potenciais substitutos da fração protéica de origem animal para peixes, o farelo de soja é o que vem recebendo maior atenção por parte dos nutricionistas (KUBITZA, 1990). A proteína da farinha de soja integral foi considerada, por LIM & AKIYAMA (1992), como a melhor fonte de proteína de origem vegetal para suprir as necessidades de aminoácidos essenciais para peixes.

Embora a indústria de rações utilize o tratamento térmico para eliminar fatores antinutricionais, Soto-Salanova *et al.* (1996) relataram que níveis residuais de lectinas e atividades de inibidores de proteases mostraram-se bastantes razoáveis em diferentes amostras de farelo de soja. Francis *et al.*, (2001) comprovaram que amostras de farelos continham níveis de lectina residual suficientes para deprimir a digestibilidade da proteína e mostraram que 0,2 g/kg de inibidor de tripsina deprimem em 15% a digestibilidade da proteína.

Webster *et al* (1992), supõe que a diminuição do ganho de peso de peixes alimentados com farelo de soja, em substituição à farinha de peixe, pode correr tanto pela atividade dos inibidores de proteases como pelo menor conteúdo de energia da dieta.

A eficiência de técnicas de processamento, como as de secagem, aquecimento úmido e extração de solvente e o tratamento com enzimas na remoção dos efeitos deletérios dessas substâncias antinutricionais do alimento, ainda deve ser alvo de discussão, devido a resultados muito divergentes nas pesquisas (FRANCIS *et al.*, 2001).

O amido é um importante ingrediente da dieta de peixes de água doce, como a carpa e a tilapia. Representando em média 60% a 70% do peso dos grãos de cereais, o amido é um componente importante, do ponto de vista nutricional. Para que um animal monogástrico consiga digerir o amido, é necessário que ocorra a ruptura tanto do pericarpo, como da aleurona, sendo esta mais difícil de ser rompida (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

3.7 Larvicultura

Pesquisas têm avaliado diferentes aspectos da larvicultura, incluindo o desenvolvimento inicial dos peixes e o uso de hormônios para a otimização da larvicultura (CLAVIJO-AYALA, 2006; MATTOS *et al.*, 2009).

O sucesso da larvicultura, depende de vários fatores como tipo, quantidade e manutenção do alimento natural disponível nos viveiros, incubadoras, aquários, densidade de estocagem, manejo de larvas e parâmetros da qualidade da água, como pH, amônia, alcalinidade, dureza total e oxigênio dissolvido (KUBITZA, 2000). Dentre esses fatores, os relacionados com a nutrição e o manejo alimentar das larvas e matrizes, são considerados como os pontos mais críticos pois, se não forem bem aplicados, podem ocasionar retardo no crescimento e produção de larvas de baixa qualidade (CHONG *et al.*, 2002a; SOARES, *et al.* 2008).

Em particular, é fundamental aprofundar o conhecimento da fisiologia nutricional das larvas de peixes, de forma a se proceder eficazmente a uma substituição dos organismos zooplancônicos vivos usados na sua alimentação por microdietas inertes (CONCEIÇÃO, 2003a; CONCEIÇÃO, 2007).

As larvas de peixes marinhos, quando comparadas com as suas fases juvenis, têm uma capacidade reduzida de digerir e absorver nutrientes, ainda que, paradoxalmente, tenham taxas de crescimento relativas muito superiores (CONCEIÇÃO *et al.*, 2003b; RONNESTAD & CONCEIÇÃO, 2005).

Este elevado potencial de crescimento implica, no entanto, que as larvas de peixes têm requisitos muito mais elevados em termos de aminoácidos (AA), ácidos graxos altamente insaturados (HUFA) e fosfolípidos (PL), entre outros nutrientes, ainda que os seus requisitos exatos sejam pouco conhecidos (SANTOS, *et al.*, 2008).

Dependendo do tamanho da larva e da especialização do seu trato digestivo no início da alimentação exógena, o alimento vivo permanece como uma necessidade essencial para muitas espécies de peixes. Logo, um dos principais problemas que prejudicam o desenvolvimento da produção de juvenis em escala comercial é a alimentação das larvas nos primeiros dias de vida. Além disso, as necessidades nutricionais das larvas são fortemente influenciadas pela composição nutricional do saco vitelínico e pela composição bioquímica do seu organismo no início da alimentação exógena (muito

variáveis e dependentes da composição do vitelo formado durante a vitelogênese). Este é um fator bem conhecido e que pode ser modificado pela alteração do estado nutricional dos reprodutores (SEGNER, *et al.*, 1994; VEGA-ORELLANA *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2008).

Segundo Hidalgo *et al.* (1999) para efeitos práticos, pode-se classificar as larvas, quanto ao desenvolvimento do trato digestivo e das enzimas secretadas no intestino, em dois grupos. Um com o trato digestivo completo e outro com o trato digestivo rudimentar. As espécies que no momento da primeira alimentação possuem tratos digestivos completos (estruturalmente e funcionalmente diferenciados) possuem menor ou nenhum problema com a alimentação inicial. Aquelas que possuem sistemas digestivos rudimentares (imaturos ou pouco desenvolvidos na primeira fase de vida) são mais difíceis de alimentar e frequentemente necessitam de alimentos vivos como parte das suas dietas.

As larvas com o trato digestivo completo aceitam e conseguem utilizar adequadamente rações fareladas de boa palatabilidade e com adequado balanceamento nutricional, pois apresentam estômago funcional antes da mudança do alimento endógeno para o exógeno, se alimentando pela via oral antes mesmo da completa absorção do vitelo. Neste grupo estão as larvas de salmonídeos e ciclídeos como: tilápias, truta arco-íris, salmão, carpa comum. Mesmo tendo hábitos alimentares diferentes estes dois grupos de peixes apresentam similaridade no desenvolvimento do trato digestório (VEGA-ORELLANA, 2006).

As larvas que possuem o trato digestivo rudimentar geralmente apresentam em comum um pequeno tamanho e pouca habilidade natatória. Neste grupo estão as larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), surubins, curimatá (*Prochilodus sp.*), entre outras (DABROWSKI, 1984).

Os peixes possuem estômago funcional ou glândulas digestórias que desenvolvem-se após o início da alimentação exógena como o pregado (*Scophthalmus maximus*) o linguado (*Solea solea*) e a tainha (*Mugil platanus*). Neste tipo de larvas é observada, nos primeiros dias após a eclosão, a ação de enzimas digestórias no intestino (tripsina, quimiotripsina e aminopeptidase) verificando-se somente a digestão alcalina. Após o desenvolvimento do

estômago (variável conforme a espécie), verifica-se a presença de digestão ácida, que serve como indicativo do início da ação do estômago como órgão funcional (GALVÃO *et al.*, 1997).

Existe ainda um grupo de peixes que não possuem estômago, como alguns representantes das famílias Cyprinidae (kinguio, *Carassius auratus*), Callionymidae (peixe-mandarim, *Synchiropus splendidus*), Loricariidae (limpa-fundos, *Hypostomus plecostomus*) e Syngnathidae que é uma família de peixes que inclui o cavalo-marinho (*Hippocampus sp*) os quais possuem apenas digestão alcalina para degradação do alimento (DABROWSKI, 1984).

Na eclosão, o trato digestivo da larva tem a forma de um simples tubo, mas, após um a três dias do início da alimentação, inicia-se a transformação com a diferenciação das células intestinais para então obter as características do trato digestivo da forma adulta. Em algumas espécies de peixes, as larvas não ingerem alimento após a eclosão, pois sua boca ainda é muito pequena ou está total ou parcialmente fechada. As larvas das carpas chinesas possuem um pequeno período em que não se alimentam, durante o qual o saco vitelínico se encontra quase, mas não totalmente, absorvido. Este período pode variar de um a cinco dias, dependendo da temperatura da água e da espécie (LAUFF & HOFFER, 1984; ORBOLATO, *et al.*, 2006).

Quando as pós-larvas consomem todo o vitelo presente no saco vitelino, e passam a utilizar alimento exógeno, o intestino é curto e as células da mucosa intestinal são pouco diferenciadas, de modo que a digestão é muito rudimentar. A absorção de nutrientes ocorre por pinocitose de macromoléculas e essas são posteriormente digeridas no interior dos enterócitos. Como o intestino é pequeno, o alimento é retido no trato digestivo apenas por um curto período de tempo, de modo que à medida que a pós-larva cresce, a mucosa intestinal se desenvolve e uma maior quantidade de enzimas digestivas são produzidas, facilitando a digestão extracelular. Sabe-se que a habilidade de um organismo para digerir partículas de alimento depende da presença e da quantidade apropriada de enzimas digestivas (ARGENZIO, 1996ab).

Como as pós-larvas iniciam a ingestão de alimento antes da total absorção do vitelo e do seu total desenvolvimento gástrico, muito pouco se aproveita do alimento inicialmente ingerido. Logo, não são capazes de aproveitar bem as primeiras dietas artificiais. Isto se deve à ausência ou inatividade de

algumas enzimas digestivas que podem prejudicar a eficácia da utilização de rações preparadas para pós-larvas (AZEVEDO, 1998; BALDISSEROTO, 2002).

O zooplâncton, como os protozoários, rotíferos, náuplios e adultos de cladóceros e copépodos, entre outros organismos, são os primeiros alimentos externos para as pós-larvas da maioria dos peixes e possuem enzimas endógenas necessárias para o crescimento e sobrevivência dos mesmos, pois as enzimas proteolíticas do próprio zooplâncton são liberadas pela ação física dos processos de captura e ingestão pelas pós-larvas (ESTEVES, 1988; BRAGA *et al.*, 2005).

Essas enzimas exógenas desencadeiam a hidrólise das proteínas do próprio zooplâncton ingerido, estimulando a secreção de enzimas endógenas pelo trato digestivo das pós-larvas, que são substrato-dependentes. A utilização de náuplios vivos de artêmia (*Artemia salina*) na alimentação de pós-larvas é vantajosa por conter várias enzimas proteolíticas, as quais apresentam um importante papel no desenvolvimento do trato digestivo das pós-larvas (CHONG, 2002b; FABREGAT, *et al.*, 2008).

As pós-larvas possuem um pequeno tempo de permanência do bolo alimentar no aparelho digestivo devido ao seu comprimento curto. O esvaziamento pode ocorrer dentro de 2 a 9 horas, o que indica que o fornecimento de alimento deve ser mais frequente nessa fase que para os adultos. As pós-larvas ingerem mais alimento por unidade de peso que os peixes adultos, consumindo de 300% a 50% do seu peso corporal por dia, comparado com 10% a 1% do peso corporal dado aos juvenis ou peixes em crescimento e terminação. Logo, para distribuir esta grande quantidade de alimento durante a larvicultura, é comum que este seja fornecido de 6 a 10 vezes ao dia ou de forma contínua e em excesso (KUROKAWA, *et al.*, 1998; NEVES, *et al.*, 2004; SANTOS, *et al.*, 2007).

Outro aspecto que explica esta necessidade é que a maioria dos ovos que dão origem às larvas dos Teleósteos são numerosos e diminutos, possuindo, portanto, uma pequena reserva vitelínica para a construção do seu corpo, o que exige uma alimentação mais intensa e frequente na fase inicial da vida (MATTOS, 2009).

Quando alimentadas com rações, torna-se necessário que cada partícula de alimento ingerida possua não apenas um ingrediente, mas sim uma

combinação balanceada dos mesmos, pois as pós-larvas usualmente ingerem poucas partículas por vez. As pós-larvas devem receber rações balanceadas em proteína e energia, para promover o rápido crescimento. (SHIM & CHUA, 1986; ZUANON, 2006; VIDAL JUNIOR, 2008).

As rações completas formuladas para pós-larvas devem conter altos níveis de proteína, geralmente entre 40% e 50%, e elevado valor energético, entre 3.600 a 4.200 kcal de ED/kg de ração. Durante a fase inicial recomenda-se uma ração extrusada e finamente moída (SENHORINI, 1993; ROSTAGNO, *et al.*, 2000; SANTOS, *et al.*, 2007)

3.8 Digestão

Segundo Rotta (2003), a digestão é a combinação dos processos mecânicos, químicos e microbianos que sofre o alimento ingerido, promovendo sua quebra em componentes que são absorvidos pelo organismo ou que permanecem na luz do intestino até serem excretados. As atividades mecânicas são a mastigação e as contrações do tubo digestivo; a principal atividade química é efetuada pelas enzimas secretadas pelo animal, nos diversos sucos digestivos; e a atividade microbiana dos alimentos também é enzimática, porém é realizada por bactérias e protozoários presentes geralmente na porção final do tubo digestivo.

O processo geral de digestão nos peixes tem sido pouco estudado quando comparados com os animais homeotermos. Porém, as informações disponíveis sugerem que os peixes são, de uma maneira geral, semelhantes aos outros vertebrados quanto aos processos digestivos (MOURA *et al.*, 2007).

A fim de avaliar a digestibilidade de novos alimentos com maior precisão, recomenda-se o conhecimento da quantidade e especificidade de cada enzima presente no sistema digestivo e as condições em que ocorre a hidrólise. A estreita relação entre as enzimas presentes no trato digestivo dos peixes e a utilização dos nutrientes da dieta tem sido demonstrada. Os peixes onívoros são relativamente eficientes na utilização dos carboidratos da dieta e produzem as enzimas digestivas associadas à degradação e metabolismo de pós-absorção dos açúcares (MOURA *et al.*, 2007).

As informações sobre o padrão de desenvolvimento de enzimas digestivas pancreáticas, suas secreções no duodeno e atividades nos conteúdos intestinais são importantes para a projeção e implementação de estratégias nutricionais e dietéticas para melhorar a utilização de nutrientes pelos animais (VIDAL Jr. *et al.*, 2004). Porém, essas informações não são suficientes para promover melhor desempenho de peixes, visto que a temperatura promove mudanças na fisiologia da digestão e na velocidade das reações metabólicas (FABREGAT, 2006). Portanto, é necessário um conhecimento maior sobre a relação existente entre atividade enzimática e o ambiente.

Para que o peixe possa se nutrir, o alimento capturado terá de ser reduzido a substâncias menos complexas. Isso é necessário para que estes possam atravessar a parede do tubo digestivo e chegar às células do peixe, onde efetivamente serão consumidos. A este processo denomina-se digestão. À passagem do nutriente pela parede do tubo digestivo, chamamos de absorção (SANTOS, *et al.*, 2007; CHONG, *et al.*, 2002b).

Na maioria das espécies de peixes, o alimento é ingerido sem ser triturado e, em muitos casos, o alimento é ingerido vivo. Poucas espécies trituram o alimento, em geral as que o fazem são espécies herbívoras ou onívoras. Esta forma de ingestão, associada ao fato de que os peixes não possuem glândulas salivares, faz com que a digestão mecânica e química comece no estômago (HIDALGO, *et al.*, 1999; SAMPAIO *et al.*, 2001).

Somente alguns peixes secretam produtos digestivos dentro da cavidade bucal, incluindo a faringe. A maioria dos peixes secreta muco para proteger o epitélio que reveste a boca e que possui vários receptores gustativos. Este muco também pode servir como fonte de alimento às larvas dos Ciclídeos herbívoros o que pode ocorrer com as tilápias, que incubam seus ovos na boca como também conter co-fatores que auxiliam na digestão (SEGNER, *et al.*, 1994; SEIXAS FILHO, *et al.*, 1999).

Os peixes, diferentemente dos mamíferos, não possuem atividade da amilase na boca, sendo a produção desta enzima restrita ao pâncreas e intestino, principalmente em animais onívoros e herbívoros. A parede do esôfago é frequentemente pregueada e enrugada, algumas vezes em arranjos bem elaborados e produzem muco em grandes quantidades. Os sacos esofágicos, quando presentes, podem produzir muco e armazenar ou moer o

alimento. Na perca preta (*Girella tricuspidata*) também foi detectada atividade proteolítica na sua mucosa esofágica (ARGENZIO, 1996ab; BALDISSEROTTO, 2002; BRAGA, 2005).

3.9 Enzimas Digestivas

Na maioria dos peixes, a maior parte da digestão ocorre no intestino (ROTTA, 2003), porém, tanto o estômago quanto a mucosa intestinal, o pâncreas e os cecos pilóricos são fontes de enzimas proteolíticas. Onal *et al.*, (2010); Alvarez-Gonzalez *et al.*, (2010), ressaltam que os cecos pilóricos são embriologicamente equivalentes ao pâncreas exócrino e podem ter um papel fisiológico equivalente em alguns casos, sendo portanto muito importante no processo digestivo, já que um grande número de enzimas como tripsina, quimiotripsina, amilases, lipases e quitinase são produzidas pelas células pancreáticas. O tecido pancreático também pode estar associado ao tecido adiposo que reveste os cecos pilóricos ou disperso no mesentério, assim como ocorre em muitos teleosteos (KIM *et al.*, 2001; PEREZ-CASANOVA *et al.*, 2006). Geralmente, a distribuição e a atividade dessas enzimas variam em função do hábito alimentar e da morfologia do trato digestório (HENRY *et al.*, 1993; CHAKRABARTI & RATHORE, 2010; Lin *et al.*, 2010).

3.9.1 Amilase

Amilase é uma enzima da classe das hidrolases que catalisa reações que implicam na ruptura das ligações glicosídicas pela adição de uma molécula de água. A amilase rompe ligações glicosídicas do tipo α -1,4 presentes nas moléculas de amido e glicogênio e possui pH ótimo em torno de 7,0 (YOON & ROBYT, 2003; STRYER *et al.*, 2004).

O amido é a forma de armazenamento para a glicose nos vegetais, sendo constituído por uma mistura de amilose (amido não ramificado) e amilopectina (amido ramificado). A estrutura do glicogênio é similar ao da amilopectina, com maior número de ramificações, sendo a forma de armazenamento de glicose nos

animais. A α -amilase catalisa a hidrólise das ligações α -1,4 da amilose, amilopectina e glicogênio, liberando maltose e isomaltose e não é capaz de hidrolisar as ligações α -1,6 (STRYER *et al*, 2004).

A amilase é uma das enzimas digestivas, de origem pancreática, que age no intestino delgado sobre os polissacarídeos presentes no quimo. Embora os carboidratos constituam um dos três principais componentes das dietas de animais utilizados como fontes de energia para crescimento, as funções biológicas e a metabolização desse nutriente em peixes ainda não estão totalmente entendidas (CAMILO, 2007).

Carboidratos da dieta não são a principal fonte de energia ou carbono para a maioria dos peixes. Os peixes carnívoros como o salmão e a truta, não digerem eficientemente as fontes de carboidratos. Peixes onívoros como o "catfish" e a carpa aproveitam melhor os carboidratos que podem ser adicionados em níveis mais elevados na ração. Em geral, nutricionalmente os peixes aproveitam melhor os carboidratos complexos, como o amido, do que os açúcares simples (HALVER & HARDY, 2002).

3.9.2 Protease

Segundo Halver & Hardy (2002), proteínas são o principal material orgânico nos tecidos de peixes, sendo responsáveis por cerca de 65% a 75% do peso seco total do animal. Peixes consomem proteína para obter aminoácidos. A proteína é digerida ou hidrolisada e libera aminoácidos livres, os quais são absorvidos pelo trato intestinal e distribuídos através do sangue para os órgão e tecidos.

Uma ingestão regular de proteínas ou aminoácidos é necessária porque os aminoácidos são usados continuamente pelo peixe tanto para construção de novas proteínas (crescimento e reprodução) quanto para repor proteínas existentes (manutenção). Proteína inadequada na dieta resulta em uma redução ou parada do crescimento e perda de peso devido ao deslocamento de proteínas de tecidos menos vitais para manter as funções de tecidos mais vitais. Por outro lado, se proteína em excesso for fornecida na dieta, apenas uma parte será usada para síntese de novas proteínas e o restante será convertido em energia (HALVER & HARDY, 2002).

As proteases clivam proteína por uma reação de hidrólise, que compreende a adição de uma molécula de água a uma ligação peptídica. A digestão de proteínas começa pela ação da pepsina no estômago, sendo completada pela ação de proteases alcalinas, como tripsina e quimiotripsina, no intestino. A atividade de protease ácida é mais concentrada no estômago, ocorrendo devido à ativação, em meio ácido, do pepsinogênio em pepsina. Outras proteases atuam também em pH alcalino após serem ativadas por tripsina, a qual é ativada através da enteroquinase, enzima secretada por células intestinais. Estas enzimas encontradas no trato gastrointestinal são muitas vezes complementares e levam à total digestão dos nutrientes da dieta permitindo sua completa absorção (STRYER *et al*, 2004; CAMILO, 2007).

3.9.3 Enzimas digestivas em peixes

As informações sobre o padrão de desenvolvimento de enzimas digestivas pancreáticas, suas secreções no duodeno e atividades nos conteúdos intestinais são importantes para a projeção e implementação de estratégias nutricionais e dietéticas para melhorar a utilização de nutrientes pelos animais (MORO, *et al.*, 2010)

Porém, essas informações não são suficientes para promover melhor desempenho de peixes, visto que a temperatura promove mudanças na fisiologia da digestão e na velocidade das reações metabólicas. Portanto, é necessário um conhecimento maior sobre a relação existente entre atividade enzimática e o ambiente (MOURA, *et al.*, 2007).

Segundo Lauff & Hofer (1984) e Galvão *et al.* (1997), as larvas podem aproveitar as enzimas do próprio alimento vivo, o que facilitaria os processos de digestão na larva até seu sistema digestório estar totalmente diferenciado e desenvolvido. Outros autores, entretanto, afirmam o contrário, o que torna imprescindível o estudo das enzimas digestivas das larvas de interesse zootécnico e ornamental (SEGNER *et al.*, 1994; KUROKAWA *et al.*, 1998).

A maior parte da digestão dos alimentos ocorre no intestino e nos cecos pilóricos dos peixes, quando presentes figura 4. As secreções intestinais contêm um grande número de enzimas, incluindo as três maiores classes, que são as proteases, as lipases e as amilases, as quais hidrolisam as três classes

respectivas de nutrientes, e que são substrato dependentes (HIDALGO, *et al.* 1999; CONCEIÇÃO *et al.*, 2003a; MORO, *et al.*, 2010).

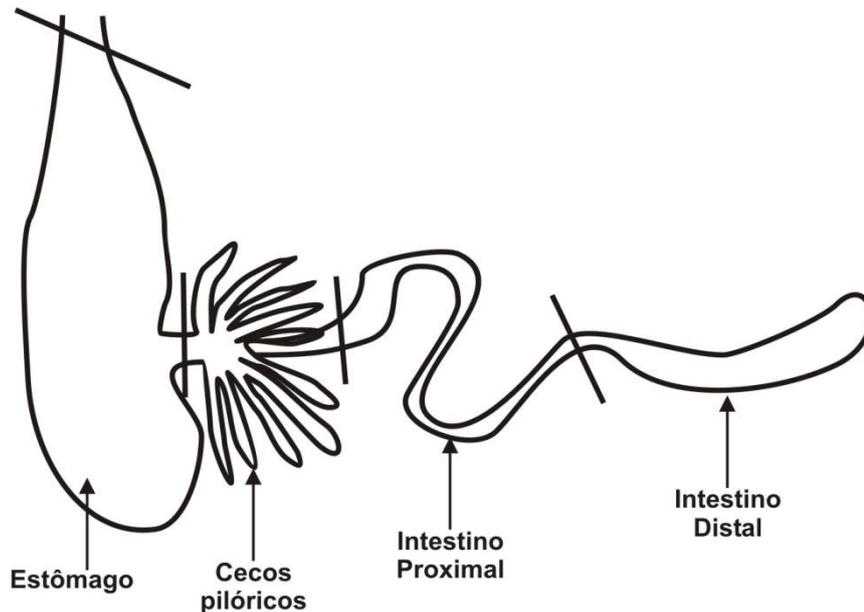


Figura 4. Ilustração adaptada do trato digestório de peixes com algumas divisões.

A secreção das enzimas digestivas é mediada por estímulos neurais e hormonais que geralmente provocam um aumento da secreção enzimática para a luz do tubo digestório. Os dois principais hormônios envolvidos no processo digestivo são a gastrina e a colecistocinina (CCK) (STRYER *et al.*, 2004).

As células secretoras do intestino parecem seguir o clássico padrão dos vertebrados. Na parede do intestino dos peixes ocorrem dobras profundas e as células secretoras que se formam no fundo dessas dobras migram para as suas cristas e descarregam suas secreções. Os enterócitos (células que revestem as paredes do intestino) possuem pequenas pregas em sua membrana apical, as microvilosidades, formando a chamada "borda em escova" que mantém contato com o lúmen intestinal e têm por finalidade aumentar a área de absorção dos nutrientes (HALVER & HARDY, 2002). Ainda segundo os mesmos autores, o comprimento dessas microvilosidades também pode ser alterado conforme o estado nutricional do peixe, diminuindo nas situações de jejum prolongado.

O suco entérico produzido na superfície luminal do intestino é o resultado das secreções oriundas das glândulas de Brünner e de Lieberkühn. O muco é secretado pelas glândulas de Brünner, e age como lubrificante, além de

proteger a mucosa intestinal contra o ácido clorídrico proveniente do estômago, pois também contém HCO_3^- (íon bicarbonato), como nos mamíferos. Essas glândulas também secretam as enzimas senteroquinase e amilase (VEGA-ORELLANA, *et al.*, 2006).

As glândulas de Lieberkühn secretam as enzimas intracelulares sacarase, maltase, oligo-1,6-glicosidases, aminopeptidases, dipeptidases, lecitinases, fosfolipases, ribonucleases, nucleosidases e fosfatases. Essas enzimas são liberadas pelo pâncreas no início do intestino e nos cecos pilóricos (SEIGNER, *et al.*, 1994; ROTTA, 2003).

A digestão dos carboidratos nos peixes é rápida. Os processos digestivos finais dos carboidratos ocorrem no epitélio mucoso do intestino, diminuindo à medida que avançam no trajeto ao reto, e incluem a ação de várias dissacaridases e oligossacaridases. Estas enzimas são secretadas através dos enterócitos e permanecem associadas à borda em escova da mucosa intestinal (SEIXAS FILHO, *et al.*, 1999).

3.10 Funções das Proteínas

Formação dos tecidos: Os órgãos e a maioria dos tecidos são formados principalmente por substâncias protéicas, cuja função nenhuma outra substância pode exercer. Além disso, pele, pelos, penas, unhas, chifres e músculos são constituídos quase que exclusivamente de proteínas (STRYER *et al.*, 2004).

Manutenção e reparo: As proteínas são necessárias, não somente para a construção dos tecidos novos, mas também para renovação dos mesmos, com necessidades que variam segundo o estágio de desenvolvimento e a categoria do animal dentro da espécie (STRYER *et al.*, 2004).

Fonte de energia: As proteínas atuam como fonte de energia quando em excesso, ou quando faltam os carboidratos e gordura, que representam o material combustível do organismo (STRYER *et al.*, 2004).

3.11 Regulação do Metabolismo

Secreções Glandulares: Muitos hormônios e enzimas são materiais protéicos ou contêm resíduos de aminoácidos como parte essencial de sua

estrutura. A insulina possui, pelo menos, nove (9) aminoácidos (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

Desintoxicação do organismo: Durante o metabolismo há produção de ácido benzóico, que seria bastante tóxico para o próprio organismo se não houvesse uma combinação sua com a glicina produzindo o ácido úrico, que não é tóxico (SILVA & ANDERSON, 1995).

As proteínas são importantes também na síntese de outras substâncias para o metabolismo, como a creatina. Atuam no mecanismo de defesa, desempenhando neste uma importante função na formação de anticorpos, como as imunoglobulinas. No balanço de fluidos, a manutenção do equilíbrio ácido-base tem a participação das proteínas. Participam na formação de nucleoproteínas e no transporte como as hemoglobina, mioglobina e globulinas (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

A assimilação de fósforo (P) dietético pelos peixes varia com a quantidade e, principalmente, a fonte dietética de fósforo. Utilizar níveis dietéticos de fósforo (P) ajustados cuidadosamente às exigências nutricionais dos peixes e alimentos altamente digestíveis é o modo mais seguro para evitar perdas excessivas de fósforo e eutrofização da água. Concentração de amônia na água é outro fator que limita a produtividade na piscicultura. Dependendo da biomassa acumulada ou densidade de estocagem, a composição das dietas, a excreção de nitrogênio pode alcançar níveis crônicos ou letais em um sistema de piscicultura, ou resultar também em super-eutrofização e consequente "desequilíbrio ou perda" de um determinado sistema de produção (PEZZATO *et al*, 2002).

3.12 Proteína Requerida para Peixes

Uma das mais intensivas áreas de pesquisa de nutrição de peixe está centrada na dieta de proteína requerida de vários peixes. Por causa da importância da proteína para o peixe, isto tem se tornado um ótimo tópico muito bem estudado sobre nutrição de peixe.

A grande maioria dos trabalhos feitos para determinar o requerimento de proteína dos peixes indica que peixe necessita de 2 a 4 vezes mais proteína do que animais de sangue quente como pássaros e mamíferos. Isto é devido a uma

alta necessidade do peixe em aminoácidos essenciais (HALVER & HARDY, 2002).

Está bastante claro que a maioria dos peixes necessita de pelo menos duas vezes ou mais, de proteína do que ratos e porcos e outros mamíferos. Tem-se encontrado diferença no nível ótimo de proteína entre os peixes carnívoros e onívoros (PEZZATO, 1997).

3.13 Fatores que Influenciam a Necessidade de Proteína nos Peixes

Boa parte da literatura tem revelado que existem muitos fatores que afetam a necessidade de proteína nos peixes. Dentre estes fatores alguns de grande importância na produção de peixes encontram-se relacionados abaixo:

A Temperatura: DeLong *et al* (1958), usando dietas de gelatina-caseína, demonstraram que o nível ótimo de proteína na dieta para salmão chinook era 40% a 8.3°C e 55% a 14.4°C, o critério do experimento usado foi o crescimento. Em outro experimento usando dieta de caseína e glúten de trigo, descobriram que o nível ótimo de proteína na dieta era 35% a 20.6°C e 40% a 24.4°C para o bagre do canal. Os autores verificaram ainda que à medida que a temperatura sobe, o crescimento do peixe é acelerado, provocando um acréscimo na necessidade de proteína. Com a redução da temperatura da água, o crescimento é reduzido e isto resulta em menor necessidade de proteína. DeLong *et al* (1958) consideraram a hipótese, entretanto, de que maiores valores de necessidade de proteína a uma temperatura mais alta deve ser atribuído a um aumento da excreção endógena do nitrogênio devido ao aumento do catabolismo do nitrogênio. Isso pode indicar não um incremento da necessidade para o crescimento, mas um incremento da necessidade de manutenção.

A Qualidade da Proteína: A qualidade da proteína determina o valor da proteína para o crescimento. A mais eficiente fonte dietética será a de quantidade exata e qualidade de aminoácido necessários ao animal. Os dez aminoácidos essenciais também foram encontrados em salmão e truta e, para a maioria dos estudos, a um mesmo nível. Estes aminoácidos são a arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, lisina

e valina. A utilização de proteína por peixe depende dos padrões de aminoácidos essenciais que são fornecidos na dieta. Sabe-se que o fornecimento de aminoácidos essenciais em excesso para o peixe pode não necessariamente aumentar sua utilização, e que proteína de baixa qualidade é queimada para energia ou depositada como gordura (HEPHER, 1988; LI & ROBINSON, 1998).

Concentrados de proteína são frequentemente taxados ou classificados usando a composição dos aminoácidos tendo a proteína de ovo inteiro como padrão. O perfil do aminoácido essencial da proteína do ovo inteiro da galinha foi usado por muitos pesquisadores como uma referência para formulação de alimentos para peixe no início das pesquisas para elucidar as necessidades proteicas de peixes (SMITH, 1982; SILVA & ANDERSON, 1995).

Algumas proteínas vegetais têm um valor nutritivo menor do que de proteína de origem animal, provavelmente devido a uma falta relativa de aminoácidos essenciais, especialmente de lisina, triptofano, treonina ou metionina. Produtos vegetais têm, de fato, cinco a oito vezes menos metionina e duas a três vezes menos lisina do que tecido de peixe. Uma maior proporção de produtos vegetais na dieta dará um balanço pobre em aminoácidos (CHO *et al*, 1985).

Cho *et al* (1985) realizaram experimento onde solha (*Pleuronectes ferrugineus*) foi alimentada com dieta em que a fonte de proteína consistia de proteína animal e ia aumentando a proporção de proteína vegetal. Os resultados mostraram máxima redução da taxa de crescimento da solha quando o nível de substituição da proteína de origem animal por proteína vegetal chegou a 40% de inclusão na dieta.

Em outro experimento, juvenis de carpa (*Ctenopharyngodon idella*) alimentados com dietas contendo carne de peixe como fonte de proteína mostraram um crescimento maior do que aqueles alimentados com dieta a base de soja. De acordo com estes trabalhos, a razão principal do baixo crescimento no peixe e da redução na utilização de proteína quando é acrescentado na dieta soja, parece ser que a destruição de fatores anti-nutricionais pelo calor de processamento da soja foi apenas parcial (PEZZATO *et al*, 1982).

Medições da qualidade nutricional de alimentação em relação às proteínas mostraram que a carne de peixe ou proteína derivada deste são superior a outras fontes protéicas.

A Salinidade: Um terceiro fator que influencia níveis ótimos de proteína em peixe é a salinidade. Zeitoun *et al* (1973) submeteram a truta arcoiris a duas diferentes salinidades (10 e 20% partes por mil) e descobriu que o nível ótimo de proteína sob as duas condições, são 40% a 10 partes por mil e 45% a 20 partes por mil. Entretanto, aparentemente um resultado contraditório foi obtido em outro experimento onde o mínimo de proteína necessário do salmão smolts não diferiu no peixe a qualquer salinidade. Ganho de peso e retenção de proteína decaíram depois que foi alcançado 40% de proteína na dieta.

A Idade: Experimentos com o peixe sol longear (*Lepomis megalotis megalotis*) e peixe sol verde (*Lepomis cyanellus*) não encontraram diferença entre diferentes idades para absorção de proteína. O peixe sol jovem (10g de peso) utilizou próximo de 33% do consumo de proteína para crescimento. O peixe sol longear mais velho (105g) utilizou 5% da proteína disponível para crescimento, enquanto o maior peixe sol verde (55g) utilizou 20% da proteína absorvida pelo corpo para crescimento. O maior peixe sol verde não se aproximou ao tamanho máximo da espécie, enquanto o maior peixe sol logear sim. O experimento mostrou que o peixe pode utilizar menos da proteína disponível para crescimento à medida em que ele aumenta de tamanho. Este fenômeno é associado com o envelhecimento. Os autores concluíram que o crescimento de peixe pode assim ser muito mais determinado do que é frequentemente considerado, desde que o peixe de máxima idade pode utilizar muito pouco da proteína disponível para crescimento. O decréscimo da eficiência na utilização da comida com o aumento da idade tem sido considerado uma hipótese verdadeira por muitos pesquisadores (GERKING, 1952).

A necessidade de proteína muda durante o curso do ciclo de vida do peixe. Peixe jovem, com crescimento rápido necessita de mais proteína do que peixe maior e mais velho o qual tem uma taxa de crescimento menor. Durante o período de pré-desova, um suprimento abundante de proteína é necessário para a viabilidade de formação de espermatozóides e ovos (BALDISSEROTTO, 2009b).

Diferenças genéticas também irão influenciar a necessidade de proteína. Pesquisas investigaram o efeito da variação do nível de proteína na dieta em diferentes famílias de truta arcoiris e descobriram diferenças significantes entre famílias de peixes para o crescimento, fator da circunstância, composição química da carcaça e capacidade de digestão da proteína (BUDDINGTON *et al*, 1987).

O nível de alimentação é outro fator importante que afeta o consumo ótimo de proteína. Cho *et al* (1985) descobriram que o ótimo pode ser incrementado restringindo o nível de alimentação. Rações mínimas próximas do nível de manutenção resultam em uma conversão pobre de alimento que se aproxima a um valor ínfimo enquanto a taxa de crescimento cessa. Uma alimentação intensiva, na maioria das vezes aplicado na aquicultura, também alcança uma conversão pobre de comida. Isto resulta não apenas na perda de comida, mas também da utilização real de comida. A capacidade de digestão de proteína crua decresce 3% com 1% de acréscimo na ração diária para truta arcoiris.

O nível de energia numa dieta também afeta a necessidade de proteína no peixe. A finalidade de pesquisas na relação da dieta protéica/energética é para conseguir estimativas da concentração de proteína relativa ao de energia, o qual pode permitir um crescimento rápido. Truta (*Salvelinus fontinalis*) necessita de 7.5 kcal de energia metabolizada para cada grama de proteína na alimentação (ZEITOUN *et al*, 1973). Obteve-se a máxima retenção de proteína em "yellowtail flounder" (*Limanda ferruginea*) jovem quando a dieta fornecia 9.0 kcal de energia metabolizável para cada grama de proteína. A utilização de dieta protéica por peixe depende da relação entre a caloria da proteína e a caloria de outros itens na dieta. O balanço entre energia e proteína mostrou ser importante para crescimento ótimo e conversão de alimento em peixes. A relação caloria protéica ótima para a caloria dos demais itens na dieta varia entre espécies de peixe e também com o nível de protéico na dieta (ZEITOUN *et al*, 1973; KUBITIZA, 1998).

Existem efeitos benéficos definitivos da porção de carboidrato das rações. De acordo com a Shiau (1997), carboidratos podem fornecer mais de 20% das calorias disponíveis na ração. Isto fará com que menos proteína seja usada para energia. A ação poupadora de proteína com acréscimo da proporção de carboidrato disponível em baixos níveis de proteína foram demonstrados por Boscollo *et al* (2002). Foram feitos testes com proteína e valores de conversão total de alimento para quatro diferentes níveis de proteína em dois níveis de carboidratos. Um efeito poupador de proteína depende fortemente do tipo da fonte de energia na dieta. Isto é principalmente lipídios e carboidratos, os quais são parte da fonte energética da dieta. Carboidratos

naturais são menos apropriados para peixes por causa da sua baixa digestibilidade (BOSCOLLO *et al.*, 2002).

3.14 Considerações Gerais sobre os Ciclídeos

A família de peixes ciclídeos engloba cerca de 105 gêneros com mais de 1300 espécies de água doce e água salobra, que formam a família Cichlidae, na ordem dos Perciformes, dentro da Classe Osteichthyes (MEIJIDE & GUERRERO, 1997). São peixes de ampla distribuição geográfica nativos da África (com 900 espécies válidas, mais de 1300 espécies estimadas), América do Sul (com 290 espécies válidas), América Central (Cuba e Caribe, com 4 espécies válidas, algumas salobras), América do Norte e América Central (com 95 espécies válidas), Ásia (sul da Índia e Sri Lanka, com 3 espécies salobras), Madagascar (com 17 espécies válidas, algumas salobras), Oriente Médio (vale do Jordão, com 4 espécies), Irã (uma espécie) e algumas regiões dos Estados Unidos (KULLANDER, 1998).

Segundo Lowe-McConnell (1999), existem cerca de 400 espécies de ciclídeos neotropicais agrupadas em 50 gêneros. Os ciclídeos nativos da América do Sul estão representados nas regiões Amazônica, Guianense, região do Rio Orinoco para o norte e na região Paranaense para o sul, como também nos rios do leste brasileiro.

Os principais grupos de ciclídeos sul-americanos estão bem representados em quatro das oito regiões faunísticas, denominadas Amazônica/Guiana, Orinoco-Venezuela, Paraná, e Brasileira Oriental, em rios fluindo para a costa atlântica. As outras quatro regiões (Madalena, Trans-Andina, Andina e Patagônica) apresentam poucas espécies de ciclídeos (KEENLEYSIDE, 1991).

A Bacia Amazônica possui extensa área coberta por densa floresta pluvial, localizada cerca de 200 m acima do nível do mar. O complexo da Bacia Amazônica inclui lagos laterais, planícies de inundação (lagos de várzea), rios de águas brancas ricos em nutrientes, com pH neutro; e águas negras, pobres em nutrientes, com pH ácido, em torno de 4 a 5 (Rio Negro). Além destes, inclui também rios de águas claras (Xingu e Tapajós), também pobres em nutrientes, com pH variando de 4,5 a 7,8, e rios de floresta pluvial (Purus e Jaruá). Esta

região da Bacia Amazônica é o habitat de variedades selvagens do acará disco e recebe uma pluviosidade de 3.000 mm ao ano (LOWE-MCCONNELL, 1999).

A maioria dos ciclídeos neotropicais ocupa habitats mais lênticos dentro dos rios e córregos; mas há também um número moderado de espécies reofílicas fortemente adaptadas às migrações e a diferentes padrões de qualidade de água. Os últimos incluem muitas espécies dos gêneros *Crenicichla*, *Teleocichla* e *Retroculus*, as quais encontram-se distribuídas principalmente nos planaltos do Brasil e das Guianas (KULLANDER, 1998).

3.15 O Acará Disco (*Symphysodon sp*)

O termo acará disco engloba duas espécies, o *Symphysodon discus* e o *Symphysodon aequifasciatus* (figura 5), sendo que a primeira espécie possui duas subespécies e a última possui três subespécies, todas restritas à Bacia Amazônica, ocorrendo em diversos rios como, por exemplo, os rios Purus, Urubu, Madeira, Negro e Xingu.

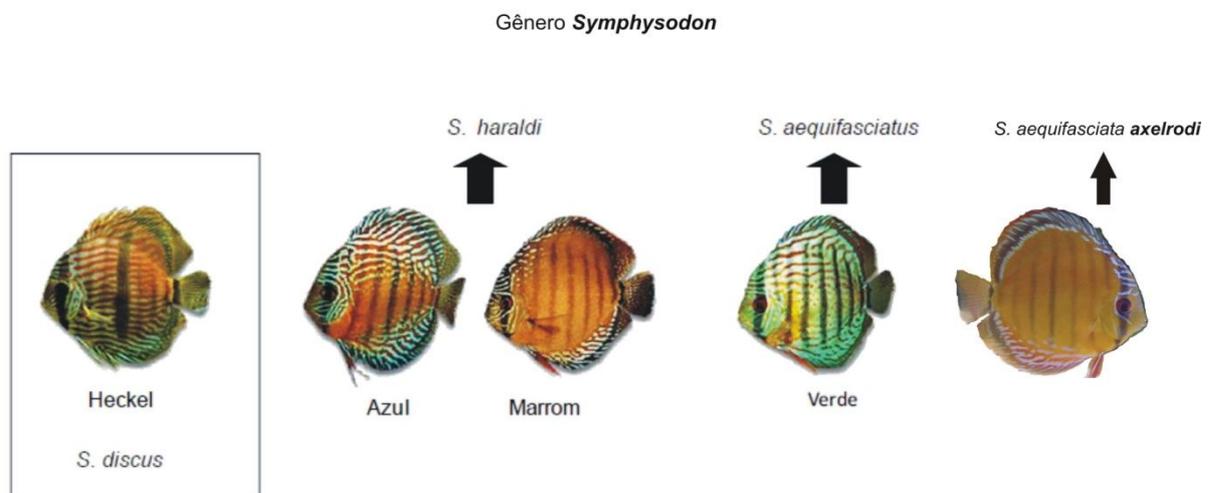


Figura 5. Características morfológicas do acará-disco. Fonte Gross (2009).

O acará disco, *Symphysodon sp.*, é originário dos igarapés da Bacia Amazônica e sua distribuição é restrita às regiões mais baixas dos rios Negro, Abacaxis e Trombetas. O acará disco apresenta natação lenta, habitando águas tranquilas e límpidas, sendo uma espécie ornamental facilmente capturada pelo homem (CAMARA *et al.*, 2002).

O gênero *Symphysodon* destaca-se dentre outros ciclídeos por apresentar o corpo com formato discoidal, variando cerca de 12 a 20 cm de comprimento, podendo atingir 25 cm de altura. É uma espécie de alto valor comercial, muito utilizada em aquarofilia, e exportada como peixe ornamental (FERRAZ, 1999). Devido a sua boca diminuta, quando jovem alimenta-se de pequenos vermes vivos e náuplios de microcrustáceos (MATTOS *et al.*, 2009).

O acará disco (*Sympsonodon sp.*), é um dos peixes ornamentais mais belos dentre todas as espécies conhecidas, incluindo as marinhas. Seu formato peculiar e a grande variedade de cores e padrões fazem dele um dos mais procurados peixes ornamentais, apesar de seu elevado preço. O acará disco pode chegar a medir até 25 cm de diâmetro, e com 3 a 4 cm já é comercializado. Neste tamanho, o preço unitário pago ao produtor está em torno de 8 a 20 reais, dependendo da variedade (RIBEIRO, 2007).

Segundo Câmara *et al.* (2002) o acará disco geralmente é de cor marrom amarelada e possui faixas verticais, que lhe servem de camuflagem, em meio as macrófitas de folhas estreitas. É comum aquaristas e mesmo os produtores novatos pensarem que todos os acaras discos capturados em ambiente natural não possuem cores intensas, entretanto, em cada população é observada a presença de peixes com pontos vermelhos, azuis e verdes. Em algumas subespécies a ocorrência de uma determinada cor é maior que das demais.

Além disso, segundo Gross (2009), os indivíduos possuem apenas um orifício nasal de cada lado da face, boca prostrátil, musculatura labial aparente, raios anteriores das nadadeiras dorsal e anal e os primeiros raios da ventral transformados em espinhos, além de linha lateral interrompida, características morfológicas peculiares da família Cichlidae à qual pertence.

O acará disco é de comportamento calmo e territorialista. Quando jovem, vive em cardume e estabelece hierarquia. Normalmente é encontrado junto a madeiras e vegetação submersa, que servem de abrigo contra predadores (GROSS, 2009).

A identificação do sexo dos indivíduos pelo exame da papila genital não é difícil, entretanto, a simples colocação de um macho e uma fêmea em um aquário resulta na formação de um casal produtivo em no máximo 30% dos casos, o que justifica a adoção de identificação da papila genital que aumenta este valor para mais de 50%. Os reprodutores são alojados em grupos de seis

a doze exemplares e à medida que os casais vão sendo formados, estes são transferidos para aquários ou caixas individuais, onde passarão toda a vida (CHELLAPA *et al.*, 2005).

A produção de acará disco possui características marcantes. A água deve apresentar baixo pH, entre 4,2 e 5,6, e temperatura elevada variando entre 26 a 29 °C, e de baixa amplitude térmica diurna e anual. Para a criação do acará disco é necessário ter água de baixa condutividade elétrica (abaixo de 80 μ S/L), também conhecida como "água mole". Os níveis de amônia e alumínio devem estar baixos, pois são substâncias tóxicas as quais estes peixes apresentam elevada sensibilidade (CLAVIJO-AYALA *et al.*, 2006).

O aquário do casal de reprodutores deve possuir um sistema de filtro ou ter um terço de sua água renovada diariamente. A alimentação dos reprodutores deve ser com ração (36 a 38% de PB e 3.100 Kcal/Kg) e suplementada com alimentos vivos como daphnias, nauplios de artemia, artemias, patês e tubifex que devem ser fornecidos tanto aos reprodutores quanto às larvas e pós-larvas (CHONG *et al.*, 2002a).

O acará disco, assim como outros Ciclídeos como a tilápia e o apaiari, cuida de sua prole, porém, no seu caso, a reprodução é ainda mais interessante. A fêmea do acará disco coloca seus óvulos aderidos a uma superfície, o macho os fertiliza e depois o casal vigia e aera os ovos, movimentando a água com as nadadeiras, com isso renovando a água que fica ao entorno da desova (VIDAL JUNIOR, 2008).

Existe um cuidado parental que é demonstrado pelo casal durante o período embrionário e posteriormente no período larval, que ao nascerem permanecem aderidas ao ninho por aproximadamente dois dias e a seguir, já na fase de pós-larva, se alimentam do muco dos pais. Quando as pós-larvas começam a nadar, nadam para o corpo dos pais e se alimentam de um muco secretado por ambos. É possível fazer a retirada da desova, sua incubação artificial e a posterior criação das larvas, entretanto este procedimento torna sua produção mais complexa (CHELLAPPA *et al.*, 2005).

Aos quatro meses de idade, os juvenis atingem tamanho comercial e deve-se ter a precaução de transportá-los em sacos plásticos acondicionados em caixas de isopor para minimizar o estresse e a variação de temperatura durante o transporte (CLAVIJO-AYALA, *et al.*, 2006).

Os acarás disco são muito exigentes quanto à alimentação, dando preferência aos alimentos vivos como as dáfnias, vermes e larvas de mosquito. Em cativeiro o acará-disco deve receber uma dieta balanceada, constituída por alimentos congelados, alimento seco como rações, alimento vivo e patês. As misturas congeladas incluem carne de coração de boi ou de peru moídas, ou ainda, camarão e suplementos vitamínicos e minerais. Os peixes têm preferência por enquitréias, náuplios e artemia salina. Os alimentos liofilizados e secos deverão ser previamente umedecidos, pois os peixes relutam em pegar comida que flutua na superfície (CLAVIJO-AYALA, *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007).

Normalmente, entre 20 e 30 dias após a eclosão, os alevinos não necessitam mais de se alimentarem preferencialmente de muco, pois são capazes de nutrir-se de rações balanceadas e adequadas ao seu desenvolvimento, e podem ser transferidos para outras caixas ou para tanques de cultivo. Esta transferência deve ser precedida da adaptação dos peixes à ração por no mínimo uma semana (CHONG, *et al.*, 2000).

A ração para as larvas e juvenis deve ter de 40 a 42% de PB, sendo a suplementação com alimentos vivos essencial para a intensificação da cor. Apesar da importância da alimentação natural, não devemos adotar a prática de adubação dos tanques de cultivo (externos ou não) uma vez que esta espécie é muito sensível à amônia (SENHORINI, 1993; ROSTAGNO, *et al.*, 2000; CHONG, *et al.*, 2002a).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J.S.; SOUZA, G.A. de; BONA FILHO, A. **Nutrição animal. As bases e os fundamentos da nutrição animal: Os alimentos.** São Paulo: Nobel, 4 ed., 1990. 395p

ALBERNAZ, N.D.S. **Efeito do processamento da ração sobre os valores de digestibilidade aparente dos nutrientes para Piau Verdadeiro (*Leporinus elongatus*).** 2000. 54 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Lavras, MG.

ALVAREZ-GONZALEZ, C.A.; MOYANO-LOPEZ, F.J.; CIVERA-CERECEDO, R.; CARRASCO-CHAVEZ, V.; ORTIZ-GALINDO, J.L.; NOLASCO-SORIA, H.; TOVAR-RAMIREZ, D.; DUMAS, S. **Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II: Electrophoretic analysis.** Fish Physiol Biochem v.36, p.29–37, 2010.

ARGENZIO, R. A. **Funções gerais do trato gastrointestinal e seu controle e integração.** In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. (Eds). DUKES fisiologia dos animais domésticos. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996a. p.297-306.

ARGENZIO, R. A. **Motilidade gastrointestinal.** In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. (Eds). DUKES Fisiologia dos animais domésticos. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996b. p.307-318.

AZEVEDO, P.A.; CHO, C.Y.; LEESON, S.; BUREAU, D.P. **Effects of feeding level and water temperature on growth, nutrient and energy utilization and waste outputs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquatic Living Resources, v.11, p.227-238, 1998.

BALDISSEROTTO, B. **Digestão.** In: BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002. p.19-39.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.** 2^a Ed., Ed. UFSM. 2009b. 350p

BELLAVER, C. **Implicações da qualidade das farinhas de carne e ossos sobre a produção de rações animais.** Suinocultura Industrial, Porto Feliz SP, p. 16 - 20, 30 out. 2000.

BELLAVER, C. **Ingredientes de origem animal destinados à fabricação de rações.** In: Simpósio sobre Ingredientes na Alimentação Animal. Campinas-SP p.167-190.18 a 20 de Abril de 2001.

BELLAVER, C. **Limitações e Vantagens do Uso de Farinhas de Origem Animal na Alimentação de Suínos e de Aves.** Embrapa. 2005a.

BELLAVER, C.; Ludke, J.L. **Qualidade de ingredienets para rações.** In: Global Feed and Food Forum. FAO. IFIF. Sindirações. 11-13 de Julho de 2005. São Paulo SP. 2005b.

BICUDO, A.J.A.; PINTO, L.F.B.; CYRINO, J.E.P. **Clusterin of ingredients with amino acid composition similar to nutritional requirement of Nile tilapia.** Scientia Agrícola (USP. Impresso), v. 67, p. 517-523, 2010.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. **Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** Revista Brasileira de Zootecnia/Brazilian Journal of Animal Science, v.31, n.2, p. 539-545, 2002.

BRAGA, Luís Gustavo Tavares; Oliveira, Maria Goreti de Almeida; Lima, William Cardoso; Euclides, Ricardo Frederico. **Atividade da amilase em rã-touro durante a fase pós-metamórfica.** Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.40, n.10, p.947-951, 2005.

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

CÂMARA, M.R., VERANI, J.R., CHELLAPPA, S. 2002. **Descrição morfológica, merística e produção de muco do acará disco, *Symphysodon discus* Heckel, 1840 (Osteichthyes:Cichlidae).** In: Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia. Curitiba: Associação Brasileira de Zoologia, v.1, 319 p.

CAMILO, RODRIGO YAMAKAMI. **Efeitos da adição de aminoácidos essenciais livres à dieta e da ausência de nutrientes na atividade de enzimas digestivas e no metabolismo intermediário de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*).** 2007. 66f. Dissertação. Mestrado em Ciências. São Carlos: UFSCar.

CAVALLI, R.O. ; FERREIRA, J. F. **O futuro da pesca e da aquicultura marinha no Brasil: a maricultura.** Ciência e Cultura, São Paulo, p. 38 - 39, 01 jul. 2010.

CHAPMAN, F.A.; FITZ-COY, S.A.; THUNBERG, E.M. **United States of America trade in ornamental fish.** Journal of the World Aquaculture Society. v.28, n.1, p.1-10, 1997.

CHELLAPPA, S. ; CÂMARA, M. R. ; VERANI, J. R. **Ovarian development in the Amazonian red discus, *Symphysodon discus* Heckel (Osteichthyes: Cichlidae).** Brazilian Journal of Biology. São Carlos SP, v. 65, n. 4, p. 609-616, 2005.

CHAKRABARTI, R.; RATHORE, R.M. **Ontogenic changes in the digestive enzyme pattern and characterization of proteases in Indian major carp *Cirrhinus mrigala*.** Aquaculture Nutrition. v.16, p. 569-581. 2010.

CHO, C.Y., COWEY, C.B.; WATANABE, T. **Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development, IDRC.** International Development Research Centre, Ottawa, Ontario, Canada. 233p. 1985.

CHONG, A.S.C.; HASHIM, R.; ALI, A.B. **Dietary protein requirements for discus (*Symphysodon spp.*).** Aquaculture nutrition, London, v.6, n. 4, p. 275-278, dez. 2000.

CHONG, A.S.C.; HASHIM, R.; ALI, A.B. **Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using in vivo and in vitro methods.** Aquaculture nutrition, London, v.8, n. 3, p. 229, 2002a.

CHONG, A.S.C. ; HASHIM, R.; Chow-Yang, L.; ALI, A.B . **Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodon aequifasciata*.** Aquaculture research, v. 33, n. 9, p. 663, 2002b.

CLAVIJO-AYALA, J. A.; SANTANNA, J. F. M.; RIBEIRO, F. A. S.; FERNANDES, J. B. K.; PORTELLA, M. C.. **Desenvolvimento inicial do acará disco *Symphysodon* sp.** In: Aquaciência 2006, Bento Goncalves. Anais do Aquaciência 2006.

CONCEIÇÃO, L.E.C.; GRASDALEN, H.; RONNESTAD, I. **Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings.** Aquaculture, v.227, p.221-232, 2003a.

CONCEIÇÃO, L.E.C.; GRASDALEN, H.; DINIS, M.T. **A new method to estimate the relative bioavailability of individual amino acids in fish larvae using ¹³C -NMR spectroscopy.** Comp. Biochem. Physiol, v.134B, p.103-109, 2003b.

CONCEICAO, Luís; MORAIS, Sofia; ARAGAO, Cláudia. **Fluxos de nutrientes em larvas de peixes: aplicação de técnicas com marcadores isotópicos e de modelação.** Revista Brasileira de Zootecnia, vol.36, pp.11-20. 2007.

CUTAIT, M. S. **Palavra do Presidente.**2009. Disponível em: <<http://www.sindiracoes.org.br/institucional/palavra/>>. Acesso em: Dez.2011.

DABROWSKI, K. **The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives.** Reproduction Nutrition and Development, v.24, p.807-833, 1984.

DABROWSKI, K.; SEGNER, H.; DALLINGER, R. *et al.* **Rearing of roach larvae: the vitamin C-minerals interrelationship and nutrition-related histology of the liver and intestine.** Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, v.62, p.188-202, 1989.

DEGUARA, S.; JEUNCEY, K.; AGIUS, C. **Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream.** Journal of Fish Biology, v.62, n.5, p.1033-1043, 2003.

DeLONG, D.C.; HALVER, J.E.; MERTZ, E.T. **Nutrition of salmonoid fishes: Protein requeriments of chinook salmon at two water temperatures.** Journal of Nutrition, v.65, p.589-599, 1958.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de limnologia.** Rio de Janeiro, Interciência/FINEP, 1988. 575 p.

EUSEBIO, P.; COLOSO, R. **Proteolytic enzyme activity of juvenile Assian sea bass (*Lates calcarifex* Bloch), in increased with protein intake.** Aquaculture Research, v.33, n.8, p.569-574, 2002.

FABREGAT, T. E. H. P.; FERNANDES, J. B. K.; RODRIGUES, L. A.; RIBEIRO, F. A. S.; SAKOMURA, N. K.. **Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de apaiari (*Astronotus ocellatus*).** Acta Scientiarum. Animal Sciences, v. 28, p. 477-482, 2006.

FABREGAT, Thiago El Hadi Perez; FERNANDES, Joao Batista K; TIMPONE, Ian Taipo; RODRIGUES, Laurindo André; PORTELLA, M. C. **Utilização de Água Salinizada e Náuplios de Artemia Durante a Larvicultura do Acará-Bandeira *Pterophyllum scalare***. In: AquaCiência 2008, Bento Gonçalves. Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura II. Jaboticaba: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2008. v. 1. p. 105-110.

FAO. Fundo da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO. **El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura**. Rome. 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **State of world aquaculture: 2006**. FAO Fisheries Technical Paper. No. 500. Rome, FAO. 2006. 134p.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture: 2010**. Rome. 2010.

FERRAZ, E. 1999. **Management and diseases of the ornamental fish exported from the rio Negro basin**. In: Biology of Tropical Fish (Eds. A.L. VAL & V.M.F. ALMEIDAVALE). Manaus: INPA. 99-111

FERREIRA, M. F. N. ; SILVA, C. C. . **Descrição Morfológica do Trato Digestivo do Tucunaré, *Cichla* sp.**. XXV Congresso Brasileiro de Zoologia.. In: XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2004, Brasília, D.F.. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2004.

FRANCIS, G.; MAKKAR, HPS; BECKER, K. **Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish**. Aquacultura, Amsterdam, n. 3/4, p. 197-227, Aug. 2001.

GALVÃO, M.S.N.; YAMANAKA, N.; FENERICH-VERANI, N. *et al.* **Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil**. Boletim do Instituto de Pesca, v.24, n.único, p.101-110, 1997

GERKING, S.D. **The protein metabolism of sunfish of different ages**. Phytol. Zool. v35, p358-72. 1952.

GROSS, Maria Claudia. **Citogenética comparativa das variedades selvagens de acará-disco (*Symphysodon* spp. , Cichlidae, Perciformes) endêmicos da Amazônia: uma abordagem clássica e molecular dos cromossomos mitóticos e meióticos**. 2009. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2009. Disponível em: <http://gcbev.inpa.gov.br> Acesso em: 06 ago. 2010.

HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (3ª Ed.) **Fish Nutrition**. London: Academic Press, 2002. 824p.

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

HENRY, M.; BENLIMAME, N.; BOUCAUD-CAMOUS, E.; MATHIEUS, M.; DONVALO, A.; WORMHOUDT, A.V. **The amylase-secreting cells of the stomach of the scallop *maximus*: ultrastructural, immunohistochemical and immunocytochemical characterizations**. *Tissue and Cell*. v.25, p. 537-548. 1993.

HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 388 p.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. **Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits**. *Proteolytic and amylase activities*. *Aquacult.*, v. 170, n. 3-4, p. 267-283,1999.

IBAMA. **Estatística da Pesca, 2004**. Grandes Regiões e Unidades da Federação, Brasília-DF, dezembro de 2005.

IFIF (Internacional Feed Industry Federation). **Global Feed**. Disponível em: <http://www.ifif.org/global_stats1.php>. Acesso em: 2010

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. New York: Chapman & Hall, 1995. 455p.

KEENLEYSIDE, M. H. A., 1991. **Cichlid Fishes-Behaviour Ecology and Evolution**. London: Chapman and Hall, p. 377.

KIM, B.G.; DIVAKARAN S.; BROWN, C.L.; OSTROWSKI, A.C. **Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*)**. *Fish Physiology and Biochemistry*. v.24, p. 225-241. 2001.

KUBITZA, F. **Substituição total da farinha de peixe pelo farelo de soja em rações para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), suplementados com metionina**. 1990. 80p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. Campo Grande, MS, 1998.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285p.

KULLANDER, S.O., 1998. **A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes)**. p. 461-498. In L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M. Lucena and C.A.S. Lucena (Eds.) *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, EDIPUCRS. 603p.

KUROKAWA, T.; SHIRAIISHI, M.; SUZUKI, T. **Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanotictus*) larvae.** Aquaculture, v.161, p.491-499, 1998.

LAUFF, M.; HOFFER, R. **Proteolic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes.** Aquaculture, v.37, p.335-346, 1984.

LI, M.H.; ROBINSON, E.H. **Effects of supplemental lysine and methionine in low protein diets on weight gain and body composition of young catfish *Ictalurus punctatus*.** Aquaculture, v.163, p.297-307, 1998.

LIM, C.; AKIYAMA, D. M. **Full-fat soybean meal utilization by fish.** Asian Fisheries Science, Swer, v. 5, p. 181-197, 1992.

LIN, S.; MAI, K.; TAN, B.; LIU, W. **Effects of Four Vegetable Protein Supplementation on Growth, Digestive Enzyme Activities, and Liver Functions of Juvenile Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*.** Journal of the World Aquaculture Society. v.41, p. 583-593. 2010.

LOWE-McCONNELL, R. H., 1999. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais.** São Paulo: EDUSP. 534p.

MATTOS, D.C.; CARDOSO, LD.; MOTTA, J.H.S.; RADAEL, M.C.; VIDAL JR, M.V.; DUARTE, S.C. **Descrição da Fase de Gástrula no Desenvolvimento Ontogênico de Acará Disco (*Symphysodon aequifasciatus*).** In: V Mostra Sadi Bogado de Ensino, Pesquisa e Extensão, UENF, 2009, v.1. Campos dos Goytacazes, RJ.

MEIJIDE, F.J.; GUERRERO, G.A. 1997. **Characterization of the reproductive behaviour and early life history stages of *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) (Perciformes, Cichlidae) under laboratory conditions.** In: Proceedings of International Symposium on Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS. p.74.

MORO, G.V.; Camilo, R.Y.; MORAES, G.; FRACALLOSSI, D.M. **Dietary non-protein energy sources: growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá.** Aquaculture Research, v. 41, p. 394-400, 2010.

MOURA, G.S.; OLIVEIRA, A.M.G.; LANNA, E.T.A.; MACIEL JÚNIOR, A.; MACIEL, C.M.R.R. **Desempenho e atividade de amilase em tilápias-do-nilo submetidas a diferentes temperaturas.** Brasília, Df. 2007. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.42, n.11, p.1609-1615, nov. 2007.

NEVES, P.R.; FURUYA, W.M.; SILVA, L.C.R.; BOTARO, D.; HAYASHI, C.; FURLAN, A.C.; SANTOS, V.G. **Coeficientes de Digestibilidade Aparente da Energia e Proteína da Silagem de Sorgo com Alto e Baixo Tanino Pela Tilápia do Nilo.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 34, p. 1213-1217, 2004.

OLIVEIRA, G.R.; LOGATO, P.V.R.; FREITAS, R.T.F.; RODRIGUES, P. B.; FIALHO, E.T.; DIODATTI, F.C.; OLIVEIRA, G.R.; LOGATO, P.V.R.; FREITAS, R.T.F.; RODRIGUES, P.B.; FIALHO, E.T.; DIODATTI, F.C. **Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo** (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.36, n.6 (supl.) pp. 1945-1952, 2007.

ONAL, U.; ÇELIK, I.; CIRIK, S. **Histological development of digestive tract in discus, *Symphysodon spp. larvae***. Aquaculture Int. v. 15, p. 589-601. 2010.

ORBOLATO, T.S.; AQUINO-SILVA, M. R.; MITTIMANN, J.; DE OLIVEIRA, M.A.; GIRARDI, L.; FIORINI, M. P. **Desenvolvimento embrionário da piabanha, (*Brycon insignis*), (Steindachner, 1876)**. In: X INIC Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2006, São José dos Campos. Revista Univap - Edição especial. São José dos Campos, 2006. v. 13. p. 162-165.

PEREZ-CASANOVA, J.C.; MURRAY, H.M.; GALLANT, J.W.; ROSS, N.W.; DOUGLAS, S.E.; JOHNSON, S.C. **Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)**. Aquaculture. v.251, p.377– 401. 2006.

PEZZATO, L.E.; TAMBURRO, M.E.; PEZZATO, A.C.; SILVEIRA, A.C.; SOUZA, J.L.G. **Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) de álcool de cana-de-açúcar como fonte protéica da alimentação da carpa (*Cyprinus carpio*)**. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 19, 1982, Piracicaba. Anais... Piracicaba: SBZ, 1982. p. 467.

PEZZATO, L.E. 1997 **O Estabelecimento das Exigências Nutricionais das Espécies Cultivadas**. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, Piracicaba, 1997. Anais... Piracicaba -SP, p.45-60.

PEZZATO, L.E.; SCORVO FILHO, J.D. **Situação atual da aqüicultura na Região Sudeste**. In: VALENTI W.C. (Ed.) Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. p.303-322.

PEZZATO, L.E. ; MIRANDA, E. C.; FURUYA, W. M.; PINTO, L.G. Q.; BARROS, M.M. ; ROSA, G.J.M. **Diâmetro do ingrediente e a digestibilidade aparente de rações por duas espécies de peixes tropicais**. Acta Scientiarum (UEM), Maringá, v. 24, n. 4, p. 901-907, 2002.

PEZZATO, L.E. BARROS, M.M. **Nutrição de peixes no Brasil**. In: Palestra I Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, Unesp Botucatu, SP. Anais... Botucatu: Aquanutri, Cd-rom. 2005.

PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FURUYA, W.M. **Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.38, p.43-51, 2009.

- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal – Mecanismos e Adaptações**. 4ª Ed., Guanabara Koogan, 2000. 729p.
- RIBEIRO, F. A. S.; RODRIGUES, L. A.; FERNANDES, J. B. K.. **Desempenho de juvenis de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) com diferentes níveis de proteína bruta na dieta**. Boletim do Instituto de Pesca (Online), v. 33, p. 195-203, 2007.
- RONNESTAD, I.; CONCEIÇÃO, L.E.C. **Aspects of protein and amino acid digestion and utilization by marine fish larvae**. In: STARCK, J.M.; WANG, T. (Eds.), *Physiological and ecological adaptations to feeding in Vertebrates*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, 2005. p.389-416.
- ROSTAGNO, H.S., ALBINO, L.F.T., DONZELE, J.L. *et al.* **Tabelas brasileiras para aves e suínos - composição de alimentos e exigências nutricionais**. 1.ed. Viçosa: UFV-DZO. 141p., 2000.
- ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2. Ed. Viçosa-MG: UFV, 2005. 186 p.
- ROTTA, M.A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. – Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003.
- SAMPAIO, M.I.C.; ANDRADE, F.; SCHNEIDER, H.; FARIAS, I.; FELDBERG, E. **Análise filogenética das espécies simpátricas de Tucunarés (Cichla, Perciformes) com registro de hibridização em diferentes ecossistemas da Amazônia brasileira**. Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA, Belém, Pará, v.1, n.1, p.1-11, 2001.
- SANTOS, M.V.B.; MENDONÇA, P.P.; TONINI, W.C.T.; VIDAL JR, M.V.; ANDRADE, D.R. **Tempo de passagem da digesta em acará bandeira (*Pterophyllum scalare*)**. In: Semana de atualização em Ciências Veterinárias da FACASTELO, 2007, Castelo - ES. Anais da Semana de atualização em Ciências Veterinárias da FACASTELO, 2007. v. 01.
- SANTOS, V.B.; MARTINS, T.R.; YOSHIHARA, E.; FREITAS, R.T.F. **Crescimento e composição corporal de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. In: 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2008, Lavras. Anais da 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2008. v. CD-ROM.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal - Adaptação e Meio Ambiente**. Ed.Santos. 2002. 611p.
- SCORVO FILHO J. D. **Aspectos econômicos da piscicultura de água doce com ênfase na cadeia produtiva**. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, II, 1998, Campinas: CBNA. Anais... Ed. CYRINO, J. E. P., MENTEN, J. F. M., MIYADA, V. S. Piracicaba, 1998. p. 21-33.

SEIXAS FILHO, J. T.; OLIVEIRA, M.G.A.; DONZELE, J.L.; GOMIDE, A.T.M.; MENIN, E. **Atividade de amilase em quimo de três espécies tropicais de peixes teleostei de água doce.** Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, v.28, p.907-913, 1999.

SEIGNER, H.; STORCH, V.; REINECKE, M. **The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*.** Marine Biology, v.119, p.471-486, 1994.

SENHORINI, J. A. **Procedimento para criação de larvas de peixes.** IBAMA-CEPTA. Pirassununga- São Paulo. 21p., 1993.

SHIAU, S.Y. **Utilization of carbohydrates in warmwater fish-with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*.** Shi Yen. Aquaculture. v.151, p.79-96. 1997.

SHIM, K.F.; CHUA, Y.L. **Some studies on the protein requirement of the guppy, *Poecilia reticulata*.** Journal of Aquariculture and Aquatic Science, Parkville, 1986. 4: 79-84

SHIM, K.F. **Magnesium requirements of the guppy, *Poecilia reticulata*.** Aquaculture, Amsterdam, 1988. 73: 131-141.

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

SINDIRAÇÕES (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL). **Posicionamento da Indústria de Alimentação Animal.** Boletim Março de 2009. Disponível em: <<http://www.sindiracoes.org.br>>. Acesso em: Dez.2011

SINDIRAÇÕES (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL). **Posicionamento da Indústria de Alimentação Animal.** Boletim Março de 2011.

SMITH, L.S. **Digestion.** In: SMITH, L. S. Introduction to fish physiology. Hong Kong: T.F.H., 1982. p.157-179.

SOARES, E.C.S.; PEREIRA FILHO, M.; ROUBACH, R.; SILVA, R. C. S. E. . **Proteases exógenas em dietas para juvenis de tucunaré paca (*Cichla* sp.).** Revista Brasileira de Zootecnia/Brazilian Journal of Animal Science, Viçosa, v. 37, p. 971-976, 2008.

SOTO-SALANOVA, M.S. **The use of enzymes to improve the nutritional value of corn-soy diets for poultry and swine.** In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO DE SUINOS E AVES, 1996, Campinas. Proceedings... Campinas: CBNA, 1996. p. 13.

- STRYER, L.; BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. **Bioquímica**. 5ª edição. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1059p, 2004.
- VEGA-ORELLANA, O ; FRACALOSSO, D ; SUGAI, J ; FRACALOSSO, D.M. . **Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases**. Aquaculture (Amsterdam), Amsterdã, v. 252, p. 484-493, 2006.
- VIDAL JR, M.V. **Nutrição e Alimentação de Peixes**. Viçosa-MG: Editora da Universidade On-line de Viçosa, 2001.
- VIDAL JR, M.V. **As boas perspectivas para a piscicultura ornamental**. Panorama da aquicultura, Rio de Janeiro, v. 12, p. 21 - 26, Set. 2002.
- VIDAL JÚNIOR, M.V.; ANDRADE, D.R.; DONZELE, J.L.; SANTOS, L. C. **Efeito da temperatura no tempo de passagem e na digestibilidade de nutrientes de alimentos para peixes tropicais**. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa - MG, v. 33, 2004.
- VIDAL JR, M.V. **Apostila Aquicultura**. UENF, 2008 (Apostila). Disponível em: <<http://www.uenf.br/Uenf/Pages/CCTA/LZNA/>>. Acessado em: 01 de outubro de 2008.
- WANG, X.; CASTANON, F. **Order of amino acid limitation in meat and bone meal**. Poultry Sci. 76:54-58. 1997.
- WANG, X.; PARSONS, C.M. **Order of amino acid limitation in poultry by-product meat**. Poultry Sci. 39:113-116. 1998a.
- WANG, X.; PARSONS, C.M. **Effect of raw material source, processing systems and processing temperatures on amino acid digestibility of Meat and Bone Meals**. Poultry Sci. 77:834- 841. 1998b.
- WEBSTER, C.D.; YANCEY, D.H.; TIDWELL, J.H. **Effect of partially or totally replacing fish meal with soybean meal on growth of blue catfish (*Ictalurus furcatus*)**. Aquaculture, Amsterdam, v. 103, N. 2, p. 141-150, May 1992.
- YOON, S.H.; ROBYT, J.F. **Study of inhibition of four alpha amylase by acarbose and its 4IV- α -maltododecaosy analogues**. Carbohydrate Research, v.338, n.19, p.1969-1980, 2003.
- ZEITOUN, I.H.; HALVER, J.E.; ULREY, D.E.; TACK, P. **Influence of salinity on protein requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri* fingerlings**. J. Fish. Res. Board. Can. V.30. 1973.
- ZUANON, J.A.S. **Níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de acará-bandeira**. Viçosa, 2006. R. Bras. Zootec., v.35, n.5, p.1893-1896, 2006.

5. CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA *IN VITRO*, EM GEL E PERFIL ENZIMÁTICO EM ELETROFORESE.

5.1 Abstract

The aim of this study was to evaluate the activity of the enzyme amylase digestive capacity and the discus (*Sympysodon sp.*) During the larval and juvenile. The paper presents a comparative dataset of amylolytic activity in gut extract the discus (*Sympysodon sp.*) And was divided into five (05) ages for the experimental monitoring of enzymatic ontogeny being: 25 days after hatching DAE, 35 DAE, 45 DAE, 65 DAE and 90 DAE and was used $n \geq 3$ for all ages. For a better understanding of enzyme kinetics in experimental ages from 45 DAE the intestine was divided into proximal and distal. The total amounts of activity (U) were obtained by experimental age: 38.32 U 25 DAE, 35 DAE 19.61 U 39.39 U 45 DAE, 65 DAE and 90 DAE 18.24 U 26.20 U checked up the digestive capacity of starch already at 25 DAE and with higher amylase activity in the distal intestine of discus (*Sympysodon sp.*). The electrophoresis showed that 45 DAE can check a differentiation in enzymatic profile of discus between the proximal and distal realizing two groups with different molecular weights.

5.2 Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da enzima amilase e a capacidade digestiva do acará-disco (*Sympysodon sp.*) durante o período de larva e juvenil. O trabalho apresenta um conjunto de dados comparativos da atividade amilolítica no extrato de intestino do Acará-disco (*Sympysodon sp.*) e foi dividido em cinco idades experimentais para o acompanhamento da ontogenia e cinética enzimática sendo: 25, 35, 45, 65 e 90 dias após eclosão DAE e foi utilizado um $n \geq 3$ para todas as idades. Para um melhor entendimento da cinética enzimática nas idades experimentais aos 45 DAE o intestino foi dividido em proximal e distal. Os valores totais de atividade (U) obtidos por idade experimental foram: 25 DAE 38,32U, 35 DAE 19,61U, 45 DAE 39,39U, 65 DAE 18,24U e 90 DAE 26,20U verificado-se a capacidade digestiva de amido já aos 25 DAE e com maiores valores de atividade amilolítica na porção distal do intestino de acará-disco (*Sympysodon sp.*). A

atividade em gel demonstrou que aos 45 DAE é possível verificar uma diferenciação no perfil enzimático do acará-disco entre a porção proximal e distal percebendo-se dois grupos com diferentes pesos moleculares.

5.3 Introdução

A maioria dos vertebrados, incluindo peixes, possui enzimas que lhes permitem digerir os alimentos que consomem, porém existem variações na atividade de enzimas que podem afetar o desempenho produtivo e reprodutivo (CHAKRABARTI *et al.*, 1995;. KUZMINA, 1996a; ALARCÓN *et al.*, 1998).

Existem poucas informações científicas sobre o acará-disco (*Sympysodon sp.*), e seu cultivo, dentre elas pode-se citar Chong *et al.* (2000); Chong *et al.* (2002); Câmara (2004); Chellappa *et al.* (2005) e Chong *et al.* (2005). Percebe-se então, que os produtores de acará-disco baseiam-se em experiência própria, obtida através de tentativas, ou adquirida com outros criadores. O que demonstra um potencial para pesquisas desta espécie uma vez que a literatura ainda é escassa e concentrada.

Nutricionalmente, apenas Chong *et al.* (2000), determinaram a exigência de proteína do acará-disco trabalhando com peixes de peso inicial de 4,4g a 4,65g, testando níveis de proteína variando entre 35% e 55% com dietas isoenergéticas, durante 12 semanas. O nível exigido estaria entre 44,9%-50,1% de PB.

Enzimas digestivas podem ser uma ferramenta complementar útil para determinar quais componentes da dieta são metabolizados de forma mais eficaz por compreender a digestão e assimilação de determinados componentes da dieta.

O estudo de enzimas digestivas é um passo essencial para a compreensão o mecanismo de digestão e como o organismo adapta-se a alterações na dieta disponível em ambiente natural e em cativeiro (SUNDE *et al.*, 2004). A avaliação da atividade enzimática digestiva, em espécies de reconhecida necessidade de conservação de suas populações ou de produção comercial pode ser útil no momento de selecionar ingredientes para a produção de rações viáveis economicamente e nutricionalmente (LAN e PAN, 1993). Atualmente é necessário pesquisar sobre os processos digestivos, avaliar a

capacidade dos peixes hidrolisarem, absorverem e assimilarem os nutrientes dietéticos para uma otimização da produção aquícola. Estas pesquisas devem analisar a atividade de enzimas digestivas como as proteinases de uma forma geral, a pepsina, tripsina e quimotripsina da amilase e lipase dada a importância destas em nutrição. (GUZMAN *et al.*, 2005).

Entender a fisiologia e nutrição de peixes através de estudos nas fases iniciais de desenvolvimento, assim como a evolução da atividade das enzimas digestivas, são ferramentas valiosas para conhecer melhor as capacidades nutricionais de larvas e juvenis, e estabelecer protocolos de alimentação para otimizar a produção massal de larvas. (TONG, 2012; GLASS *et al.* 1989).

Diversas espécies de peixes carnívoros, como peixe de briga Siamese ou beta (*Betta splendens*) e o acará-disco (*Sympysodon sp.*), têm uma capacidade limitada para a digestão de carboidratos, especialmente na fase larval e juvenil, devido ao seu intestino curto e a baixa atividade de enzimas digestivas (THONGPRAJUKAEW *et al.*, 2011). No entanto, carboidratos parecem ser necessários para melhorar o crescimento e a utilização de proteínas, principalmente proteína animal em muitas espécies de peixes (WILSON, 1994). Mohapatra *et al.* (2002) relataram um significativo aumento da utilização de carboidratos em larvas e juvenis de *Labeo rohita*.

Também com relação a enzimas digestivas Hidalgo *et al.* (1999) avaliaram as atividades proteolíticas e amilolíticas em seis peixes, espécies com hábitos alimentares diferentes e diferentes pHs, e os maiores valores relatados de atividade foram em pH alcalino (pH >8), e a atividade de amilase foi maior nas espécies onívoras avaliadas. Bezerra *et al.* (2005) confirmaram que este é também o caso de *Oreochromis niloticus*, um ciclídeo. Alterações na dieta podem induzir mudanças na atividade enzimática. Uma alteração na concentração do substrato pode induzir uma resposta de curto prazo na atividade enzimática ou pode induzir um conjunto diferente de enzimas, como uma resposta a longo prazo (Gonzalez-FELIX *et al.*, 2010).

O pâncreas é, ao mesmo tempo, uma glândula de secreção externa, fornecendo o suco pancreático, e uma glândula de secreção interna, elaborando substâncias que circulam no sangue e desempenham um importante papel na regulação do metabolismo de carboidratos no organismo. Na região apical das células piramidais, acima do núcleo, localiza-se o

Aparelho de Golgi muito desenvolvido e um grande acúmulo de grânulos de secreção no citoplasma. Quando as células produzem enzimas digestivas, tais grânulos são denominados grânulos de zimogênio, que são precursores enzimáticos (RIBEIRO *et al.* 1999; MOURA *et al.*, 2007).

Amilase é produzida como um grânulo de zimogênio pelo pâncreas, e sua presença é considerada como um indicador da maturação da capacidade digestiva em larvas de peixes (CAHU & ZAMBONINO-INFANTE 1994; RIBEIRO *et al.* 1999; MOURA *et al.*, 2007).

Amilase (E.C. 3.2.1.1.) é uma enzima da classe hidrolase que catalisa reações que implicam na ruptura hidrolítica das ligações químicas. A amilase rompe ligações glicosídicas α (1→4) presentes nas moléculas de polissacarídeos e possui pH ótimo tendendo a alcalino entre 7,0 e 9,0 (STRYER *et al.*, 2004).

Os Objetivos desta pesquisa foram determinar a atividade enzimática amilolítica *in vitro*, confirmar a atividade em eletroforese e o perfil enzimático por eletroforese das larvas e juvenis de Acará-disco (*Symphysodon sp.*).

5.4 Material e Métodos

A pesquisa foi realizada na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF no Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal CCTA/LZNA em parceria com o Laboratório de Química e Funções de Proteínas e Peptídeos CBB/LQFPP para a produção das larvas e realização dos experimentos de atividade enzimática e eletroforese. Esta pesquisa foi registrada e aprovada na Comissão de ética de uso de animais (CEUA - UENF) sob nº 180.

5.4.1 Obtenção do material.

As larvas foram produzidas no Setor de Piscicultura do Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal. As matrizes de acará-disco foram mantidas em aquários de 50x50x50cm, e com aproximadamente 60 litros de água, o pH foi monitorado e manteve-se próximo de 6,8. As desovas e respectiva fertilização foram realizadas em tubo de pvc de 30mm utilizado como substrado e as larvas foram separadas dos pais aos 20 dias pós-eclosão DAE. As matrizes foram

alimentadas com ração comercial e alimento vivo artemia (*Artemia salina*) e dáfrias (*Daphnia*)

As idades experimentais testadas foram consecutivamente: 25, 35, 45, 65 e 90 dias após a eclosão. Para efeito de padronização experimental o material biológico utilizado nos experimentos, que consiste de estômago, cecos pilóricos, intestino proximal e intestino distal receberam tratamentos idênticos em todas as repetições de idades (figura 1).

O desempenho zootécnico no período experimental foi avaliado pela taxa de crescimento específico, onde: **Taxa de crescimento específico** = $[(\log(\ln) \text{ peso final} - \log(\ln) \text{ peso inicial})/n^{\circ} \text{ de dias experimentais}] \times 100$.

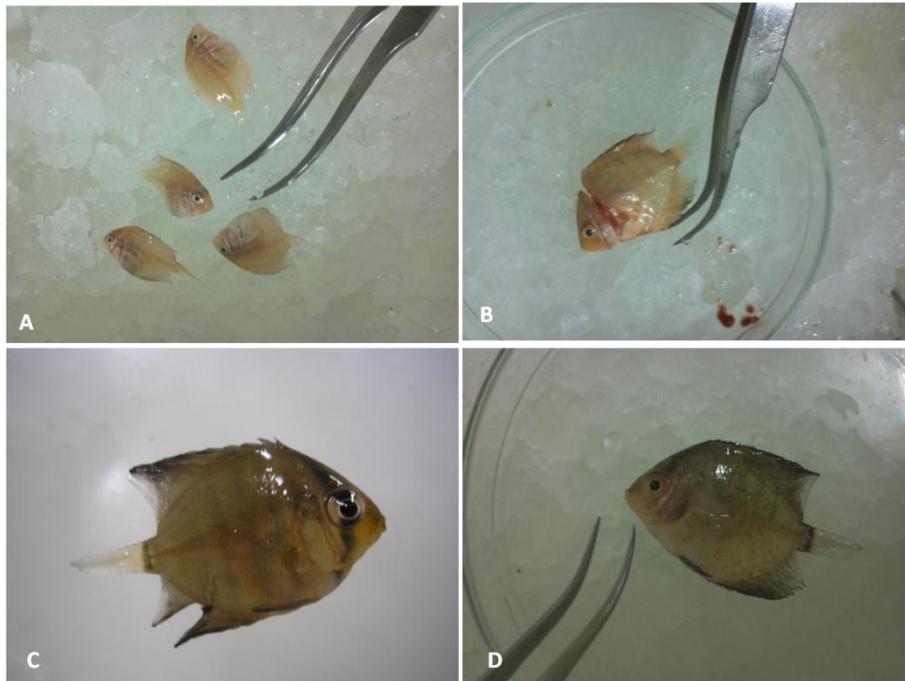


Figura 1. Acará-disco (*Sympysodon* sp.) 45 DAE (A); acará-disco 65 DAE (B); acará-disco 90 DAE (C e D).

Para as larvas de 25 e 35 dias pós-eclosão todo o intestino foi utilizado para a extração de enzimas digestivas. Para as idades de 45, 65 e 90 dias pós-eclosão o intestino foi dividido em intestino proximal e intestino distal, sendo a extração de enzimas digestivas feita de forma separada. Todas as amostras foram identificadas e fotografadas. Os pesos das larvas e juvenis foram anotados após a eutanásia, os pesos do sistema digestivo completo, e depois das partes experimentais separadas em intestino proximal e distal (figura 2).

Para a preparação dos homogeneizados celulares e determinações enzimáticas foi feita a insensibilização das larvas em água gelada até não observar-se mais movimentos operculares. A coleta do tubo digestivo das larvas foi em dias pré-determinados conforme a idade da larva. As amostras foram mantidas resfriadas para evitar degradação proteica e perda de atividade enzimática, os tecidos coletados foram homogeneizados em solução tampão (Tris-HCl 50 mM - pH 8,0) na razão de 1:9 (p:v) um (01) µg para nove (09) µL, foi utilizado Proteobloc Protease Inhibitor Cocktail-Fermentas, para inibir enzimas (proteases) que poderiam alterar a atividade amilolítica, o cocktail de Proteoblock era composto de: AEBSF HCl – serine proteases; Aprotinin – serine proteases and esterases; Bestatin – aminopeptidases; E64 - cysteine and thiol proteases; Leupeptin - cysteine and thiol proteases; Pepstatin A – Acid proteases, many aspartic proteases e EDTA, 0,5M para inibição das metaloproteases, para evitar que a atividade proteolítica não degradasse ou afetasse a amilase.

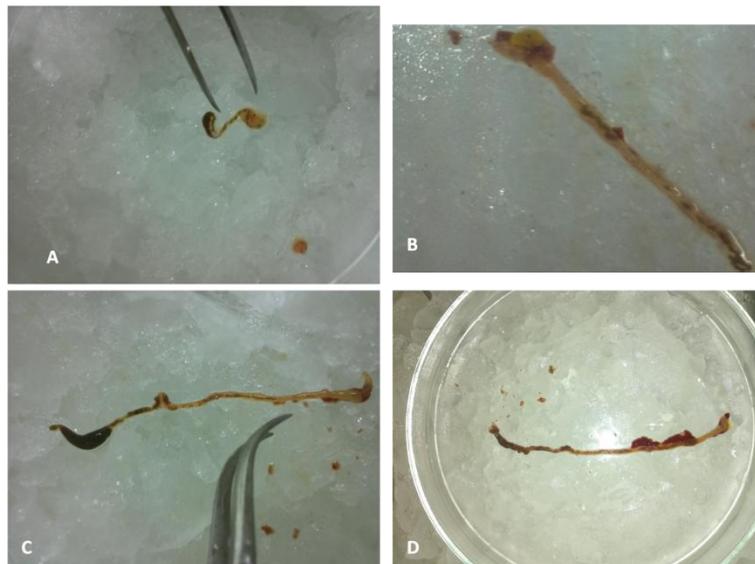


Fig. 2 Intestino de Acará-disco 35 DAE (A); intestino acarà-disco 45 DAE (B); intestino acarà-disco 90 DAE (C e D).

O homogeneizado celular de todo aparelho digestivo para as idades de 25 e 35 dias pós-eclosão e da porção proximal e distal para as idades de 45, 65 e 90 dias foram centrifugados a 12.000xg por 15 minutos a 6°C, o sedimento foi descartado e o sobrenadante como fonte enzimática foi armazenado em freezer a -20°C após ser congelado em nitrogênio líquido para realização da quantificação proteica, ensaios enzimáticos e eletroforese. Os sobrenadantes

foram utilizados como fonte de enzima, conforme metodologia adaptada de Caraway (1959), Hidalgo *et al.* (1999), Camilo (2007), Moura *et al.* (2007), Santos *et al.* (2012).

5.4.2 Dosagem de proteínas.

A determinação da concentração total de proteínas de acará-disco (*Sympysson sp.*), foi baseada no método descrito por Bradford (1976) após adaptações. As concentrações foram avaliadas por leitura espectrofotométrica, em comprimento de onda de 595 nm, e com isso foi obtido a concentração de proteína, em $\mu\text{g}/\mu\text{L}^{-1}$ (ZAIA *et al.*, 1998).

O método consiste em utilizar uma curva de calibração inicial para comparação aos valores de proteína das amostras. A curva é determinada através de leitura espectrofotométrica utilizando-se concentrações pré-determinadas de proteína fornecida no kit da Thermo Scientific – Coomassie Plus (Bradford). Após a curva com as concentrações de BSA determinada, e previamente memorizada no Picodrop (espectrofotometro para leitura de amostras com pouco volume de material) as leituras das amostras foram obtidas de forma direta no aparelho (figura 3). Para a leitura utilizou-se uma amostra de $4\mu\text{L}$ do extrato enzimático e obteve-se o valor da concentração proteica total.

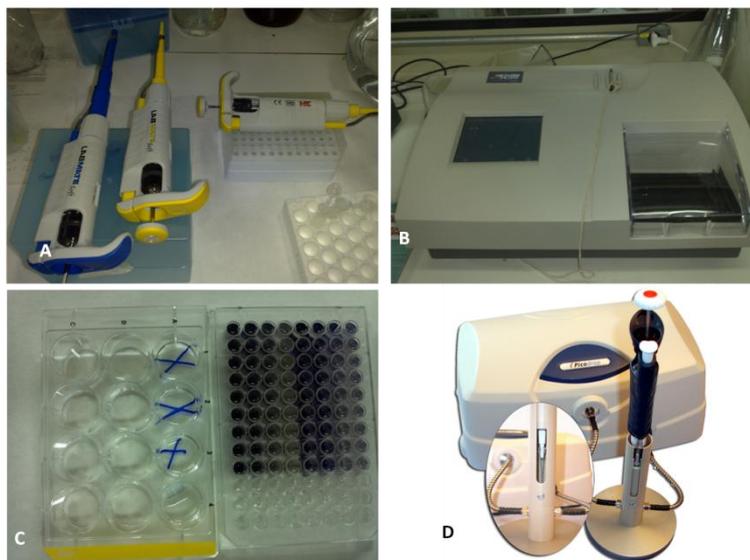


Figura 3. Equipamentos utilizados na extração e análise dos experimentos. Pipetas (A); Leitor de microplacas (B); placas de reação (C); Picodrop (D).

5.4.3 Detecção da atividade enzimática amilolítica *in vitro* de larvas Acará-disco (*Symphysodon sp.*).

A atividade específica enzimática da amilase foi calculada em relação à concentração de proteínas do sobrenadante enzimático. Uma unidade de enzima (1 UI) foi considerada quando um μmol de substrato foi hidrolisado (ou o produto foi formado) por minuto, e foi expressa por mg de proteína (UI / mg de proteína).

A detecção e a quantificação da atividade amilolítica nas larvas foram realizadas utilizando-se kits enzimáticos comerciais Bioclin, as concentrações, temperatura e tempo de reação foram adaptadas e após os ajustes a leitura foi realizada em uma leitora de microplacas (espectrofotômetro).

A determinação da atividade de amilase baseia-se na hidrólise do amido por essa enzima, com liberação de moléculas de glicose e dextrina. Pela adição de iodo, o amido não hidrolisado adquire coloração azul. A atividade da amilase é inversamente proporcional à intensidade de cor azul e calculada pela comparação com um controle. A atividade foi determinada em leitor de microplacas, em comprimento de onda de 670nm, utilizando-se o kit de amilase colorimétrica da Bioclin, a reação foi feita a temperatura de 25°C e com tempo total de reação de oito (08) minutos. O ensaio enzimático foi realizado utilizado amido em 4 concentrações 4,10 $\mu\text{g/ml}$, 8,20 $\mu\text{g/ml}$, 12,30 $\mu\text{g/ml}$, 16,41 $\mu\text{g/ml}$, para as idades de 25, 35 e 45 dias pós-eclosão. Já para as idade de 65 e 90 dias pós-eclosão foram utilizadas 7 concentrações de amido nos experimentos 4,10 $\mu\text{g/ml}$, 8,20 $\mu\text{g/ml}$, 12,30 $\mu\text{g/ml}$, 16,41 $\mu\text{g/ml}$, 20,5 $\mu\text{g/ml}$, 24,60 $\mu\text{g/ml}$, 28,72 $\mu\text{g/ml}$ para traçar a curva de atividade amilolítica, utilizou-se ainda iodo 50 μL , Tris 50mM pH 8,0, e extrato enzimático 3 μL , o volume total da reação foi de 350 μL para cada poço da microplaca, a reação foi mantida em constante agitação. Para demonstrar a atividade utilizou-se o modelo da cinética de Michaelis-Menten de uma reação mono-substrato, figura 4, e determinou-se o K_m , onde a constante de Michaelis K_m é definida como a concentração para a qual a velocidade da reação enzimática é metade de V_{max} (velocidade máxima enzimática), a metodologia também foi adaptada de Lineweaver & Burk (1939); Caraway (1959); Bradford (1976) e Camilo (2007). Os valores de amilase foram expressos em $U(\mu\text{mol/min})/\mu\text{g}$ de proteína.

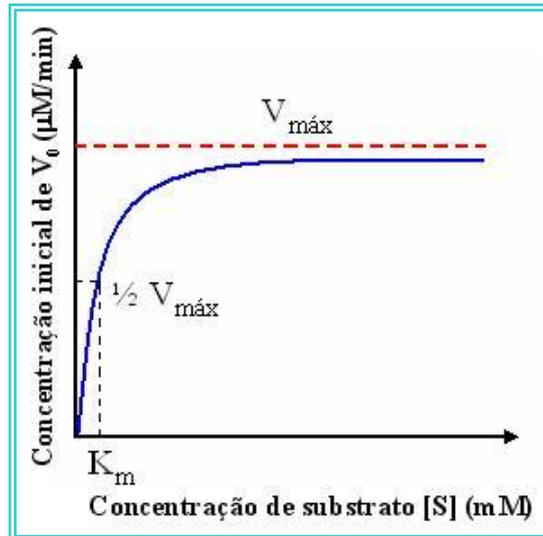


Fig. 4 Representação gráfica do modelo de Michaelis-Menten.

A atividade específica de amilase foi obtida pela divisão do valor da atividade de amilase pelo valor da concentração de proteína da respectiva amostra.

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão linear com o auxílio do Originlab data analysis (versão 8.5).

5.4.5 Visualização do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras proteicas extraídas de intestino proximal e intestino distal de acará-disco (*Symphysodon sp.*), já descritas, foram colocadas em (tampão de amostra - Tris-HCl 0,5M pH 8,0, glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 1%) e visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) na presença de SDS, segundo método descrito por Laemmli (1970); Alvarez-Gonzalez *et al.*, (2010); Falcon-Hidalgo *et al.*, (2011). A estratégia utilizada para visualização da mobilização de proteínas foi a isovolumétrica e isotrópica, sendo aplicada 30µg de proteína para cada divisão do intestino por idade em cada poço. A eletroforese foi realizada em um sistema vertical Mini Protean II da BIORAD. A separação protéica procedeu-se sob uma corrente constante a 80V por 20 minutos e após este período foi de 100 V até o término da corrida do gel.

O gel foi corado com solução de azul brilhante de Coomassie G 2% em água, metanol e ácido acético (6:3:1, v/v/v), e descorado com solução composta de água destilada, metanol e ácido acético na mesma relação de proporcionalidade usada na preparação da solução corante.

O marcador de peso molecular Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder foi usado para nos auxiliar na identificação das massas moleculares das bandas de proteínas para determinação do perfil proteico.

5.4.6 Detecção de atividade amilolítica em gel.

As amostras proteicas extraídas de intestino proximal e intestino distal de acará-disco (*Symphysodon sp.*), já descritas, foram colocadas em (tampão de amostra - Tris-HCl 0,5M pH 8,0, glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 1%) e visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) na presença de SDS, segundo método descrito por Laemmli (1970); Perez-Casanova *et al.*, (2006); Falcon-Hidalgo *et al.*, (2011). A separação protéica procedeu-se sob uma corrente constante de 100 V. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com Triton X-100 2,5 % duas vezes por 30 minutos cada; logo após, o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 20 mM; NaCl 0,2 mM; CaCl₂ 100 mM e contendo 1 % amido pH 5.5 a 25⁰ C durante 3 horas. Posteriormente o gel foi revelado com lugol na proporção de 1:50 (1mL de lugol para 49mL de água destilada) As bandas de atividade aparecem brancas em fundo azul.

5.5 Resultados

5.5.1 Alterações morfométricas, peso e crescimento.

A análise da idade e o peso médio das larvas e juvenis durante o período experimental estão descritas na figura 5.

O trato gastrointestinal do Acará-disco apresenta cinco seções distintas morfologicamente: esôfago, estômago, cecos pilóricos e secções proximal e distal do intestino. Além das diferenciações anatômicas, foram observadas também algumas variações na concentração total de proteínas e da atividade amilolítica ao longo do trato digestivo.

O peso total e o peso do intestino proximal e distal e os valores da concentração total de proteína, por idade e divisão do intestino, estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Médias de peso do peixe, do intestino, e valores de quantificação de proteína.

Idade	Valores médios						
	Peso do peixe (mg)	Peso total do intestino (mg)	Peso intestino Prox. (mg)	Peso intestino distal (mg)	Valor total de proteína µg/ml	Proteína µg/ml Prox.	Proteína µg/ml Distal
25	180,26	18,24	-	-	471,97	-	-
35	383,48	36,63	-	-	784,04	-	-
45	757,07	85,33	40,97	44,37	1270,03	733,46	536,57
65	1025,03	93,93	44,36	49,56	1461,14	861,95	599,19
90	2060,28	123,67	61,46	62,22	1548,53	914,44	634,08

As variáveis relacionadas ao desenvolvimento do acará-disco como, taxa de crescimento específico (TCE) e ganho de peso em função da idade são demonstradas na figura 5. As variáveis apresentaram um comportamento quadrático, determinado através da análise de regressão polinomial, e a taxa de crescimento específico (TCE) do acará-disco no período experimental foi de 3,75%.

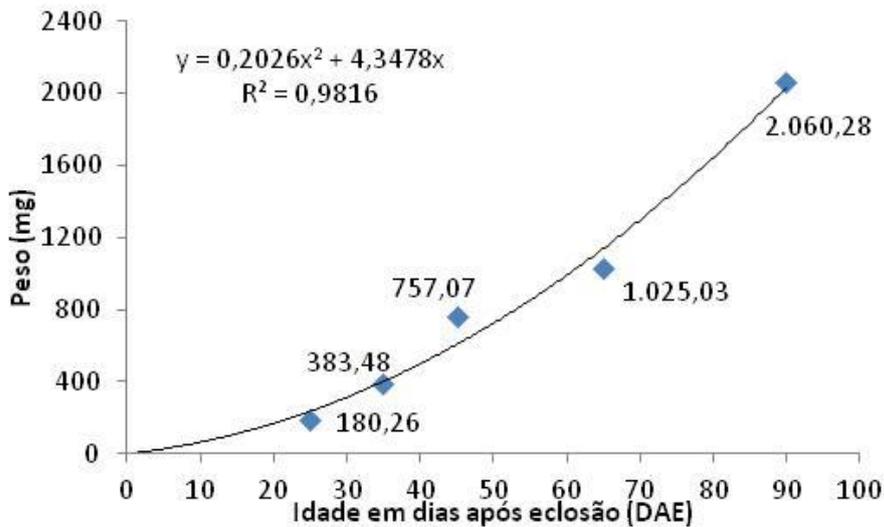


Figura 5. Crescimento médio em dias após eclosão DAE.

A relação de aumento de peso do intestino proximal e distal respectivamente versus a idade após eclosão está evidenciada nas figuras 6 e 7 e variáveis apresentaram um comportamento quadrático, determinado através da análise de regressão polinomial.

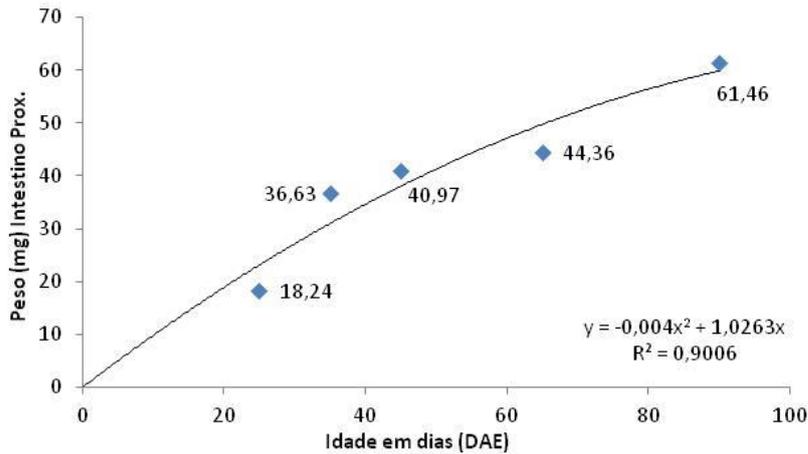


Figura 6. Análise do desenvolvimento do intestino proximal: peso médio em dias após eclosão DAE.

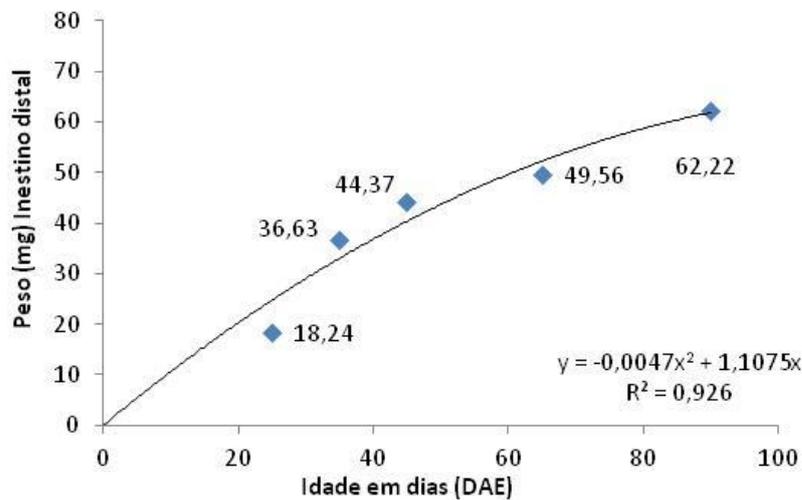


Figura 7. Análise do desenvolvimento do intestino distal: peso médio em dias após eclosão DAE.

5.5.2 Atividade amilolítica

As datas dos experimentos, os valores das médias da variação das absorvâncias de peixes de 25 DAE são apresentados na tab. 2 e na figura 8.

Tabela 2. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x Tempo (min.) para 4 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de peixes de 25 DAE.

Data exp.	4,10 μ g/ml	8,20 μ g/ml	12,30 μ g/ml	16.41 μ g/ml
06/07/2011	-	0,028	0,038	-
31/05/2012.1	0,020	0,026	0,038	0,043
31/05/2012.3	0,015	0,029	0,031	0,037
01/06/2012	0,023	0,033	0,048	0,051
05/07/2012	0,020	0,029	0,038	0,044
Médias Δ ABS	0,020	0,029	0,039	0,044

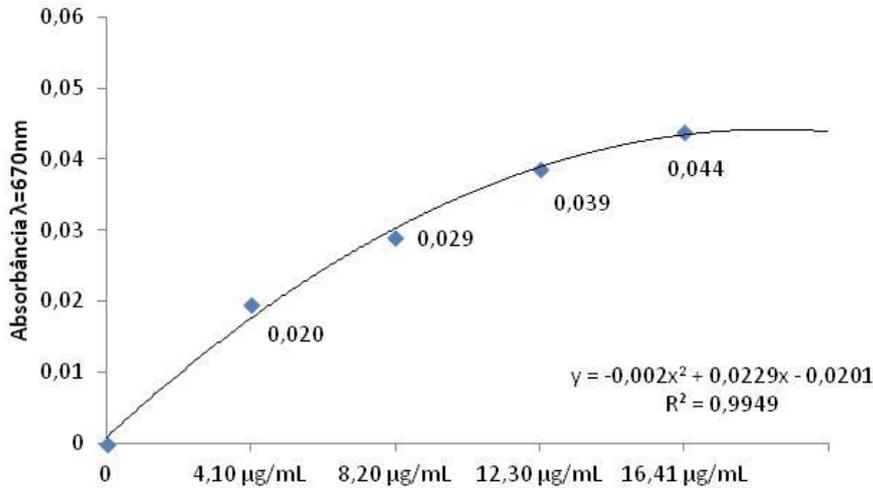


Figura 8. Atividade da amilase x concentração de amido(µg/mL) e valores de R^2 para 4 concentrações de amido em peixes de 25 DAE.

Os valores de velocidade máxima da reação (V.max.) e o valor da constante de afinidade (Km) foram calculados e são apresentados na figura 9.

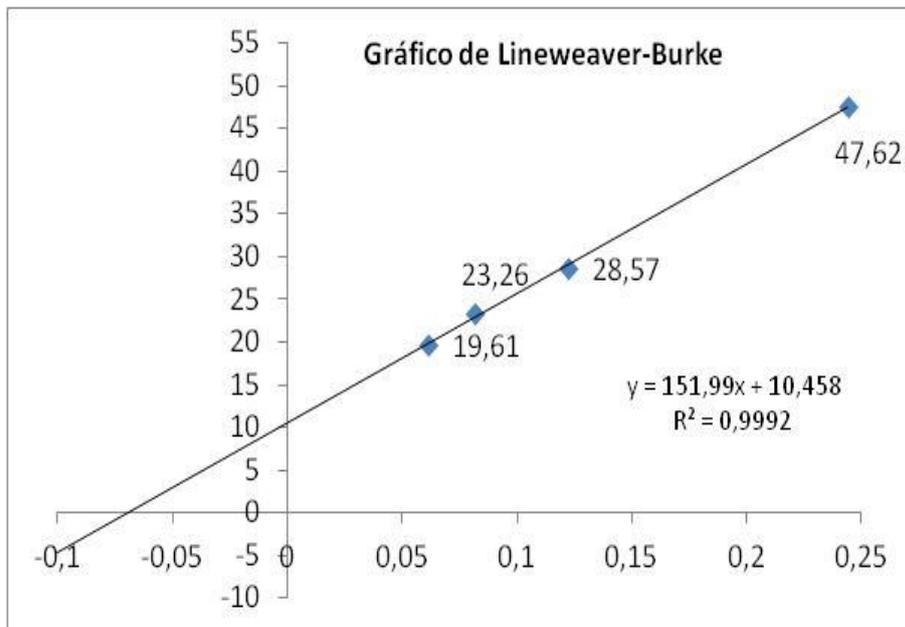


Figura 9. Gráfico duplo-reverso 25 DAE. Valor de $R^2 = 0,9992$.

Para o cálculo da velocidade máxima da reação (V.max.) e o valor da constante de afinidade (Km) aos 25 DAE, os valores de X (-0,07) e Y (10,5) foram determinados.

As datas dos experimentos, os valores das médias da variação das absorvâncias de peixes de 35 DAE são apresentados na tab. 3 e na fig. 10.

Tabela 3. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x Tempo (min.) para 4 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de peixes de 35 DAE.

Data exp.	4,10 μ g/ml	8,20 μ g/ml	12,30 μ g/ml	16.41 μ g/ml
22/05/12	0,024	0,042	0,052	0,064
23/05/2012	0,023	0,040	0,050	0,066
12/06/2012.1	0,023	0,029	0,031	0,032
12/06/2012.2	0,018	0,025	0,027	0,030
14/09/2012	0,020	0,031	0,037	0,040
Médias Δ ABS	0,022	0,033	0,039	0,046

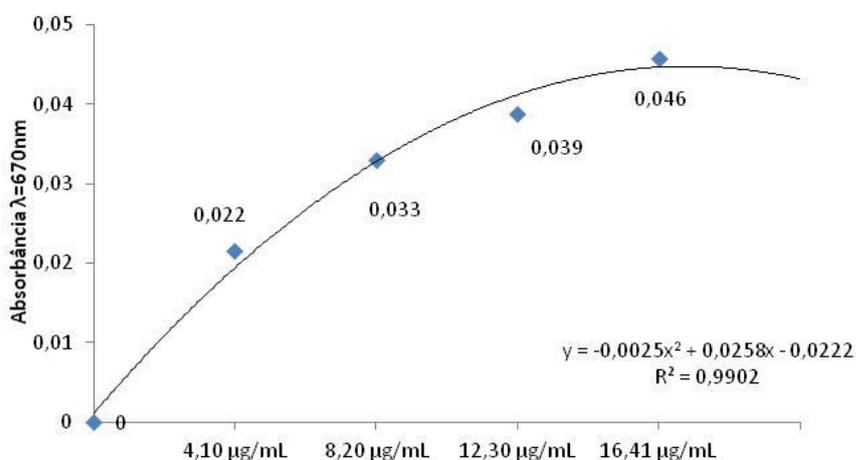


Figura 10. Atividade da amilase x concentração de amido (μ g/mL) e valores de R^2 para 4 concentrações de amido em peixes de 35 DAE.

Os valores de velocidade máxima da reação (V.max.) e o valor da constante de afinidade (Km) foram calculados e são apresentados na fig. 11.

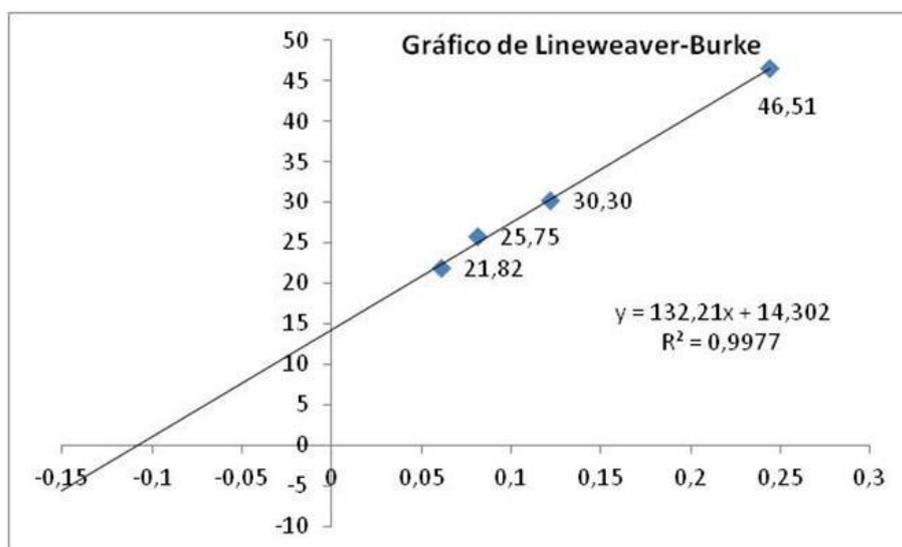


Figura 11. Gráfico duplo-reverso 35 DAE. Valor de $R^2 = 0,9977$.

Para o cálculo da velocidade máxima da reação (V_{max}) e o valor da constante de afinidade (K_m) aos 35 DAE os valores de X (-0,11) e Y (14,3) foram determinados.

As datas dos experimentos, os valores das médias da variação das absorvâncias do intestino proximal e distal de peixes de 45 DAE são apresentados na tab. 4 e tab.5. A fig. 12 (A) e (B) demonstra a variação da cinética enzimática em diferentes concentrações de amido.

Tabela 4. Valores médios de absorvância (ΔABS) x min. para 4 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino proximal de peixes de 45 DAE.

Data exp.	4,10 $\mu\text{g/ml}$	8,20 $\mu\text{g/ml}$	12,30 $\mu\text{g/ml}$	16.41 $\mu\text{g/ml}$
16/12/2010	-	0,036	0,042	-
22/02/2011	0,023	0,041	0,048	0,044
25/07/2012	0,017	0,029	0,034	0,035
26/07/2012	0,011	0,020	0,023	0,030
27/07/2012	0,017	0,029	0,034	0,035
Médias ΔABS	0,017	0,031	0,036	0,036

Tabela 5. Valores médios de absorvância (ΔABS) x min. para 4 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino distal de peixes de 45 DAE.

Data exp.	4,10 $\mu\text{g/ml}$	8,20 $\mu\text{g/ml}$	12,30 $\mu\text{g/ml}$	16.41 $\mu\text{g/ml}$
25/07/2012	0,025	0,046	0,067	0,074
26/07/2012	0,033	0,049	0,068	0,096
27/07/2012	0,029	0,056	0,065	0,075
Médias ΔABS	0,029	0,050	0,067	0,082

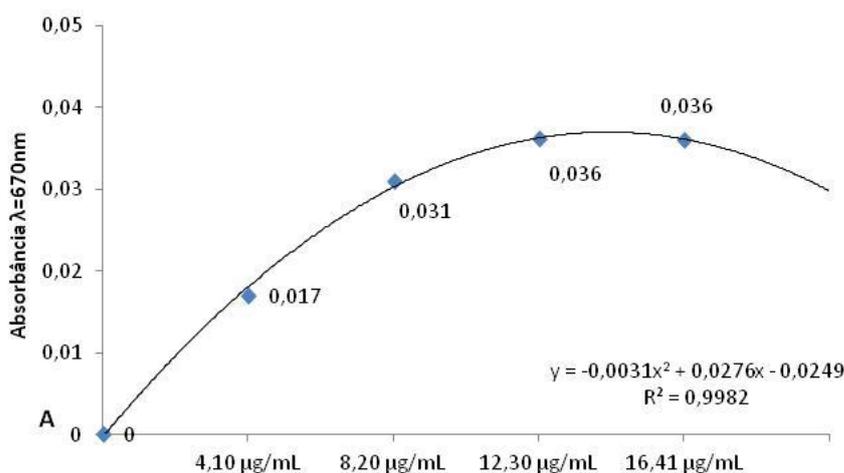


Figura 12. Gráfico da atividade enzimática x concentração de amido ($\mu\text{g/mL}$) e valores de R^2 para 4 concentrações de amido, intestino proximal de peixes aos 45 DAE (A).

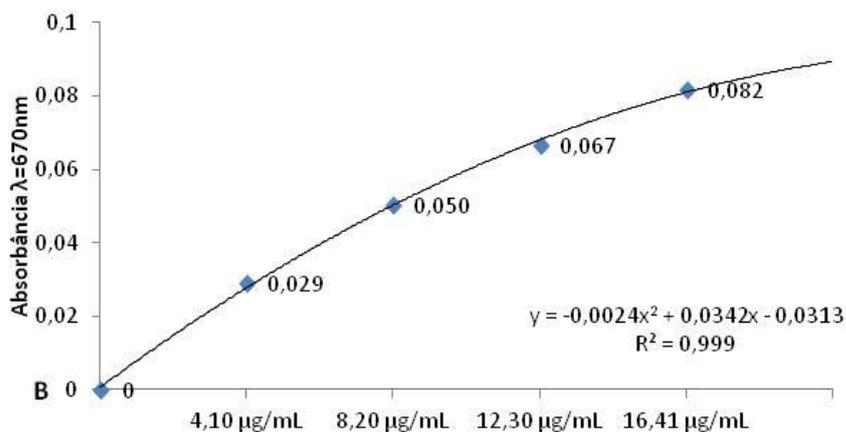


Figura 12. Gráfico da atividade enzimática x concentração de amido ($\mu\text{g/mL}$) e valores de R^2 para 4 concentrações de amido, Intestino distal de peixes aos 45 DAE (B).

Os valores de velocidade máxima da reação (V_{max}) e o valor da constante de afinidade (K_m) foram calculados e são apresentados na fig. 13 (A) e (B).

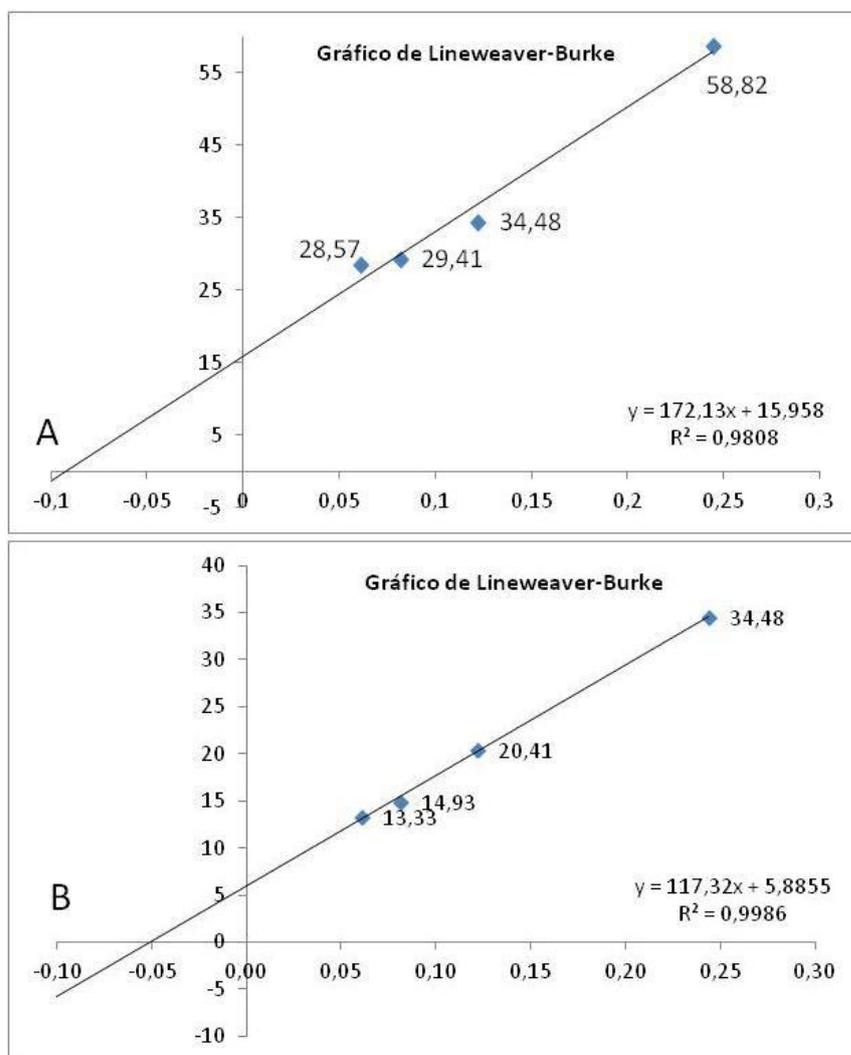


Figura 13. Gráfico duplo-reverso 45DAE proximal (A) e distal (B). Valor de $R^2 = 0,9808$ (A) e valor $R^2 = 0,9986$ (B).

Para o cálculo da velocidade máxima da reação (V.max.) e o valor da constante de afinidade (Km) aos 45 DAE os valores de X (-0,09) e Y (15,96) para o intestino proximal e de X (-0,05) e Y (5,89) para intestino distal foram determinados.

As datas dos experimentos, os valores das médias da variação das absorvâncias do intestino proxima e distal de peixes de 65 DAE são apresentados na tab. 6 e tab. 7. A fig. 14 (A) e (B) demonstra a variação da cinética enzimática em diferentes concentrações de amido.

Tabela 6. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 7 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino proximal de peixes de 65 DAE.

Data exp.	4,10 μ g/mL	8,20 μ g/mL	12,30 μ g/mL	16,41 μ g/mL	20,51 μ g/mL	24,60 μ g/mL	28,72 μ g/mL
29/03/2011	0,020	0,037	0,042	-	-	-	-
04/01/2011	0,020	0,038	0,042	-	-	-	-
04/02/2011	0,027	0,045	0,056	-	-	-	-
20/09/2011	-	0,039	0,049	0,056	-	-	-
09/07/2012	0,020	0,024	0,030	0,041	-	-	-
12/07/2012	0,016	0,023	0,027	0,037	-	-	-
13/08/2012	0,016	0,025	0,035	0,049	-	-	-
29/11/2012	-	-	-	0,077	0,084	0,092	0,098
26/11/2012	-	-	-	0,077	0,094	0,106	0,107
05/11/2012	-	-	-	0,078	0,095	0,107	0,107
Médias Δ ABS	0,020	0,033	0,040	0,059	0,091	0,102	0,104

Tabela 7. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 7 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino distal de peixes de 65 DAE.

Data exp.	4,10 μ g/mL	8,20 μ g/mL	12,30 μ g/mL	16,41 μ g/mL	20,51 μ g/mL	24,60 μ g/mL	28,72 μ g/mL
09/07/2012	0,025	0,040	0,055	0,084	-	-	-
12/07/2012	0,013	0,021	0,022	0,029	-	-	-
13/08/2012	0,027	0,068	0,092	0,122	-	-	-
29/11/2012	-	-	-	0,091	0,105	0,101	0,108
26/11/2012	-	-	-	0,105	0,113	0,116	0,117
05/11/2012	-	-	-	0,101	0,117	0,112	0,12
Médias Δ ABS	0,022	0,043	0,056	0,089	0,112	0,110	0,115

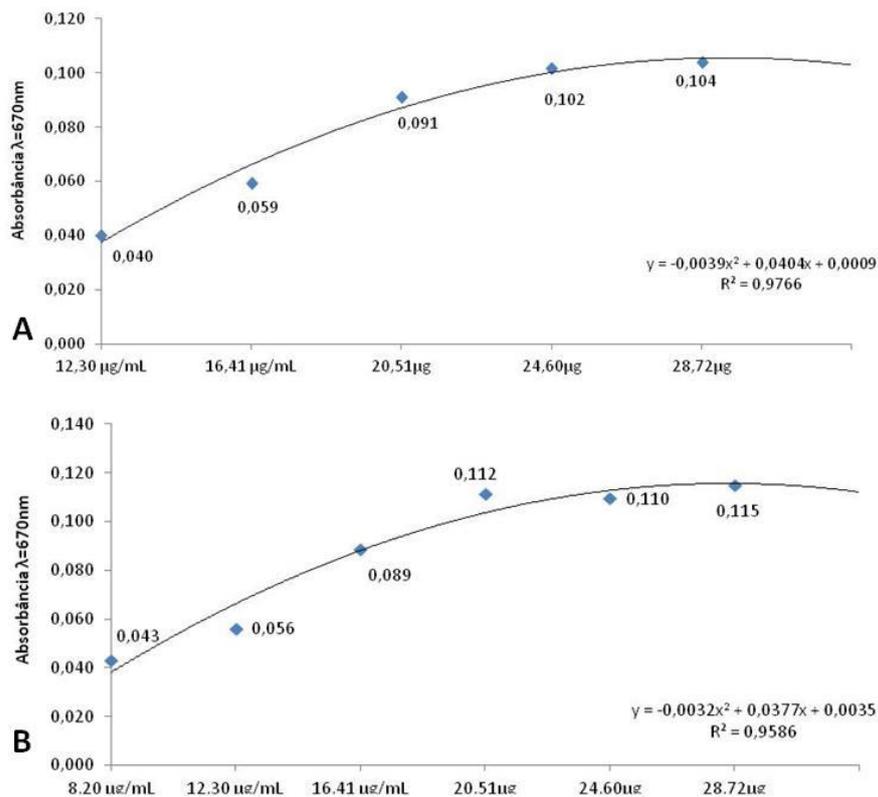


Figura 14. Atividade da amilase x concentração de amido(μg/mL) e valores de R^2 para 5 concentrações de amido, intestino proximal de peixes aos 65 DAE (A); Intestino distal de peixes aos 65 DAE (B).

Os valores de velocidade máxima da reação (V_{max}) e o valor da constante de afinidade (K_m) foram calculados e são apresentados na fig. 15 (A) e (B).

Para o cálculo da velocidade máxima da reação (V_{max}) e o valor da constante de afinidade (K_m) aos 65 DAE os valores de X (-0,02) e Y (3,64) para o intestino proximal e de X (-0,02) e Y (2,88) para intestino distal foram determinados.

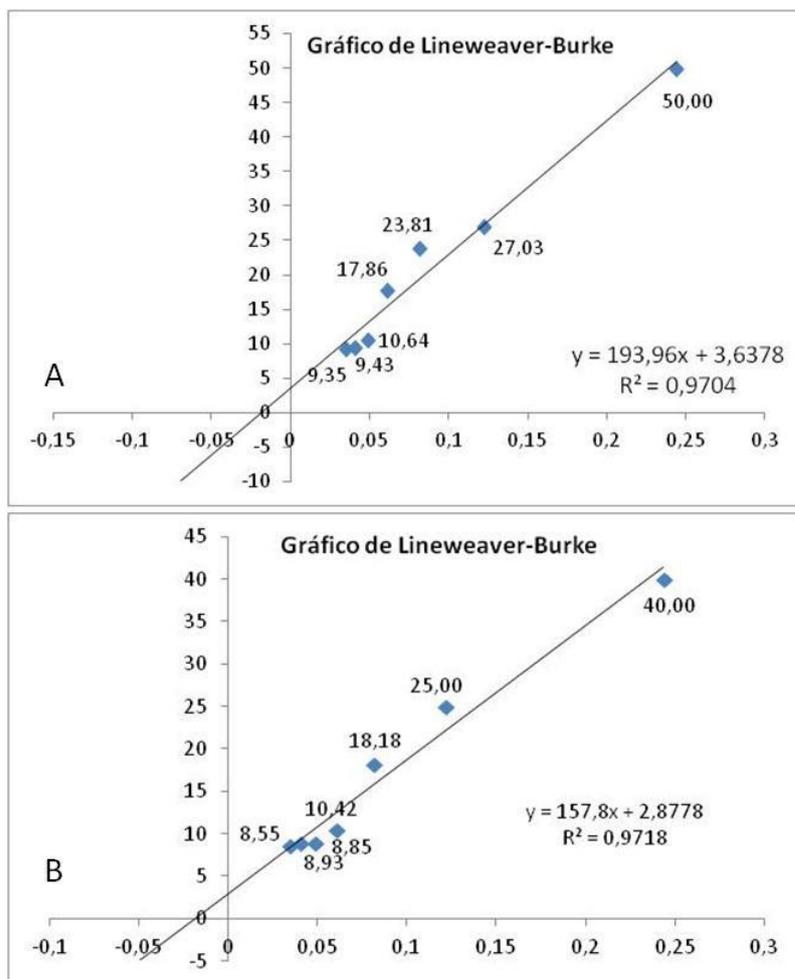


Figura 15. Gráfico duplo-reverso 65 DAE proximal (A) e distal (B). Valor de $R^2 = 0,9704$ (A) e valor $R^2 = 0,9718$ (B).

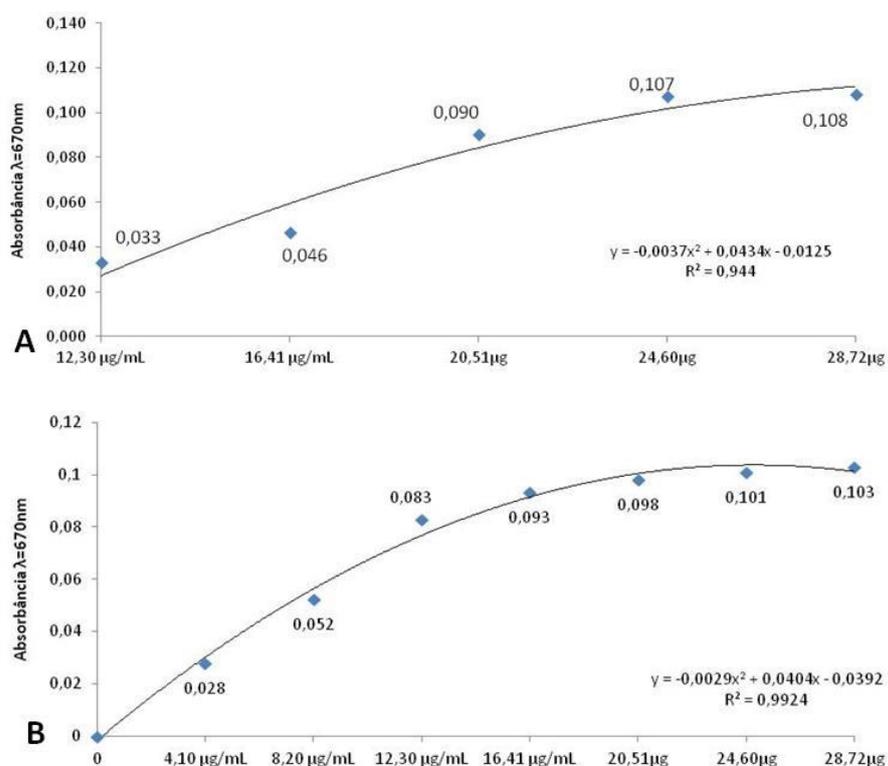
As datas dos experimentos, os valores das médias da variação das absorvâncias do intestino proximal e distal de peixes de 90 DAE são apresentados na tab. 8 e tab. 9. A fig. 16 (A) e (B) demonstra a variação da cinética enzimática em diferentes concentrações de amido.

Tabela 8. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 7 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino proximal de peixes de 90 DAE.

Data exp.	4,10 μ g/mL	8,20 μ g/mL	12,30 μ g/mL	16,41 μ g/mL	20,51 μ g/mL	24,60 μ g/mL	28,72 μ g/mL
26/05/2011	0,022	0,036	0,040	0,054	-	-	-
07/08/2012	0,026	0,038	0,042	0,044	-	-	-
08/08/2012	0,009	0,014	0,017	0,019	-	-	-
03/09/2012	0,020	0,024	0,032	0,036	-	-	-
18/10/2012	-	-	-	0,078	0,088	0,106	0,105
27/11/2012	-	-	-	0,079	0,090	0,107	0,108
Médias Δ ABS	0,019	0,028	0,033	0,052	0,089	0,107	0,107

Tabela 9. Valores médios de absorvância (Δ ABS) x min. para 7 concentrações de amido em sobrenadante enzimático de intestino distal de peixes de 90 DAE.

Data exp.	4,10 μ g/mL	8,20 μ g/mL	12,30 μ g/mL	16,41 μ g/mL	20,51 μ g/mL	24,60 μ g/mL	28,72 μ g/mL
26/05/2011	0,019	0,032	0,069	-	-	-	-
07/08/2012	0,024	0,055	0,109	0,128	-	-	-
08/08/2012	0,019	0,042	0,045	0,103	-	-	-
03/09/2012	0,050	0,08	0,108	0,080	-	-	-
18/10/2012	-	-	-	0,095	0,113	0,11	0,114
27/11/2012	-	-	-	0,060	0,083	0,092	0,092
Médias Δ ABS	0,028	0,052	0,083	0,093	0,098	0,101	0,103

Figura 16. Atividade da amilase x concentração de amido (μ g/mL) e valores de R^2 para 7 concentrações de amido, intestino proximal de peixes aos 90 DAE (A); Intestino distal de peixes aos 90 DAE (B).

Os valores de velocidade máxima da reação (V_{max}) e o valor da constante de afinidade (K_m) foram calculados e são apresentados na fig. 17 (A) e (B).

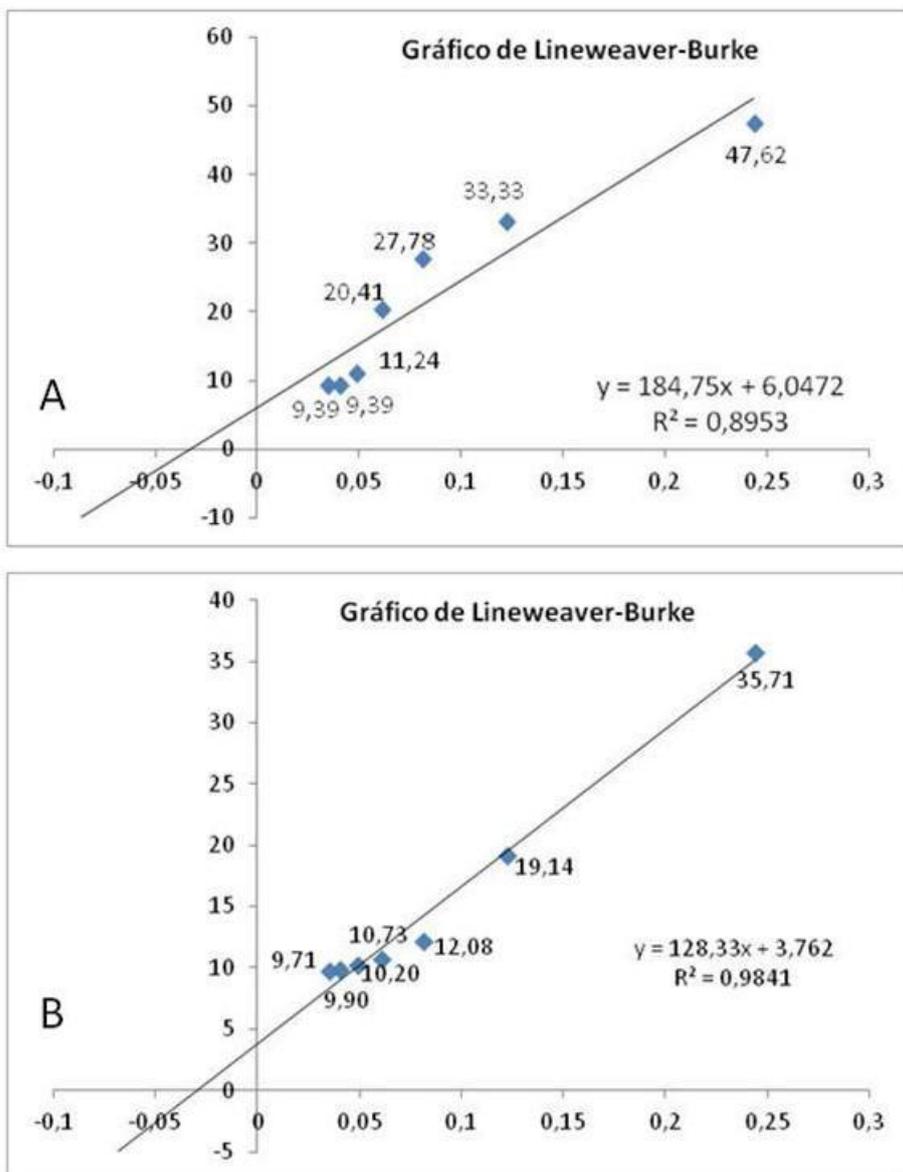


Figura 17. Gráfico duplo-reverso 90 DAE proximal (A) e distal (B). Valor de $R^2 = 0,8953$ (A) e valor $R^2 = 0,9841$ (B).

Para o cálculo da velocidade máxima da reação (V_{max}) e o valor da constante de afinidade (K_m) aos 65 DAE os valores de X (-0,03) e Y (6,05) para o intestino proximal e de X (-0,03) e Y (3,76) para intestino distal foram determinados.

Os valores de X e Y, por idade e divisão experimental do intestino, nos gráficos duplo-reverso são demonstrados na tab. 10.

Tabela 10. Valores de X e Y no gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-reverso).

Idade	Eixo			
	X prox.	Xdistal	Y prox.	Ydistal
25		-0,07		10,5
35		-0,11		14,3
45	-0,09	-0,05	15,96	5,89
65	-0,02	-0,02	3,64	2,88
90	-0,03	-0,03	6,05	3,76

Os valores calculados da constante de afinidade Km (1/x) e velocidade máxima de atividade enzimática Vmax. (1/y) por idade e divisão experimental do intestino, estão demonstradas na tab. 11.

Tabela 11. Valores de Km e Velocidade máxima para 4 idades experimentais.

Idade	Km prox.	Km distal	Vmax. prox.	Vmax. distal
25		14,29		0,10
35		9,09		0,07
45	11,11	20	0,063	0,170
65	50	50	0,275	0,347
90	33,33	33,33	0,165	0,266

A tab. 12 demonstra os valores calculados para a atividade enzimática da amilase para as 5 idades, a concentração de proteína determinada nos experimentos e também a atividade enzimática específica que é a atividade determinada dividida pela concentração de proteína encontrada. Os valores são apresentados por divisões experimentais do intestino.

Tabela 12. Médias dos valores de unidades (U) de amilase e concentração de proteína.

Idade*	U/mL	µg/mL	Uae/µg¶
25	18085	471,98	38,32
35	15372	784,05	19,61
45p	10225	733,46	13,94
45d	13658	536,57	25,45
65p	2706	861,95	3,14
65d	9049	599,19	15,10
90p	6386	914,44	6,98
90d	12185	634,08	19,22

* Idade em dias após eclosão DAE; ¶ Valores médios calculados de unidades de amilase por idade e segmento do intestino. Uae - Unidade de atividade específica.

A fig. 18 demonstra cinética enzimática em peixes de 25, 35, 45, 65 e 90 DAE com valores da atividade enzimática do intestino proximal e distal e valores totais. A atividade enzimática amilolítica do acará-disco é dada em Unidade de enzima enquanto a atividade enzimática específica é demonstrada em $U/\mu g$ de proteína/ min^{-1} .

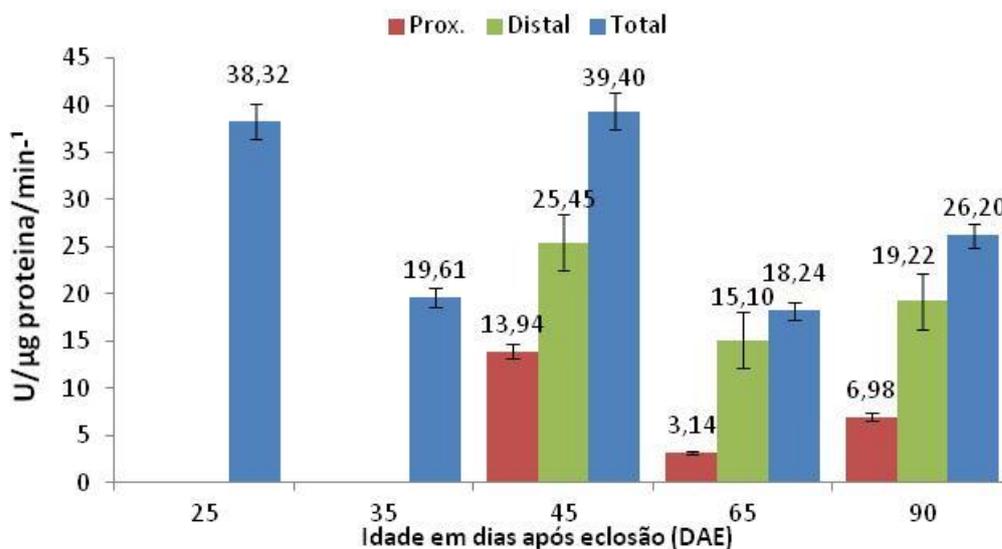


Figura 18. Atividade específica da amilase em $U/\mu g$ de proteína em função da idade e divisões experimentais do intestino do acará-disco.

5.5.3 Zimograma e atividade em gel "SDS-PAGE".

O padrão apresentado na eletroforese demonstra o desenvolvimento precoce de proteínas (enzimas) no sistema digestório do acará-disco fig. 19, 20, 21. O peso molecular das proteínas variou durante a ontogênese inicial. O número e a intensidade das bandas variou na porção proximal e distal do intestino e também com a idade.

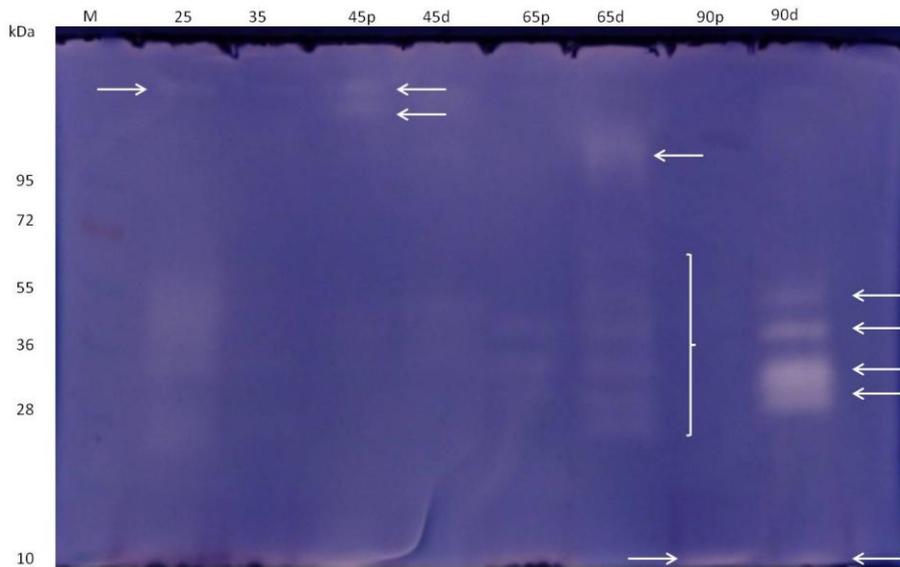


Figura 19. Atividade de amilase em gel SDS-PAGE de acará-disco durante os 90 dias após-eclosão. Os valores de M correspondem ao marcador molecular de baixo peso padrão (Thermo Scientific: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder). As setas indicam o aparecimento de bandas durante o desenvolvimento.

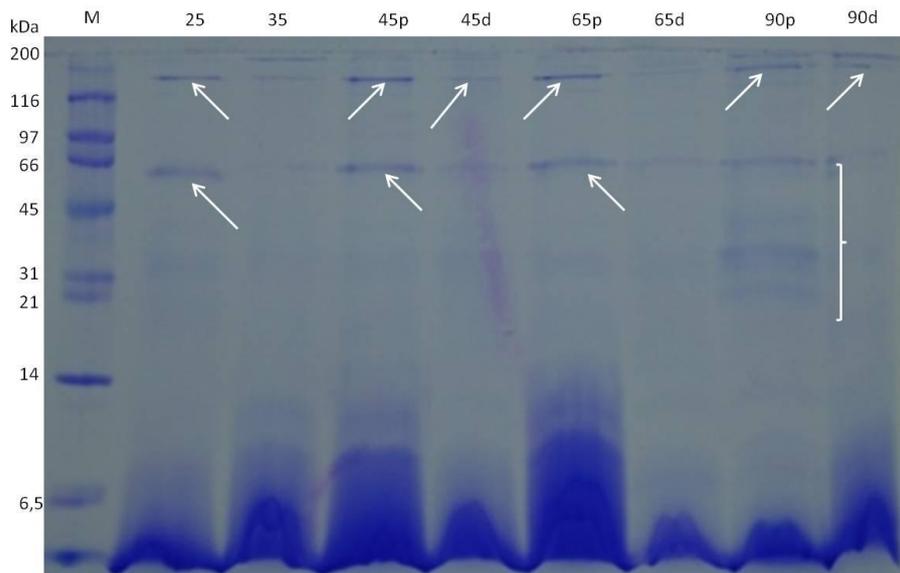


Figura 20. Perfil enzimático em gel SDS-PAGE de acará-disco durante os 90 dias após-eclosão corado com Coomassie Blue. Os valores de M correspondem ao marcador molecular de baixo peso padrão (Bio-Rad Standards, Broad Range).

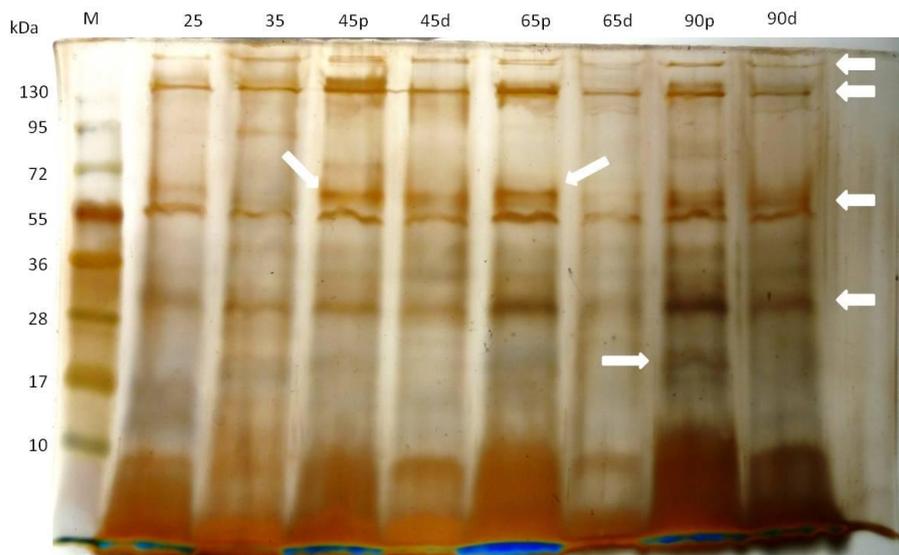


Figura 21. Perfil enzimático em gel SDS-PAGE de acará-disco durante os 90 dias após-eclosão corado com prata. Os valores de (M) correspondem ao marcador molecular de baixo peso padrão (Thermo Scientific: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder).

5.6 Discussão

Os peixes possuem enzimas ativas para digestão de proteínas, carboidratos e outros nutrientes da sua dieta já na primeira alimentação. No entanto, a atividade destas enzimas são relativamente mais baixas nas fases iniciais de larvas e juvenis do que em adultos. Outro fator é o hábito alimentar, peixes herbívoros e onívoros tendem a ter mais amilase que peixes carnívoros. Neste estudo foi observado que houve variação nas concentrações, na atividade e no tipo de enzimas em cada uma das idades do acará-disco.

A presença de amilase tem sido relatada em várias espécies no período larval ou juvenil (CAHU & ZAMBONINO-INFANTE 1994; MOYANO *et al.* 1996).

Como as enzimas atuam em combinação com diversos fatores e cofatores, assim como a composição da alimentação (LUNDSTEDT *et al.*, 2004) podemos dizer que, apenas o conhecimento da atividade de enzimas digestivas de determinada espécie não é suficiente para se determinar o valor nutritivo de uma dieta para alimentação dos peixes. Normalmente, os peixes utilizam menos carboidrato, exigindo níveis mais elevados de proteína na alimentação (LAZZARI *et al.*, 2010). No entanto, vários investigadores demonstraram a presença de carboidrases, tais como amilase, em muitas espécies de peixes mesmo quando muito jovens (HIDALGO *et al.*, 1999;

LUNDSTEDT *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012) assim como foi determinado neste estudo para o acará-disco.

O acará-disco teve um aumento de peso contínuo até os 90 DAE, e sofreu uma mudança morfológica no formato do corpo até os 35 DAE. Tendo como peso médio inicial aos 25 dias 180,26mg, 35 dias 383,48mg, 45 dias 757,07mg, 65 dias 1.025,03g e aos 90 dias 2.060,28g. Os pesos divergem dos encontrados em diferentes estudos realizados por outros pesquisadores com acará-disco uma vez que os autores optaram por trabalhar com peixes juvenis em crescimento ou em idade adulta (CHONG *et al.*, 2002ab; CHONG *et al.*, 2005; ÇELIK, 2010; ONAL *et al.*, 2010).

O desenvolvimento do trato digestivo ficou evidenciado ao longo do período experimental através do aumento de peso e tamanho, conforme descrito na Tab.1. O peso dos peixes e tamanho do intestino não foi diretamente proporcional à atividade da amilase encontrada no acará-disco no período entre 25 e 90 dias após a eclosão. Os valores de proteína total encontrados para o acará-disco demonstram uma relação direta com o crescimento do peixe, conforme o animal se desenvolve, maior é a quantidade de proteínas formadas no seu trato digestório, sinalizando capacidade digestiva já aos 25 dias após a eclosão com 471,97 µg/ml de proteína, valor este que é superado em mais de 3 vezes aos 90 dias com 1548,53 µg/ml de proteína.

Os valores totais de atividade amilolítica variaram de acordo com a idade e parte do intestino avaliada. Esta variação está melhor detalhada na Fig. 22 que representa os valores, e onde foi encontrada a atividade de amilase. Pode-se perceber que aos 25 DAE os peixes apresentaram a segunda maior quantidade de atividade amilolítica, ficando os 45 DAE com o maior valor de atividade amilolítica e aos 90 DAE com outro pico dos valores observados. Outra constatação é que a maior concentração de atividade de amilase ocorreu no intestino distal. Quando comparado a estudos feitos por Lazzari *et al.*, (2010) com o jundiá (*Rhamdia quelen*) em 3 diferentes idades e por Lin *et al.*, (2010); Santos *et al.*, (2012) é possível verificar que também houve variação na atividade em função da idade dos peixes, esta variação pode ser em função do desenvolvimento morfológico e fisiológico em que o peixe se encontrava.

A atividade enzimática da amilase aos 90 DAE para o acará-disco foi inferior quando comparada ao encontrado por Lin *et al.*, (2010) e Santos *et al.*,

(2012) quando trabalharam com tilápias (*Oreochromis niloticus*). A atividade da amilase foi superior ao encontrado para acará-disco também em um Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) Rangsin *et al.*, (2012) para a truta arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) Marianne *et al.*, (2007) e para o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) por Correa *et al.*, (2007).

Porém, quando comparado aos valores encontrados por Al-Tameemi *et al.*, (2010) para 3 espécies de ciprinídeos e principalmente para carpa capim, os valores de atividade da amilase do acará-disco são 14 vezes superiores. Novamente quando comparado com os valores encontrados por Lazzari *et al.*, (2010) para 3 idades do Jundiá (*Rhamdia quelen*) o acará-disco obteve valores 32 vezes superiores para atividade amilolítica.

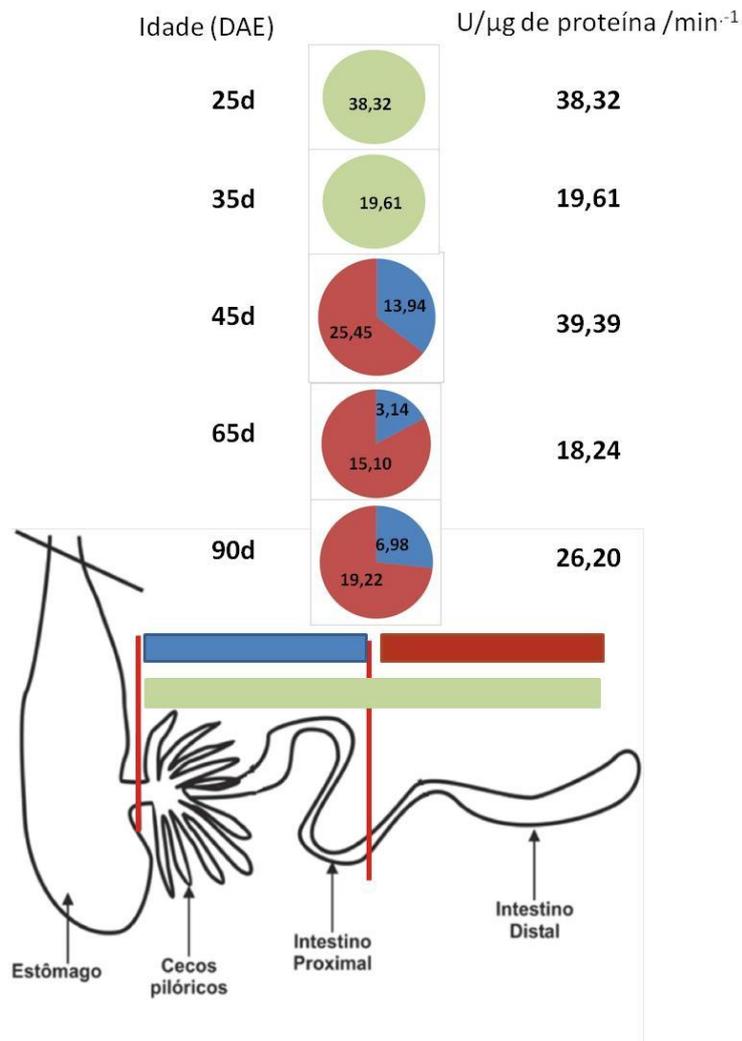


Figura 22. Demonstrativo da atividade amilolítica encontrada no intestino proximal e intestino distal nas diferentes idades experimentais para o Acará-disco.

Hidalgo *et al.*, (1999) pesquisando sobre hábitos alimentares de peixes e seu perfil enzimático confirmou capacidade digestiva de amido nos peixes, e com peixes carnívoros apresentando alguns valores superiores aos herbívoros e onívoros, o que é compatível com os resultados obtidos na pesquisa com o acará-disco. Os resultados demonstram ainda que o hábito alimentar que deveria ser fator preponderante na capacidade de digestão de carboidrato, não fica claramente caracterizado pelos valores de atividade enzimática obtidos por pesquisas recentes. Seria normal esperar que peixes herbívoros e onívoros possuísem uma maior capacidade de digestão de carboidratos quando comparados com os carnívoros (LOPEZ-VASQUEZ *et al.*, 2009).

Na tab.13 estão relacionados resultados de pesquisas com peixes de hábito alimentar carnívoro, onívoro e herbívoro que podem ser comparados com o acará-disco, que obteve uma maior atividade amilolítica quando comparado a algumas espécies já pesquisadas. Este maior desempenho enzimático demonstra a capacidade de digestão de carboidrato pelo acará-disco.

Tabela 13. Valores encontrados para a atividade da amilase na literatura nos últimos 10 anos.

Espécie	Peso do peixe	Total U/μg	Referência
<i>Symphysodon</i> sp. (Acará-disco)	2,06g	26,2	Presente trabalho
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i> (Aruanã)	251g	1,44	Natalia <i>et al</i> , 2004
<i>Oreochromis niloticus</i> (Larva)	4,33g	90,63	Lin <i>et al</i> , 2010
<i>Butis butis</i>	17,3g	0,011	Chaudhuri <i>et al</i> , 2012
<i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon)	170g	12,53	Marianne <i>et al</i> , 2006
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout)	300g	87,66	Marianne <i>et al</i> , 2007
<i>Cyprinus carpio</i> (Carpa)	84,43g	1,84	Al-Tameemi <i>et al</i> , 2010
<i>Aspius vorax</i>	77,25g	0,76	Al-Tameemi <i>et al</i> , 2011
<i>Pseudapocryptes elongates</i>	11,3g	0,129	Chaudhuri <i>et al</i> , 2012
<i>Scatophagus argus</i>	29,0g	0,0077	Chaudhuri <i>et al</i> , 2012
<i>Oreochromis niloticus</i> (Juvenil)	27,18g	45,47	Santos <i>et al</i> , 2012
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (Catfish)	98,25g	137,17	Rangsin <i>et al</i> , 2012
<i>Rhamdia quelen</i> (Jundiá)	15g	0,8	Lazzari <i>et al</i> , 2010
<i>Rhamdia quelen</i> (Jundiá)	-	0,15	Lazzari <i>et al</i> , 2010
<i>Rhamdia quelen</i> (Jundiá)	-	0,18	Lazzari <i>et al</i> , 2010
<i>Colossoma macropomum</i> (Tambaqui)	167,7g	10,5	Correa <i>et al</i> , 2007
<i>Gadus morhua</i> (Bacalhau)	500g	31,17	Marianne <i>et al</i> , 2006
<i>Brycon amazonicus</i> (Matrinxã)	90g	5,23	Camilo, 2007
<i>Barbus sharpeyi</i>	84,43	1,33	Al-Tameemi <i>et al</i> , 2011

Segundo Chaudhuri *et al*, (2012) quando trabalharam com 10 espécies de peixes carnívoros indianos, o padrão da atividade enzimática pode sofrer

grandes variações. Estas variações podem ser por diversos fatores como: tipo de alimentação, condições de criação, genética e fatores experimentais (PERERA *et al.*, 2008).

Os resultados também demonstram uma correlação entre atividade enzimática da amilase e taxa de crescimento do acará-disco, sendo que aos 25 e 35 DAE temos um padrão na atividade enzimática com enzimas de alto peso molecular e que tem uma menor afinidade enzima substrato e uma maior taxa de atividade enzimática conforme descrito nas Tab. 12 e 13.

Já aos 45 dias após eclosão podemos perceber um pico na atividade enzimática amilolítica e uma diferenciação do padrão enzimático ficando caracterizado um grupo enzimático de alto peso molecular > 95kDa no intestino proximal e outro grupo enzimático de peso molecular intermediário entre 72kDa e 28kDa no intestino distal. Este padrão enzimático se repete aos 65 DAE e aos 90 DAE para intestino proximal e distal. Observa-se uma mudança no padrão de afinidade enzimática a partir dos 45 DAE onde pode-se perceber que existe um aumento significativo no valor de K_m que representa a afinidade da enzima pelo substrato.

5.7 Conclusão

Em conclusão, as principais enzimas digestivas, incluindo amilase, estão presentes no acará-disco aos 25 dias após eclosão. Os padrões desta atividade enzimática digestiva são um indicativo do desenvolvimento funcional do sistema digestivo do acará-disco de forma bem precoce. A existência da enzima amilase e os valores de atividade enzimática indicam boa capacidade de digestão do amido mesmo em formas mais jovens do acará-disco, principalmente na porção distal do intestino. O estudo mostrou que existe uma diferenciação no padrão enzimático do Acará-disco aos 45 dias após eclosão, principalmente no que se refere às porções proximais e distais do intestino.

6.7 Referências bibliográficas

- ALARCÓN, F.J., DIAZ, M., MOYANO, F.J.; ABELLAN, E. 1998. **Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*)**. Fish Physiology and Biochemistry, 19: 257-267.
- ALVAREZ-GONZALEZ, C.A.; MOYANO-LOPEZ, F.J.; CIVERA-CERECEDO, R.; CARRASCO-CHAVEZ, V.; ORTIZ-GALINDO, J.L.; NOLASCO-SORIA, H.; TOVAR-RAMIREZ, D.; DUMAS, S. **Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II: Electrophoretic analysis**. Fish Physiol Biochem v.36, p.29–37, 2010.
- AL-TAMEEMI R.; ALDUBAIKUL, A.; SALMAN N.A. 2010. **Comparative study of α -amylase activity in three Cyprinid species of different feeding habits from Southern Iraq**. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 10: 411-414.
- Bezerra, R.; Lins, E.; Alencar, R.; Paiva, M.; Chaves, M.; Coelho, L.; Carvalho, L. (2005) **Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. Proc. Biochem. v.40, p.1829–1834.
- BRADFORD M.M., 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding**. Analytical Biochemistry. v.72, p.248-254.
- CAHU, C.L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L. **Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes**. Compendium of Biochemistry and Physiology, v.109A, p.213-222, 1994.
- CÂMARA, M. R., VERANI, J. R., CHELLAPPA, S., 2002, **Descrição morfológica, merística e produção de muco do acará disco, *Symphysodon discus* Heckel, 1840 (Osteichthyes:Cichlidae)**. In: Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia. Curitiba: Associação Brasileira de Zoologia, v.1, 319 p.
- CAMILO, R.Y. **Efeitos da adição de aminoácidos essenciais livres à dieta e da ausência de nutrientes na atividade de enzimas digestivas e no metabolismo intermediário de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. 2007. 66f. Dissertação. Mestrado em Ciências. São Carlos: UFSCar.
- CARAWAY, W.T. **A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids**. American Journal of Clinical Pathology, v.32, p.97-99, 1959.
- ÇELİK Y. 2010. **Characterization by microphotography of larval and prejuvenile stage of discus fish (*Symphysodon spp.*)**. Journal of FisheriesSciences.com. 4, 99-111.

CHAKRABARTI, I.; GANI, M.A.; CHAKI, K.K.; SUR, R.; MISRA, K.K. 1995. **Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation.** *Comp. Biochem. Physiol. A* 112, 167–177.

CHAKRABARTI, R.; RATHORE, R.M. **Ontogenic changes in the digestive enzyme pattern and characterization of proteases in Indian major carp *Cirrhinus mrigala*.** *Aquaculture Nutrition*. v.16, p. 569-581. 2010.

CHAUDHURI, A.; MUKHERJEE, S.; HOMECHAUDHURI, S. **Diet Composition and Digestive Enzymes Activity in Carnivorous Fishes Inhabiting Mudflats of Indian Sundarban Estuaries.** *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 12, p.265-275. 2012.

CHONG, A.S.C.; HASHIM, R.; Ali, A.B. **Dietary protein requirements for discus (*Symphysodon spp.*).** *Aquaculture nutrition*, London, v.6, n. 4, p. 275-278, dez. 2000.

CHONG, A.S.C.; HASHIM, R.; Ali, A.B. **Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using in vivo and in vitro methods.** *Aquaculture nutrition*, London, v.8, n. 3, p. 229, 2002a.

CHONG, A.S.C.; HASHIM, R.; CHOW-YANG, L.; Ali, A.B. **Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodon aequifasciata*.** *Aquaculture research*, v. 33, n. 9, p. 663, 2002b.

CHONG, K.; YING, T.S.; FOO, J.; JIN, L.T.; CHONG, A. **Characterization of proteins in epidermal mucus of discus fish (*Symphysodon spp.*) during parental phase.** *Aquaculture*. 249, p.469-476. 2005.

CHELLAPPA, S.; CÂMARA, M.R.; VERANI, J.R. **Ovarian development in the Amazonian red discus, *Symphysodon discus* Heckel (Osteichthyes: Cichlidae).** *Brazilian Journal of Biology*. São Carlos SP, v. 65, n. 4, p. 609-616, 2005.

CORRÊA, C.F.; AGUIAR, L.H.; LUNDSTEDT, L.M.; MORAES, G. **Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. v.147, p.857-862. 2007.

FALCÓN-HIDALGO, B.; FORRELLAT-BARRIOS, A.; FARNÉS, O.C.; HERNÁNDEZ, K.U. **Digestive enzymes of two freshwater fishes (*Limia vittata* and *Gambusia punctata*) with different dietary preferences at three developmental stages.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* v.158, p.136-141.2011.

GLASS, H.J.; MCDONALD, N.L.; MORAN, R.M.; STARK, J.R. (1989) **Digestion of protein in different marine species.** *Fish Physiol Biochem B*. v.94, p.607–611.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L.; CASTILLO-YAÑEZ, F.J.; OCAÑO-HIGUERA, V.M.; PEREZ-VELAZQUEZ, M.; COTA-MORENO, V.; LOZANO-TAYLOR, J. **Effect of dietary protein source and time on alkaline proteolytic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. Fish Physiol. Biochem. v.36, p.779–785. 2010.

GUZMAN, C.; GAXIOLA, G.; ROSA, C.; TORRE-BLANCO, A. 2001. **The effect of dietary protein and total energy content on digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae**. Aquacult. Nutr., 7: 113-122.

HIDALGO, M.C.; UREA, E.; SANZ, A. **Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities**. Aquaculture, v.170, n.3-4, p.267-283,1999.

KUZMINA, V.V.; GOLOVANOVA, I.L.; IZVEKOVA, G.I. 1996. **Influence of temperature and season on some characteristics of intestinal mucosa carbohydrases in six freshwater fishes**. Comp. Biochem. Physiol. B 113, 255–260.

LAEMMLI, U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature 227:680–685. doi:10.1038/227680a0

LAN, C.C.; PAN, B.C. **In Vitro digestibility stimulating the proteolysis of feed protein in the midgut of grass shrimps (*Penaeus monodon*)**. Aquaculture. v.10, p.59-70. 1993.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; PEDRON, F.A.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; GIODA, C.R. **Protein sources and digestive enzyme activities in jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Scientia Agrícola, v.67, p.259-266. 2010.

LIN, S.; MAI, K.; TAN, B.; LIU, W. **Effects of Four Vegetable Protein Supplementation on Growth, Digestive Enzyme Activities, and Liver Functions of Juvenile Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus***. Journal of the World Aquaculture Society. v.41, p. 583-593. 2010.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. **The determination of enzyme dissociation constants**. Journal of the American Chemical Society, Washington, v. 56, n. 1, p. 658-666, 1934.

LÓPEZ-VÁSQUEZ, K.; CASTRO-PÉREZ, C.A.; Val, A. L. 2009. **Digestive enzymes of eight Amazonian teleosts with different feeding habits**. Journal of Fish Biology. v.74, p. 1620–1628.

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

- MOHAPATRA, M.; SAHU, N.P.; CHAUDHARI, A. **Utilization of gelatinized carbohydrate in diets in *Labeo rohita* fry.** *Aquaculture Nutrition*. v.9. p.189–196. 2003.
- MOURA, G.S.; OLIVEIRA, A.M.G.; LANNA, E.T.A.; MACIEL JÚNIOR, A.; MACIEL, C.M.R.R. **Desempenho e atividade de amilase em tilápias-do-nilo submetidas a diferentes temperaturas.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.11, p.1609-1615, 2007.
- MOYANO, F.J., Díaz, M., ALARCÓN, F.J.; SARASQUETE, M.C. **Characterization of digestive enzyme during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*).** *Fish Physiology and Biochemistry*. v.15,p.121 -1 30.1996.
- ONAL, U.; ÇELIK, Y.; CIRIK, S. **Histological development of digestive tract in discus, *Symphysodon spp. larvae*.** *Aquaculture Int.* 18, 589-601. 2010.
- PERERA, E.; MOYANO, F.J.; DIAZ, M.; PERDOMO-MORALES, R.; MONTERO-ALEJO, V.; ALONSO, E.; CARRILLO, O.; GALICH, G.S. **Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. v.150, p.247–254. 2008.
- PEREZ-CASANOVA, J.C.; MURRAY, H.M.; GALLANT, J.W.; ROSS, N.W.; DOUGLAS, S.E.; JOHNSON, S.C. **Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*).** *Aquaculture*. v.251, p.377– 401. 2006.
- RANGSIN, W.; AREECHON, N.; YOONPUNDH, R. **Digestive Enzyme Activities During Larval Development of Striped Catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878).** *Kasetsart Journal: Natural Science*. 46, p. 217-228. 2012.
- RIBEIRO, L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; CAHU, C. 1999. **Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858.** *Aquaculture*. v.179, p.465-473.
- SANTOS, J.F.; CASTRO, P.F.; LEAL, A.L.G.; FREITAS Jr., A.C.V.; LEMOS, D.; CARVALHO Jr., L.B.; BEZERRA, R.S. **Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate.** *Aquacult Int.* v.20, p.1-15, 2012.
- SUNDE, J.; EIANE, S.A.; RUSTAD, A.; JENSEN, H.B.; OPSTVEDT, J.; NYGARD, E.; VENTURINI, G.; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. 2004. **Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** *Aquaculture Nutrition* 10: 261-277.
- THONGPRAJUKAEW, K.; KOVITVADHI, U.; KOVITVADHI, S.; SOMSUEB, P.; RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K. **Effects of different modified diets on**

growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Aquaculture*, v.322-323. p. 1–9, 2011.

TONG, X. H.; XU, S.H.; LIU,Q.H.; LI, J.; XIAO, Z.Z.; MA, D. Y. **Digestive enzyme activities of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during early developmental stages under culture condition.** *Fish Physiol Biochem* v.38, p715–724, 2012.

ZAIA, D.A. M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. **Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods.** *QUÍMICA NOVA*, v.21, p.787-793.1998.

WILSON, R.P. **Amino acid requirements of fish.** In: D'MELLO, J.P.F. (Ed). *Amino acids in farm animal nutrition.* Wallingford: CAB International (Centre for Agricultural Bioscience International-UK), 1994.

6. CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA (Tripsina e Quimiotripsina) *IN VITRO* E ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR ELETROFORESE

6.1 Abstract

The aim of this study was to evaluate the activity of the enzyme trypsin and chymotrypsin in the intestine of discus (*Sympysodon sp.*) during the larval and juvenile. The paper presents a set of comparative data of this activity in the gut extract Acará-disc (*Sympysodon sp.*) and was divided into five (05) for ages experimental monitoring of ontogeny and enzyme kinetics being: 25 days after hatching DAE , 35 DAE, 45 DAE, 65 DAE and 90 DAE and was used $n \geq 3$ for all ages. For a better understanding of enzyme kinetics in experimental ages from 45 DAE the intestine was divided into proximal and distal. The total amounts of activity (U) obtained by experimental age were 25 DAE 0.85U, 35 DAE 1.58U, 45 DAE 3.80U, 65 DAE 3.67U and 90 DAE 6.02U for trypsin and 25 DAE 2.02U, 35 DAE 3.99U, 45 DAE 17.01U, 65 DAE 9.54U and 90 DAE 10.06U for chymotrypsin. Checking up on both the activity of digestive enzymes already at 25 DAE and with higher activity occurring in the distal intestine of discus (*Sympysodon sp.*). The electrophoresis showed that 45 DAE can check a differentiation in enzymatic profile of discus between the proximal and distal realizing two groups with different molecular weights and found similarity between activity in vitro and activity in the gel serine proteases (alkaline).

6.2 Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da enzima tripsina e da quimiotripsina no intestino do acará-disco (*Sympysodon sp.*) durante o período de larva e juvenil. O trabalho apresenta um conjunto de dados comparativos desta atividade no extrato de intestino do Acará-disco (*Sympysodon sp.*) e foi dividido em cinco (05) idades experimentais para o acompanhamento da ontogenia e cinética enzimática em períodos de: 25, 35, 45, 65 e 90 dias após eclosão DAE e para cada período foi utilizado um $n \geq 3$ para todas as idades. Para um melhor entendimento da cinética enzimática nas idades experimentais a partir de 45 DAE o intestino foi dividido em proximal e distal. Os valores totais de atividade (U) obtidos por idade experimental foram: 25 DAE 0,85U, 35 DAE 1,58U, 45 DAE 3,80U, 65 DAE 3,67U e 90 DAE 6,02U para a tripsina e

de 25 DAE 2,02U, 35 DAE 3,99U, 45 DAE 17,01U, 65 DAE 9,54U e 90 DAE 10,06U para a quimiotripsina. Verificado-se a atividade em ambas enzimas digestivas já aos 25 DAE e com maiores valores de atividade ocorrendo na porção distal do intestino de acará-disco (*Sympysodon sp.*). A eletroforese demonstrou que aos 45 DAE é possível verificar uma diferenciação no perfil enzimático do acará-disco entre a porção proximal e distal, percebendo-se dois grupos com diferentes pesos moleculares e verificou-se similaridade entre a atividade *in vitro* e a atividade em gel para as serinoproteases (alcalinas).

6.3 Introdução

Diversas enzimas proteolíticas digestivas têm sido isoladas a partir dos órgãos internos do peixe. A capacidade dos peixes de digerir os alimentos depende da presença de um adequado conjunto de enzimas, distribuídas por todo o sistema digestivo. Geralmente, esta distribuição de enzimas e sua atividade no sistema digestivo pode variar conforme o hábito alimentar, tipo de alimentação disponível ou fornecida e morfologia de seu intestino (CORREA, *et al.*, 2007; GONZALEZ-FELIX, *et al.*, 2010).

Segundo Hidalgo *et al.* (1999) e Bezerra *et al.*, (2005) a atividade proteolítica (serinoproteases) é relatada como maiores atividades quando em pH alcalino e diretamente influenciada pela alimentação fornecida, podendo ser induzida pelo maior fornecimento de substratos específicos.

As enzimas digestivas proteolíticas mais importantes são a pepsina, secretada pela mucosa gástrica e as serino proteases: tripsina e quimotripsina, secretadas pelo pâncreas e presentes nos cecos pilóricos e intestino. Proteases ácidas de estômagos de peixes possuem sua melhor atividade entre pH 2,0 e 4,0, ao passo que as proteases digestivas alcalinas, tais como a tripsina e quimiotripsina, são mais ativas entre pH 8,0 e 10,0 (ALI *et al.*, 2010).

Uma adequada digestão e absorção de proteínas de origem vegetal ou animal é fundamental na nutrição de peixes e está diretamente ligada ao processo digestivo das proteases. Estas enzimas têm sido estudadas desde os anos de 1940, mas informações sobre proteases de peixes tropicais de água doce ainda são escassas (GONZALEZ-FELIX, *et al.*, 2010).

Chong, *et al.*, (2002a) sugeriram que um melhor conhecimento da propriedades enzimáticas digestivas das proteases, e das condições

otimizadas para a hidrólise de proteína pelo sistema digestivo em peixes irão permitir uma medição mais precisa da digestibilidade das proteínas fornecidas nas rações. A taxa de digestão e absorção de aminoácidos essenciais durante a proteólise também podem ser determinadas com o conhecimento adequado das atividades funcionais das proteases.

Autores têm relatado uma relação positiva entre a taxa de secreção intestinal de tripsina com coeficientes de digestibilidade das rações fornecidas a peixes. Em salmão chinook, o ganho de peso foi positivamente correlacionado com a capacidade das enzimas digestivas em hidrolisar dietas (CHONG, *et al.*, 2002b).

O conhecimento mais detalhado das mudanças ontogênicas do sistema digestivo que ocorrem durante as fases iniciais da vida de peixes é essencial para um larvicultura mais adequada e otimizada, com estratégias de alimentação mais eficientes e na formulação de dietas secas (RATHORE, *et al.*, 2005; LI, *et al.*, 2006).

Segundo Fong *et al.*, (1998) a quimiotripsina em peixes difere de outros animais e possui uma grande capacidade catalítica, melhorando o desempenho digestivo dos peixes. Além disso uma mesma enzima pode ser diferente de uma espécie para outra, ou até mesmo durante o período de desenvolvimento dos peixes por ter conformação e constituição diferente nos diversos momentos de desenvolvimento.

É importante o conhecimento da eficiência digestiva das espécies cultivadas durante suas fases específicas do desenvolvimento. O objetivo deste estudo foi determinar a atividade enzimática proteolítica intestinal da tripsina e quimiotripsina durante o desenvolvimento inicial do acará-disco, caracterizar e conhecer as classes de enzimas digestivas presentes no tubo digestivo do acará-disco.

6.4 Material e Métodos

A pesquisa foi realizada na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF no Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal CCTA/LZNA em parceria com o Laboratório de Química e Funções de Proteínas e Peptídeos CBB/LQFPP para a produção das larvas e realização

dos experimentos de atividade enzimática e eletroforese. Esta pesquisa foi registrada e aprovada na Comissão de ética de uso de animais (CEUA - UENF) sob nº 180.

6.4.1 Obtenção do material.

As larvas foram produzidas no Setor de Piscicultura do Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal. As matrizes de acará-disco foram mantidas em aquários de 50x50x50cm, e com aproximadamente 60 litros de água, o pH foi monitorado e manteve-se próximo de 6,8. As desovas foram em um tubo de pvc que foi utilizado como substrado e as larvas foram separadas dos pais aos 20 dias pós-eclosão DAE. As matrizes foram alimentadas com ração comercial e alimento vivo artemia (*Artemia salina*) e dáfnias (*Daphnia sp.*)

As idades experimentais testadas foram consecutivamente: 25, 35, 45, 65 e 90 dias após a eclosão. Para efeito de padronização experimental o material biológico utilizado nos experimentos, que consiste de estômago, cecos pilóricos, intestino proximal e intestino distal receberam tratamentos idênticos em todas as repetições de idades.

Para as larvas de 25 e 35 dias pós-eclosão todo o intestino foi utilizado para a extração de enzimas digestivas. Para as idades de 45, 65 e 90 dias pós-eclosão o sistema digestivo foi dividido em intestino proximal e intestino distal, sendo a extração de enzimas digestivas feita de forma separada. Todas as amostras foram identificadas e fotografadas. Os pesos das larvas e juvenis foram anotados após a eutanásia, os pesos do sistema digestivo completo, e depois das partes experimentais separadas em proximal e distal para posterior extração de sobrenadante enzimático.

Para a preparação dos homogeneizados celulares e determinações enzimáticas foi feito a insensibilização das larvas em água gelada até que não se observa-se movimento opercular. A coleta do tubo digestivo das larvas foi em dias pré-determinados conforme a idade da larva. As amostras foram mantidas resfriadas para evitar degradação proteica e perda de atividade enzimática, os tecidos coletados foram homogeneizados em solução tampão (Tris-HCl 50 mM - pH 8,0) na razão de 1:9 (p:v) um (01) µg para nove (09) µL, e EDTA, 0,5M para inibição das metaloproteases.

O homogeneizado celular de todo aparelho digestivo para as idades de 25 e 35 DAE e da porção proximal e distal para as idades de 45, 65 e 90 DAE foram centrifugados a 13.000xg por 15 minutos a 6°C, o sedimento foi descartado e o sobrenadante como fonte enzimática foi armazenado em freezer a -20°C após ser congelado em nitrogênio líquido para realização da quantificação proteica, ensaios enzimáticos e eletroforese. Os sobrenadantes foram utilizados como fonte de enzima, conforme metodologia adaptada de Caraway (1959), Hidalgo *et al.* (1999), Camilo (2007), Moura *et al.* (2007), Santos *et al.* (2012).

6.4.2 Dosagem de proteínas.

A determinação da concentração total de proteínas de acará-disco (*Symphysodon sp.*), foi baseada no método descrito por Bradford (1976) após adaptações. As concentrações foram avaliadas por leitura espectrofotométrica, em comprimento de onda de 595 nm, e com isso foi obtido a concentração de proteína, em $\mu\text{g}/\mu\text{L}^{-1}$ (ZAIA *et al.*, 1998).

O método consiste em utilizar uma curva de calibração inicial para comparação aos valores de proteína das amostras. A curva é determinada através de leitura espectrofotométrica utilizando-se concentrações pré-determinadas de proteína fornecida no kit da Thermo Scientific – Coomassie Plus (Bradford). Após a curva com as concentrações de BSA determinada, e previamente memorizada no Picodrop (espectrofotometro para leitura de amostras com pouco volume de material) as leituras das amostras foram obtidas de forma direta no aparelho. Para a leitura utilizou-se uma amostra de 4 μL do extrato enzimático e obteve-se o valor da concentração proteica total.

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão linear com o auxílio do Originlab data analysis (versão 8.5).

6.4.3 Detecção da atividade enzimática proteolítica da Tripsina e Quimiotripsina de larvas Acará-disco (*Symphysodon sp.*) *in vitro*.

Para a atividade de tripsina e quimotripsina, foram utilizadas as metodologias descritas por HUMMEL (1959). A atividade de tripsina (E.C.3.4.21.4) foi realizada a 26°C com o substrato α -p-toluenesulphonyl-L-arginine methyl ester

hydrochloride (TAME) 1,2mM e determinada em um período de 30 minutos. O extrato enzimático (50µL) foi incubado por 30 minutos em 850µL de Tris100mM/CaCl₂50mM tampão, pH 8,1 e a absorbância foi lida a 247nm.

A atividade da quimotripsina (E.C.3.4.21.1) foi realizada com Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) 1mM a 26°C e determinada em um período de 20 minutos. O extrato enzimático (20µL) foi incubado por 20 minutos em 880µL de Tris100mM/CaCl₂50mM tampão pH 8,1 e a absorbância foi lida a 256nm.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolizar 1µmol de substrato (TAME ou BTEE) por 1 minuto.

Uma unidade de TAME (U) = $(\Delta \text{ABS}) / (0,964 \times 0,050)$ onde:

$(\Delta \text{ABS}) = \text{ABS final} - \text{ABS inicial}$;

0,964 = Coeficiente de extinção do TAME;

0,050 = volume em mL de extrato enzimático

Uma unidade de BTEE (U) = $(\Delta \text{ABS}) / (0,964 \times 0,020)$ onde:

$(\Delta \text{ABS}) = \text{ABS final} - \text{ABS inicial}$;

0,964 = Coeficiente de extinção do BTEE;

0,020 = volume em mL de extrato enzimático

6.4.5 Visualização do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras proteicas extraídas de intestino proximal e intestino distal de acará-disco (*Symphysodon sp.*) foram colocadas em (tampão de amostra - Tris-HCl 0,5M pH 8,0, glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 1%) e visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) na presença de SDS, segundo método descrito por Laemmli (1970); Alvarez-Gonzalez *et al.*, (2010); Falcon-Hidalgo *et al.*, (2011). A estratégia utilizada para visualização da mobilização de proteínas foi a isovolumétrica e isoprotéica sendo aplicada 30µg de proteína para cada divisão do intestino por idade em cada poço. A eletroforese foi realizada em um sistema vertical Mini Protean II da BIORAD. A separação protéica procedeu-se sob uma corrente constante a 80V por 20 minutos e após este período foi de 100 V até o término da corrida do gel.

O gel foi corado com solução de azul brilhante de Coomassie G 2% em água, metanol e ácido acético (6:3:1, v/v/v), e descorado com solução composta de água destilada, metanol e ácido acético na mesma relação de proporcionalidade usada na preparação da solução corante.

O marcador de peso molecular Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder foi usado para nos auxiliar na identificação das massas moleculares das bandas de proteínas para determinação do perfil proteico.

6.4.6 Detecção de atividade proteolítica serínica e sistínica *in gel*

As amostras protéicas do tubo digestivo do acará-disco, por idades experimentais e divisão do intestino foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) na presença de SDS, contendo gelatina em uma concentração de 0,1%, baseado na metodologia descrita primeiramente por Heussen e Dowdle (1980). De uma solução concentrada de gelatina (1%), uma alíquota foi utilizada de forma a alcançar-se uma concentração final de 0,1% de gelatina, na composição do gel. A separação protéica procedeu-se sob uma corrente constante de 100 V. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com Triton X-100 2,5 % duas vezes por 30 minutos cada; logo após, o gel foi incubado em tampão citrato de sódio 100 mM; fosfato de sódio 100 mM; DTT 1,5 mM e Triton X-100 0,1 % pH 5.6 em banho-maria a 37⁰ C durante 16 horas para proteinases sistínicas. Para proteinases serínicas – tripsina incubamos o gel com glicina 100mM pH 8,0. Posteriormente o gel foi corado com Coomassie Brilhante Blue R 2% e então descorado com uma solução de metanol: ácido acético: água (40:10:50, v/ v/ v), respectivamente. As bandas de atividade aparecem brancas em fundo azul.

6.5 Resultados

O trato gastrointestinal do Acará-disco apresenta cinco seções distintas morfológicamente: esôfago, estômago, cecos pilóricos e secções proximal e distal do intestino. Além das diferenciações anatômicas, foram observadas

também variações na concentração total de proteínas e da atividade proteolítica ao longo do trato digestivo.

O peso total e o peso do intestino proximal e distal e os valores da concentração total de proteína, por idade e divisão do intestino, estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Médias de peso do peixe, do intestino, e valores de quantificação de proteína.

Idade	Valores médios						
	Peso do peixe (mg)	Peso total do intestino (mg)	Peso intestino Prox. (mg)	Peso intestino distal (mg)	Valor total de proteína µg/ml	Proteína µg/ml Prox.	Proteína µg/ml Distal
25	180,26	18,24	-	-	471,97	-	-
35	383,48	36,63	-	-	784,04	-	-
45	757,07	85,33	40,97	44,37	1270,03	733,46	536,57
65	1025,03	93,93	44,36	49,56	1461,14	861,95	599,19
90	2060,28	123,67	61,46	62,22	1548,53	914,44	634,08

6.5.1 Atividade da Quimiotripsina

Os valores das médias da variação das absorvâncias (Δ ABS) de peixes de 25 DAE são apresentados nas tabela 2 na figura 1. O Valor médio final das variações da ABS em 3 peixes de 25 DAE foi de 0,039.

Tabela 2. Valores de ABS para 25 DAE observados durante o período experimental.

Tempo (min)	BTEE 1mM		
	Peixe 25d	Peixe 26d	Peixe 26d
1	0,051	0,111	0,149
3	0,081	0,136	0,179
5	0,123	0,149	0,243
7	0,148	0,158	0,258
10	0,161	0,198	0,301
12	0,188	0,225	0,325
15	0,274	0,344	0,341
17	0,169	0,220	0,473
20	0,192	0,213	0,492
Δ Médio	0,035	0,039	0,043

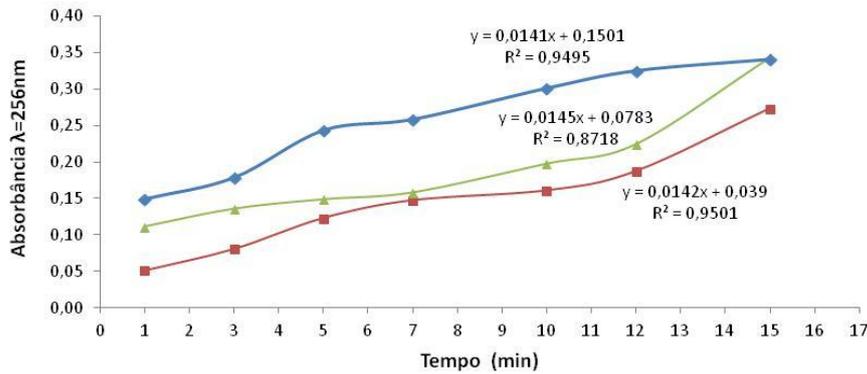


Figura 1. Gráfico da atividade enzimática quimi tripsina (1mMBTEE) ABS x tempo, e valores de R^2 em peixes de 25 DAE.

Os valores das médias da variação das absorbâncias (ΔABS) do intestino peixes de 35 DAE são apresentados na tabela 3 e na figura 2 (A) e (B). O Valor médio final das variações da ABS em 3 peixes de 35 DAE foi de 0,091.

Tabela 3. Valores de ABS para 35 DAE observados durante o periodo experimental.

Tempo (min)	BTEE 1mM		
	Peixe 37d	Peixe 35d	Peixe 35d
1	0,102	0,222	0,425
3	0,161	0,271	0,476
5	0,246	0,267	0,649
7	0,295	0,316	0,689
10	0,322	0,395	0,803
12	0,375	0,499	0,867
15	0,547	0,687	0,909
17	0,738	0,739	1,161
20	0,555	0,826	1,191
Δ Médio	0,091	0,087	0,096

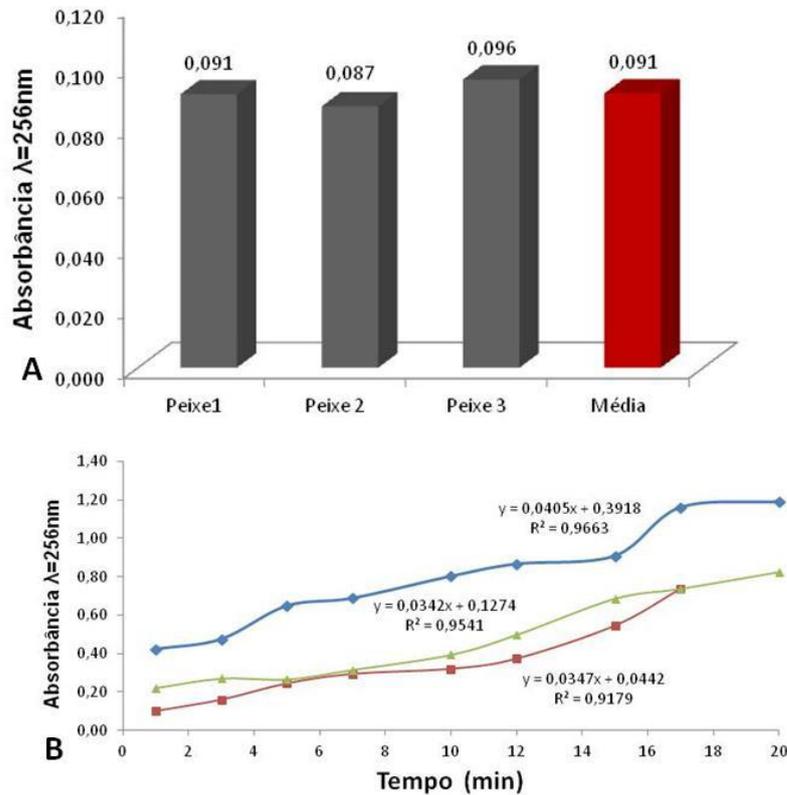


Figura 2. Médias das variações da absorbância ABS (A). Gráfico da atividade enzimática quimi tripsina (1mM BTEE) ABS x tempo (B), e valores de R^2 em peixes de 35 DAE.

Os valores das médias da variação das absorbâncias do intestino proximal e distal de peixes de 45 DAE são apresentados na tab. 4 e na fig. 3 (A) e (B). O Valor médio final das variações da ABS em 4 peixes de 45 DAE foi de 0,131 para o intestino proximal e de 0,197 para o intestino distal.

Tabela 4. Valores de ABS para 45 DAE observados durante o periodo experimental para intestino proximal e distal de acará-disco.

Tempo (min)	BTEE 1mM							
	45d Prox.	45d Distal						
1	0,461	0,514	0,427	0,671	0,202	0,248	0,567	0,632
3	0,516	0,864	0,444	0,985	0,344	0,423	0,635	1,063
5	0,598	0,960	0,561	1,058	0,380	0,467	0,736	1,181
7	0,655	1,171	0,930	1,328	0,416	0,512	0,806	1,440
10	0,675	1,235	1,045	1,411	0,460	0,566	0,830	1,519
12	0,780	1,497	1,406	1,480	0,693	0,852	0,959	1,841
15	0,783	1,875	1,967	1,626	0,887	1,091	0,963	2,306
17	0,934	1,886		1,710			1,149	2,320
20	1,012	2,271		1,931			1,245	2,793
Δ								
Médio	0,069	0,220	0,257	0,158	0,114	0,140	0,085	0,170

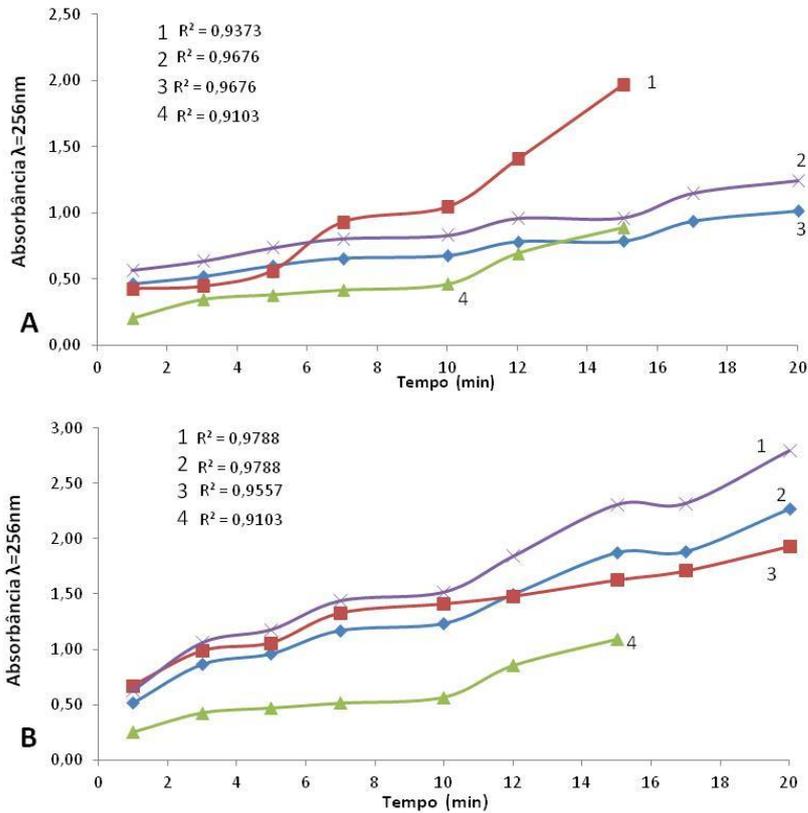


Figura 3. Gráfico da atividade enzimática quimi tripsina (1mM BTEE) ABS x tempo em peixes de 45 DAE. Os valores de R^2 para o intestino proximal e de para o intestino distal.

Os valores das variações das absorbâncias e médias das variações para intestino proximal e distal de peixes de 65 DAE são apresentados na tab. 5.

A fig. 4 e fig. 5 representa respectivamente, as médias das variações da absorbância (Δ ABS) e os valores apresentados na tab. 5 para intestino proximal. O Valor médio final das variações da ABS em 4 peixes de 65 DAE foi de 0,083 para o intestino proximal e de 0,101 para o intestino distal.

Tabela 5. Valores de ABS para 65 DAE observados durante o período experimental para intestino proximal e distal de acará-disco.

Tempo (min)	BTEE 1mM					
	67d Prox.	67d Distal	65d Prox.	65d Distal	65d Prox.	65d Distal
1	0,168	0,267	0,324	0,421	0,457	0,489
3	0,271	0,315	0,353	0,535	0,592	0,697
5	0,525	0,328	0,427	0,546	0,622	0,727
7	0,536	0,419	0,478	0,583	0,740	0,845
10	0,565	0,498	0,503	0,687	0,763	0,897
12	0,623	0,588	0,585	0,791	0,798	0,985
15	0,627	0,602	0,698	0,847	0,812	0,987
17	0,649	0,821	0,819	0,878	0,937	1,089
20	0,957	1,480	0,967	0,930	1,028	1,186
Δ Médio	0,099	0,152	0,080	0,064	0,071	0,087

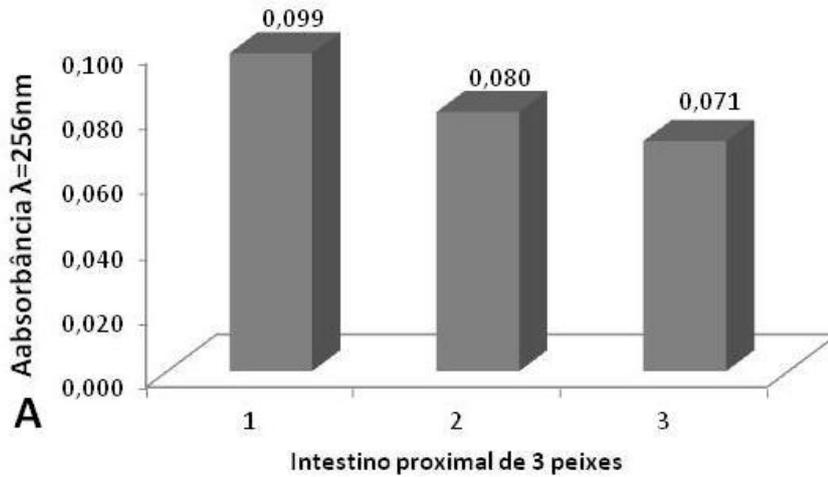


Figura 4. Médias das variações da absorvância ABS 65 DAE intestino proximal.

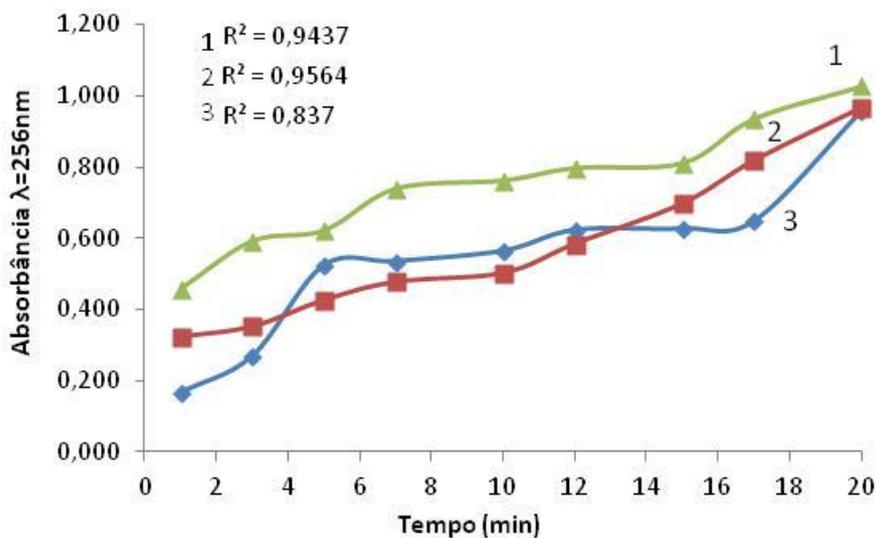


Figura 5. Gráfico da atividade enzimática quimiotripsina (1mM BTEE) ABS x tempo em peixes de 65 DAE. Os valores de R^2 para o intestino proximal.

As fig. 6 e fig. 7 representam respectivamente, as médias das variações da absorvância (ΔABS) e os valores apresentados na tab. 5 para intestino distal.

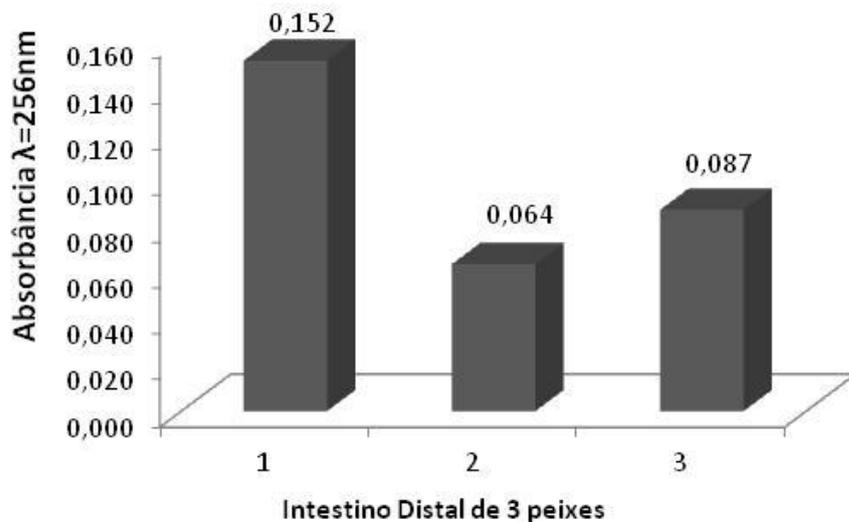


Figura 6. Médias das variações da absorbância ABS 65 DAE intestino distal.

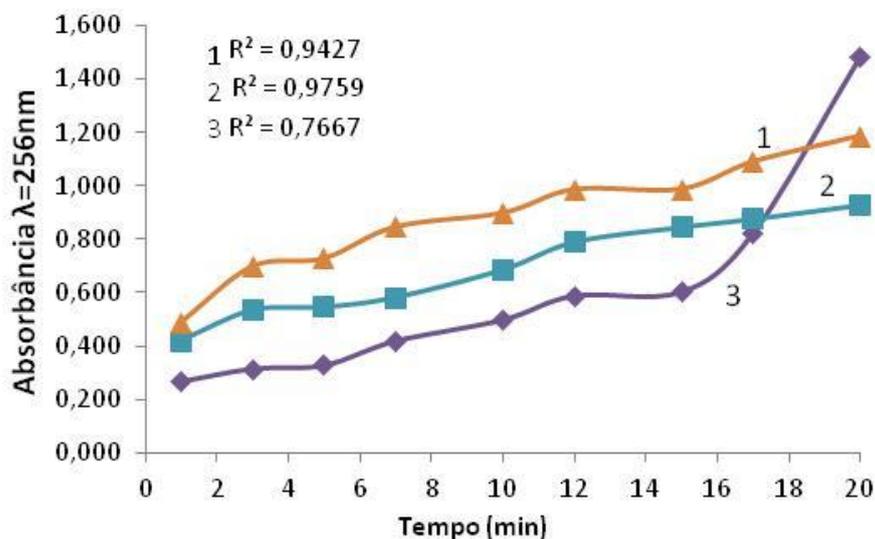


Figura 7. Gráfico da atividade enzimática quimiotripsina (1mM BTEE) ABS x tempo em peixes de 65 DAE. Os valores de R^2 para o intestino distal.

Os valores das variações das absorbâncias e médias das variações para intestino proximal e distal de peixes de 90 DAE são apresentados na tab. 6.

As fig. 8 e fig. 9 representam respectivamente, as médias das variações da absorbância (ΔABS) e os valores apresentados na tab. 6 para intestino proximal. O Valor médio final das variações da ABS em 4 peixes de 65 DAE foi de 0,095 para o intestino proximal e de 0,108 para o intestino distal.

Tabela 6. Valores de ABS para 90 DAE observados durante o período experimental para intestino proximal e distal de acará-disco.

Tempo (min)	BTEE 1mM					
	90d Prox.	90d Distal	90d Prox.	90d Distal	90d Prox.	90d Distal
1	0,444	0,467	0,701	0,930	0,711	1,146
3	0,637	0,544	0,800	0,973	0,778	1,236
5	0,694	0,646	0,906	1,009	0,794	1,241
7	0,832	0,708	1,054	1,054	0,842	1,339
10	0,899	0,783	1,100	1,252	1,001	1,540
12	0,989	0,878	1,182	1,286	1,013	1,633
15	1,098	0,958	1,337	1,576	1,187	1,938
17	1,195	1,176	1,365	1,512	1,296	1,992
20	0,948	1,224	1,202	1,467	1,155	1,863
Δ Médio	0,107	0,095	0,095	0,108	0,084	0,121

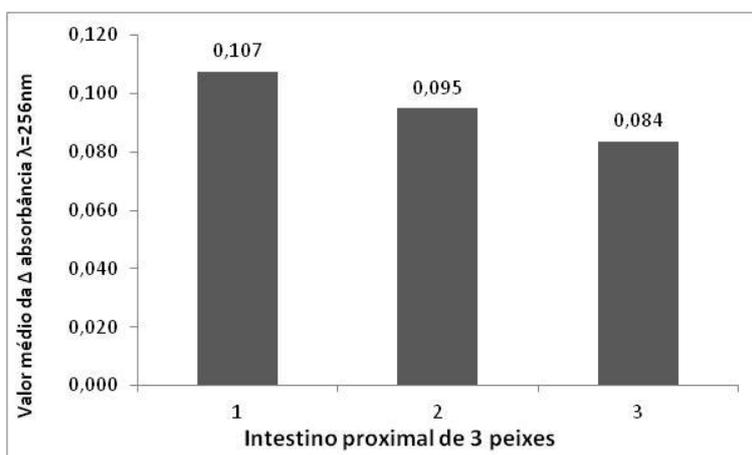
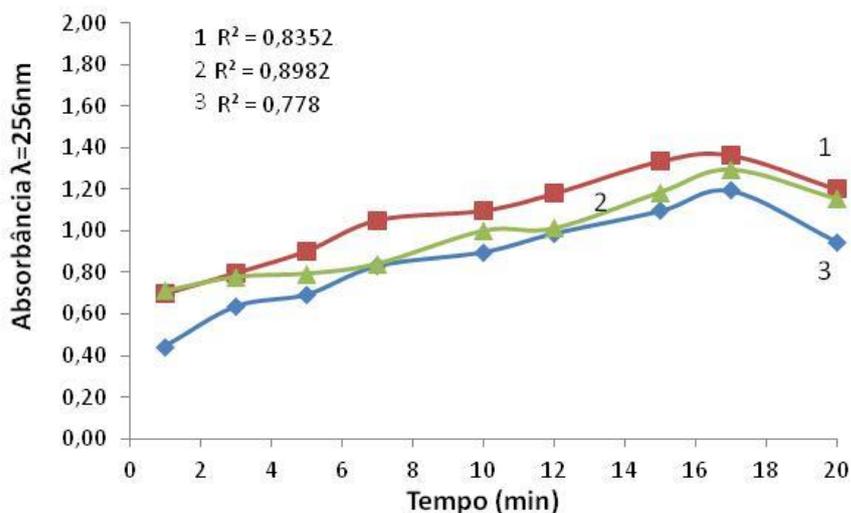


Figura 8. Médias das variações da absorbância ABS 90 DAE intestino proximal.

Figura 9. Gráfico da atividade enzimática quimi tripsina (1mM BTEE) ABS x tempo em peixes de 90 DAE. Os valores de R^2 para o intestino proximal.

As fig. 10 e fig. 11 representam respectivamente, as médias das variações da absorbância (Δ ABS) e os valores apresentados na tab. 6 para intestino distal.

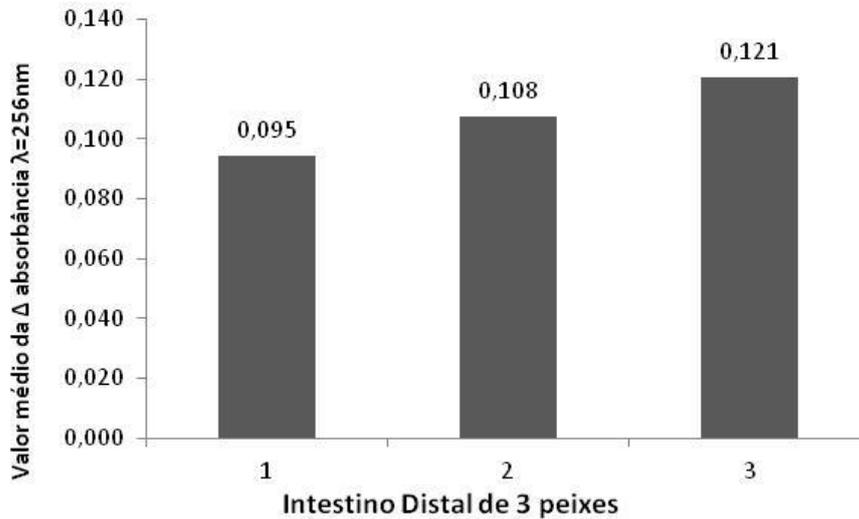


Figura 10. Médias das variações da absorbância ABS 90 DAE intestino distal.

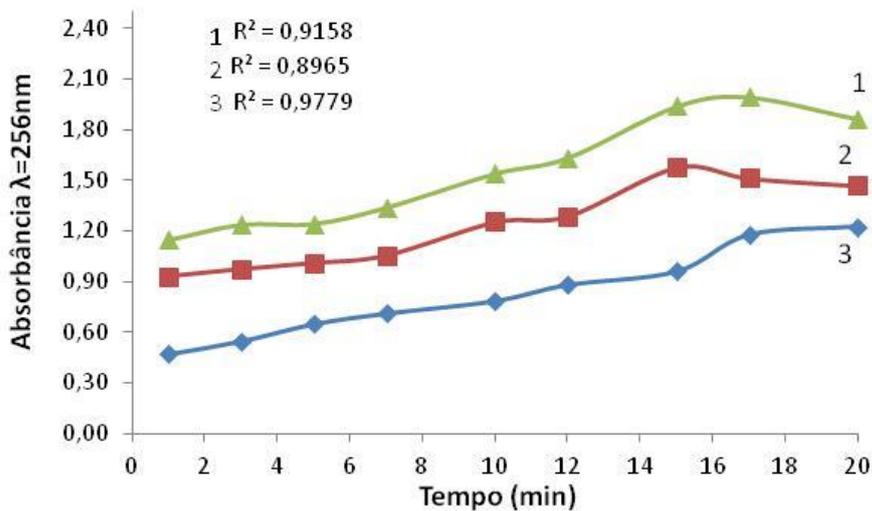


Figura 11. Gráfico da atividade enzimática quimi tripsina (1mM BTEE) ABS x tempo em peixes de 90 DAE. Os valores de R^2 para o intestino distal.

Os valores das médias da absorbância (Δ ABS) ($\lambda=256\text{nm}$) por idade e divisão do intestino estão agrupados na tab. 7 e são demonstrados

graficamente na fig. 12, estes valores serão utilizados no cálculo da atividade da quimi tripsina em acará-disco.

Tabela 7. Valores médios de Δ ABS utilizando BTEE 1mM.

Idade/Porção intestinal	Valor médio Δ ABS 256nm	U(μ mol/min)
25 dias	0,039	2,023
35 dias	0,091	3,994
45 dias prox.	0,131	6,795
45 dias distal	0,197	10,218
65 dias prox.	0,083	4,305
65 dias distal	0,101	5,239
90 dias prox.	0,095	4,824
90 dias prox.	0,108	5,239

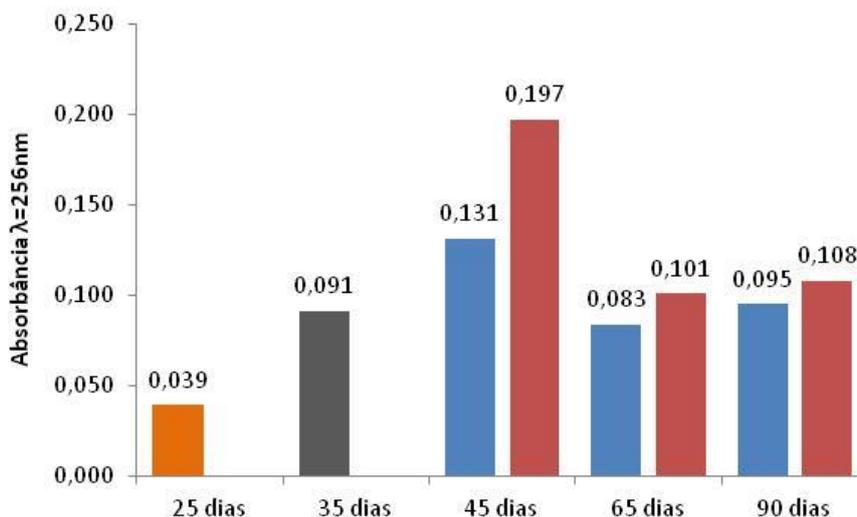


Figura 12. Valores médios da Δ ABS nas 5 idades e divisões experimentais.

Os valores calculados para a atividade da quimi tripsina do acará-disco (*Sympy sodon sp.*) por idade e divisão do intestino, a 26°C e com 1nM de BTEE nos experimento *in vitro* são demonstrados na fig. 13.

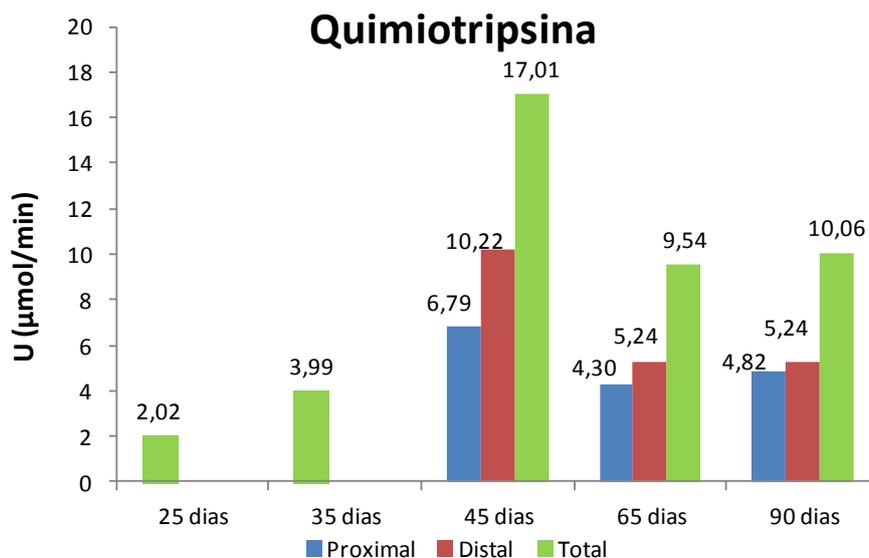


Figura 13. Valores da atividade de quimiotripsina em U($\mu\text{mol}/\text{min}$) para as 5 idades e divisões experimentais do acará-disco.

6.5.2 Atividade da Tripsina

Os valores das médias da variação das absorbâncias (ΔABS) de peixes de 25 DAE são apresentados nas tab. 8 na fig. 14. e fig 15. O valor médio final das variações da ABS em 3 peixes de 25 DAE foi de 0,041.

Tabela 8. Valores de ABS para 25 DAE observados durante o período experimental.

Tempo (min)	TAME 1mM		
	Peixe 25d	Peixe 26d	Peixe 25d
3	0,630	0,675	0,717
5	0,646	0,717	0,730
7	0,692	0,727	0,765
10	0,779	0,818	0,861
12	0,828	0,870	0,916
15	0,861	0,877	0,943
17	0,871	0,889	0,987
20	0,915	0,904	1,014
22	0,964	1,013	1,066
25	1,002	1,053	1,108
27	1,088	1,089	1,135
30	1,101	1,117	1,152
Δ Médio	0,043	0,040	0,040

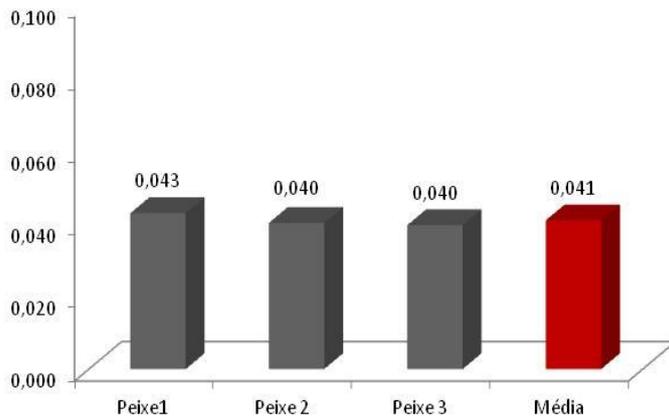


Figura 14. Médias das variações da absorbância ABS 25 DAE.

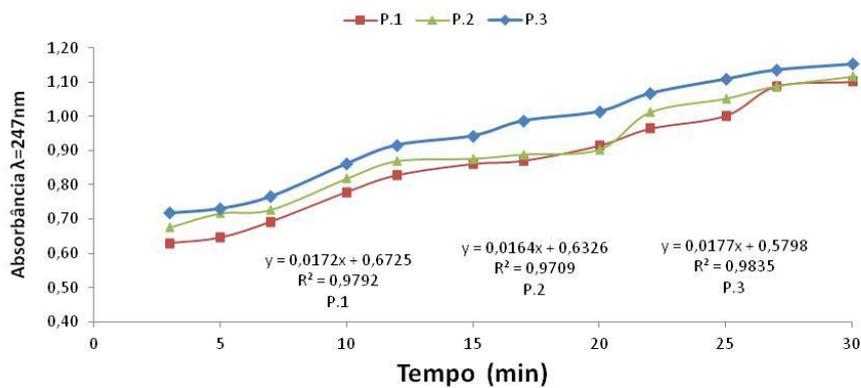


Figura 15. Gráfico da atividade enzimática tripsina (1mM TAME) ABS x tempo, e valores de R^2 em peixes de 25 DAE.

Os valores das médias da variação das absorbâncias (Δ ABS) de peixes de 35 DAE são apresentados nas tab. 9 nas fig. 16. e fig 17. O Valor médio final das variações da ABS em 3 peixes de 35 DAE foi de 0,076.

Tabela 9. Valores de ABS para 35 DAE observados durante o período experimental.

Tempo (min)	TAME 1mM		
	Peixe 37d	Peixe 35d	Peixe 35d
3	0,802	0,860	0,913
5	0,797	0,913	0,930
7	0,882	0,926	0,975
10	0,992	1,042	1,097
12	1,055	1,108	1,167
15	1,097	1,152	1,201
17	1,109	1,133	1,257
20	1,165	1,151	1,248
22	1,228	1,290	1,358
25	1,277	1,341	1,412
27	1,386	1,456	1,533
30	1,530	1,607	1,692
Δ Médio	0,073	0,077	0,079

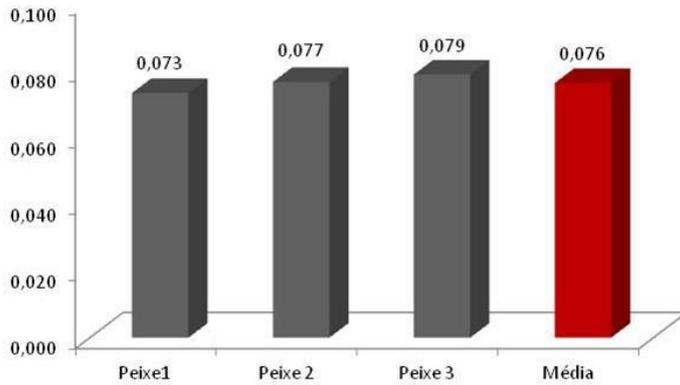


Figura 16. Médias das variações da absorbância ABS 35 DAE.

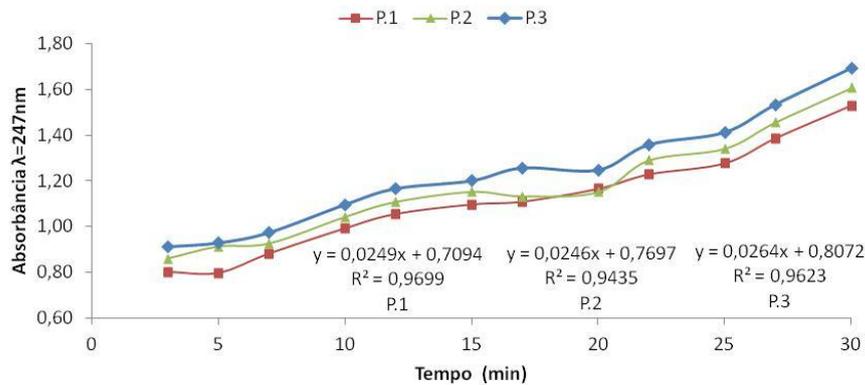


Figura 17. Gráfico da atividade enzimática tripsina (1mM TAME) ABS x tempo, e valores de R^2 em peixes de 35 DAE.

Os valores das variações das absorbâncias e médias das variações para intestino proximal e distal de peixes de 45 DAE são apresentados na tab. 10.

Tabela 10. Valores de ABS para 45 DAE observados durante o período experimental para intestino proximal e distal.

Tempo (min)	TAME 1mM					
	45d Prox.	45d Distal	45d Prox.	45d Distal	45d Prox.	45d Distal
3	0,455	0,608	0,631	0,529	0,543	0,526
5	0,712	0,955	0,832	0,697	0,849	0,842
7	0,759	0,990	0,925	0,775	0,934	0,872
10	0,782	1,118	0,990	0,830	0,933	0,986
12	0,815	1,154	1,059	0,888	0,973	1,017
15	0,842	1,218	1,142	0,957	1,004	1,073
17	0,946	1,270	1,124	0,942	1,128	1,119
20	0,984	1,321	1,284	1,076	1,174	1,164
22	1,003	1,347	1,352	1,133	1,197	1,187
25	1,150	1,544	1,371	1,191	1,272	1,361
27	1,137	1,565	1,444	1,210	1,332	1,391
30	1,298			1,437	1,463	1,498
Δ Médio	0,086	0,096	0,095	0,092	0,092	0,088

As fig. 18 e fig. 19 representam respectivamente, as médias das variações da absorbância (Δ ABS) e os valores apresentados na tab. 10 para intestino proximal. O Valor médio final das variações da ABS em 3 peixes de 45 DAE foi de 0,091 para o intestino proximal e de 0,92 para o intestino distal.

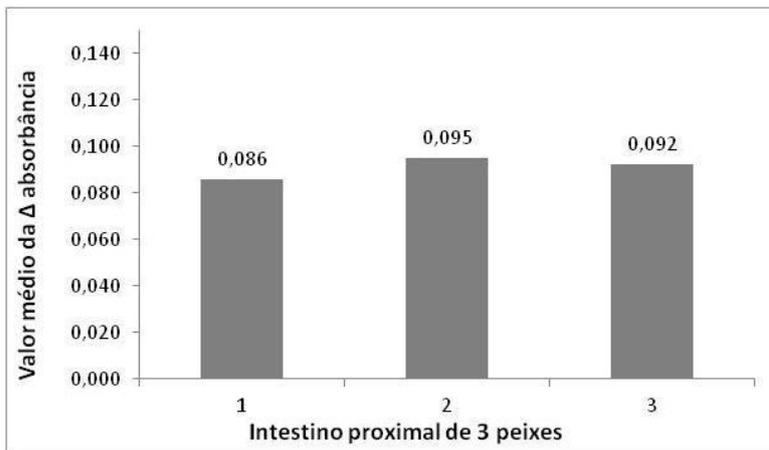


Figura 18. Médias das variações da absorbância ABS 45 DAE intestino proximal.

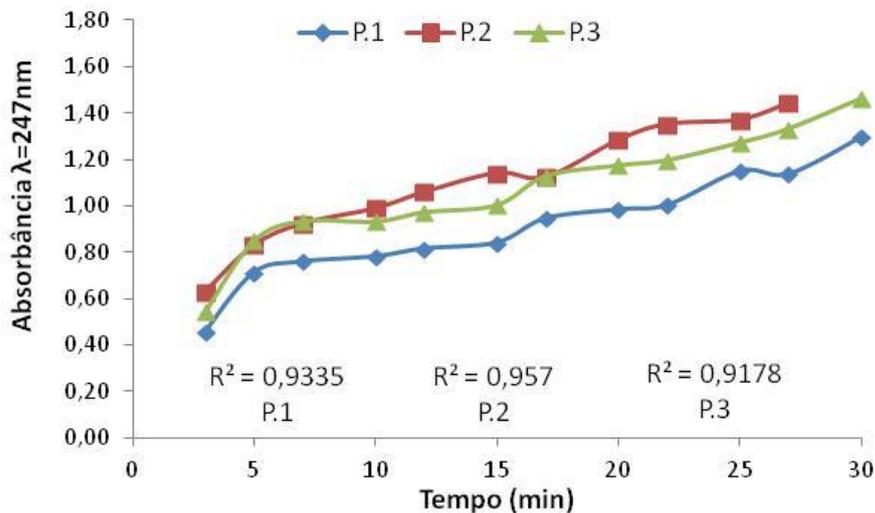


Figura 19. Gráfico da atividade enzimática tripsina (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 45 DAE. Os valores de R^2 para o intestino proximal.

As fig. 20 e fig. 21 representam respectivamente, as médias das variações da absorbância (Δ ABS) e os valores apresentados na tab. 10 para intestino distal.

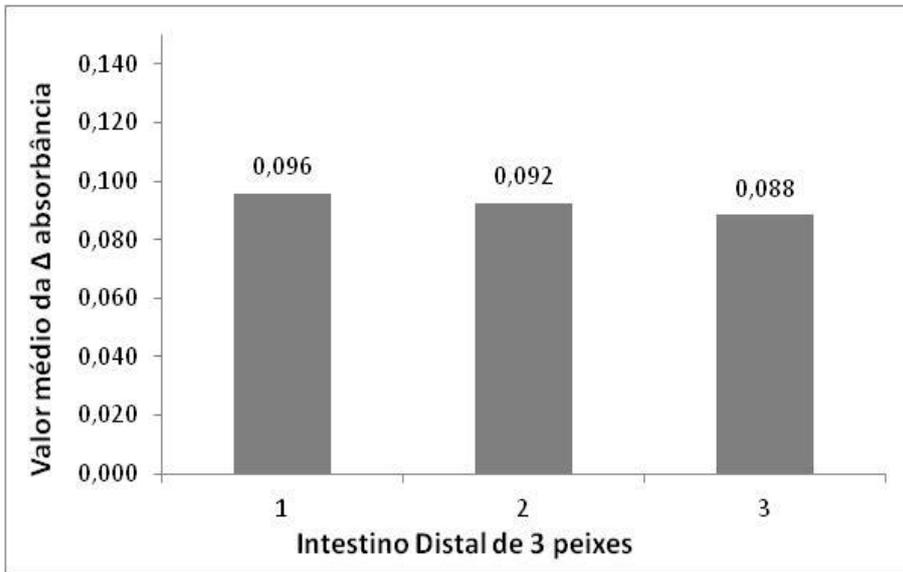


Figura 20. Médias das variações da absorbância ABS 45 DAE intestino distal.

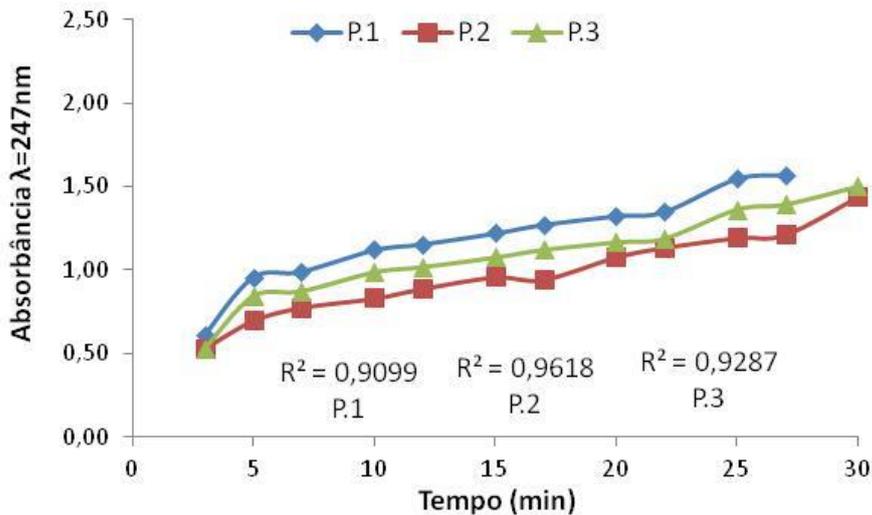


Figura 21. Gráfico da atividade enzimática tripsina (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 45 DAE. Os valores de R^2 para o intestino distal.

Os valores das variações das absorbâncias e médias das variações para intestino proximal e distal de peixes de 65 dias DAE são apresentados na tab. 11.

As fig. 22 e fig. 23 representam respectivamente, as médias das variações da absorbância (Δ ABS) e os valores apresentados na tab. 11 para intestino proximal. O Valor médio final das variações da ABS em 3 peixes de 65 DAE foi de 0,091 para o intestino proximal e de 0,92 para o intestino distal.

Tabela 11. Valores de ABS aos 65 DAE observados durante o período experimental para intestino proximal e distal.

Tempo (min)	TAME 1mM					
	65d Prox.	65d Distal	65d Prox.	65d Distal	65d Prox.	65d Distal
3	0,426	0,542	0,502	0,690	0,395	0,526
5	0,669	0,852	0,785	1,084	0,620	0,826
7	0,643	0,893	0,837	1,123	0,696	0,832
10	0,783	0,956	0,862	1,269	0,726	0,911
12	0,712	0,997	0,899	1,309	0,735	0,967
15	0,791	1,007	0,928	1,382	0,784	0,977
17	0,889	1,132	1,043	1,441	0,824	1,098
20	0,925	1,178	1,085	1,499	0,857	1,142
22	0,943	1,200	1,106	1,528	0,874	1,164
25	1,081	1,376	1,268	1,752	1,002	1,335
27	1,089	1,386	1,254	1,765	1,126	1,345
30			1,398		1,203	
Δ Médio	0,095	0,084	0,091	0,107	0,073	0,082

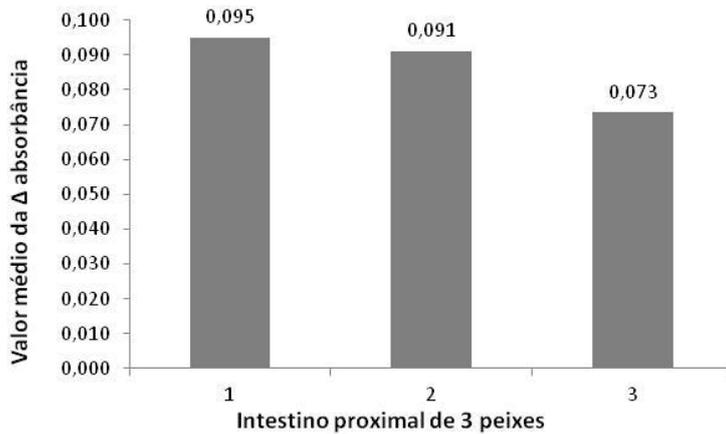
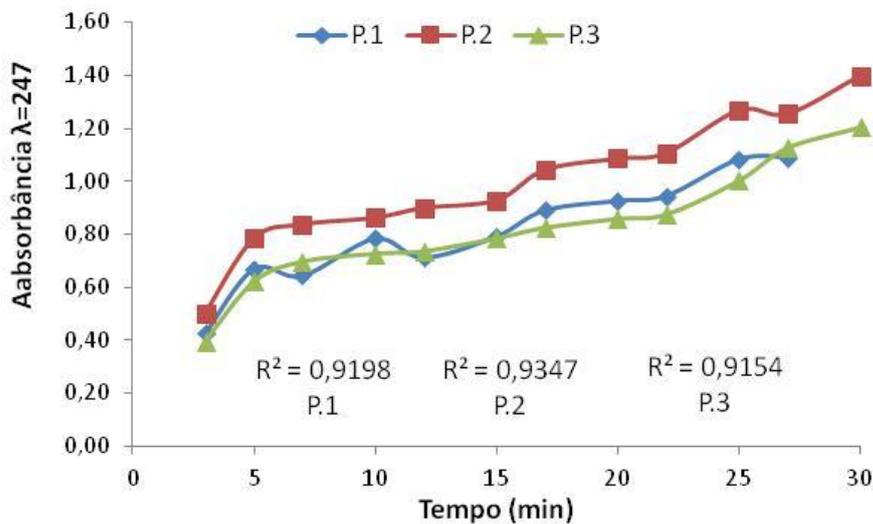


Figura 22. Médias das variações da absorbância ABS 65 DAE intestino proximal.

Figura 23. Gráfico da atividade enzimática tripsina (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 65 DAE. Os valores de R^2 para o intestino proximal.

As fig. 2 e fig. 25 representam respectivamente, as médias das variações da absorbância (Δ ABS) e os valores apresentados na tab. 11 para intestino distal.

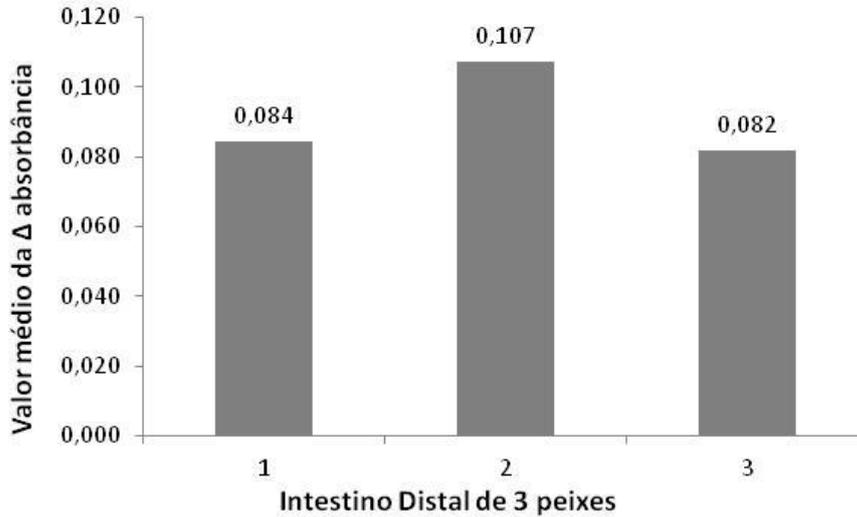


Figura 24. Médias das variações da absorbância ABS 65 DAE intestino distal.

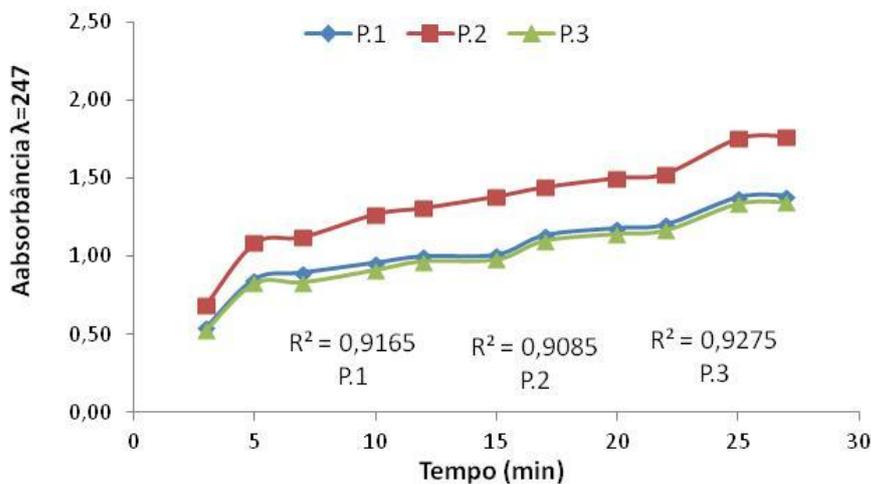


Figura 25. Gráfico da atividade enzimática tripsina (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 65 DAE. E valores de R^2 para o intestino proximal.

Os valores das variações das absorbâncias e médias das variações para intestino proximal e distal de peixes de 90 DAE são apresentados na tab. 12.

As fig. 26 e fig. 27 representam respectivamente, as médias das variações da absorbância (Δ ABS) e os valores apresentados na tab. 12 para intestino proximal. O valor médio final das variações da ABS em 3 peixes de 90 DAE foi de 0,128 para o intestino proximal e de 0,146 para o intestino distal.

Tabela 12. Valores de ABS aos 90 DAE observados durante o período experimental para intestino proximal e distal.

Tempo (min)	TAME 1mM					
	90d Prox.	90d Distal	90d Prox.	90d Distal	90d Prox.	90d Distal
1	0,973	0,431				
3	1,070	0,529	0,847	0,951	0,779	1,084
5	1,138	0,725	1,061	1,035	0,976	1,180
7	1,134	0,782	0,853	1,198	0,785	1,366
10	1,396	0,568	0,870	1,542	0,800	1,758
12	1,451	0,591	0,925	1,579	0,851	1,800
15	1,341	0,790	0,987	1,609	0,908	1,834
17	1,301	0,806	0,992	1,390	0,913	1,585
20	1,668	0,886	1,188	1,617	1,093	1,843
22	1,269	0,876	1,280	1,764	1,178	2,011
25	1,478	1,263	1,328	1,775	1,222	2,024
27	1,492	1,497	1,675	1,975	1,541	2,252
30	1,716					
Δ Médio	0,162	0,143	0,115	0,138	0,106	0,157

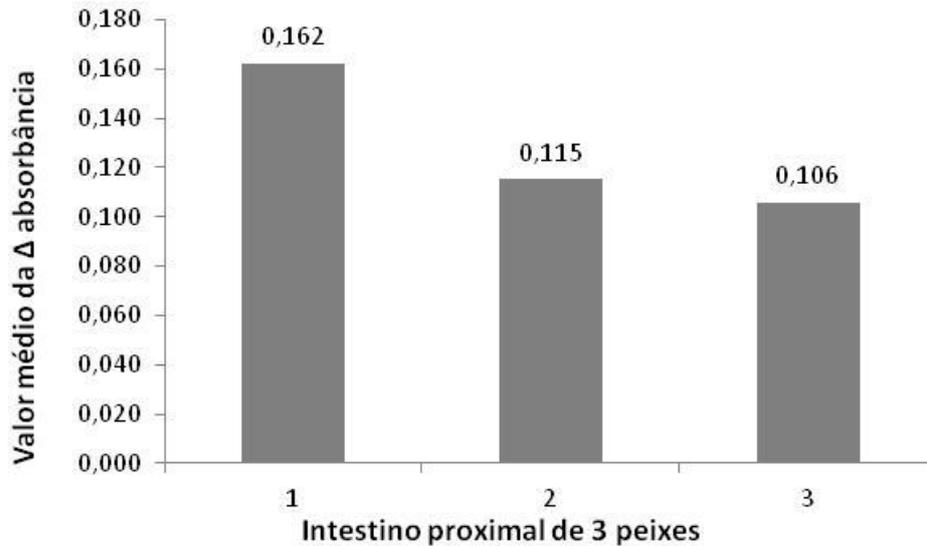


Figura 26. Médias das variações da absorbância ABS 90 DAE intestino proximal.

As fig. 28 e fig. 29 representam respectivamente, as médias das variações da absorbância (Δ ABS) e os valores apresentados na tab. 12 para intestino distal.

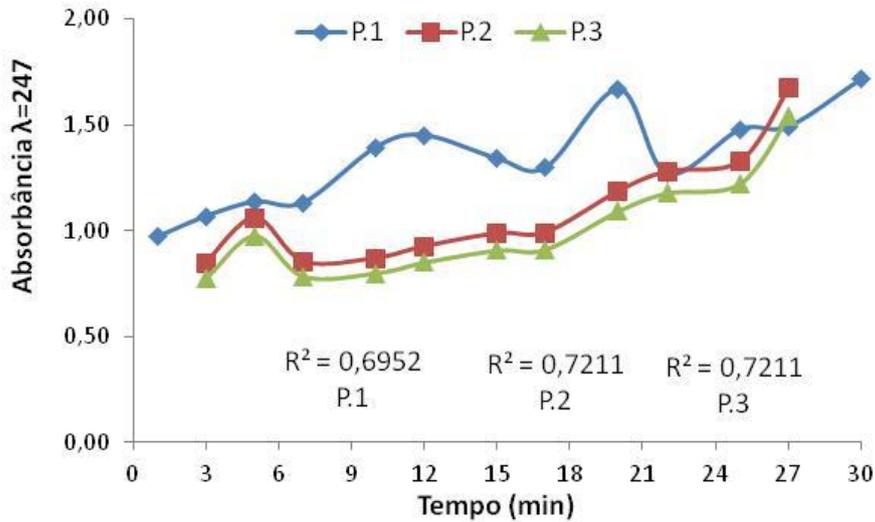


Figura 27. Gráfico da atividade enzimática tripsina (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 90 DAE. Os valores de R^2 para o intestino proximal.

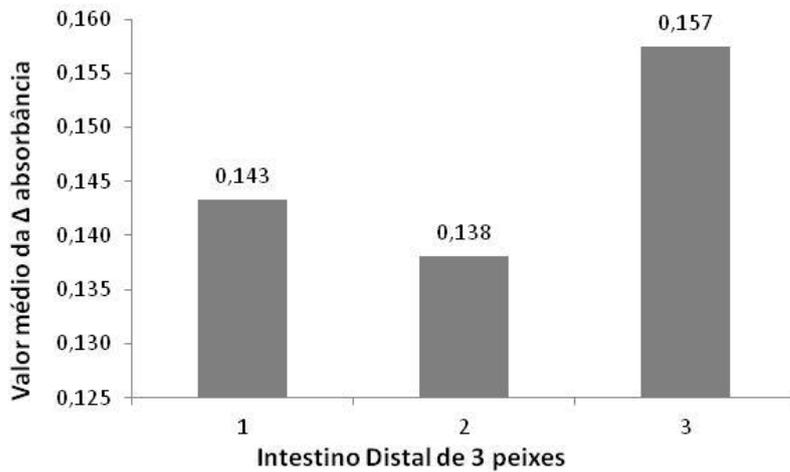


Figura 28. Médias das variações da absorbância ABS 90 DAE intestino proximal.

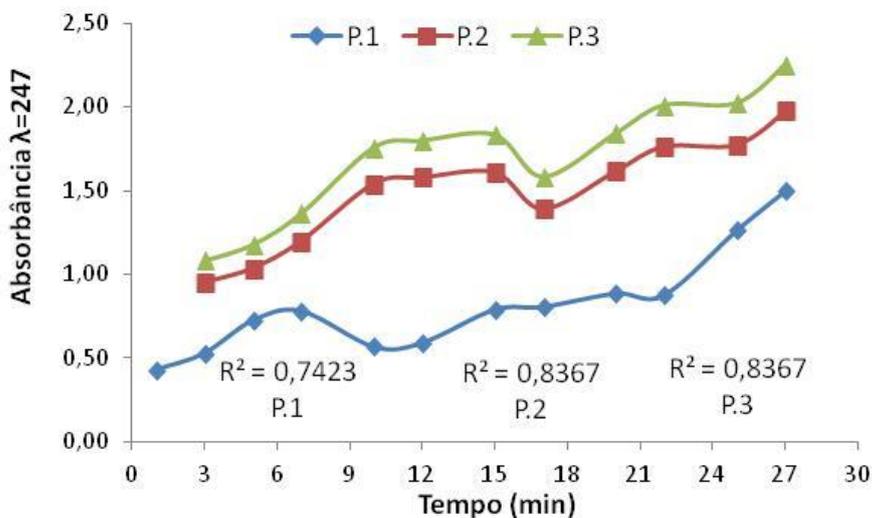


Figura 29. Gráfico da atividade enzimática tripsina (1mM TAME) ABS x tempo em peixes de 90 DAE. Os valores de R^2 para o intestino proximal.

Os valores das médias da absorbância (Δ ABS) ($\lambda=247\text{nm}$) por idade e divisão do intestino estão agrupados na tab. 13 e são demonstrados graficamente na fig. 30, estes valores serão utilizados no cálculo da atividade da tripsina em acará-disco.

Tabela 13. Valores médios de Δ ABS utilizando TAME 1mM e atividade em U por idade e divisão experimental.

Idade/Porção intestinal	Valor Δ médio ABS 247nm	U($\mu\text{mol}/\text{min}$)
25 dias	0,041	0,851
35 dias	0,076	1,577
45 dias prox.	0,091	1,888
45 dias distal	0,092	1,909
65 dias prox.	0,086	1,784
65 dias distal	0,091	1,889
90 dias prox.	0,128	2,987
90 dias prox.	0,146	3,029

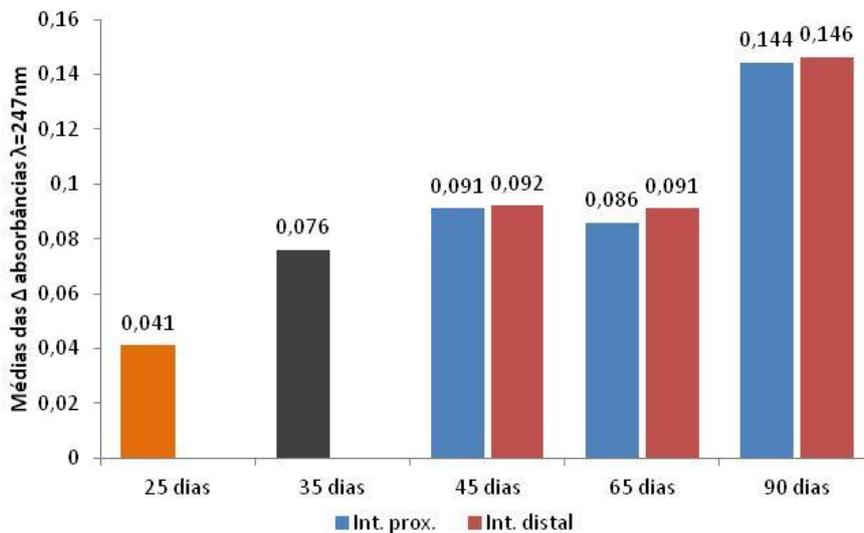


Figura 30. Valores médios da Δ ABS nas 5 idades e divisões experimentais.

Os valores calculados para a atividade da tripsina do acará-disco (*Sympysodon sp.*) por idade e divisão do intestino, a 26°C e com 1mM de TAME nos experimentos *in vitro* são demonstrados na fig. 31.

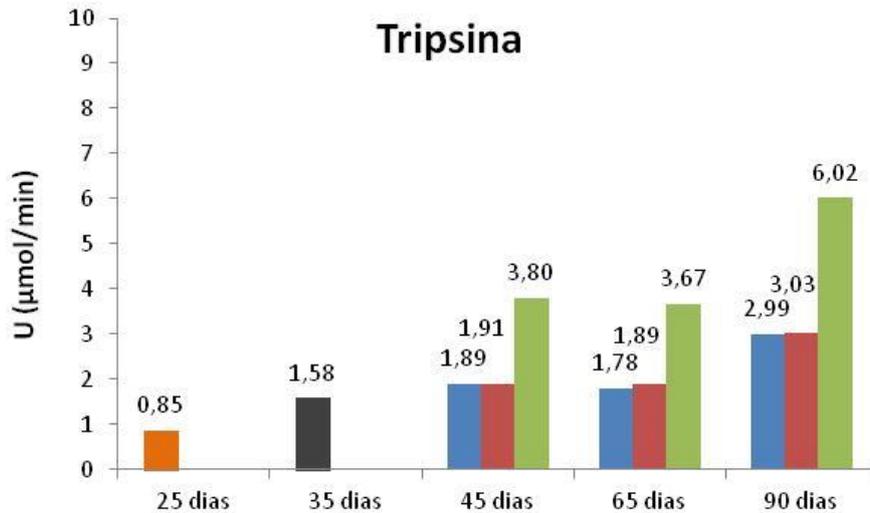


Figura 31. Valores da atividade de tripsina em U($\mu\text{mol}/\text{min}$) para as 5 idades e divisões experimentais do acará-disco.

A fig. 32 demonstra a atividade das proteases alcalinas intestinais, as serinoproteases: quimiotripsina e tripsina, em gel SDS-PAGE durante os primeiros 90 dias após-eclosão do acará-disco. Os valores de M correspondem ao marcador molecular de baixo peso padrão (Thermo Scientific: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder).

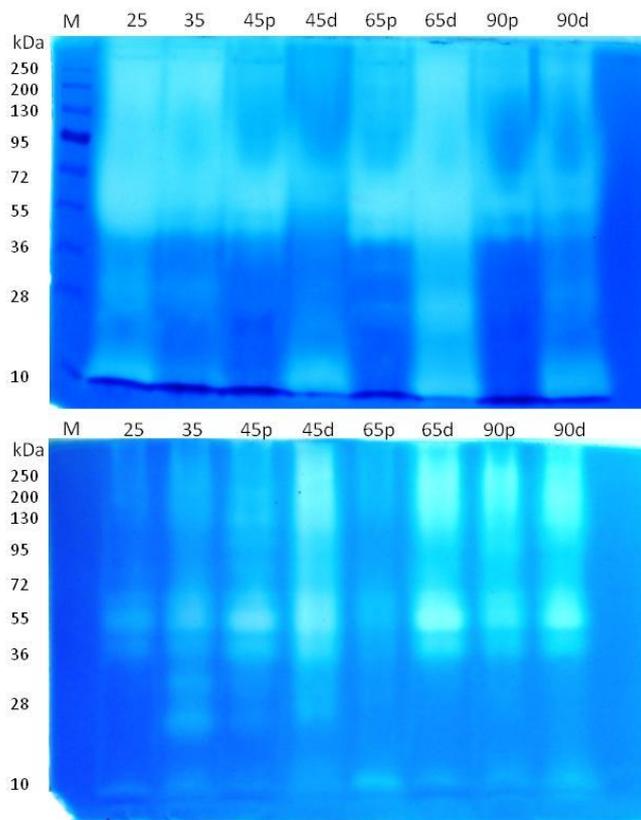


Figura 32: Gel de atividade de proteases serínicas pH 8,0 para tripsina e quimiotripsina.

A fig. 33 demonstra a atividade das proteases ácidas sendo a pepsina em geral a mais importante e ativa, em gel SDS-PAGE durante os primeiros 90 dias após-eclosão do acará-disco. Os valores de M correspondem ao marcador molecular de baixo peso padrão (Thermo Scientific: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder).

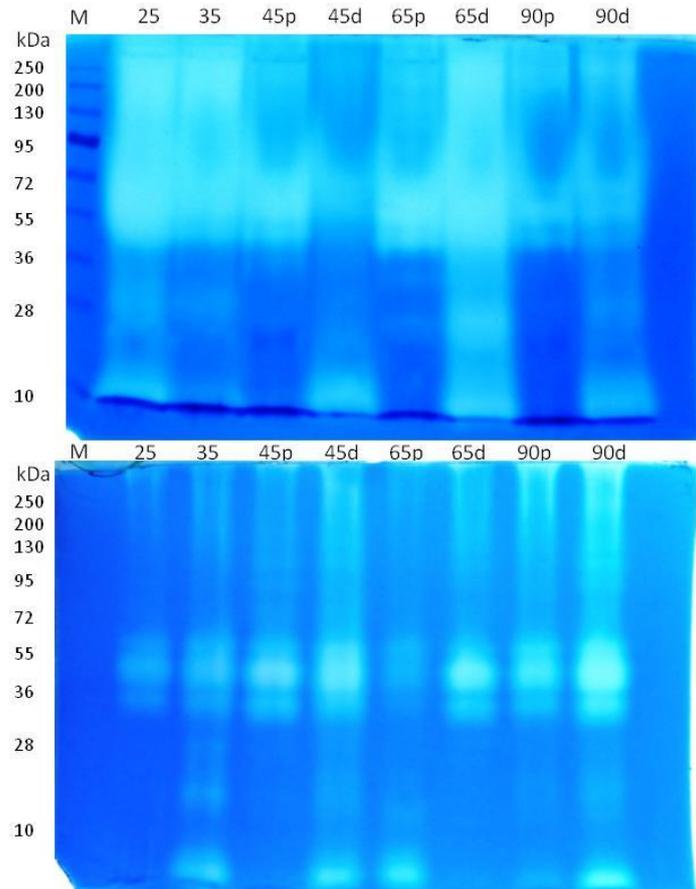


Figura 33: Gel de atividade de proteases cisteínicas ou proteases ácidas pH 4,0 (pepsina).

6.6 Discussão

Proteases digestivas são fundamentais para os peixes, uma vez que a proteína é o nutriente dietético mais importante. As proteases são relatadas no intestino de várias espécies de peixes e em geral estão bem adaptadas para o pH neutro a alcalino do intestino. Proteases ácidas estão presentes em todo o intestino dos peixes. As proteases alcalinas, tripsina e quimiotripsina, são geralmente restritas a algumas seções anatômicas dos peixes. No acará-disco, assim como no tambaqui (Corrêa *et al.*, 2007), a tilápia (Gonzalez-Felix *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012), no jundiá (Lazzari, 2005; Lazzari *et*

al., 2010), no aruanã (Natalia *et al.*, 2004) e na carpa capim (Serrano Jr., 2012), são observadas nos cecos pilóricos e em todo o intestino.

O acará-disco apresentou baixos níveis de atividade da tripsina aos 25 DAE assim como o observado por Chong *et al.*, (2002ab) e obteve valores crescentes nas idades experimentais, aumentando a atividade enzimática em mais de 7 vezes em apenas 65 dias experimentais, obtendo o pico aos 90 DAE, demonstrando rápido desenvolvimento morfológico e funcional do sistema digestivo.

A quimiotripsina apresentou valores superiores aos observado para a tripsina em todas as idades experimentais, o pico de atividade foi observado aos 45 DAE e também foram superiores aos observados por Chong *et al.*, (2002ab).

O valor nutricional da dieta não é baseado simplesmente na sua composição química, mas também na capacidade fisiológica do peixe para digerir e absorver estes nutrientes de acordo com os hábitos alimentares destes animais. Durante a digestão, estas proteínas são quebradas em compostos mais simples (péptidos e aminoácidos livres) e são absorvidos por proteínas de membrana específicos, especializadas em transporte destes peptídeos e metabolizadas pelo organismo. Uma série de autores analisou a atividade de enzimas digestivas em organismos aquáticos relatando resultados divergentes e que também podem ser observados neste trabalho quando comparados aos valores obtidos de atividade enzimática.

O Acará-disco (*Sympysodon sp.*) apresentou valores da atividade da tripsina e da quimiotripsina superiores aos encontrados por Chong *et al.*, (2002a) e Chong *et al.*, (2002b) quando trabalharam com o acará-disco, conforme descrito na tab.14 e na tab. 15. Já quando comparada a atividade enzimática digestiva da tripsina à tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) Gonzalez-Félix *et al.*, (2010) e Santos *et al.*, (2012) obtiveram valores inferiores aos demonstrados pelo acará-disco. Ainda trabalhando com a tilápia, Santos *et al.* (2012), obtiveram valores aproximadamente 10 vezes maiores para a quimiotripsina que os obtidos pelo acará-disco no presente trabalho.

Tanto a atividade enzimática da carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*) descrita por Fong *et al.*, (1998) como a carpa Indiana (*Catla catla*) descrita por Rathore *et al.*, (2005), que aos 35 DAE, apresentaram valores superiores tanto para tripsina quanto para quimiotripsina quando comparadas com valores

encontrados para o acará-disco no presente trabalho. Demonstrando uma diferença na capacidade digestiva entre as espécies, apesar do hábito alimentar das fases iniciais de larva e juvenil do acará-disco serem mais favoráveis ao desenvolvimento das proteases, a ontogenia enzimática ocorreu de forma a divergir da literatura.

Correia *et al.*, (2007) trabalhando com tambaqui (*Clossoma macropomum*) obtiveram valores inferiores para a atividade da tripsina e aproximadamente 14 vezes superiores para a quimiotripsina quando comparado ao acará-disco.

Os valores de atividade da tripsina encontrados no acará-disco foram similares aos valores encontrados por Lazzari (2005) e Lazzari *et al.*, (2010) quando trabalharam com o jundiá (*Rhamdia quelen*). Os mesmos autores relatam valores superiores para a quimiotripsina.

Tabela 14. Valores encontrados para a atividade da tripsina na literatura.

Espécie	Idade	Peso	Total U/ μ mol	Referência
<i>Sympysodon sp.</i> (Acará-disco)	90d	2,06	6,06	Presente trabalho
<i>Sympysodon sp.</i> (Acará-disco)	25-35d	-	0,5-0,7	Chong <i>et al.</i> , 2002a
<i>Sympysodon sp.</i> (Acará-disco)	90d	5,2g	0,9	Chong <i>et al.</i> , 2002b
<i>Scophthalmus maximus</i> (Turbot)	60d	1,0g	0,08	Tong <i>et al.</i> , 2012
<i>Lateolabrax japonicus</i> (Japanese seabass)	-	1500g	1979	Cai <i>et al.</i> , 2011
<i>Lithognathus mormyrus</i> (Striped Seabream)	-	100g	270	Ali <i>et al.</i> , 2010
<i>Oreochromis niloticus</i> (Juvenil)	65d	29g	3,38	Santos <i>et al.</i> , 2012
<i>Oreochromis niloticus</i> (Juvenil)	40d	-	1,81	Gonzalez-Felix <i>et al.</i> , 2010
<i>Colossoma macropomum</i> (Tambaqui)	-	167,70g	0,7	Coreia <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhamdia quelen</i> (Jundiá)	-	15g	4,98	Lazzari, 2005
<i>Rhamdia quelen</i> (Jundiá)	-	15g	6,72	Lazzari <i>et al.</i> , 2010
<i>Oncorhynchus masou</i> (Salmonideo)	-	-	8,41	Kanno <i>et al.</i> , 2010
<i>Scleropages formosus</i> (Aruanã)	-	251,5g	0,08	Natalia <i>et al.</i> , 2004
<i>Limia vittata</i>	-	-	0,03	Falcón-Hidalgo <i>et al.</i> , 2011
<i>Gambusia punctata</i>	-	-	0,04	Falcón-Hidalgo <i>et al.</i> , 2011
<i>Catla catla</i> (Carpa Indiana)	35d	-	11,8	Rathore <i>et al.</i> , 2005
<i>Melanogrammus aeglefinus</i> (Arinca)	25-45d	-	15,78	Perez-Casanova <i>et al.</i> , 2006
<i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod - Bacalhau)	25-45d	-	10	Perez-Casanova <i>et al.</i> , 2006

A atividade enzimática da tripsina e da quimiotripsina apresentou em todas as idades experimentais valores superiores na porção distal do intestino em detrimento a porção proximal, ficando assim demonstrando não somente a

capacidade de digestão de proteínas aos 25 DAE, como também a superioridade nesta capacidade de digestão da porção distal.

Tabela 15. Valores encontrados para a atividade da quimiotripsina na literatura.

Espécie	Idade	Peso	U/μmol	Referência
<i>Sympysodon sp.</i> (Acará-disco)	90	2,06	10,06	Presente trabalho
<i>Sympysodon sp.</i> (Acará-disco)	90	5,2g	0,65	Chong <i>et al.</i> , 2002b
<i>Colossoma macropomum</i> (Tambaqui)	-	167,70g	144	Coreia <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhamdia quelen</i> (Jundiá)	-	15g	2400	Lazzari <i>et al.</i> , 2010
<i>Ctenopharyngodon idellus</i> (Grass Carp)	-		107	Fong <i>et al.</i> , 1998
<i>Scleropages formosus</i> (Aruanã)	-	251,5g	0,03	Natalia <i>et al.</i> , 2004
<i>Limia vittata</i>	-	-	0,03	Falcón-Hidalgo <i>et al.</i> , 2011
<i>Gambusia punctata</i>	-	-	0,05	Falcón-Hidalgo <i>et al.</i> , 2011
<i>Catla catla</i> (Carpa Indiana)	35d	-	179,8	Rathore <i>et al.</i> , 2005
<i>Oreochromis niloticus</i> (Juvenil)	65d	29g	37,74	Santos <i>et al.</i> , 2012

Os resultados também demonstram uma correlação entre atividade enzimática da tripsina e quimiotripsina e taxa de crescimento do acará-disco o que também foi relatado por Falcon-Hidalgo *et al.*, (2011). Ficou evidenciado atividade na eletroferese em gel SDS-PAGE que aos 25 e 35 DAE temos um padrão na atividade enzimática com enzimas de alto peso molecular. Já aos 45 DAE podemos perceber as tendências no padrão enzimático sinalizando um grupo enzimático de alto peso molecular > 95kDa no intestino proximal e outro grupo enzimático de peso molecular intermediário entre 72kDa e 28kDa no intestino distal. Este padrão enzimático se repete aos 65 DAE e aos 90 DAE para intestino proximal e distal.

6.7 Conclusão

O acará-disco (*Sympysodon sp.*) possui atividade da tripsina e quimiotripsina aos 25 DAE, o que foi confirmado *in vitro* e em gel, tanto para proteases ácidas e alcalinas, desta forma demonstra capacidade digestiva de proteínas. Os valores para a atividade enzimática podem ser correlacionados positivamente com a idade do acará-disco. O intestino distal é responsável pela maior parte da digestão destas proteínas. A diferenciação enzimática ocorre próximo aos 45 DAE formando um grupo enzimático específico para o intestino proximal e outro grupo para o intestino distal.

6.8 Referências bibliográficas

ALI, N.E.H.; HMIDET, N.; ZOUARI-FAKHFAKH, N.; KHALED, H.B.; NASRI, M. **Alkaline Chymotrypsin from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Purification and Characterization.** J. Agric. Food Chem. v.58, p.9787–9792. 2010.

ALVAREZ-GONZALEZ, C.A.; MOYANO-LOPEZ, F.J.; CIVERA-CERECEDO, R.; CARRASCO-CHAVEZ, V.; ORTIZ-GALINDO, J.L.; NOLASCO-SORIA, H.; TOVAR-RAMIREZ, D.; DUMAS, S. **Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II: Electrophoretic analysis.** Fish Physiol Biochem v.36, p.29–37, 2010.

BEZERRA, R.S.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO Jr., L.B. **Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** Process Biochemistry, v. 40, p. 1829-1834. 2005.

BRADFORD M.M.,. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding.** Analytical Biochemistry. v.72, p.248-254. 1976.

CAMILO, R.Y. **Efeitos da adição de aminoácidos essenciais livres à dieta e da ausência de nutrientes na atividade de enzimas digestivas e no metabolismo intermediário de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*).** 2007. 66f. Dissertação. Mestrado em Ciências. São Carlos: UFSCar.

CARAWAY, W.T. **A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids.** American Journal of Clinical Pathology, v.32, p.97-99, 1959.

ÇELIK Y. 2010. **Characterization by microphotography of larval and prejuvenile stage of discus fish (*Symphysodon spp.*).** Journal of FisheriesSciences.com. 4, 99-111.

CHONG, A.S.C.; HASHIM, R.; ALI, A.B. **Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using in vivo and in vitro methods.** Aquaculture nutrition, London, v.8, n. 3, p. 229, 2002a.

CHONG, A.S.C.; HASHIM, R.; CHOW-YANG, L.; ALI, A.B. **Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodon aequifasciata*.** Aquaculture research, v. 33, n. 9, p. 663, 2002b.

Corrêa, C.F.; Aguiar, L.H.; Lundstedt, L.M.; Moraes, G. **Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. v.147, p.857-862. 2007.

FALCÓN-HIDALGO, B.; FORRELLAT-BARRIOS, A.; FARNÉS, O.C.; HERNÁNDEZ, K.U. **Digestive enzymes of two freshwater fishes (*Limia vittata* and *Gambusia punctata*) with different dietary preferences at three developmental stages**. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B v.158, p.136-141.2011.

FONG, Wing-Ping.; ELAINE, Yee-Man C.; LAU, King-Kwan. **Isolation of two chymotrypsins from grass carp**. Biochemistry and Molecular Biology International. v. 45, p. 409-418. 1998.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L.; CASTILLO-YAÑEZ, F.J.; OCAÑO-HIGUERA, V.M.; PEREZ-VELAZQUEZ, M.; COTA-MORENO, V.; LOZANO-TAYLOR, J. **Effect of dietary protein source and time on alkaline proteolytic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. Fish Physiol. Biochem. v.36, p.779–785. 2010.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E.B. **Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and co-polymerized substrates**. Anal. Biochemistry. v.102, p.196-202. 1980.

HIDALGO, M.C.; UREA, E.; SANZ, A. **Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities**. Aquaculture, v.170, n.3-4, p.267-283,1999.

HUMMEL, B.C.W. **A Modified Spectrophotometric Determination of Chymotrypsin, Trypsin and Thrombin**. Can J. Biochem Physiol. v.37, p.1393-1399. 1959.

KLOMKLAO S.; BENJAKUL S.; VISSESANGUAN W.; SIMPSON B.K.; KISHIMURA H. **Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus thongol*)**. J. Agric. Food Chem. v.54, p.617-622. 2006.

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature. v.227, p.680–685. 1970.
doi:10.1038/227680a0

LAZZARI, R. **Estudo de enzimas digestivas, crescimento e composição centesimal de filés de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com diferentes fontes protéicas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS). 2005.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; PEDRON, F.A.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; GIODA, C.R. **Protein sources and digestive enzyme activities in jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Scientia Agrícola, v.67, p.259-266. 2010.

Li Jun-sheng; Li Jian-lin; Wu Ting-ting. **Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid Juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*)**. Fish Physiol Biochem. v.32, p.295-303. 2006.

LIN, S.; MAI, K.; TAN, B.; LIU, W. Effects of Four Vegetable Protein Supplementation on Growth, Digestive Enzyme Activities, and Liver Functions of Juvenile Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. v.41, p. 583-593. 2010.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. **The determination of enzyme dissociation constants**. *Journal of the American Chemical Society*, Washington, v. 56, n. 1, p. 658-666, 1934.

NATALIA, Y., HASHIM, R., ALI, A., CHONG, A. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture* v.233, p.305-320. 2004.

RATHORE, R.M; KUMAR, S.; CHAKRABARTI, R. **Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae) during early developmental stages**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. v.142, p.98-106. 2005.

SANTOS, J.F.; CASTRO, P.F.; LEAL, A.L.G.; FREITAS Jr., A.C.V.; LEMOS, D.; CARVALHO Jr., L.B.; BEZERRA, R.S. **Digestive enzyme activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to different dietary levels of shrimp protein hydrolysate**. *Aquacult Int*. v.20, p.1-15, 2012.

SERRANO Jr., E.A. **Effects of Quillaja saponins on growth, feed efficiency, digestive enzyme activities and metabolism of common carp (*Cyprinus carpio*)**. *Aquaculture Nutrition*. 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2012.00980.x

VALETTI, N.W.; BOERIS, V.; PICÓ, G. **Characterization of chymotrypsin-L-arrageenan complex in aqueous solution: A solubility and thermodynamical stability study**. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 52, p.45-51. 2013.

ZAIA, D.A. M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. **Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods**. *QUÍMICA NOVA*, v.21, p.787-793.1998.

7. CAPÍTULO III: NUTRIÇÃO DE PEIXES E ATIVIDADE ENZIMÁTICA: ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA DAS PUBLICAÇÕES MUNDIAIS E BRASILEIRAS NA BASE SCOPUS

Formatado no modelo de artigo segundo as normas para a revista *Aquaculture* em: <http://ees.elsevier.com/aqua/default.asp>

Fish Nutrition and Enzymatic Activity: Bibliometric Analysis of World's and Brazilian's Publications in SCOPUS Database.

DUARTE, S.C.*¹, ANDRADE, D. R.², SHIMODA, E.³, FERNANDEZ, J.H.⁴; VIDAL Jr., M.V.².

*shaytnercampos@hotmail.com

1 Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro. UENF/CCTA/LZNA

2 Professor Doutor da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro/CCTA/LZNA

3 Professor Doutor da Universidade Candido Mendes.

4 Professor Doutor da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro/CBB/LQFPP

7.1 ABSTRACT:

The information concerning the pattern of development of digestive enzymes, its secretion in the duodenum and its activity in the intestinal contents are important to implement nutritional and dietary strategies, to improve the use of nutrients by the animals. Realizing the need for more clarification on the status of research on Fish Nutrition, this work aimed to do a bibliometric study, using the *Scopus* database, using the entries Fish Nutrition and Enzyme Activity, both in Brazil and worldwide. The results were presented stratified, showing the tendencies of publication in the specific knowledge area. The research in the *Scopus* database was performed on January 2012, taking into account the historical series from 1999 to 2010. The data obtained from the research were: number of publications per year or historic series, publication by author, by area, by journal, by institution, by country and the language of the publication. The analysis of the concentration was performed by the comparison of the number of publication of the 10 main contributors (countries, knowledge area, authors, institutions and journal) in relation to the total of publications from *Scopus* database. For a temporal analysis, were used exponential regression equations of the number of publications in relation to the year. The values of each variable were linearized by the application of the logarithm, by means that the equation's angular coefficient indicates the rank of growth in a specific period. The research showed that publications in "Fish Nutrition" and "Enzyme activity" had significant growth in the last decade, once the growth rate in

publications worldwide and in Brazil were 204.4 and 493.2 in "Fish Nutrition" , respectively. Also, the growth rate of publications for "Enzyme activity" showed values of 157.9 and 292 for the world and Brazil. The analysis of these data suggests a continuous interest in the areas surveyed, with great potential for development of this kind of research, especially in Brazil.

Keywords: Animal science, feeding, statistic methods, Digestive enzymes.

7.2 RESUMO

O conhecimento em relação aos hábitos alimentares dos peixes é importante para a adequação da ração oferecida. Existe uma relação de interdependência entre o habitat, a nutrição e o desenvolvimento do sistema digestivo, que mostra-se especialmente em sua adaptação e modificação. A informação sobre o padrão de desenvolvimento de enzimas digestivas, sua secreção no duodeno e sua atividade nos conteúdos intestinais são importantes para a implementação de estratégias nutricionais e dietéticas, para melhorar a utilização de nutrientes pelos animais. Percebendo a necessidade de mais esclarecimentos sobre o estado da pesquisa em Nutrição de Peixes, este trabalho teve como objetivo fazer um estudo bibliométrico, utilizando banco de dados *Scopus*, usando as publicações em Nutrição de Peixes e Atividade Enzimática, tanto no Brasil quanto no mundo. Os resultados foram apresentados de forma estratificada, mostrando as tendências de publicação na área de conhecimento específico. A pesquisa na base de dados *Scopus* foi realizada em janeiro de 2012, tendo em conta a série histórica 1999-2010. Os dados obtidos com a pesquisa foram: número de publicações por ano ou a série histórica, a publicação por autor, por área, por jornal, por instituição, por país e do idioma da publicação. A análise da concentração foi realizada pela comparação do número de publicação das 10 principais contribuintes (países, área de conhecimento, autores, instituições e revistas) em relação ao total de publicações da base de dados *Scopus*. Para uma análise temporal, foram utilizadas equações de regressão exponencial do número de publicações relativamente ao ano. Os valores de cada variável foram linearizados com a aplicação do logaritmo, por meio de que o coeficiente angular da equação indica a patente de crescimento durante um período específico. A pesquisa mostrou que as publicações em "Nutrição de Peixes" e "Atividade Enzimática"

tiveram um crescimento significativo na última década, uma vez que a taxa de crescimento em publicações no mundo e no Brasil foram 204,4 e 493,2 em "Nutrição de Peixes", respectivamente. Além disso, a taxa de crescimento das publicações de "atividade enzimática" apresentaram valores de 157,9 e 292 para o mundo e do Brasil. A análise desses dados sugere um interesse contínuo em todas as áreas pesquisadas, com grande potencial para o desenvolvimento deste tipo de pesquisa, especialmente no Brasil

Palavras-chave: Ciência animal, alimentação, métodos estatísticos, enzimas digestivas.

7.3 Introduction

Aquaculture can be defined as the growth of organisms whose life cycle is totally or partially aquatic; among them are fishes, amphibians, mollusks, crustaceans and aquatic plants. Within the aquaculture, fish-farming is a very highlight sector.

The world catch of fish raised its apex at the years 1990, stopping at the baseline of 95 million tons. Aquaculture, by its time, presented growing rates near 10% per year, at the last 15 years. It raised, in 2010, the rank of 55.1 million tons, being one of the most raising activities among the world agribusiness (FAO, 2010).

Between 1993 and 2003, the world produce of fish raised 2% per year. The aquaculture was responsible for 88% of this growth and responded, in 2005, for 40% of the entire world fish produced, against 17% in 1993. The expectation is that aquaculture represents 70% of the world's fish consumption until 2020, with 100 million tons produced. The FAO's estimation was that, between 2003 and 2015, the aquaculture would represent 41% of the world fish production. Such data is already being revised, once aquaculture reached this mark in 2005. It has been estimated that until 2020, the world demand of fish rises to 30 - 60 million tons, and only the aquaculture could supply this requirement (FAO, 2010).

China is the responsible for about 66% of the world aquatic production. Brazil, with less than 2%, does not even appear at the ranking of the 10 greatest producers.

The nutritional quality of the dietary is important for the fish-farming and can be decisive for the success of this raising. Nowadays, the study of the fish nutrition has the aim of recognize and understand the interrelations of the levels of dietary nutrients, the digestibility, the nutrients absorption, the growth and the health of the animals used in aquaculture (HALVER, 2001; CHONG *et al.*, 2002).

Among several aspects related to fish-farming, those involved to feeding have been widely discussed, mainly because it represents close to 70% of the production costs in intensive systems (OLIVEIRA *et al.*, 2007). In relation to fish-farming, this problem is even more severe. It is due the higher protein requirements, in comparison to other species. So, it becomes necessary a protein-rich ration, what increases even more the costs of production. Therefore, the provision of proper food, in quantity and quality, is important for the economic success of fish-farming (THONGPRAJUKAEW *et al.*, 2011).

It is important the knowledge of the eating habits of the fishes, for the adequacy of the given ration. The eating habit gives an idea of the nutritional needs of each species. For example: carnivorous fishes make better use of animal's origin food, needing higher protein content in ration, when bred in captivity. Besides, they normally don't use well the vegetable food; omnivorous and herbivorous fishes are less exigent in relation to protein content and well profit a larger variety of foods. The eating management, therefore, must consider the animal's habits, the breeding system, the natural productivity, the climatic conditions, the food handling, among other aspects (OLIVEIRA *et al.*, 2007; CONCEIÇÃO *et al.*, 2009).

There is a slight interdependent relation between nutrition, habitat and digestive apparel organization, which shows up especially in adaptations and modifications. These are morphological changes brought about by environmental factors over the organism, being of permanent character, produced at phylogenetic evolution, as in the case of adaptations, or of temporary character, produced at the individual ontogenetic cycle (individual development since fecundation until the reproductive maturity), called modifications. Therefore, the diet is one of the major factors that confers to the digestive apparel organs its functional, anatomic and morphometric characteristics, proper to each dietary (ROTA, 2003; PRADHAN *et al.*, 2013).

Most of food digestion occurs in the fishes' intestines and pyloric caeca, when they exist. The intestinal secretions presents a high number of enzymes, including the three major classes, that are the proteases, lipases and amylases, wich hydrolyses the three major respective classes of nutrients, and that are substratum-dependents (HIDALGO *et al.*, 1999; CONCEIÇÃO *et al.*, 2003; MORO *et al.*, 2010).

The intestine secreting cells seems to follow the classic pattern for the vertebrates. In the intestinal walls of fishes occurs deep folders, and the secreting cells that are formed there migrates to the crests, where discharge its secretions (HALVER & HARDY, 2002; NATALIA *et al.*, 2004).

The information about the pancreatic enzyme development pattern, its secretion in the duodenum and activity in the intestinal content are important to implement nutritional and dietary strategies, to improve the use of nutrients by the animals (CONCEIÇÃO *et al.*, 2003).

Nowadays, one of the sciences that have raised attention is bibliometrics, from which is possible, through application of statistic methods, do observations towards the state of the art or scientific strand (PRITCHARD, 1969).

The information flow, the behavior of the scientific community, the communication channels, mainly journal, all of this is part of the Science and are as important as the researches that constitute new discovers (FONSECA, 1986; OLIVEIRA *et al.*, 1992).

The question, however, is in what manner is possible to make such diagnostic. On e of the possibilities consists in utilization of methods that *allow* measuring the productivity of the researchers, groups or research institutions. To do so, it is essential the use of specific techniques of evaluation that may be quantitative or qualitative, or even a combination of both (ALVARDO, 1984).

Generally, these are some possibilities of application of the bibliometric, scientometric and informetric techniques: identify the tendencies and the growth of the knowledge in a specific area; identify the papers of the core of a discipline; predict the publication tendencies; study the dispersion and the obsolesce of the scientific literature; measure the degree and the pattern of collaboration among the authors; analyze the process of citation and co-citation; evaluate the circulation and usage of documents in a document center;

measure the growth of specific areas and the raising of new themes (ALVARDO, 1984).

The aim of the present work is realize a bibliometric study, using the Scopus data base, on the subjects “Fish nutrition” and “Enzyme activity”, as in Brazil as in the world, being the results presented stratified, stating the publication tendencies in the scientific area.

7.4 Material and Methods

The data were obtained based on the Scopus scientific database (www.scopus.com). The search was performed on January 09, 2012, being the research refine performed as described below and illustrated in Table 1.

The data obtained from the research were: number of publications per year or historic series, publication by author, by area, by journal, by institution, by country and the language of the publication.

Table 1. Search criteria and refine of the researches in Scopus database.

TITLE-ABS-KEY	REFINE		
	SUBJAREA	TITLE-ABS-KEY2	COUNTRY
fish nutrition	no restriction	no restriction	no restriction
fish nutrition	no restriction	no restriction	Brazil
fish nutrition	Agri, Bioc, Vete	no restriction	no restriction
fish nutrition	Agri, Bioc, Vete	no restriction	Brazil
fish nutrition	Agri, Bioc, Vete	Enzyme activity	no restriction
fish nutrition	Agri, Bioc, Vete	Enzyme activity	Brazil

The analysis of the concentration was accomplished by the comparison of the number of publication of the 10 most contributors (countries, knowledge area, authors, institutions and journal) in relation to the total of publications.

For the calculation of the concentration, were always used the top 10 of each search mode in the statistic analysis. The rank of growth was calculated in the base of the number of publications between the years 1999 to 2010, once at the time of the research the data of 2011 and 2012 were not totally registered at Scopus database.

For a temporal analysis, were used exponential regression equations of the number of publications in relation to the year. The values of each variable were linearized by the application of the logarithm, by means that the equation's

angular coefficient indicates the rank of growth in a specific period. The statistic analyses were performed in the Minitab applicative, 15.1.1.0.2007 version.

7.5 Results

Table 2 shows the total number of listed articles in Scopus database when are used the terms “Fish nutrition” and “Enzyme activity” without any restriction, being referential the number of publications, and using the restriction tool for country “Brazil”.

It was performed a research to the database taking as referential the period between 1999 to 2010, being shown the number of published articles per year, by research terms and restricted to the target areas of the research, according to Table 2.

The Figure 1 shows the linearized regressions for the analyzed data. For these regressions were used all the publications corresponding to the terms and filters of interest, being comprised the period between 1999 and 2010, once the 2011 and 2012 data were not totally indexed to the database at the time of this study.

Table 2. Publications per year and total, at the world and in Brazil, using the searching terms and the research refine tools.

Year	– Fish nutrition		– Fish nutrition – Agriculture		– Fish nutrition – Agriculture – Enzyme activity	
	Total	Brazil	Total	Brazil	Total	Brazil
2010	550	41	238	36	48	5
2009	476	31	182	23	43	6
2008	435	17	247	12	35	2
2007	483	12	293	10	50	1
2006	469	11	323	8	66	1
2005	359	10	211	8	42	1
2004	378	10	252	7	49	2
2003	381	6	253	4	41	1
2002	276	5	156	3	22	0
2001	231	4	151	2	29	0
2000	185	1	118	1	23	0
1999	171	5	112	3	19	1
TOTAL	6903	193	3901	147	589	22

Table 3 presents a top 10 ranking of the major authors that published more articles concerning the search methodology and research refine, as worldwide as national sphere.

Table 3. The “top 10” authors by term and search refining.

Fish nutrition		Fish nutrition - agriculture		Fish nutrition - agriculture enzyme activity							
Total	Brazil	Total	Brazil	Total	Brazil						
Author	n	Author	n	Author	n						
Calder, P.C.	33	Pezzato, L.E.	18	Gatlin, D.M.	24	Pezzato, L.E.	18	Panserat, S.	17	Moraes, G.	6
Bistrrian, B.R.	28	Barros, M.M.	15	Shiau, S.Y.	22	Barros, M.M.	14	Kaushik, S.	16	Goncalves, G.S.	3
Gatlin, D.M.	27	Boscolo, W.R.	12	Hardy, R.W.	22	Boscolo, W.R.	12	Tocher, D.R.	13	Lundstedt, L.M.	3
Kaushik, S.J.	24	Feiden, A.	10	Kaushik, S.J.	20	Feiden, A.	10	Medale, F.	11	Pezzato, L.E.	2
Shiau, S.Y.	23	Donzele, J.L.	9	Kaushik, S.	20	Donzele, J.L.	9	Conceicao, L.E.C.	10	Almeida, L.C.	2
Hardy, R.W.	22	Waitzberg, D.L.	8	Pezzato, L.E.	19	Signor, A.A.	8	Ronnestad, I.	10	Cyrino, J.E.P.	2
Panserat, S.	22	Signor, A.A.	8	Panserat, S.	19	Guimaraes, I.G.	7	Krogdahl, A..	9	Barros, M.M.	2
Kaushik, S.	21	Guimaraes, I.G.	7	Tocher, D.R.	19	Cyrino, J.E.P.	6	Calder, P.C.	8	Neto, J.R.	2
Michaelsen, K.F.	21	Dorea, J.G.	7	Pezzato, L.E.	18	Moraes, G.	6	Shiau, S.Y.	8	Donzele, J.L.	2
Medale, F.	20	Moraes, G.	6	Calder, P.C.	17	Roubach, R.	6	Kaushik, S.J.	7	Pedron, F.A.	1

The Tables 4 show the top 10 media or journal in which are published the paper about “Fish nutrition” and “Enzyme activity”. These information are specially important to take choices about where to submit an article.

The Table 5 shows the total number of publications by institutions in the world and in Brazil, using the proposed methodology. The institutions are ranked by the top 10.

7.6 Discussion

The Figure 2:A represents the percent (%) participation of Brazilian articles in comparison to the total publications, found in the research using as reference the Scopus database, at the period from 1999 to 2010. Were first analyzed the published articles containing the term “Fish nutrition”, without any filter, what showed, after statistical analysis, that Brazilian articles represented 2.796% of the total published articles. It was also performed the analysis for the publications with the term “Fish nutrition”, refined/filtered by the knowledge areas that are of interest to the research, “agriculture and biological sciences” or “biochemistry, genetics and molecular biology” or “veterinary”, that represents 3.76% of the total publications. When, besides the previous restrictions and search terms, the term “Enzyme activity” was added, the Brazilian participation maintains representation of 3.73%, almost equal to the previous evaluation.

One of the possible evaluation forms is the composition of a publication ranking inside the Scopus database, highlighting the position of Brazilian publications, in relation to other countries. The Figure 2:B represents this ranking, whose amplitude ranges from the 1st to the 15th countries, being Brazil at the 12th position, when the reference search term is “Fish nutrition”. When was performed the restriction by knowledge area, the position in the ranking

jumps to 8th; and introduced the term “Enzyme activity”, the position becomes the 9th, showing the significance of Brazilian publications in relation to the world total in the areas and subjects here focused.

The Figure 2:C shows the proportion of Brazilian authors publishing in English, when apply only the term “Fish nutrition” as reference in the Scopus database. It was observed that 54% of publications were published in English. When the knowledge area filters applied were “agriculture and biological sciences” or “biochemistry, genetics and molecular biology” or “veterinary”, this value decreases to 46%. When the term “Enzyme activity” is added, it is observed an increase of the number of publications in English, what may shown a tendency of publication in specialized international journals, and higher classification in Brazilian regulating organs attending this field.

The Figure 3:A represents the detailed analisis of the linearized angular coefficient obtained in figure 2 that may be understood as a publication growth rate, worldwide and in Brazil, at the period from 1999 to 2010, indexed at Scopus database. It can be seen that when the search reference is “Fish nutrition”, the world publications increased at a rate of 204.4 in the decade, while Brazil publications increases at a rate of 493.3 in the same area. When the search in the database is restricted to the knowledge areas “agriculture and biological sciences”, or “biochemistry, genetics and molecular biology” or “veterinary”, it can be seen that the world improvement is about 135.7, against 534.9 increase in Brazilian publications. When, besides the term “Fish nutrition” and the restriction/refine of the specific knowledge areas, is also included the term “Enzyme activity”, the world growth rate in the historic series is about 157.9, while in Brazil is of 292.

These results suggest that the growth rate of publications in the studied period is at minimum two times more elevated, in Brazil, for every used search forms, terms and filters/refines, what shows a tendency in fish nutrition research, above the world media (Figure 3:A). In Brazil, these researches are mainly focused at the agricultural sciences area. It is also observed a higher growth rate in Brazilian publishing when the search is refined by the term “Enzyme activity”, stating the development of a research subarea, linked to animal nutrition.

The author’s contribution rate, related to worldwide and Brazilian publications, can be seen in Figure 3:B. These authors observed that the rate of

concentration of the top 10 authors corresponds to 3.1% of the world publication and the top 10 Brazilian authors correspond to 32.1% of the national publication, when the search term is “Fish nutrition”. It was also observed a significant rising at the concentration range of publications for the main authors when the search in database is restricted to “agriculture and biological sciences” or “biochemistry, genetics and molecular biology” or “veterinary”, amounting 4.8% of the world publications and 39.5% of Brazilian publications.

When, besides the previously listed terms and the knowledge area restriction, is added the term “Enzyme activity”, the concentration rate jumps to 13.8% in the world and 68.2% in Brazil, showing that the research in these areas are probably concentrated in established and organized institutions and research groups. Another statement was that the concentration range of publications of the top 10 authors becomes even higher as the areas and subareas of knowledge were defined, specifically and correlated to the wide range of the research lines (Figure 3:B).

The figure 4 shows the concentration of publications when analyzed the distribution by knowledge area. When our search was performed without restrictions and only by the term “Fish nutrition”, there was a great concentration in the Medicine area, corresponding to 53.5% and 24.4%, for total and Brazilian publications, respectively. However, when the number of publications in “agriculture and biological sciences” were analyzed, obtained numbers were 44.6% for total and 68.4% for Brazilian publications. The observed concentration of publications was higher in Medicine area, in total records and may indicate that important research institutions work with fish for other means that not applies to the Animal Sciences. In fact, sebrafish (*Danio rerio*) is a conventional animal model for “*in vivo*” experiments in developmental biology and applied physiology. The observed concentration of Brazilian publications also showed the major relevance of this theme for Agricultural Sciences in Brazil.

The Figure 5 shows the participation of the top 10 journals with higher concentration of articles in the search for “Fish nutrition” and “Enzyme activity”. This information is especially important in case of choice of where to submit an article in these fields. As showed in figure 5:A, 21.9% of the total publications are restricted to the “top 10” journals, although on research restricted to Brazil this value is of 46.6%. When the search in the Scopus database was performed

using two interest terms and restricting the knowledge areas, was observed a significant concentration rates to 39.0% for the world's "top 10" journals, and incredible 90.9% for the Brazilian's top 10 journals. It is important to highlight the Brazilian Journal of Zootechny, the journal with higher number of national publications with the reference term "Fish nutrition". When, the term "Enzyme activity" was added, and restricting to "agriculture", this journal was even competitive at international level appearing in "top ten" journal (Table 4).

These numbers may lead to an interpretation of a greater specificity of journals for the publications in Animal Nutrition, when the subarea is Enzymology. They also may indicate that in Brazil, the "top 10" journals (Table 4) are practically the better/only reference for researches in knowledge areas of interest of this work.

The Figure 5:B demonstrates the concentration of publication by institution, worldwide and in Brazil. The concentration rate of the "top 10" more productive institution, when the reference term was "Fish nutrition" showed a percentage of 7.5% in relation to the total data. The Harvard School of Public Health was the 1st score institution, not being observed any Brazilian institution in the list. When the search was restricted to Brazil, the concentration value raises to 66.3%, being UNESP – Universidade Estadual Paulista, Universidade de São Paulo and Universidade Federal de Viçosa the three institutions that more published. It indicates that in Brazil, Enzymology research is strongly concentrated to a few universities or research groups.

When, besides the search term, it was used the filter/restriction to the knowledge areas "agriculture or biological sciences" or "biochemistry, genetics and molecular biology" or "veterinary", it were obtained values of 9.4% for the top 10 world institutions, and of 68.7% for Brazil. When the term "Enzyme activity" was included, the values raised to 20.2% and 81.8%, worldwide and Brazil (Figure 5:B), respectively, suggesting a strong concentration of researches of specific groups in a few institutions, being the French Unité Mixte INRA-INFREMER-Université Bordeaux the world most productive and Universidade Federal de São Carlos, Universidade de São Paulo e Universidade Federal de Santa Catarina, in Brazil, at the three first positions of the rank (Table 4).

7.7 Conclusions

This research demonstrated that quantity of publications concerning “Fish nutrition” and “Enzyme activity” raised significantly at the last decade, being the improvement of publications worldwide and in Brazil of 204.45 and 493.2, respectively. Also the observed growth rate of publications about “Enzyme activity”, were of 157.9 and 292, worldwide and in Brazil respectively, suggesting a crescent interest on the researchers in those areas attending to a great potential of biotechnological development mainly in Brazil. This interest can be understood as a higher need to improve the animal nutrition researches, leading scientists and institutions to deepen studies in enzymology applied to animal nutrition.

Aknnowledgment

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Also thanks to Mrs. Heloisa Alves Guimarães for the orthographic revising.

7.8 References

ALVARADO, R.U., 1984. **A bibliometria no Brasil**. Ciência da Informação, Brasília 13,91-105.

CONCEIÇÃO, L.E.C., GRASDALEN, H., RONNESTAD, I., 2003. **Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings**. Aquaculture 227, 221-232.

CONCEIÇÃO, E.C., ARAGÃO, C., RICHARD, N., ENGROLA, S., GAVAIA, P., MIRA, S., DIAS, J., 2009. **Avanços recentes em nutrição de larvas de peixes**. Revista Brasileira de Zootecnia 38, 26-35.

CHONG, A. S.C., HASHIM, R., CHOW-YANG, L., ALI, A.B., 2002. **Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*)**. Aquaculture 203, 321-333.

FAO, 2010. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Rome.

FONSECA, E.N., 1986. **Bibliometria: teoria e prática**. São Paulo:ed.Cultrix USP.

HALVER, J.E., 2001. **My 50 years in fish nutrition, 1949-99**. Aquaculture Research 32, 615-622.

HALVER, J.E., HARDY, R.W., 2002. **Fish Nutrition**. London: Academic Press, 3ª Ed.

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

MORO, G.V., CAMILO, R.Y., MORAES, G., FRACALOSSO, D.M., 2010. **Dietary non-protein energy sources: growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá**. *Aquaculture Research* 41, 394-400.

NATALIA, Y., HASHIM, R., ALI, A., CHONG, A., 2004. **Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae)**. *Aquaculture* 233, 305-320.

OLIVEIRA, A.C., DÓREA, J.G., DOMENE, S.M.A., 1992. **Bibliometria na avaliação da produção científica da área de nutrição registrada no Cibran: período de 1984-1989**. *Ciência da Informação*, Brasília 21, 239-242.

OLIVEIRA, G.R., LOGATO, P.V.R., FREITAS, R.T.F., RODRIGUES, P. B., FIALHO, E.T., DIODATTI, F.C., OLIVEIRA, G.R., LOGATO, P.V.R., FREITAS, R.T.F., RODRIGUES, P.B., FIALHO, E.T., DIODATTI, F.C., 2007. **Digestibilidade de nutrientes em ração com complexo enzimático para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa 36, 1945-1952.

PRADHAN, P.K., JENA, J.K., MITRA, G., SOOD, N., GISBERT, E., 2012. **Ontogeny of the digestive enzymes in butter catfish *Ompok bimaculatus* (Bloch) larvae**. *Aquaculture* 372-375 (2013) 62-69.

PRITCHARD, A., 1969. **Statistical bibliography or bibliometrics?** *Journal of documentation* 25, 348-49.

ROTTA, M. A., 2003. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. Ed. Corumbá: Embrapa Pantanal.

THONGPRAJUKAEW, K., KOVITVADHI, U., KOVITVADHI, S., SOMSUEB, P., RUNGRUANGSAK-TORRISSEN, K., 2011. **Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910)**. *Aquaculture* 322, 1-9.

APÊNDICE A

Table 4. Leading journals by numbers of publications in the total and in Brazil using the search term “Fish nutrition” and refining the research in the area “agriculture”.

Fish nutrition			Fish nutrition – agriculture			Fish nutrition - agriculture - enzyme activity					
Total	Brazil		Total	Brazil		Total	Brazil				
Aquaculture	338	Rev. bras. zootec.	28	Aquaculture	338	Rev. bras. zootec.	28	Aquaculture	75	Rev. bras. zootec.	8
Am. j. clin. nutr.	259	Pesqui. agropecu. Bras.	14	Am. j. clin. nutr.	163	Pesqui. agropecu. Bras.	14	Aquaculture Nutrition	26	Aquaculture	2
J. nutr.	228	Ciencia Rural	10	Journal of Nutrition	162	Ciencia Rural	10	Lipids	24	Aquaculture Nutrition	2
Br. j. nutr.	145	Hydrobiologia	8	Aquaculture Research	88	Hydrobiologia	8	Aquaculture Research	22	Aquaculture Research	2
Eur. j. clin. nutr.	116	Aquaculture	7	Eur. j. clin. nutr.	86	Aquaculture	7	Comp. biochem. physiol	18	Comp. biochem. physiol., Part A Mol. integr. physiol	2
Public Health Nutrition	101	Archivos De Zootecnia	6	Hydrobiologia	83	Archivos De Zootecnia	6	Fish physiol. biochem.	16	Scientia Agricola	2
Aquaculture Research	88	Aquaculture Nutrition	5	Lipids	83	Aquaculture Nutrition	5	Comp. biochem. physiol, Part A Mol. integr. physiol.	15	Boletim do Instituto de Pesca	1
Hydrobiologia	83	Acta sci., Anim. sci.	4	J. Am. Diet. Assoc.	71	Acta sci., Anim. sci.	4	Journal of Nutrition	15	Comp. biochem. physiol., Part B Mol. integr. physiol	1
Lipids	83	JPEN	4	Aquaculture Nutrition	71	Scientia Agricola	4	Am. j. clin. nutr.	11	Fish physiol. biochem.	1
Aquaculture Nutrition	71	Scientia Agricola	4	Public Health Nutrition	64	Aquaculture Research	4	Rev. bras. zootec.	8	Grasas Y Aceites	1

APÊNDICE B

Table 5. Number of publications by institution, in total SCOPE data and from Brazil.

Fish nutrition		Fish nutrition - agriculture				Fish nutrition - agriculture enzyme activity					
Total	Brazil	Total	Brazil	Total	Brazil	Total	Brazil	Total	Brazil		
Harvard School of Public Health	71	UNESP- Universidade Estadual Paulista	39	University of Stirling	53	UNESP- Universidade Estadual Paulista	36	Unité mixte INRA - IFREMER-Université Bordeaux	23	Universidade Federal de São Carlos	6
Nasjonalt instiutt for ernærings- og sjømatforskning	67	Universidade de São Paulo	30	Nasjonalt instiutt for ernærings- og sjømatforskning	51	Universidade de Sao Paulo	14	University of Stirling	21	Universidade de São Paulo	3
University of Southampton	65	Universidade Federal de Viçosa	14	Texas A and M University	41	Universidade Federal de Viçosa	12	Nasjonalt instiutt for ernærings- og sjømatforskning	17	Universidade Federal de Santa Catarina	3
Wageningen University and Research Centre	64	Universidade de Brasília	13	Unité mixte INRA - IFREMER- Université Bordeaux	41	Universidade Estadual do Oeste do Paraná	12	Universitetet i Bergen	15	Universidade Federal de Santa Maria	3
University of Stirling	55	Universidade Estadual do Oeste do Paraná	12	UNESP- Universidade Estadual Paulista	39	Instituto Nacional de Pesquisas Da Amazônia	12	Universidade do Algarve	14	Universidade Federal de Viçosa	2
Inserm	49	Instituto Nacional de Pesquisas Da Amazônia	12	UC Davis	33	Universidade Estadual de Maringá	11	IFREMER Centre de Brest	14	UNESP- Universidade Estadual Paulista	2
UC Davis	48	Universidade Estadual de Maringá	11	Inserm	31	Instituto de Pesca	8	Norges veterinærhøgskole	12	Universidade Estadual de Campinas	2
Texas A and M University	47	Universidade Federal do Rio de Janeiro	10	Universitat de Barcelona	31	Universidade Federal de Sao Carlos	7	National Taiwan Ocean University	10	Instituto de Pesca	2
National Institute of Public Health and the Environment	46	Universidade Federal de São Paulo	10	University of Southampton	31	Universidade Federal de Santa Catarina	7	Universidade do Porto	9	FMVZ	1
University of Copenhagen, Faculty of Life Sciences	44	Instituto de Pesca	8	Universitetet i Bergen	31	Universidade Federal de Santa Maria	7	University of Southampton	9	FEAD	1

APÊNDICE C

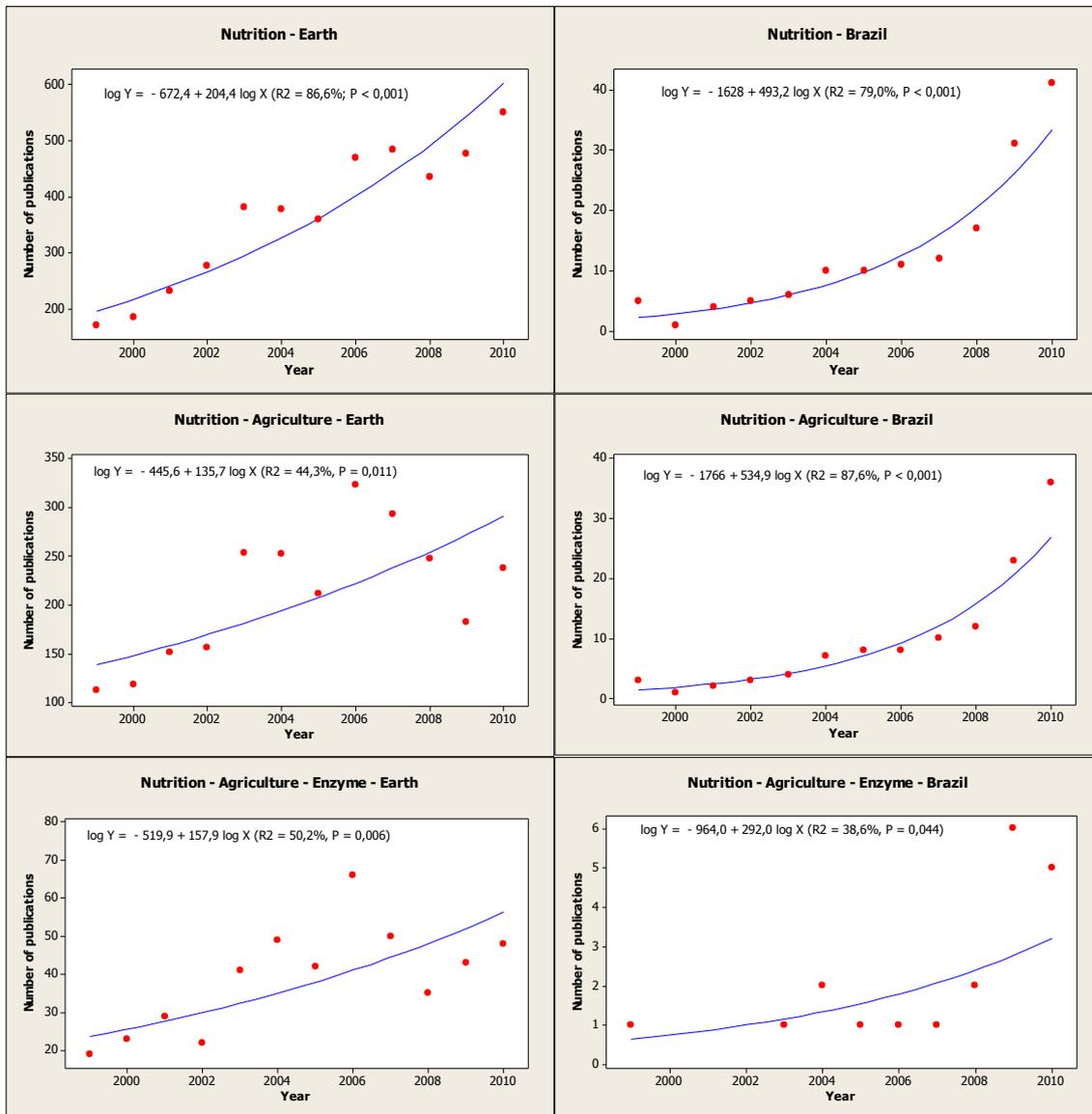


Figure 1. Publication growth rate, worldwide and in Brazil, at the period from 1999 to 2010, expressed by the linearized angular coefficient.

APÊNDICE D

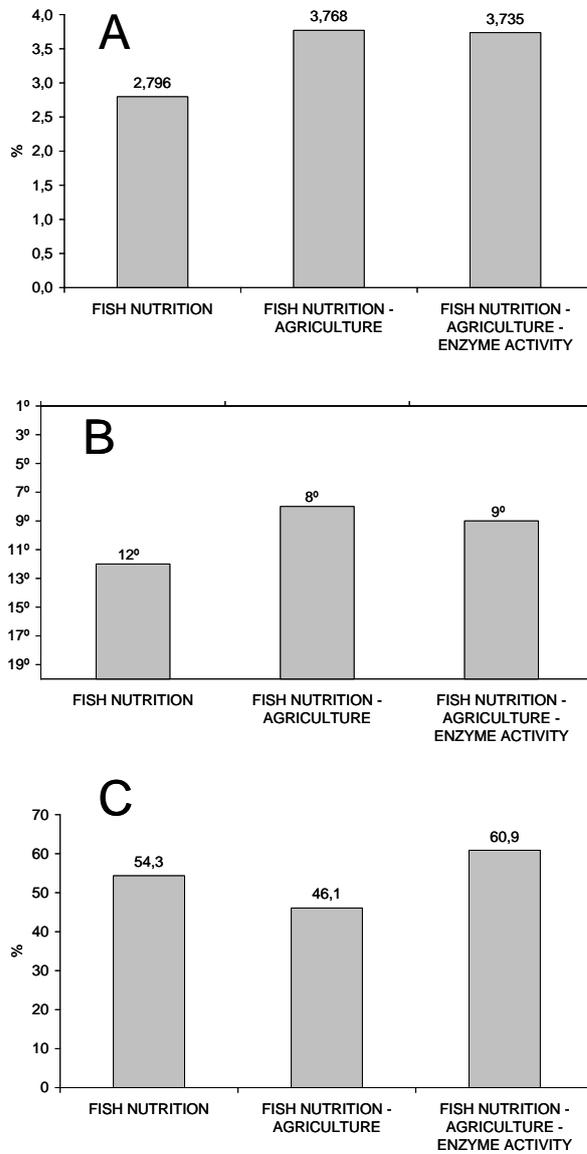


Figure 2. Participation of (%) Brazilian articles in relation to the worldwide (A); Position of the Brazilian publication in relation to other countries (B); Proportion of Brazilian authors publishing in English (C).

APÊNDICE E

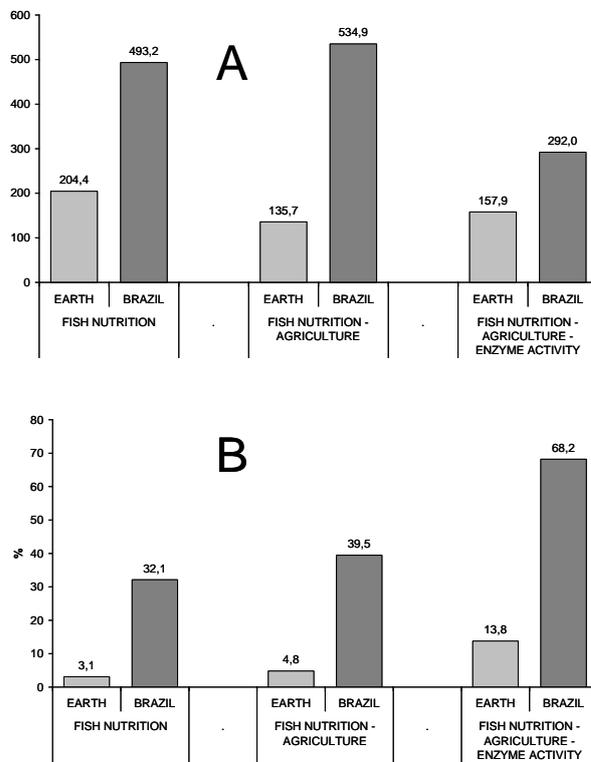


Figure 3. Publication growth rate (%), worldwide and in Brazil (A); Concentration range of publication by the main authors (B).

APÊNDICE F

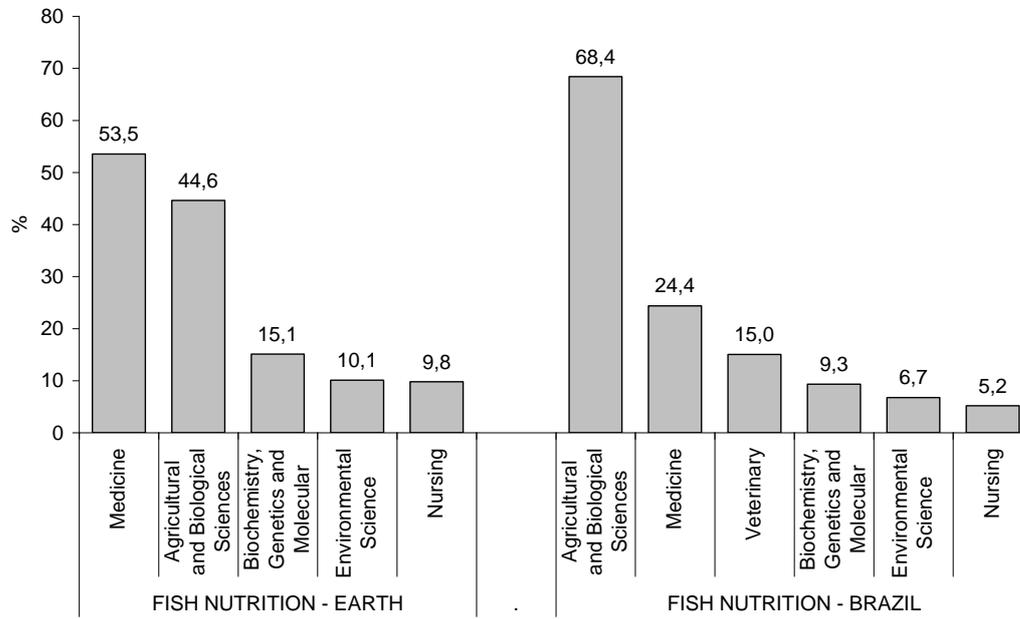


Figure 4. Concentration range of publication by knowledge area.

APÊNDICE G

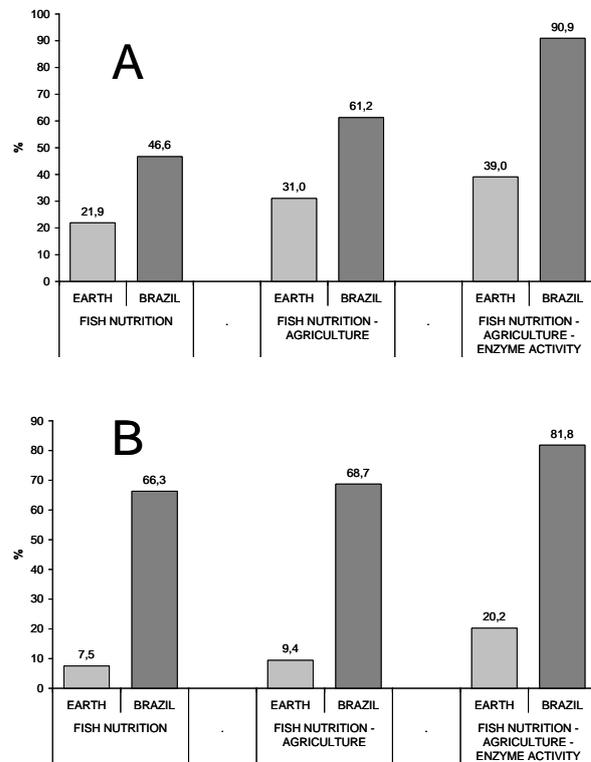


Figure 5. Concentration range of publication of the "top 10" journals (A); Concentration range of publication by institution, worldwide and in Brazil (B).