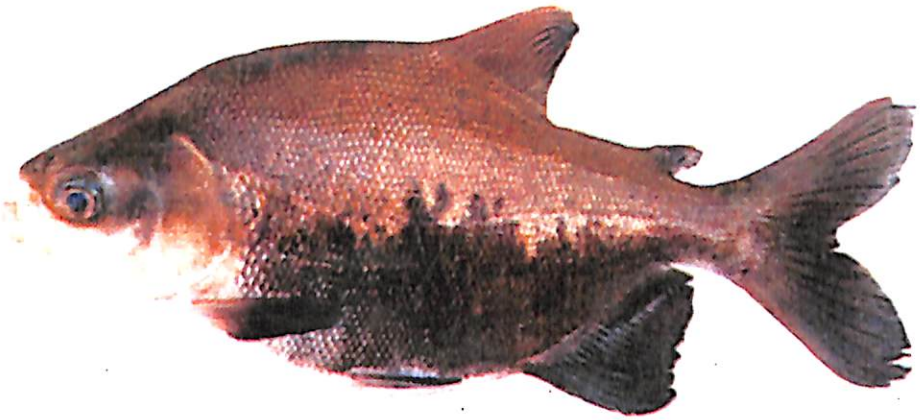
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - UA



Efeito da vitamina D no ganho de peso e nos níveis de cálcio e fósforo inorgânico de *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasalmidae)

Francisco de Assis Mendes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA-UA, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus - AM
2000

41

BIBLIOTECA DO INPA

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
UNIVERSIDADE DO AMAZONAS - UA

Efeito da vitamina D no ganho de peso e nos níveis de cálcio e fósforo inorgânico de *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasalmidae).

Francisco de Assis Mendes[1]

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA-UA, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Orientador: **Adalberto Luís Val, Dr.**

[1]Bolsista do CNPq

Fonte financiadora: CNPq e INPA

T
597.5041
M5[illegible]
ex 1

Manaus – AM

2000

ESTA DISSERTAÇÃO É DEDICADA À

Meu pai MANOEL pelo seu amor fraternal e esforço sobre-humano dedicado durante toda a minha existência, suprindo a ausência de minha mãe e conduzindo-me pelos caminhos da vida.

A todos os meus irmãos Ageu, Almir, Paulo, Auxiliadora, Iracélia, Iraci e Ivaneide pelo apoio moral, especialmente a minha irmã CLEIDE pelo amor, apoio e incentivos constantes que contribuíram muito para a realização desta etapa de minha vida.

Minhas queridas filhas, KELLY, RITHA DE KASSIA e AMARÍLIS, motivos de minha persistência e busca por dias melhores.

Memória do meu querido filho FRANKLIN DOUGLAS com carinho e amor, que Deus o abençoe e ilumine por toda a eternidade.

Memória de minha mãe ALZIRA com amor e carinho por ter me trazido ao mundo, permitindo esta realização, que Deus a abençoe e ilumine por toda a eternidade.

FICHA BIBLIOGRÁFICA

Mendes, Francisco de Assis

Efeito da vitamina D no ganho de peso e nos níveis de cálcio e fósforo inorgânico de *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasalmidae). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós–Graduação em Biologia de água Doce e Pesca Interior. CNPq/INPA, Manaus – AM, 2000. xi + 63p.

Dissertação de Mestrado
1. Fisiologia de peixes 2. *Colossoma macropomum* 3. Nutrição 4. Vitamina D 5. Cálcio total 6. Fósforo inorgânico 6. Mineralização óssea

SINOPSE:

Este trabalho apresenta um estudo de juvenis tambaqui (*Colossoma macropomum*) e sua capacidade de aproveitar a vitamina D contida na dieta. A suplementação de vitamina D na dieta resultou num ganho de peso positivo e num equilíbrio nos níveis de cálcio. A carência da vitamina resultou em distúrbios no crescimento e no equilíbrio do cálcio do plasma e dos ossos.

Palavras Chaves:

Amazônia, Peixes, *Colossoma macropomum*, Fisiologia, Nutrição, Vitamina D, Cálcio, Fósforo inorgânico, Mineralização óssea

AGRADECIMENTOS

Ao terminar este trabalho eu deixo minha profunda gratidão a todos os colegas e professores que de alguma forma contribuíram para esta etapa de minha vida profissional:

ao meu orientador Dr. Adalberto Luís Val, (Pesquisador do INPA) pelo apoio, orientações e valiosos ensinamentos transmitidos durante toda a minha jornada no INPA desde a iniciação científica até a concretização deste trabalho,

à Dra. Vera Maria F. de Almeida Val (Pesquisadora/INPA), pelo seu apoio e incentivo durante a execução deste trabalho,

à MSc Maria de Nazaré Paula da Silva (INPA), pela sua incansável ajuda na aquisição de materiais durante este trabalho de pesquisa e pela sua dedicada amizade,

ao Dr. Edson Lessi (Pesquisador/INPA) pelos valiosos ensinamentos e atenção dispensada,

ao MSc Paulo Falcão, (Coordenador/CPTA/INPA) pela concessão das instalações do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, para a elaboração das rações e análises bromatológicas,

ao Dr. Rodrigo Roubach (Pesquisador/INPA) por sua boa vontade e disposição sempre pronto a ajudar,

à Dra. Maria de Jesus Coutinho Varejão (CPPF/INPA) pela concessão do uso de equipamentos de seu laboratório em parte dos experimentos,

aos pesquisadores que fizeram parte da banca examinadora desta Dissertação, Drs. Adalberto Luís Val (LEEM/INPA), Edson Lessi (CPTA/INPA), Elizabeth Urbinati (UNESP/Jaboticabal), Evoir Zaniboni (UFSC), José Arlindo Pereira (LABOMAR/UFCeará) pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para a estrutura final deste trabalho,

aos amigos Marco Aurélio, Kátia Maruyama, Michel Catarino, Jasmin Kavassaki, Alzira Miranda, Cristhian Perez, Katherine Vásquez, pela valiosa colaboração nos trabalhos laboratoriais,

a todos os colegas do Curso Biologia de Água Doce e Pesca Interior e do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/INPA) pela amizade e companheirismo,

ao amigo Levy C. Gomes (Doutorando/BADPI/INPA) pelo apoio, sugestões e pela gentileza de ter feito as fotos que constam neste trabalho,

aos amigos Engenheiro de Pesca Gilvan Machado e MSc Jânio Silveira, por suas valiosas colaborações nas análises bromatológicas realizadas neste trabalho,

aos professores do curso BADPI/INPA, pela dedicação e ensinamentos transmitidos,

à Vanice Waldige (Departamento de Aqüicultura/Purina) por sua dedicada atenção dispensada na formulação do premix, doado pela conceituada empresa Agribrands Purina do Brasil Ltda,

à indústria Agribrands Purina do Brasil Ltda. pela gentil doação do premix que fez parte da composição das rações utilizadas neste trabalho,

ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia por ter-me concedido a oportunidade de realizar o curso de mestrado, e

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro desta pesquisa.

ABSTRACT

The vitamin D is an important item in the animal nutrition acting on the skeleton growth through bone mineralization. However, it effects on fish is nearly unknown. Juveniles of tambaqui (*Colossoma macropomum*) were fed for 60 days on diets containing 0, 250 and 1000 IU of vitamin D_3 per kilogram of diet. Weight gain, plasma levels of phosphorus, ash and levels of phosphorus in the bone were significantly smaller in the animals fed on diets free of vitamin D. Food conversion rate was significantly lower in fish fed on diets containing vitamin D. Hypercalcaemia was observed in fish fed on diet free of vitamin D, suggesting that tambaqui is able to mobilize calcium when first facing such condition. After 60 days, however, calcium levels in this group were significantly lower than those in fish fed on vitamin D rich diets. Bone calcium also was significantly higher in animals fed on diets free of vitamin D, compared to those fed on vitamin D rich diets suggesting that bone absorption was not improved in this group. This may be related to the fact that most of the fish receiving a vitamin D poor diet presented teeth decalcification. Overall, the results of the present study suggest that vitamin D is an important item to be added to the diet of *Colossoma macropomum* under captivity conditions.

RESUMO

A vitamina D é importante na nutrição dos animais porque atua sobre o crescimento do esqueleto através da mineralização óssea. No entanto, seus efeitos em peixes ainda não estão elucidados. Juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram alimentados durante 60 dias com rações contendo 0, 250 e 1000 UI de vitamina D_3/Kg de dieta. O ganho de peso e os níveis de fósforo plasmático, cinza e fósforo dos ossos foram significativamente menores nos peixes alimentados com deficiência de vitamina D, enquanto, a taxa de conversão alimentar foi menor naqueles que receberam suprimento da vitamina.

Os peixes alimentados com baixos níveis de vitamina D apresentaram hipercalcemia nos primeiros 30 dias, sugerindo que tambaqui possui uma estratégia para tentar manter os níveis de cálcio no plasma no início de uma alimentação deficiente em vitamina D. Em 60 dias, este grupo apresentou níveis de cálcio plasmático menores do que os animais alimentados com vitamina D.

Os níveis de cálcio nos ossos dos peixes que receberam ração com baixos níveis de vitamina D foram significativamente mais altos do que nos animais suplementados com a vitamina, mostrando ausência de reabsorção óssea pela carência da vitamina. Os animais alimentados com suplemento de vitamina D apresentaram equilíbrio, tanto nos níveis do cálcio plasmático como nos do cálcio ósseo. Estes resultados mostram que a vitamina D regula os níveis de cálcio no plasma e nos ossos, evitando a hipercalcemia que poderia causar a calcificação dos tecidos moles, principalmente rins e artérias. Os dados de ganho de peso, cinza e minerais do plasma e ossos mostram a importância da vitamina D para o crescimento da espécie *Colossoma macropomum*.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 1
   1.1. O ambiente aquático amazônico e a disponibilidade de alimento.. 1
   1.2. As vitaminas na nutrição dos animais 2
   1.3. Importância das vitaminas nos animais 3
   1.4. Vitamina D 4
   1.5. Metabolismo da vitamina D 5
   1.6. O efeito da vitamina D e de sua deficiência na alimentação dos peixes 7
   1.7. A espécie *Colossoma macropomum* 9
   1.8. Objetivo 10
2. MATERIAIS E MÉTODOS 11
   2.1. Material biológico 11
   2.2. Transporte 11
   2.3. Aclimatação 11
   2.4. Desenho experimental 12
   2.5. Biometria 13
   2.6. Obtenção do material para análises hematológicas 13
   2.7. Rações 13
      2.7.1. Ingredientes 13
      2.7.2. Preparação da farinha de peixe 18
      2.7.3. Elaboração das rações 18
   2.8. Análises bromatológicas das rações 18
      2.8.1. Composição centesimal das rações 18
      2.8.2. Determinação da umidade 18
      2.8.3. Determinação da gordura 19
      2.8.4. Determinação da proteína bruta 20
      2.8.5. Determinação da fibra 21
      2.8.6. Determinação de cinza 22
   2.9. Análises dos parâmetros físico químicos da água 22

2.9.1. Amônia total ($NH_3 + NH_4^+$) 22
2.9.2. Nitrito 23
2.10. Análises do material biológico 23
2.10.1 Determinação de cinza dos ossos 23
2.10.2 Determinação do cálcio total e fósforo inorgânico dos ossos 24
2.10.3. Determinação do fósforo inorgânico plasmático 25
2.10.4. Determinação do cálcio plasmático 25
2.10.5. Determinação dos níveis plasmáticos de Na^+, K^+ 25
2.10.6. Determinação da concentração de magnésio nos ossos 26
2.11. Cálculos de ganho de peso e conversão alimentar 26
2.12. Análise Estatística 26
3. RESULTADOS 27
3.1. Sobrevivência e parâmetros físico químicos da água 27
3.2. Ganho de peso e conversão alimentar 27
3.3. Conteúdo plasmático de minerais 31
3.3.1. Níveis plasmáticos de fósforo inorgânico e cálcio total... 31
3.4. Cinza e minerais nos ossos 35
3.4.1. Cinza 35
3.4.2. Conteúdo de fósforo inorgânico e cálcio total nos ossos 35
4. DISCUSSÃO 41
4.1. Efeito da vitamina D na calcificação dos dentes 41
4.2. Ganho de peso e conversão alimentar 42
4.3. Efeito da vitamina D sobre os minerais 45
5. CONCLUSÕES 50
6. PERSPECTIVAS 51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 52

ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDAS

CaBP	Calcium Binding Protein
Ca^{++}	Íon cálcio
$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Hidroxiapatita
$CaCO_3$	Carbonato de Cálcio
Cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
$CaHPO_4.2H_2O$	Fosfato de cálcio dibásico dihidratado
$CuSO_4.5H_2O$	Sulfato de cobre penta-hidratado
g	Grama
H_3BO_3	Ácido bórico
HCl	Ácido clorídrico
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
K^+	Íon potássio
Kcal/kg	Kilocaloria por quilo
Kg	Quilograma
Km	Quilômetro
KIO_3	Iodato de potássio
mEq/L	Miliequivalente por litro
mg	Miligrama
mg/dl	Miligrama por decilitro
mg/L	Miligrama por litro
Mg	Magnésio
ml	Mililitro
$MnSO_4.H_2O$	Sulfato de maganês hidratado
N	Normal
Na^+	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato, reduzida
NaOH	Hidróxido de sódio

NH_4^+	Íon amônio
nm	Nanômetro
NO_2	Nitrito
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
PTH	Paratormônio
rpm	Rotações por minuto
UI	Unidade internacional
$ZnSO_4.7H_2O$	Sulfato de zinco hepta-hidratado
%	Percentagem
μg	Micrograma
μmol/L	Micromol por litro
<1mg/L	Menor que 1 miligrama por litro
1,25-$(OH)_2$-D_3	1,25-diidroxicolecalciferol-D_3
25-(OH)-D_3	25-hidroxicolecalciferol-D_3
24,25$(OH)_2$-D_3	24,25-dihidroxicolecalciferol-D_3

1. INTRODUÇÃO

1.1. O ambiente aquático amazônico e a disponibilidade de alimento

A bacia amazônica contribui com 20% de toda a água doce que deságua nos oceanos (Shubart, 1983). Nesta bacia, uma rede de igarapés e rios pequenos contribui para a formação dos rios de primeira ordem. Os diferentes corpos d'água, neste gigantesco complexo ambiental, podem apresentar-se ricos ou pobres em nutrientes. Isso acontece em função das diferenças geográficas e geológicas existentes ao longo do ambiente aquático. Cerca de 2000 mil espécies de peixes vivem neste ambiente (Junk, 1983).

As diferenças geológicas são responsáveis pelos tipos de água branca, preta e clara encontradas na região amazônica e pelas suas características químicas muito diversificadas. A água preta, proveniente dos escudos guianenses, e a clara, proveniente dos igarapés, são de modo geral pobres em cálcio e magnésio, resultando em pH ácido em torno de 4,0. A água branca, de origem andina, é rica em cálcio, o que lhe confere o pH próximo do neutro (Junk, 1983). Nestes corpos d'água, o conteúdo de sódio, potássio, fósforo e magnésio diferem de acordo com o tipo de água, variando em função da geologia dos solos onde eles são formados (Junk, 1983; Sioli, 1990).

O fósforo é o principal fator limitante da produtividade, assim como é responsável pela eutrofização dos ambientes aquáticos, principalmente viveiros de estações de aqüicultura (Castagnolli, 1992). No entanto, as águas desta região são pobres em fósforo. Segundo Esteves (1988), a produtividade de alguns lagos amazônicos está mais relacionada com a disponibilidade do oxigênio dissolvido e o regime de estratificação do sistema aquático do que com a disponibilidade de fósforo.

A vegetação encontrada neste ecossistema aquático fornece uma variedade de itens alimentares aos organismos que nele vivem, principalmente para os peixes (Junk, 1983; Shubart, 1983). Como a vegetação sofre influência do nível da água dos rios, a alimentação dos peixes também é afetada.

O hábito alimentar dos peixes amazônicos é muito diversificado: carnívoros, herbívoros, omnívoros com tendência a herbívoros e omnívoros com tendência a carnívoros (Junk, 1983). O estudo da morfologia do trato digestivo, da boca, dos dentes e dos rastros branquiais, juntamente com o conteúdo estomacal de algumas espécies, tem mostrado a diversidade do hábito alimentar dos peixes desta região (Santos, 1981; Soares *et al.*, 1986).

Na grande oferta de alimentos disponíveis aos peixes na floresta alagada e nos lagos amazônicos, encontram-se frutos, sementes e macrófitas aquáticas, entre os quais são conhecidos: salvínia (*Salvinia sp*), buriti (*Mauritia vinifera*) e tucumã (*Astrocaryun vulgare*), ricos em nutrientes como proteína, carboidrato, cinza e gordura (Pereira Filho *et al.*, 1987a), sendo confirmados como fonte de pró-vitamina A o buriti e o tucumã (Chaves & Pecnnik, 1949 *apud* Pereira Filho *et al.*, 1987a).

Os peixes omnívoros como o matrinxã aproveitam bem o conteúdo protéico e vitamínico do buriti e salvínia (Pereira Filho *et al.*, 1987b). O tambaqui, sendo também um peixe omnívoro com dentes apropriados para triturar frutos e sementes (Honda, 1974), aproveita a subida do nível das águas para satisfazer suas necessidades nutricionais. Além disso, o tambaqui possui numerosos rastros branquiais longos e finos que lhe permitem filtrar plâncton durante todo o seu ciclo de vida (Carvalho, 1981; Fim, 1995). Este peixe, provavelmente, encontra no plâncton uma fonte de vitamina D, como tem sido descrito para os peixes filtradores da água doce (Rao & Raghuramulu, 1996a; Sundell *et al.*, 1996).

1.2. As vitaminas na nutrição dos animais

As vitaminas são compostos orgânicos denominados micro nutrientes porque são necessárias ao organismo em pequenas quantidades para realizar funções específicas (Lehninger, 1990; Schmidt-Nielsen, 1996). De modo geral, não podem ser sintetizadas por seres humanos porque os animais superiores perderam esta capacidade (Stryer, 1992; Champe & Harvey, 1997). Com a exceção da vitamina D,

as demais são obtidas pela alimentação (Champe & Harvey, 1997). No entanto, alguns animais podem sintetizar vitaminas, como por exemplo, os ruminantes que sintetizam a vitamina K e algumas do complexo B. O ácido ascórbico (vitamina C) é sintetizado por alguns mamíferos, peixes pulmonados, répteis, anfíbios e a maioria das aves (Chatterjee, 1973). Esta vitamina, entretanto, não é sintetizada por muitos invertebrados, peixes teleósteos e algumas aves (Schmidt-Nielsen, 1996).

As vitaminas são classificadas em dois grupos. O grupo das hidrossolúveis é formado pelo ácido ascórbico (vitamina C) e as do complexo B, que são: tiamina (vitamina B_1), riboflavina (vitamina B_2), niacina (vitamina B_3), piridoxina (vitamina B_6), cobalamina (vitamina B_{12}), biotina, ácido pantotênico e ácido fólico. O grupo das lipossolúveis inclui retinol (vitamina A), ergocalciferol (vitamina D_2), colecalcifarol (vitamina D_3), filoquinona (vitamina K_1), menaquinona (vitamina K_2), menadiona (composto sintético da vitamina K) e o tocoferol (vitamina E), sendo o alfa-tocoferol o mais ativo (Lehninger, 1990; Champe & Harvey, 1997).

As hidrosolúveis são precursoras de coenzimas para as enzimas do metabolismo intermediário. As vitaminas pertencentes a este grupo, de modo geral, não são tóxicas e as quantidades armazenadas no corpo são pequenas. Quando tomadas em excesso são excretadas na urina (Lehninger, 1990; Stryer, 1992; Champe & Harvey, 1997).

No grupo das lipossolúveis, somente a vitamina K tem função de coenzima, sendo as outras absorvidas e transportadas com a gordura da dieta. Estes compostos não são facilmente excretados na urina e quantidades significativas de vitaminas A e D podem ser armazenadas no fígado e no tecido adiposo, com efeito tóxico (Lehninger, 1990; Champe & Harvey, 1997).

1.3. Importância das vitaminas nos animais

No final do século XIX e no início do século XX, foi descoberto que as dietas restritas a carboidratos, proteínas e gorduras eram deficientes do ponto de vista nutricional. Foi percebido, então, a necessidade de pequenas quantidades diárias

de outros nutrientes que mais tarde foram chamados de vitaminas (Lovell, 1989; Schmidt-Nielsen, 1996).

As vitaminas são indispensáveis na nutrição dos animais porque auxiliam na assimilação dos outros nutrientes, tendo funções específicas como a regeneração dos tecidos (vitamina A), a maturação das gônadas e a antioxidação dos fosfolipídios insaturados da membrana celular (Vitamina E), a calcificação dos ossos (vitamina D), a resistência às doenças (vitamina C e algumas vitaminas do complexo B), etc (Lovell, 1989; Castagnolli, 1992).

As necessidades orgânicas com relação às vitaminas não são as mesmas para todos os animais. Isso difere porque muitos organismos têm a capacidade de sintetizar no intestino algumas vitaminas através de microorganismos simbiônticos. Um exemplo disso é a vitamina K que é sintetizada por bactérias no trato digestivo dos mamíferos (Lovell, 1989; Schmidt-Nielsen, 1996).

A ausência de vitaminas pode resultar em distúrbios orgânicos. A deficiência da vitamina B_1, por exemplo, está associada à doença humana denominada de beribéri (Schmidt-Nielsen, 1996), enquanto a deficiência de vitamina D em humanos causa o raquitismo em crianças e a osteomalacia (amolecimento dos ossos) em adultos (Joint FAO/WHO, 1970; Lehninger, 1990). A osteomalacia é uma doença muito comum nas mulheres beduínas árabes devida ao excesso de roupas (Stryer, 1992).

Em peixes, a deficiência da vitamina C resulta em escolioses e lordoses (Lovell, 1989). Experimentos recentes mostraram que a adição de vitamina C na ração do tambaqui tem um efeito positivo contra o estresse, favorecendo o crescimento e o ganho de peso (Chagas, 1998).

1.4. Vitamina D

As vitaminas D são um grupo de esteróis que ocorrem na natureza e mais propriamente no organismo animal (Harper, 1982; Krause & Mahan, 1985). As formas precursoras das vitaminas D são o ergocalciferol-D_2 e o colecalciferol-D_3, ambos formados pela radiação ultravioleta do sol sobre o ergosterol (nas plantas) e

o 7-deidrocolesterol (na pele dos animais) (Joint FAO/WHO, 1970; Bell, 1978; Lovell, 1989).

O colecalciferol-D_3 é um composto com propriedade anti-raquítica, encontrado em grande quantidade no óleo de fígado de peixes e sintetizado pela ação dos raios ultravioletas da luz solar na pele dos animais (Bell, 1978; Harper, 1982).

Os animais terrestres que recebem exposição da luz solar geralmente não necessitam de vitamina D na dieta porque esse composto é sintetizado naturalmente. Porém, nas regiões onde a atividade solar é baixa, existe carência desta vitamina que pode ser obtida a partir de alimentos de origem animal como peixe rico em gorduras, ovos, fígado e manteiga (Joint FAO/WHO, 1970; Harper, 1982; Krause & Mahan, 1985; Lehninger, 1990).

Na composição química dos peixes, o conteúdo de vitamina D varia em função da faixa da coluna da água onde habitam (Rao & Raghuramulu, 1995). Para Lovell (1989), os peixes necessitam de vitamina D na dieta porque recebem pouca radiação ultravioleta, uma vez que a penetração dos raios solares alcança pouca profundidade nas águas naturais. No entanto, para Rao & Raghuramulu (1996a), os peixes filtradores da água doce em ambientes naturais encontram no plâncton uma fonte importante de vitamina D. Isso não acontece, entretanto, com este mesmo tipo de peixe quando cultivado em sistema intensivo e super-intensivo onde a alta densidade estocada exige uma grande renovação de água, inviabilizando a adubação e, consequentemente, a produção de plâncton, sendo necessário neste caso fornecer uma ração integralmente balanceada contendo todos os nutrientes indispensáveis para a manutenção biológica dos animais (Castagnolli & Cyrino, 1986; Castagnolli, 1992).

1.5. Metabolismo da vitamina D

Nos animais, a vitamina D_3 não tem atividade própria, sendo precursora de 1,25-diidroxicolecalciferol-D_3, o qual é considerado um hormônio por ser um tipo de

mensageiro produzido em um órgão para a regulação metabólica de outros tecidos (Lawson, 1980; Henry, 1980; Lovell, 1989; Lehninger, 1990).

A radiação ultravioleta produz reações fotoquímicas que atuam sobre o precursor inativo, o 7-deidrocolesterol, produzindo na pele dos animais o colecalciferol-D_3 (Bell, 1978; Lehninger, 1990). O colecalciferol-D_3 é hidroxilado duas vezes para produzir, primeiro no fígado, por uma reação que envolve o NADPH e o oxigênio, o 25-hidoxicolecalciferol-D_3 (25-(OH)-D_3) e, depois, nos rins, por uma reação que envolve o citocromo P_{450}, o 1,25-diidroxicolecalciferol-D_3 (1,25$(OH)_2$-D_3), o qual é transportado para o intestino delgado (Holick & DeLuca, 1978; Henry, 1980; Lawson, 1980; Naw, 1981; Champe & Harvey, 1997).

O metabólito mais potente da vitamina D é o 1,25-$(OH)_2$-D_3, cuja formação é rigidamente regulada pelo nível de fosfato e cálcio plasmático. A atividade da enzima 25-hidroxicolecalciferol-1-hidroxilase aumenta diretamente quando baixa o nível de fosfato plasmático ou indiretamente quando baixa o nível de cálcio plasmático que ativa a liberação do hormônio da paratireóide (PTH). A hipocalcemia resulta no aumento do 1,25$(OH)_2D_3$ cujo aumento reduz a atividade da enzima 1-hidroxilase (Naw, 1981; Champe & Harvey, 1997).

Na célula intestinal, ocorre um composto formado pelo 1,25-$(OH)_2$-D_3 e um receptor solúvel, que é transportado para o núcleo (Naw, 1981; Champe & Harvey, 1997) onde, ao interagir com o DNA, modula a transcrição da informação ao mRNA e afeta a síntese de uma proteína específica cálcio-ligante CaBP (Calcium Binding Protein) na mucosa intestinal para a ligação ao cálcio (Harper, 1982; Signorini & Signorini, 1993; Champe & Harvey, 1997). Os níveis iônicos de cálcio e fosfato plasmáticos são mantidos pelo mecanismo de síntese da proteína e a presença do hormônio (PTH) ou pela reabsorção do cálcio ósseo (Champe & Harvey, 1997). Quando os níveis de cálcio são altos, as células C da glândula tireóide são ativadas e o hormônio calcitonina é liberado para inibir a reabsorção óssea e promover a calcificação dos ossos (Naw, 1981).

As informações sobre o metabolismo da vitamina D em peixes ainda são poucas e contraditórias (Andrews *et al.*, 1980; Sundell & Björnsson, 1990; Rao & Raghuramulu, 1995; Larsson *et al.*, 1995). Experiências feitas com a *Tilapia mossambica* sugerem que peixes não sintetizam a vitamina D devido a ausência de uma rota fotoquímica (Rao & Raghuramulu, 1996b). A pro-vitamina D_3 existente em duas espécies marinhas (mackerels e sauries) não pode ser convertida para vitamina D_3 pela radiação ultravioleta da luz solar (Suzuki *et al.*, 1988). Por outro lado, experimentos *in vitro* com frozen skipjack (*Katsuwonus pelamis*) demonstraram a conversão da provitamina D_3 em vitamina D_3, pela exposição da carne dos peixes a radiação ultravioleta por um período de 15 horas (Hidaka *et al.*, 1989). Pesquisas recentes feitas com tilápias mostraram que o local de conversão da vitamina D_3 para seus metabólitos 25-(OH)-D_3 e 1,25$(OH)_2$-D_3 ocorrem no fígado, ao contrário dos mamíferos, nos quais a conversão do 1,25$(OH)_2$-D_3 ocorre no rim (Rao & Raghuramulu, 1998).

Por ser lipossolúvel, a absorção da vitamina D é facilitada quando administrada em dietas que contém um nível adequado de gordura. Segundo Deuel Jr. (1955), dietas contendo 5% foram mais eficientes na absorção da vitamina D do que dietas que continham entre 10 e 20 % de gorduras. O bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) também assimilou a vitamina D de uma dieta contendo 8% de óleo de soja (Lovell & Li, 1978).

1.6. O efeito da vitamina D e de sua deficiência na alimentação dos peixes

A vitamina D é importante pelo seu efeito anti-raquítico em todos os animais (Deuel Jr., 1955; Lehninger, 1990). No entanto, é a mais tóxica de todas as vitaminas, sendo armazenada no organismo e lentamente metabolizada (Champe & Harvey, 1997).

O excesso deste composto pode ter efeito nocivo para alguns animais. Em seres humanos, por exemplo, doses acima de 1,5 mg/dia são tóxicas (Lehninger, 1990). Segundo Champe & Harvey (1997), doses em torno de 2,5 mg (100 mil UI)

ingeridas durante semanas ou meses podem causar perda de apetite, náuseas, sede e estupor, podendo resultar também no aumento da absorção do cálcio e reabsorção óssea, causando hipercalcemia, a qual pode causar o depósito de cálcio em muitos órgãos principalmente artérias e rins. O efeito contrário ao que acontece com seres humanos foi visto nos peixes (channel catfish) alimentados com 25 mg (1 milhão de UI) por kg de dieta e não apresentaram nenhum efeito tóxico (Brown, 1988). Este efeito também foi verificado em focas, que alimentadas com 10 mg (400 mil UI) de vitamina D_3 diariamente, apresentaram alta capacidade em armazenar este composto na massa de gordura sem nenhum efeito tóxico (Keiver *et al.*, 1988).

As pesquisas sobre o metabolismo da vitamina D em peixes ainda são incipientes. Assume-se, entretanto, que seu papel fisiológico nestes animais é similar aos animais de sangue quente. No entanto, assim como acontece com os outros nutrientes, a necessidade das vitaminas para estes animais varia com a espécie, tamanho, taxa de crescimento, nutrientes interrelacionados, meio ambiente (temperatura e toxidade) e funções metabólicas (crescimento, resposta ao estresse, resistência a doenças) (Lovell, 1989).

A importância da vitamina D para o crescimento dos peixes foi comprovada para várias espécies. Lovell & Li (1978) alimentou o bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) com uma dieta deficiente em vitamina D por 15 semanas ocorrendo redução do ganho de peso e da taxa de fixação de cálcio e fósforo. Teste de dois níveis de vitamina D_3, 0,25 e 2,5 μg (10 e 100 UI) por 100g de peso corporal foi realizado em carpa (*Cyprinus carpio*) durante 10 dias, resultando em aumento dos níveis de cálcio em todos os tratamentos, enquanto o fósforo inorgânico foi mais elevado nos grupos testados em 3 e 5 dias (Swarup *et al.*, 1991). A interação do cálcio com a vitamina D foi testada em tilápia (*Oreochromis aureus*). Animais que receberam dietas com suplemento de cálcio apresentaram maior ganho de peso, maior incorporação de cálcio e fósforo nos ossos, do que os animais que receberam dietas sem cálcio, enquanto que o suplemento de vitamina D_3 produziu

diferenças significativas nestes parâmetros não tendo sido, entretanto, consistente em todos os tratamentos (O'Connell & Gatlin, 1992).

A deficiência da vitamina pode apresentar distúrbios provenientes da absorção irregular do cálcio. A truta arco-íris alimentada com ração deficiente em vitamina D apresentou menor ganho de peso e incidência de tétano causado pela hipocalcemia plasmática (Barnett *et al.*, 1982a).

Os metabólitos da vitamina D tem efeitos diretos sobre os níveis do cálcio plasmático. Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) respondeu a injeções de 10 μg de 1,25-$(OH)_2$-D_3 com o aumento das concentrações do cálcio ionizado no plasma (Sundell *et al.*, 1993).

A vitamina D pode ser importante na nutrição de peixes em cativeiro para aumentar a fixação de cálcio e fósforo no tecido ósseo, acelerando o crescimento e proporcionando maior ganho de peso. Isto ocorre porque, segundo Castagnolli (1992), quando se trata de cultivo intensivo a alta densidade de estocagem exige uma intensa renovação de água. A alta renovação de água impede a produção e a retenção de plâncton no viveiro, fazendo com que toda necessidade nutricional seja fornecida pela ração.

1.7. A espécie *Colossoma macropomum*

Colossoma macropomum (Characiformes, Serrasalmidae) é uma espécie de peixe nativa da bacia Amazônica conhecida popularmente por tambaqui. Está entre as espécies importantes, de alto valor comercial, desembarcadas no mercado de Manaus (Bayley & Petrere Jr., 1989). O seu hábito alimentar é omnívoro com tendência a herbívoro, filtrador e frutívoro. Entre os alimentos do tambaqui são conhecidos: abio, abiorana, araçá, caju-rana, catanarí, maracujá, araparí, arroz bravo, catoré, janarí, jenipapo, pupunharana, seringa barriguda, plâncton, insetos e caramujos (Smith, 1979; Araújo Lima & Goulding, 1998). Este peixe chega a atingir na natureza cerca 1 metro de comprimento, 30 Kg de peso e maturação gonadal aos 55 cm de comprimento (Bayley & Petrere Jr., 1989).

O tambaqui é um peixe rústico com tecnologia de cultivo conhecida que se adapta bem ao cativeiro. Tolera baixos níveis de oxigênio dissolvido na água. Quando os níveis de oxigênio atingem valores menores do que 2 ppm o animal distende o lábio inferior para explorar a camada superficial da coluna da água, canalizando água com mais oxigênio para as brânquias (Val, 1993; Almeida-Val *et al.*, 1993; Almeida-Val & Val, 1995). A capacidade respiratória do tambaqui se deve a grande área de superfície branquial e ao recurso de aumentar a ventilação branquial o que facilita a captação de uma maior quantidade de oxigênio da água quando se encontra em água hipóxicas (Saint-Paul, 1984; Araújo Lima & Goulding, 1998).

Quando o nível de oxigênio na água é muito baixo, o mecanismo respiratório do tambaqui se ajusta para maximizar a tomada de oxigênio. Nestas condições, o animal utiliza adaptações fisiológicas, aumenta a concentração de hemoglobina, o número de eritrócitos, o hematócrito e diminui o metabolismo aeróbico (Val, 1986; Almeida-Val & Val, 1990; Val, 1996).

A sobre-exploração do tambaqui levou o IBAMA a decretar a proibição da sua pesca na época do período reprodutivo (Bayley & Petrere Jr., 1989; Falabella, 1994), o que resulta em aumento da demanda sobre os animais oriundos das fazendas de criação.

Alguns pesquisadores tem estudado as exigências nutricionais do tambaqui e valores entre 18 e 25 % de proteína bruta e os valores de energia bruta e digestível entre 2500 e 3500 Kcal/kg de ração tem apresentado bons resultados (Carneiro, 1981; Carneiro Sobrinho *et al.*, 1989; Roubach, 1991; Andrade *et al.*, 1993; Bock *et al.*, 1998).

1.8. Objetivo

Verificar o efeito da vitamina D no ganho de peso, na fixação de cálcio e fósforo no tecido ósseo e nos níveis plasmáticos destes íons em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques (condições experimentais).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com comprimento médio de 9,5 cm e peso médio 39 gramas foram adquiridos na Fazenda Litiara (Amazon Fish), localizada no km 251 da estrada Manaus-Itacoatiara. Em seguida, foram transportados ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do INPA.

2.2. Transporte

Os animais foram acondicionados em sacos plásticos com capacidade para 50 litros (20 peixes em cada saco), contendo 20 litros de água. Na água foram adicionados 5 gramas de cloreto de sódio (NaCl), 500 mg de tetraciclina e 500 mg de terramicina, com objetivo de prevenir o aparecimento de enfermidades e fungos, devido a perda do muco causada pelo manuseio da captura e o estresse causado pelo transporte. O volume do saco foi completado com oxigênio e a boca do mesmo foi amarrada com tiras de borracha. Os sacos foram acondicionados em caixas de isopor (2 sacos em cada caixa), sendo colocado em cada caixa 10 litros de água para manter a temperatura dos sacos constante com o auxílio de um pouco de gelo o qual foi colocado aos poucos quando necessário, conseguindo-se com isso mortalidade zero no transporte.

2.3. Aclimatação

No laboratório, após o equilíbrio da temperatura e do pH entre as águas do sacos e dos tanques, os animais foram acondicionados em 4 tanques de 500 litros (54 peixes em cada tanque) onde foram aclimatados por um período de 30 dias. Os tanques eram equipados com um sistema de filtro biológico e a água foi renovada à razão de 200 litros por semana. Os peixes foram alimentados com ração comercial (32% de proteína bruta) até o início do período de aclimatação experimental. Durante o

período referente ao experimento, os animais foram aclimatados e alimentados com ração devidamente balanceada de acordo com o desenho experimental.

2.4. Desenho experimental

O experimento constou de 3 tratamentos e foram utilizados 9 tanques de capacidade para 500 litros. Foram colocados 21 peixes em cada tanque e o experimento teve duração de 60 dias. Foram utilizados 2 tanques para cada tratamento, sendo que cada tratamento teve um terceiro como tanque reserva. Este tanque reserva foi mantido nas mesmas condições correspondente ao tratamento: população, ração e qualidade da água idênticas. De cada um dos 2 tanques de cada tratamento foram retirados 8 animais, a cada 30 dias, para análises laboratoriais, sendo em seguida feita a reposição dos 8 peixes com animais do tanque reserva devidamente marcados, para manter a densidade constante nos tanques experimentais. Durante o período experimental, os tanques foram cobertos com polietileno preto e a superfície da água foi iluminada durante 8 (8:16) horas com lâmpada fluorescente 20 watts. O alimento foi fornecido "ad libitum" (até a saciedade) no início da manhã e no final da tarde. No experimento, foram utilizadas rações práticas (elaboradas com ingredientes convencionais), isoprotéicas e isocalóricas (Quadro 1, Tabelas 1, 2 e 3) balanceadas pelo método do "Quadrado de Pearson". O cálculo base das rações foi 22% de proteína bruta e 3650 Kcal/kg. As rações foram diferentes quanto a adição de vitamina D: na ração 1 não foi adicionada vitamina D, nas rações 2 e 3, foram adicionados 250 e 1000 UI (6,25 e 25 μg) de vitamina D "colecalciferol D_3", respectivamente, por Kg de ração. O grupo controle foi alimentado com a ração 1. Os níveis protéicos e energéticos determinados para as rações são considerados ótimos para tambaqui conforme pesquisas anteriores (Carneiro, 1981; Carneiro Sobrinho *et al.*, 1989; Roubach, 1991; Andrade *et al.*, 1993; Bock *et al.*, 1998).

Durante todo o período experimental, a água dos tanques foi renovada em 200 litros por semana, a iluminação foi controlada igualmente para cada tanque, o

oxigênio, o pH e a temperatura foram monitorados diariamente e a água dos tanques foi analisada semanalmente para verificar a presença de amônia e nitrito.

2.5. Biometria

A biometria foi feita medindo-se todos os peixes de cada tanque com auxílio de um ictiômetro, determinando-se o comprimento padrão em milímetros. O peso foi determinado em balança com precisão de 3 casas decimais e os valores foram expressos em gramas. Este procedimento foi feito no início do experimento e após 15, 30 e 60 dias.

2.6. Obtenção do material para análises hematológicas

A obtenção do sangue para as análises dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo inorgânico foi feita por punção da veia caudal com o auxílio de seringas heparinizadas.

2.7. Rações

2.7.1. Ingredientes

As rações foram elaboradas com ingredientes adquiridos no comércio de Manaus, exceto a farinha de peixe que foi preparada no laboratório da Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos (CPTA) do INPA por não ter sido encontrada no comércio e o premix que foi doado pela empresa Agribrands Purina do Brasil Ltda. O premix foi baseado na formulação para peixes de águas quentes (Quadro 1) (N.R.C. 1977).

Quadro 1. Fórmula do premix isento de vitamina D utilizado nas rações 1, 2 e 3. Para as rações 2 e 3 foram acrescidos 250 e 1000 UI/kg de dieta. As quantidades estão calculadas para 1 kg de dieta.

Ingredientes	Quantidades
Vitamina A	5500 UI
Vitamina E	50 UI
Vitamina K	10 mg
Colina	550 mg
Niacina	100 mg)
Riboflavina	20 mg
Piridoxina	20 mg
Tiamina	20 mg
Pantotenato de cálcio-D	50 mg
Biotina	0,1 mg
Ácido fólico	5 mg
Vitamina B_{12}	20 μg
Ácido ascórbico	500 mg *
$CaCo_3$	7,5 g
$MnSO_4.H_2O$	0,3 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,7 g
$CuSO_4.5H_2O$	0,06 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,5 g
NaCl	7,5 g
KIO_3	0,002 g
$CaHPO_4.2H_2O$	20 g

Fontes: N.R.C. (1977), (*) Chagas (1998)

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes nas 3 rações que foram oferecidas aos peixes nos 3 tratamentos.

Ingredientes	Ingredientes (%)
Fubá de milho	33,15
Farelo de trigo	12,37
Farelo de soja	31,48
Farinha de peixe	5,00
Farinha de trigo	10,00
Óleo vegetal	4,00
Premix mineral+vitamina	4,00

Tabela 2. Composição centesimal dos ingredientes utilizados na elaboração das rações experimentais.

Composição	Ingredientes				
	Fubá de milho	Farelo de soja	Farelo de trigo	Farinha de peixe	Farinha de trigo
Umidade	10,97	13,69	11,89	3,52	12,83
Gordura	4,16	2,07	4,08	13,17	0,71
Proteína	7,61	44,16	14,26	57,35	9,40
Fibra	1,56	5,30	6,10	-	-
Cinza	0,28	4,84	4,21	5,63	0,53
Carboidrato	75,42	29,94	59,46	20,33	76,53
Energia Digestível	3695	3150	3316	4292	3501

Tabela 3. A composição centesimal das rações utilizadas durante o experimento.

	Ração 1	Ração 2	Ração 3
Umidade (%)	7,1	6,0	6,2
Proteína (%)	22,0	22,3	22,6
Gordura (%)	6,5	5,7	6,2
Carboidrato (%)	54,8	57,2	56,1
Fibra (%)	3,0	3,0	2,2
Cinza (%)	6,6	5,8	6,7
Energia (Kcal/kg dieta)	3657	3693	3706

2.7.2. Preparação da farinha de peixe

A farinha de peixe foi feita com jaraqui (*Semaprochilodus sp*). Os peixes foram descabeçados e eviscerados para eliminar a gordura e diminuir o conteúdo de vitamina D. Em seguida, foram cozidos e prensados para retirada de água. Toda a massa foi seca em estufa com circulação mecânica de ar a 70°C durante 48 horas, sendo moída em moinho de carne e armazenada em refrigerador.

2.7.3. Elaboração das rações

Os ingredientes utilizados nas rações (Tabela 1) foram balanceados, segundo o método do quadrado de Pearson. Os ingredientes mais pesados da ração foram pesados em balança marca Filizola com precisão de 0,1 g, enquanto o premix foi pesado em balança analítica com precisão de 5 casas decimais, sendo, em seguida, todo o volume de materiais misturados manualmente. Após a mistura, foi acrescentado mais ou menos 30 % de água e peletizados no moinho de carne. Depois de pronta, a ração foi seca em uma estufa de ar circulante a 45°C durante 12 horas.

2.8. Análises bromatológicas das rações

2.8.1. Composição centesimal das rações

Os ingredientes da ração foram inicialmente analisados para determinar a composição centesimal e, em seguida, os dados bromatológicos dos ingredientes (Tabela 2) foram utilizados para o balanceamento das rações. Após ter sido elaborada a ração, foi feita a análise bromatológica da mesma (Tabela 3).

2.8.2. Determinação da umidade

A umidade foi determinada segundo Ascar (1985). O método consiste em pesar aproximadamente 5 gramas de amostra em cápsulas de alumínio livre de

umidade e peso previamente determinado, colocar em estufa a 105°C até peso constante. O cálculo da umidade é feito segundo a formula:

Umidade = (Pi – Pf) x 100 / g

Onde:

Pi = Peso inicial (peso da cápsula + amostra úmida)

Pf = Peso final (peso da cápsula + amostra seca)

g = Gramas de amostra utilizada

2.8.3. Determinação da gordura

A determinação dos níveis de gordura foi feita segundo o método de Soxhlet descrito por Ascar (1985). Foram pesados cerca de 5 gramas de amostra seca em uma balança analítica Mettler H80 com precisão de 0,0001 g, em seguida colocada em cartucho feito com papel de filtro e tampado com algodão para evitar saída da amostra. O cartucho com a amostra foi colocado no extrator de Soxhlet conectado a um balão de vidro de 500 ml, no qual foi adicionado 150 ml de éter etílico. O refluxo com éter foi feito com o auxílio de um conjunto aquecedor de marca Marconi durante 24 horas. Após o refluxo e a recuperação do éter, a gordura foi recolhida em um béquer de 80 ml com peso previamente conhecido, o qual após a evaporação do restante do éter foi colocado em estufa a 105°C até peso constante e o cálculo foi feito com a fórmula:

%Gordura = (Bg-Bv) x 100 / PA x FCU

Onde:

Bg = peso do béquer + gordura

Bv = peso do béquer vazio

PA = peso da amostra seca

FCU = fator de correção da umidade

FCU = 100 / MS

MS = 100 - % Umidade

2.8.4. Determinação da proteína bruta

A determinação da proteína bruta seguiu o método de Kjeldahl (AOAC, 1975). Em uma balança analítica Mettler H80 foram pesados 0,02 gramas de amostra seca e colocadas em tubos de ensaio de 80 ml. Em seguida, foram colocados 5 ml de ácido sulfúrico concentrado e adicionado aproximadamente 1,0 g de mistura catalisadora composta de sulfato de potássio e 10% de sulfato de cobre. Os tubos com todo o material foram colocados em uma capela com bloco digestor Tecnal mod TE 40/250 e aquecidos a 350°C por 4 horas. Após a digestão, as amostras foram transferidas para tubos do destilador, adicionando-se 15 ml de hidróxido de sódio 40%. A destilação foi feita em destilador Tecnal mod TE 036/1. O destilado foi recolhido em um erlenmeyer de 250 ml, contendo 5 ml de uma solução de ácido bórico saturado (H_3BO_3) mais 2 gotas de uma mistura de vermelho de metila e azul de metileno (2:1), fazendo a destilação até completar 50 ml. A titulação foi feita com ácido clorídrico 0,02 N.

Os cálculos foram feitos obedecendo a fórmula:

Proteína bruta(%) = (VTA – VTB) FA x 0,2802 x 6,25 x 100 / PA x FCU

Onde:

VTA = volume do ácido clorídrico gasto na titulação da amostra

VTB = volume do ácido clorídrico gasto na titulação do branco

FA = fator de diluição do ácido clorídrico

PA = peso da amostra em miligramas

FCU = fator de correção da umidade

2.8.5. Determinação da fibra

Para a determinação da fibra foi utilizado o método de Henneberg, como descrito em Ascar (1985). O método consiste de uma digestão ácida seguida de outra alcalina. Foi pesada, em uma balança analítica Mettler H80 com precisão de 0,0001 g, aproximadamente 1 grama de amostra seca e desengordurada, que foi colocada em um erlenmeyer de 500 ml com tubo de refluxo, sendo adicionado 100 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1,25% e aquecido em ebulição no bloco aquecedor de marca Marconi por 30 minutos. Em seguida, o conteúdo foi filtrado em outro erlenmeyer e a amostra foi lavada com água destilada a 100°C até atingir o pH próximo do neutro.

A amostra foi transferida de volta ao erlenmeyer com tubo de refluxo, sendo adicionado 100 ml de hidróxido de sódio (NaOH) 1,25%, retornando ao aquecimento em ebulição por 30 minutos. Em seguida, o conteúdo foi filtrado em papel de filtro com peso e fibra conhecidos, para depois serem descontados o peso e a fibra do papel de filtro, sendo lavado com água destilada a 100°C até o pH próximo do neutro. Após a lavagem, o papel de filtro dobrado foi colocado em cadinho de porcelana previamente pesado e levado à estufa a 105°C por 12 horas, sendo em seguida pesado e incinerado a 550°C em uma mufla Quimis modelo 318D24 por 12 horas. À 100°C, os cadinhos foram retirados, esfriados em dessecador e pesados. Os cálculos foram feitos conforme a fórmula:

Fibra total = (PCA – PCC)100 / PA x FCUG

Onde:

PCA = peso do cadinho + Amostra – Fibra do papel de filtro

PCC = peso do cadinho + cinza

PA = peso da amostra em gramas

FCUG = fator de correção da umidade + gordura

Onde:

FCUG = 100 / (100 – U – G), sendo:

U = Umidade %

G = Gordura %

2.8.6. Determinação de cinza

Para a determinação de cinza foi utilizado o método de incineração dupla como descrito em Ascar (1985). Para tanto, foi pesado em uma balança analítica Mettler H80 com precisão de 0,0001 g, aproximadamente 1 grama de amostra seca e desengordurada. Em seguida, foi feita a queima prévia com o bico de Bunsen, sendo incinerado em uma mufla da marca Quimis modelo 318D24 por 24 horas. Depois de desligada e a mufla atingir temperatura de 100°C, os cadinhos foram retirados e esfriados em dessecador, pesados e os cálculos foram feitos seguindo a fórmula:

% cinza = (Pi – Pf) x 100 / PA x FCUG

Onde:

Pi = peso do cadinho + amostra

Pf = peso do cadinho + cinza

PA = peso da amostra (g)

FCUG = fator de correção da umidade + gordura

2.9. Análises dos parâmetros físico químicos da água

2.9.1. Amônia total ($NH_3 + NH_4^+$)

Os níveis de amônia foram avaliados por ensaio colorimétrico, segundo Verdouw *et al.* (1978). O método consiste na reação da amônia com salicilato de sódio e hipoclorito de sódio, utilizando como catalisador o nitroprussiato de sódio que

depois de 90 minutos de incubação produz uma cor azul. A absorbância foi lida no espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm. Os cálculos foram feitos pela equação da reta da curva de calibração, e os resultados foram expressos em μmol/L.

2.9.2. Nitrito

Os níveis de nitrito foram avaliados segundo Boyd (1984). O método consiste na reação do nitrito com uma solução ácida de sulfanilamida em ácido clorídrico que ao reagir com n(1-naftil) apresenta uma coloração rosa. A leitura foi feita no espectrofotômetro na absôrbância de 543 nm. Os cálculos foram feitos pela equação da reta da curva de calibração, e os resultados foram encontrados em NO_2^- N mg/L, sendo, em seguida, convertidos para NO_2^- mg/L através do produto pelo fator 3,28 encontrado pela fórmula:

Fator NO_2^- (mg/L) = 1mg/L de NO_2^-N x (46,01 mg de NO_2^- / 14,01 mg de N)

2.10. Análises do material biológico

2.10.1. Determinação de cinza dos ossos

A composição centesimal de cinza dos ossos foi determinada conforme a técnica utilizada no Instituto Adolfo Lutz segundo ASCA (1985). O método consiste em pesar a amostra em um cadinho de porcelana, carbonizar com o bico de Bunsen em chama baixa, e incinerar pelo método da incineração dupla em uma mufla Quimis modelo 318D24 na temperatura de 550°C. As amostras utilizadas foram os ossos da coluna vertebral do peixe inteiro. A obtenção das amostras foi feita com os peixes cozidos. Para tanto a carne foi retirada, os ossos foram desengordurados com éter durante 12 horas, sendo em seguida secos em estufa à 105°C, triturados e incinerados pelo método descrito acima. Os cálculos foram feitos como descrito na fórmula abaixo e os resultados expressos como percentagem do osso seco.

% cinza = (Pi – Pf) x 100 / PA

Onde:

Pi = peso do cadinho + amostra seca

Pf = peso do cadinho + cinza

PA = peso da amostra seca (g)

2.10.2. Determinação do cálcio total e fósforo inorgânico dos ossos

A preparação das amostras foi feita segundo Rao & Raghuramulu (1995), utilizando-se a cinza resultante da incineração em mufla (550°C). A cinza foi diluída em 1,5 ml de ácido clorídrico (HCl) 6N, centrifugadas e o sobrenadante foi separado e diluído para 100 ml com água deionizada. Esta solução foi utilizada para a determinação do cálcio e do fósforo com o auxílio dos kits da marca Doles. Os resultados são expressos como percentagem em relação ao osso seco.

i) **Cálcio total:** o kit consiste em determinar o cálcio colorimetricamente através de um complexo corado com cresolftaleína em meio alcalino, resultando numa cor azul. A leitura da absorbância foi feita no espectrofotômetro em 570 nm. Os cálculos foram feitos seguindo a fórmula do kit e depois convertidos para percentagem em relação ao osso seco.

Cálcio (mg/dl) = Absorbância da amostra x 10 /Absorbância do padrão

ii) **Fósforo inorgânico:** o fósforo presente na amostra reage com o molibdato de amônio em meio ácido, formando um complexo fosfomolibdato. A adição de uma solução alcalina permite que este complexo seja reduzido pelo ácido ascórbico, dando origem a um novo complexo fosfomolibdato de cor azul. A absorbância das amostras foi lida no espectrofotômetro em 660 nm. Os

cálculos foram feitos seguindo a fórmula do kit e depois convertidos para percentagem em relação ao osso seco.

Fósforo inorgânico (mg/dl) = Absorbância da amostra x 5 / Absorbância do padrão

2.10.3. Determinação do fósforo inorgânico plasmático

O fósforo inorgânico no plasma foi determinado com o auxílio do kit Doles como descrito acima. Os valores foram expressos em mg/100 ml.

2.10.4. Determinação do cálcio plasmático

Para a determinação dos níveis de Ca^{++}, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos para a separação do plasma. Posteriormente as amostras de plasma e o padrão foram diluídos 1:50, adicionando-se às amostras 10% de uma solução de cloreto de lantânio 2% para disponibilização do cálcio total. A leitura das amostras foi feita com o auxílio de um fotômetro de chama CELM FC180 calibrado com o padrão de 10 mEq/L. Os resultados das concentrações de Ca^{++} foram expressos em mEq/L.

2.10.5. Determinação dos níveis plasmáticos de Na^+, K^+

Para a determinação dos níveis de Na^+ e K^+, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos para a separação do plasma. Posteriormente as amostra de plasma foram diluídas 200 vezes em água deionizada utilizando-se um diluidor automático CELM DA200. Os padrões de Na^+ 150 mEq/L e K^+ 7 mEq/L também foram diluídos (1:200) com água deionizada. A leitura das amostras foi feita com o auxílio de um fotômetro de chama CELM FC180 e os resultados das concentrações iônicas do plasma (Na^+ e K^+) foram expressas em mEq/L.

2.10.6. Determinação da concentração de magnésio nos ossos

Para determinar os níveis de magnésio nos ossos foi utilizado o kit da marca Doles. O processo consiste em reagir o magnésio em meio alcalino produzindo um complexo corado frente ao corante de Mann e Yoe. A intensidade da cor formada é proporcional a concentração de magnésio. Os resultados foram calculados pela fórmula abaixo e depois convertidos para percentagem em relação ao osso seco.

Mg^{++} (mg/dl) = (absorbância da amostra x 2) / absorbância do padrão.

2.11. Cálculos de ganho de peso e conversão alimentar

a) Ganho de peso: o ganho de peso foi calculado segundo a fórmula:

Ganho de peso %= (Pf-Pi)x100/Pi

Onde:

Pf= peso final (g)

Pi= peso inicial (g)

b) Conversão alimentar: a taxa de conversão alimentar foi calculada segundo a fórmula:

Conversão alimentar = Quantidade de alimento (g) / ganho de peso em (g)

2.12. Análise Estatística

A significância das diferenças encontradas entre as médias para os parâmetros analisados foram estimados por análise de variância (ANOVA), com emprego do teste post-hoc de Tukey com nível de significância de 5%. Os valores foram expressos como média±SEM (erro padrão da média).

3. RESULTADOS

3.1. Sobrevivência e parâmetros físico químicos da água

A sobrevivência no período experimental foi de 81% nos peixes alimentados com ração sem suplemento de vitamina D, e de 100% nos alimentados com ração contendo 250 e 1000 unidades internacionais. Durante os 60 dias de experimentação, os parâmetros físico-químicos da água permaneceram sem alteração significativa entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 4).

Aos 30 dias do período experimental, alguns peixes alimentados sem suplemento de vitamina D (43%) e com suplemento de 250 UI de vitamina D (38%), apresentaram problemas evidentes de calcificação nos dentes (Figura 1). Os dentes ficavam moles e caiam, enquanto, os peixes alimentados com 1000 UI de vitamina D apresentaram dentes saudáveis.

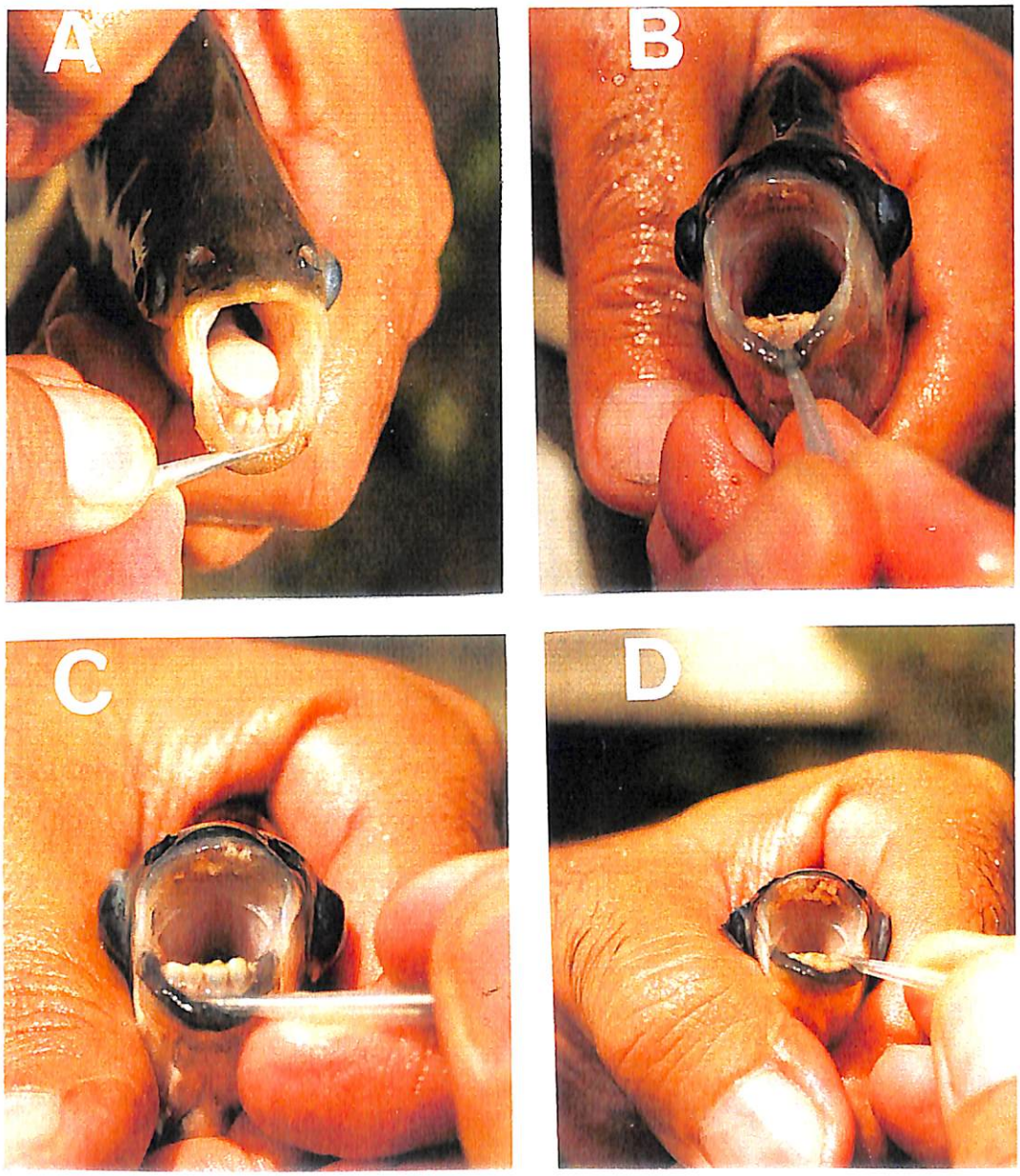
3.2. Ganho de peso e conversão alimentar

O ganho de peso dos animais alimentados com 0, 250 e 1000 UI de vitamina D não apresentou diferença nos primeiros 15 dias. No entanto, aos 30 e 60 dias, os animais alimentados com dietas contendo suplemento de vitamina D apresentaram aumento significativo, sendo os maiores ganhos observados para os animais que receberam 1000 UI (Tabela 5).

A relação da biomassa com o tempo de alimentação mostrou que o aumento de peso nos animais alimentados com 0 UI de vitamina D foi menor do que naqueles que receberam vitamina D. Nos períodos de 15 e 30 dias, os grupos de animais que receberam vitamina D apresentaram maior biomassa que o controle mas iguais entre si.

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos da água dos tanques medidos durante o período experimental com *Colossoma macropomum* alimentados com diferentes níveis de vitamina D_3. Os valores estão apresentados como média ± SEM.

Tratamentos	pH	Oxigênio (mg/L)	Temperatura (°C)	Amônia (μMol/L)	Nitrito (mg/L)
0 UI	5,91±0,04	6,00±0,10	25,83±0,10	15,77±4,66	0,102±0,039
250 UI	5,86±0,05	5,93±0,07	25,85±0,10	16,03±4,37	0,137±0,048
1000 UI	5,93±0,05	5,91±0,10	25,86±0,10	15,58±3,73	0,111±0,035



Fotos: Levy C. Gomes

Figura 1. A deficiência da vitamina D causou problemas de calcificação nos dentes do *Colossoma macropomum*: peixe com dentes saudáveis (A); peixes com dentes descalcificados e mesmo perda dos dentes (B,C e D), observados entre aqueles que não receberam vitamina D ou receberam baixos níveis da vitamina.

Tabela 5. Valores de ganho de peso (%) de *Colossoma macropomum* alimentados durante 60 dias com 3 níveis diferentes de vitamina D_3. Os valores estão expressos como média ± SEM. (*) indica diferença significativa (P<0,05) em relação ao controle.

	Ganho de peso %		
Tratamento	**15 dias**	**30 dias**	**60 dias**
0 UI	22,3±4,9	40,6±1,9	58,4±8,5
250 UI	34,3±4,6	55,8±4,6 *	106,0±9,4 *
1000 UI	35,4±1,4	59,7±1,3 *	137,7±3,8 *

No período de 60 dias, o aumento de peso foi significativamente maior comparado ao controle, sendo o aumento de peso progressivo em relação a quantidade de vitamina D na dieta (Figura 2).

A conversão alimentar manteve-se constante nos primeiros 30 dias em todos os grupos. Entretanto, no período de 60 dias, foi significativamente diferente para os animais alimentados com vitamina D, sendo menor na razão direta do aumento do nível de vitamina D na ração (Tabela 6).

3.3. Conteúdo plasmático de minerais

3.3.1. Níveis plasmáticos de fósforo inorgânico e cálcio total

Quando alimentados com ração deficiente em vitamina D, *Colossoma macropomum* apresentou redução dos níveis plasmáticos de fósforo inorgânico. Os animais alimentados com 250 UI de vitamina D apresentaram tendência a aumentar os níveis do mineral no plasma. No entanto, nos animais alimentados com 1000 UI de vitamina D o aumento destes níveis foi significativo (Figura 3 A).

Nos primeiros 30 dias de alimentação, os níveis de cálcio no plasma dos animais alimentados com ração deficiente em vitamina D apresentaram valores significativamente mais elevados do que dos animais que receberam ração contendo suplemento de vitamina D. No entanto, no período de 60 dias de alimentação, os animais alimentados com ração deficiente em vitamina D apresentaram valores significativamente mais baixos quando comparados aos animais que receberam 250 e 1000 UI de vitamina D_3 (Figura 3 B).

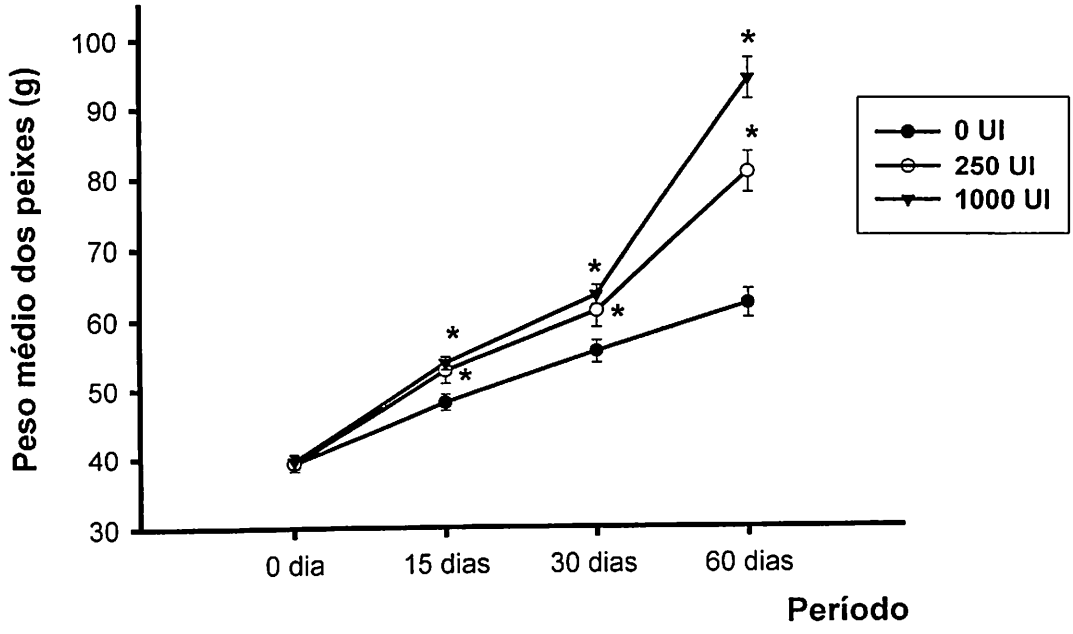


Figura 2. Peso médio (gramas) de *Colossoma macropomum* alimentados com vários níveis de vitamina D_3 ao longo do período experimental. (*) indica diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao controle.

BIBLIOTECA DO INPA

Tabela 6. Valores da conversão alimentar de *Colossoma macropomum* alimentados com vários níveis de vitamina D_3 durante o período de 60 dias. Os resultados estão expressos como média ± SEM. (*) indica diferença significativa (P<0,05) em relação ao grupo controle.

Tratamentos	30 dias	60 dias
0 UI	1,37±0,23	2,10±0,04
250 UI	0,91±0,08	1,01±0,09 *
1000 UI	0,81±0,00	0,82±0,00 *

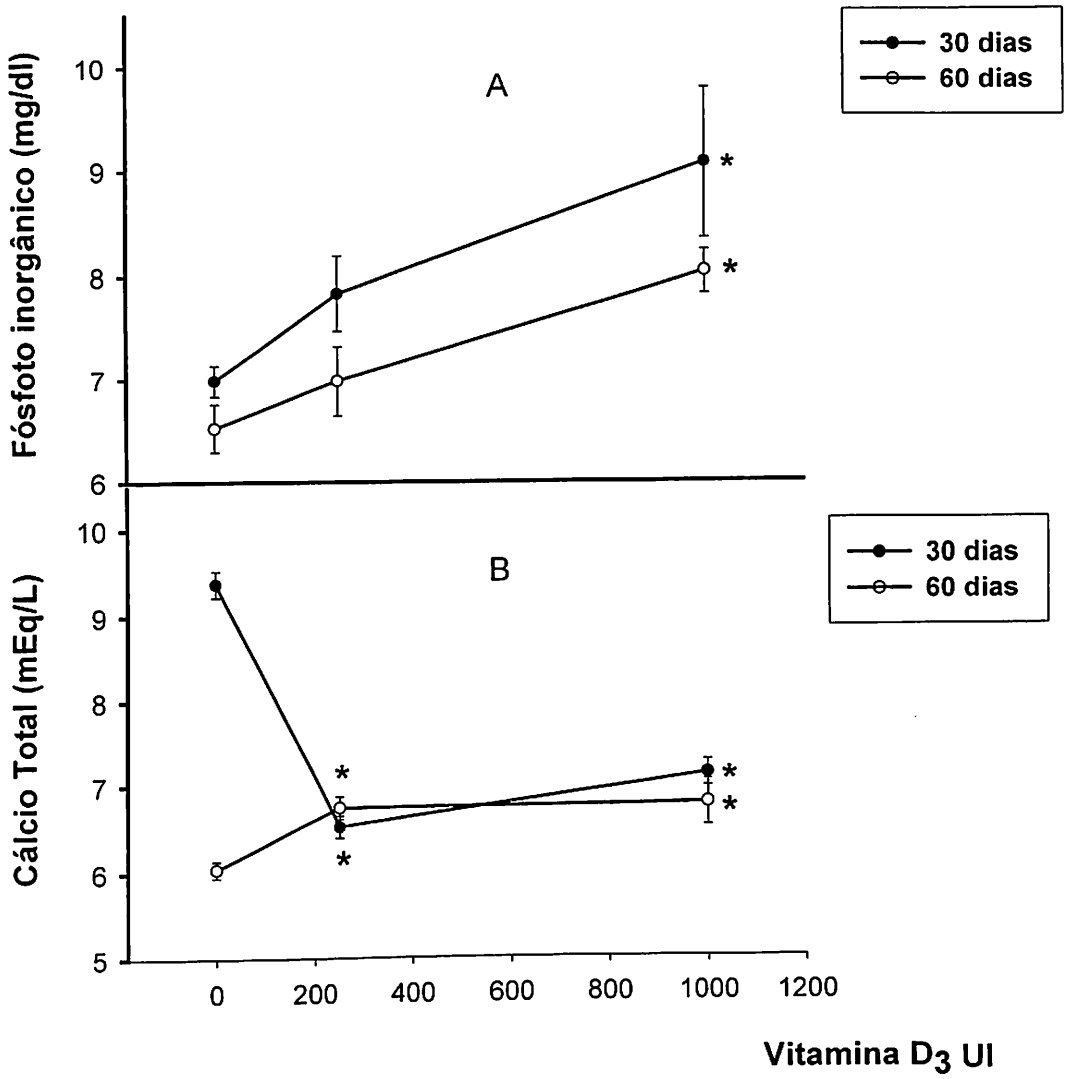


Figura 3. Níveis plasmáticos de fósforo inorgânico e cálcio total de *Colossoma macropomum* alimentados com vários níveis de vitamina D_3. (*) indica diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao controle.

Os níveis plasmáticos de sódio sofreram uma diminuição nos primeiros 30 dias para os animais alimentados com 250 UI de vitamina D, enquanto no período de 60 dias, permaneceram sem alteração. Já os de potássio apresentaram diminuição significativa nos dois tratamentos nos primeiros 30 dias, enquanto no período de 60 dias houve aumento apenas para os animais alimentados com 250 UI de vitamina D (Tabela 7).

3.4 Cinza e minerais nos ossos

3.4.1. Cinza

Os valores de cinza dos ossos de *Colossoma macropomum* alimentados com vários níveis de vitamina D não apresentaram alteração significativa entre os tratamentos nos primeiros 30 dias. Entretanto, no período de 60 dias, os animais alimentados com 250 e 1000 UI de vitamina D apresentaram aumento significativo quando comparados ao grupo controle (Figura 4).

3.4.2. Conteúdo de fósforo inorgânico e cálcio total nos ossos

Durante todo o período experimental, os animais alimentados com 1000 UI de vitamina D_3 apresentaram níveis de fósforo nos ossos significativamente mais elevados quando comparados ao controle (Figura 5 A).

Os níveis de cálcio dos ossos de *Colossoma macropomum* tratados com vitamina D não apresentaram alteração significativa nos primeiros 30 dias, porém, apresentaram tendência de aumento no grupo controle alimentado sem suplemento de vitamina D. Após 60 dias, o aumento do cálcio no grupo controle foi significativo, apresentando valores progressivamente mais baixos à medida que aumentava a quantidade de vitamina D suplementada (Figura 5 B).

Tabela 7. Níveis plasmáticos (mEq/L) de sódio (Na^+) e potássio (K^+) de *Colossoma macropomum* alimentados durante 60 dias com vários níveis de vitamina D_3. Os resultados estão expressos como média ± SEM. (*) indica diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao controle.

	Sódio		Potássio	
Vitamina D_3	**30 dias**	**60 dias**	**30 dias**	**60 dias**
0 UI	197,5±5,94	141,8±4,18	6,3±0,32	4,9±0,19
250 UI	145,6±2,72 *	151,4±3,56	4,6±0,18 *	6,5±0,19 *
1000 UI	189,2±3,96	153,7±3,24	4,4±0,18 *	5,5±0,20

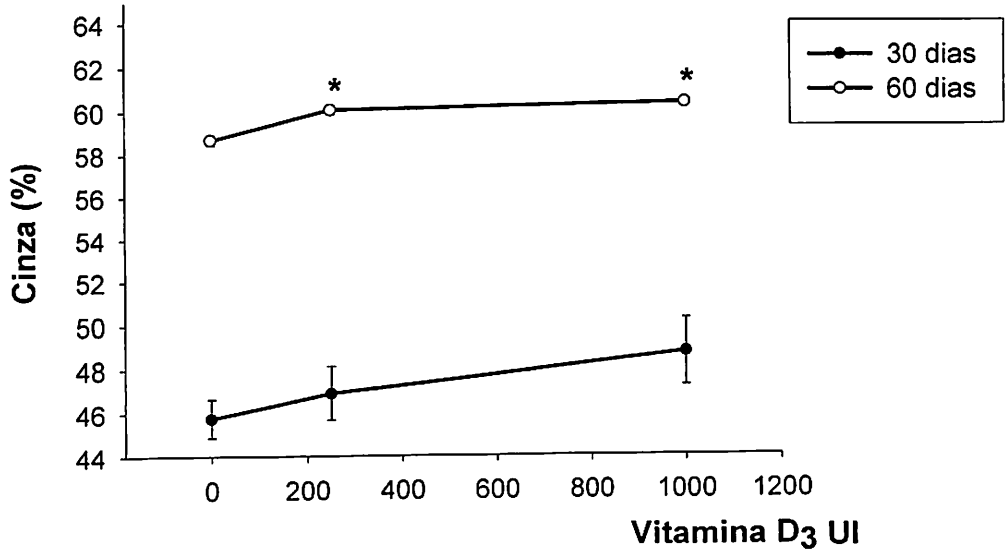


Figura 4. Valores percentuais de cinza dos ossos de *Colossoma macropomum* alimentados com vitamina D_3. (*) indica diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao controle.

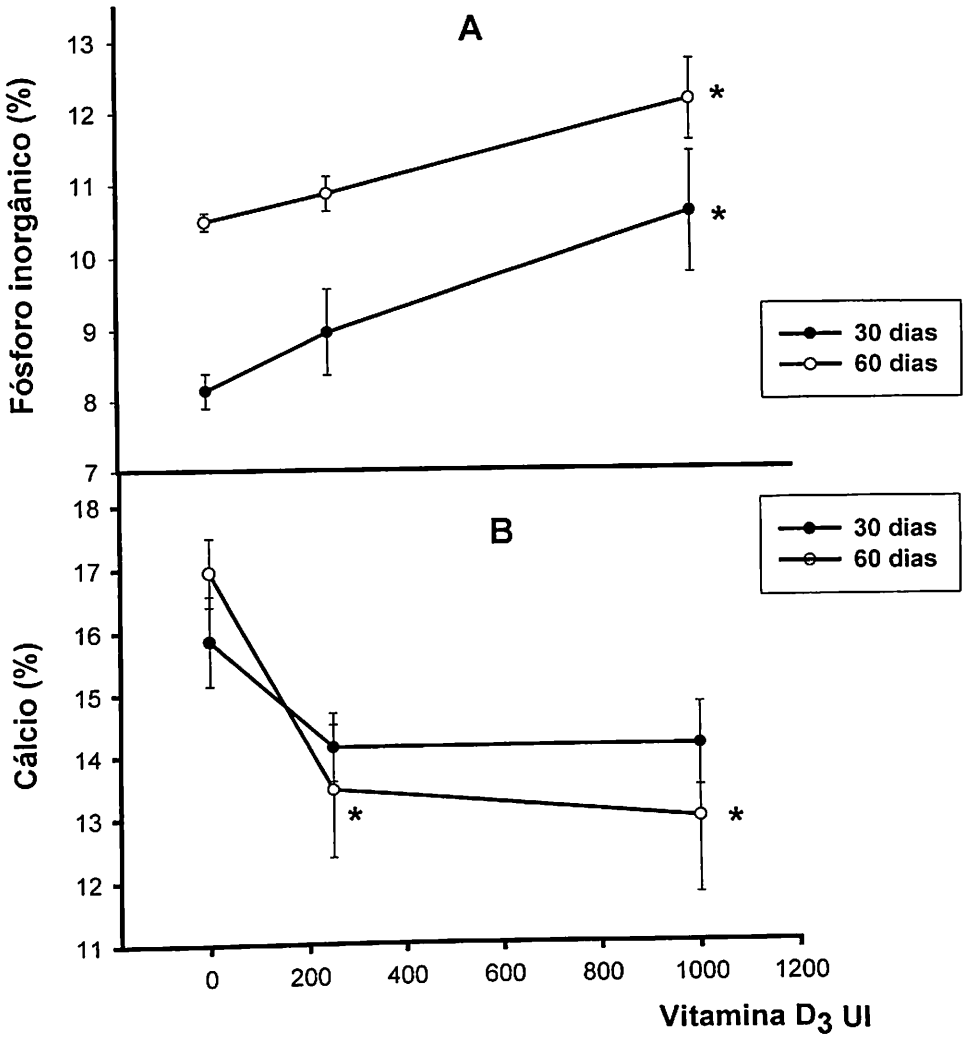


Figura 5. Níveis de fósforo inorgânico e cálcio total nos ossos de *Colossoma macropomum* alimentados com vitamina D_3. (*) indica diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao grupo controle.

Os exemplares de *Colossoma macropomum* alimentados durante 60 dias com ração contendo níveis diferentes de vitamina D_3 não apresentaram variação significativa na concentração de magnésio nos ossos (Tabela 8).

Tabela 8. Níveis de magnésio (%) nos ossos de *Colossoma macropomum* alimentados com vários níveis de vitamina D_3 durante 60 dias. Os valores estão representados como média ± SEM.

Vitamina D_3	30 dias	60 dias
0 UI	0,8±0,03	1,0±0,04
250 UI	0,8±0,04	0,9±0,03
1000 UI	0,8±0,02	1,0±0,03

4. DISCUSSÃO

4.1. Efeito da vitamina D na calcificação dos dentes

Ainda são poucas as informações disponíveis sobre as deficiências nutricionais causadas pela carência da vitamina D nos peixes. Entretanto, este nutriente é importante na nutrição destes animais porque eles são incapazes de processar a síntese desta vitamina (Rao & Raghuramulu, 1996b; Suzuki *et al.*, 1988), e também porque, o principal papel da vitamina D está concentrado na absorção e ajuste dos níveis de cálcio e fósforo, contribuindo para a formação óssea (Sundell *et al.*, 1992; Robertson, 1993; Shiau & Hwang, 1993; Sundell *et al.*, 1996).

A carência da vitamina D tem apresentado efeitos diversificados nas diferentes espécies de peixes. Em truta (*Salmo gairdneri*) resultou em lordose (anormalidades na coluna vertebral), distúrbios na homeostase do cálcio e causou o aparecimento de tetania (Barnett et al., 1982a e b; Lovell, 1989). No bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), a carência de vitamina D resultou em distúrbios no crescimento, diminuição dos minerais no corpo (Andrews *et al.*, 1980; Lovell & Li, 1978; Brown & Robinson, 1992). Nas tilápias (*Oreochromis niloticus* e *Oreochromis aureus*) resultou em alteração da hemoglobina, diminuição no crescimento, na fosfatase alcalina, nos níveis de cálcio e fósforo, assim como problemas na mineralização dos ossos (Shiau & Hwang, 1993; O'Connell & Gatlin, 1994). Na enguia de água doce (*Amphipnous cuchia*), os animais que não receberam injeções de vitamina D apresentaram hipofosfatemia e hipocalcemia no período de 10 dias (Srivastav *et al.*, 1997). No bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), os animais que não receberam injeções intraperitoniais do metabólito $1,25(OH)_2$-D_3 apresentaram redução dos níveis de cálcio (Sundell *et al.*, 1993).

No presente estudo, a carência da vitamina D e mesmo níveis dietéticos de 250 UI/kg de dieta causou no tambaqui um distúrbio novo, o qual não foi verificado ainda em outras espécies relatadas na literatura. Esta anomalia foi verificada nos

dentes, onde, observou-se a alteração da cor, tornando-os escuros como resultado da descalcificação, seguida do amolecimento, o que resultou em queda e perda dos mesmos (Figura 1). Este fato pode ser atribuído como estratégia fisiológica desta espécie, numa tentativa de minimizar os efeitos da alimentação carente de vitamina D.

4.2. Ganho de peso e conversão alimentar

A qualidade da água em tanques de piscicultura é de fundamental importância para promover melhor crescimento e menor taxa de conversão alimentar nos animais cultivados (Phillips *et al.*,1988). A alteração de diversos parâmetros físicos e químicos da água, principalmente amônia e nitrito, afeta os peixes nos tanques de criação de forma espécie específica.

No presente estudo, os parâmetros físico-químicos da água de criação de *Colossoma macropomum* apresentaram valores próximos dos encontrados na literatura para outras espécies, aparentemente, não representaram problemas para o desenvolvimento dos animais (Tabela 4).

Em tanques de criação de catfish, Boyd (1984) encontrou concentrações de amônia variando entre 0,2 e 0,6 mg/L, nitrato entre 0,05 e 0,2 mg/L e oxigênio dissolvido entre 2,8 e 6,0 mg/L, os quais não afetaram o desenvolvimento da espécie. Phillips *et al.* (1988) observaram níveis de amônia entre 0,06 e 0,23 mg/L, de oxigênio dissolvido entre 6,4 e 7,3 mg/L, de nitrito da ordem de 0,01 mg/L e de nitrato entre 0,28 e 0,29 mg/L, constatando que estes níveis não afetaram o crescimento de *Stizostedion vitreum* e que a alimentação, sendo ofertada muitas vezes por dia, melhora a qualidade da água. Roubach (1991) mediu os parâmetros físico-químicos na água de criação do *Colossoma macropomum*, encontrando valores de oxigênio entre 3,5 e 5,8 mg/L, temperatura entre 27 e 28 graus Celsius, pH entre 5,7 e 5,9, sendo que estes níveis não afetaram o desenvolvimento dos peixes.

Uma das funções da vitamina D é regular o crescimento nos animais superiores pela sua interação com o paratormônio, um hormônio produzido na glândula paratireóide (Sundell *et al.*, 1996). Estudos recentes mostraram a sua ação antirraquítica, promovendo aumento no crescimento e ganho de peso em muitas espécies de vertebrados, como porcos (Miller *et al.*, 1964), aves (Chen Jr. & Bosmann, 1964; McNutt & Haussler, 1973) e peixes (Andrews *et al.*, 1980).

O bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) apresentou maior ganho de peso e maior quantidade de cinza, fósforo e cálcio no corpo inteiro em 15 semanas, quando alimentado com dietas contendo vitamina D_3 (colecalciferol D_3) (0, 500, 1000, 10000 e 1 milhão de UI/Kg de ração). Os autores não conseguiram determinar a exigência dietética da vitamina D para a espécie, entretanto, sugeriram que este seja da ordem de 500 UI/Kg de dieta para o qual o ganho de peso foi de 593% (Lovell & Li, 1978).

Brown & Robinson (1992) alimentaram a mesma espécie (*Ictalurus punctatus*) com ração contendo vitamina D_3 (0, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000 e 1 milhão de UI/kg de dieta) durante 14 semanas. Os resultados deste estudo apontam para dois níveis de vitamina como potencialmente importantes. Com 500 UI/Kg de dieta, ocorreu o melhor ganho de peso (640%) e uma baixa taxa de conversão alimentar (0,71). Com 2000 UI/Kg de ração, o ganho de peso foi de 596%, com a taxa de conversão alimentar de 0,67. Para os animais que receberam 2000 UI/kg, os autores observaram, ainda, altos níveis de potássio plasmático e equilíbrio nos níveis dos metabólitos da vitamina D, o 25(OH)-D_3 e o 1,25$(OH)_2$-D_3, acompanhados de aumento de 24,25$(OH)_2$-D_3. Este fato torna positivo o efeito da vitamina D, porque a função do 1,25$(OH)_2$-D_3 é aumentar a absorção do cálcio no intestino, enquanto 24,25$(OH)_2$-D_3 tem efeito inverso, regulando a tomada de cálcio para evitar hipercalcemia plasmática (Sundell *et al.*, 1993). No presente estudo, não foram medidos os níveis dos metabólitos mencionados, mas os ajustes dos níveis de cálcio plasmático são evidentes nos animais que receberam vitamina D (Figura 3 B), o que indica que, também para esta espécie, a vitamina D regula a calcemia.

O'Connell & Gatlin (1994) sugeriram que a suplementação do cálcio foi responsável pelo aumento no ganho de peso, e que o efeito da vitamina D foi menos pronunciado quando a dieta foi isenta de cálcio, mostrando a importância da presença do cálcio, apesar do suplemento de vitamina D, na dieta de tilápias (*Oreochomis aureus*) criadas em água com baixas concentrações deste mineral.

O suplemento de vitamina D na alimentação de tilápias (*Oreochromis niloticus* x *Oreochormis aureus*), durante um período de 16 semanas, aumentou o ganho de peso de 1456 para 2576 %, diminuiu a taxa de conversão alimentar de 1,24 para 1,07 e aumentou a sobrevivência de 78 para 94%. A conclusão dos autores foi que a exigência dietética de vitamina D_3 para a espécie é de 374,8 UI/Kg de dieta (Shiau & Hwang, 1993).

No presente estudo *Colossoma macropomum* revela resultados semelhantes aos anteriores encontrados para catfish e tilápias, respondendo ao efeito da vitamina D, com o aumento percentual do ganho de peso nos períodos 30 e 60 dias (Tabela 5). O peso em gramas aumentou de acordo com o aumento do nível dietético da vitamina nos períodos de 15, 30 e 60 dias (Figura 2) e a melhor conversão alimentar foi nos tratamentos que receberam vitamina D (Tabela 6).

Andrews *et al.* (1980) encontraram que a dosagem de 1000 UI de vitamina D foi suficiente para um bom ganho de peso do catfish (*Ictalurus punctatus*), enquanto que quantidades maiores, entre 2000 e 20000 UI, não apresentaram bons resultados e o nível de 50000 UI causou retardamento no crescimento. Segundo os autores, isto ocorreu em função do excesso de vitamina D (hipervitaminose D). No presente estudo, o maior nível de vitamina D testado foi de 1000 UI de colecalciferol-D_3 por kg de dieta, que resultou no maior ganho de peso (Tabela 5). Os dados de ganho de peso sugerem que *Colossoma macropomum* é capaz de utilizar eficientemente o colecalciferol, como aconteceu com truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) (Barnett *et al.*, 1982a), catfish (Andrews *et al.*, 1980) e tilápias (*Oreochomis niloticus* e *O. aureus*) (Shiau & Hwang, 1993). Entretanto, como só foi

testado o colecalciferol há necessidade de outros estudos para testar o efeito de outras formas de vitamina D em *Colossoma macropomum*.

4.3. Efeito da vitamina D sobre os minerais

A resistência do osso depende da matriz orgânica e do material inorgânico. A matriz orgânica é formada de colágeno (95%) e o material inorgânico de hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), o qual dá resistência ao osso (Naw, 1981). O material inorgânico possui 99% do cálcio e 80% do fósforo do corpo, incluindo fluoreto, hidroxil, magnésio, zinco e sódio (Krause & Mahan, 1985). As quantidades restantes (1% de cálcio e 20% de fósforo) encontram-se distribuídos nos fluídos corpóreos e tecidos moles, fazendo parte do metabolismo (Harper, 1982).

Em pintos, a absorção do cálcio e do fósforo através do intestino é regulada de acordo com os níveis de vitamina D (Wasserman & Taylor, 1973). Nos teleósteos de água doce, a vitamina D atua também sobre a absorção do cálcio obtido do meio ambiente através da ingestão de água. Assim, estes animais podem usar tanto o intestino como as rotas extra intestinais para aumentar a tomada de cálcio (Andrews *et al.*, 1980; Sundell *et al.*, 1993; Björnsson *et al.*, 1999). O cálcio e o fósforo absorvidos são transportados no plasma por proteínas específicas (Wasserman & Taylor, 1973; Sundell, *et al.*, 1992) e por ação dos hormônios são destinados à manutenção dos níveis plasmáticos destes elementos e mineralização dos ossos (Shiau & Hwang, 1993). No bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), a tomada de cálcio através do intestino foi regulada pelos metabólitos da vitamina D. Enquanto o 25-hidroxicolecalciferol-D_3 aumentou a absorção do cálcio intestinal o 24,25-diidroxicolecalciferol-D_3 a inibiu (Sundell & Björnsson, 1990).

Shiau & Hwang (1993) observaram o aumento dos níveis de cinza nos ossos de tilápias alimentadas com dietas contendo suplemento de vitamina D. Para catfish criados em água contendo cálcio (14 mg/L) e fósforo (0,15 mg/L), o suplemento de vitamina D aumentou os níveis de cinza do corpo (Lovell & Li, 1978). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram esses estudos com

tilápias e catfish, pois também para *Colossoma macropomum* a suplementação de vitamina D resultou em aumento dos níveis de cinzas nos ossos no período de 60 dias (Figura 4).

Truta arco-íris alimentada com diversos níveis de vitamina D não apresentou alteração dos níveis de cálcio e fósforo plasmáticos, cálcio e fósforo total dos ossos e nem nos níveis de cinza da carcaça e dos ossos (Barnett *et al.*, 1982ab). Para a mesma espécie, Hilton & Ferguson (1982) não verificaram alteração do cálcio plasmático, cálcio, fósforo e magnésio dos ossos, da carcaça e da pele, em tratamentos com níveis elevados de vitamina D.

Barnett *et al.* (1982 ab) não mediram o magnésio nos ossos de truta arco-íris alimentadas com suplemento de vitamina D, mas não encontraram alteração nos níveis deste mineral no fígado dos animais. Em catfish (*Ictalurus punctatus*), dietas suplementadas com vitamina D resultaram no aumento dos níveis plasmáticos de magnésio e potássio, permanecendo inalterados os níveis de sódio (Brown & Robinson, 1992). No presente estudo, os níveis de magnésio dos ossos *de Colossoma macropomum* alimentados com diversos níveis de vitamina D permaneceram inalterados (Tabela 8). Estes resultados são similares aos relatados em tilápias por O'Connell & Gatlin (1994). Segundo estes autores, a alteração nos níveis de magnésio se deve à deficiência do cálcio e não da vitamina D na dieta. Resultados semelhantes foram encontrados em tilápias (Robinson *et al.*, 1987).

Existe carência de estudos sobre os efeitos da vitamina D nos íons sódio e potássio. Brown & Robinson (1992) mediram estes íons em catfish tratados com vários níveis de vitamina D, encontrando os níveis de sódio sem alteração e os níveis de potássio aumentados em alguns grupos de peixes alimentados com vitamina D. Os autores sugerem que sendo o potássio o principal íon intracelular, o aumento deste no plasma pode ser o resultado da abertura dos canais iônicos.

Neste estudo com *Colossoma macropomum*, diminuição dos níveis de sódio foi observada nos animais que receberam 250 UI da vitamina no período de 30 dias mas, aos 60 dias, não houve alteração (Tabela 7), corroborando, portanto, os

resultados encontrados para catfish por Brown & Robinson (1992). Shiau & Hwang (1993) também não encontraram alterações nos níveis de sódio e potássio plasmáticos em tilápias alimentadas com vários níveis de vitamina D entre 0 e 2100 UI/Kg de dieta.

Quanto ao potássio, os resultados em *Colossoma macropomum* são contrários aos encontrados para catfish, ocorrendo aumento deste íon nos animais deficientes em vitamina D aos 60 dias e aos 30 dias nos que receberam 250 UI da vitamina (Tabela 7) não havendo, portanto, uma consistência dos dados em todos os tratamentos.

Hilton & Ferguson (1982) alimentaram truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) com níveis excessivos de vitamina D_3 (4000, 104000 e 1004000 UI). Os animais não mostraram sintomas de efeitos tóxicos. Entretanto, não houve alteração no ganho de peso e nem nos níveis de cálcio plasmáticos ou nos níveis de cálcio, fósforo, magnésio e sódio nos ossos, pele e carcaça. Resultado semelhante foi encontrado para a mesma espécie, para todos estes minerais no plasma, ossos e rins, quando alimentados com níveis de 0, 200, 400, 800 e 1600 UI de vitamina D_3 (Barnett *et al.*, 1982a). Em outro experimento, Barnett *et al.* (1982b) alimentaram truta arco-íris com 1600 e 2400 UI/kg de dieta, verificando que a vitamina D não afetou os níveis de cálcio e fósforo nos rins, ossos e plasma e nem nos níveis renais de magnésio. Lovell & Li (1978) alimentaram bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) com vários níveis de vitamina D (entre 0 e 1 milhão de UI) por 15 semanas. Os autores não mediram os minerais no plasma e nos ossos, mas observaram aumento significante do fósforo e do cálcio na carcaça, ressaltando efeito da vitamina D na absorção destes minerais.

Estes resultados mostram que as espécies de peixes respondem de forma diferente aos efeitos da vitamina D com relação a regulação dos níveis iônicos. Isso pode explicar porque os resultados observados no presente estudo, para *Colossoma macropomum*, diferem, em parte, dos resultados anteriores encontrados para truta e tilápias. No presente estudo, observou-se aumento do

fósforo plasmático nos peixes alimentados com 1000 UI de vitamina D por quilo de dieta (Figura 3A) e aumento do cálcio plasmático nos dois grupos que receberam vitamina D no período de 60 dias (Figura 3B), sugerindo que a vitamina D teve participação na absorção destes minerais. Isto ocorre porque a vitamina D_3 tem papel regulador no sistema endócrino através do hormônio ativo 1,25-diidroxicolecalciferol-D_3 que participa da absorção intestinal do cálcio (Sundell *et al.*, 1993). Em tilápias, o efeito da vitamina D não afetou o fósforo mas resultou num aumento do cálcio dos ossos (Shiau & Hwang, 1993). Estes minerais não foram, entretanto, afetados nos ossos das tilápias alimentadas com suplemento de vitamina D e criadas em água com baixo nível de cálcio (<1 mg/L) (O'Connell & Gatlin, 1994). O oposto destes resultados ocorre no presente estudo, pois o fósforo aumentou nos períodos de 30 e 60 dias nos animais alimentados com 1000 UI (Figura 5A), enquanto o cálcio diminuiu nos que receberam vitamina D (Figura 5B). Os peixes alimentados com ração sem o suplemento de vitamina D apresentaram hipercalcemia plasmática nos primeiros 30 dias (Figura 3B) e nos ossos no período de 60 dias (Figura 5B). Isto pode ser uma estratégia fisiológica da espécie quando começa a ingerir alimentos deficientes em vitamina D. Resultados semelhantes foram encontrados para catfish quando alimentados com dietas desprovidas de vitamina D (Brown & Robinson, 1992). Também, a descalcificação dos dentes dos animais deficientes em vitamina D pode ser uma resposta fisiológica à falta da vitamina D na dieta. Neste caso, os peixes podem estar mobilizando cálcio dos dentes para depositar nos ossos, justificando o aumento do cálcio neste tecido (Figura 5B).

Nos animais terrestres, a principal função da vitamina D é elevar o cálcio e o fósforo plasmáticos até níveis suficientes para proporcionar a perfeita mineralização dos ossos, sendo o equilíbrio do cálcio ideal para o perfeito funcionamento das junções neuromusculares (Shiau & Hwang, 1993) e manutenção da homeostase orgânica (Björnsson *et al.*, 1999). O paratormônio atua junto com a vitamina D com

a principal função de evitar distúrbios pela elevação desordenada do cálcio (Shiau & Hwang, 1993).

No presente estudo, os animais que receberam vitamina D apresentaram tendência de equilíbrio dos níveis de cálcio plasmático (entre 6,5 e 7.0 mEq/L) e nos ossos (entre 13 e 14%) (Figuras 3B e 5B). Também neste caso, isto parece ocorrer porque a vitamina D_3 tem papel regulador nos níveis destes íons (Sundell *et al.*, 1993; Larsson *et al.*, 1995). Nos animais alimentados com deficiência de vitamina D, a diminuição do fósforo e do cálcio plasmáticos (60 dias) (Figura 3), associada ao aumento do cálcio ósseo (Figura 5B) mostram que não houve reabsorção óssea. Baseados em resultados semelhantes, encontrados em tilápias e em truta, Barnett *et al.* (1982a) e Shiau & Hwang (1993) sugerem que peixes não possuem a glândula paratireóide ou o paratormônio.

Barnett *et al.* (1982a) relataram que truta depende da vitamina D para absorver o cálcio da água, mas que são necessários mais estudos em água com baixo teor de cálcio para se verificar a possibilidade de absorção deste elemento presente na água. No entanto, para tilápias criadas em água com baixo nível de cálcio, a vitamina D não teve papel maior na absorção do cálcio dietético (O'Connell & Gatlin, 1994). Por outro lado, o nível dietético da vitamina D para catfish não foi afetado pela presença do cálcio na água (Brown & Robinson, (1992).

No presente estudo, *Colossoma macropomum* alimentado durante 60 dias com dieta contendo 1000 UI de vitamina D_3 (colecalciferol–D_3) apresentou 137,7% de ganho de peso, em relação ao grupo controle. Além disso, observamos a conversão alimentar de 0,82 (820 gramas de alimento para um incremento de 1000 gramas em peso do animal) no grupo que recebeu 1000 UI de vitamina D por quilo de dieta, um aumento de cinza e fósforo nos ossos e aumento dos níveis de fósforo e cálcio no plasma. Estes resultados indicam claramente a importância da adição de vitamina D na dieta de *Colossoma macropomum* mantido sob condições de cultivo.

5. CONCLUSÕES

1) A deficiência da vitamina D ou mesmo níveis dietéticos de 250 UI/kg causam retardamento do crescimento e prejudicam a calcificação óssea, causando o amolecimento e queda dos dentes de *Colossoma macropomum*.

2) A dose de 1000 UI de vitamina D afetou positivamente o crescimento de *Colossoma macropomum*, parecendo estar na faixa da necessidade dietética para a espécie.

3) *Colossoma macropomum* quando alimentado com ração deficiente em vitamina D apresenta uma estratégia fisiológica para manter os níveis de cálcio plasmático elevados por algum tempo, Entretanto estes níveis baixam se a alimentação não for suprida com a vitamina.

4) *Colossoma macropomum* alimentado com dietas contendo vitamina D apresenta níveis de cálcio obedecendo um certo equilíbrio tanto nos ossos como no plasma. Isso sugere que a vitamina D atua na regulação dos níveis deste íon nesta espécie.

5) A carência da vitamina D não induz o tambaqui a fazer a reabsorção do cálcio ósseo como acontece com os animais terrestres.

6) Os resultados do presente estudo revelam que *Colossoma macropomum* precisa do suplemento dietético de vitamina D para maior crescimento, ganho de peso e para a mineralização adequada dos ossos.

6. PERSPECTIVAS

A análise da literatura pertinente indica que este é o primeiro estudo sobre o efeito da vitamina D em peixes da Amazônia. Portanto, esta área de pesquisa ainda carece de muitos estudos, tanto sobre o metabolismo quanto sobre a necessidade dietética desta vitamina nos peixes da região. Para tanto, sugerimos assim alguns tópicos para estudos futuros:

1) Testar os efeitos da vitamina D_2 (ergocalciferol-D_2) e D_3 (colecalciferol-D_3) nos peixes amazônicos.

2) Pesquisar outros níveis de vitamina D_3 (colecalcifarol-D_3) em diferentes faixas etárias do *Colossoma macropomum* para determinar o nível dietético ótimo, o que vai favorecer a elaboração de rações que poderão proporcionar melhor desenvolvimento econômico com o menor custo de produção na piscicultura.

3) Aumentar período experimental e verificar a possibilidade de variar a quantidade de vitamina D na dieta em função da idade dos peixes.

4) Testar a interação de diferentes níveis de vitamina D e cálcio na dieta dos peixes desta região.

5) Fazer pesquisas para estimar o conteúdo de vitamina D e seus metabólitos no fígado, rim e plasma dos peixes desta região.

6) Pesquisar como os metabólitos da vitamina D atuam na absorção do cálcio intestinal destes peixes.

7) Estudar como a vitamina D atua nos mecanismos de ajustes do cálcio e do fósforo no plasma e nos ossos dos peixes amazônicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-Val, V.M.F. & Val, A.L. 1990. Adaptação bioquímica em peixes da Amazônia. *Ciência Hoje*, 11(64):62-67.

Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L. & Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazonian fishes: Status of an under-explored biological "Goldmine". *In:* Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal, M. & Van den Thillart, G. (Eds). *Surviving hypoxia: Mechanisms of control and adaptation.* CRC Press, Boca Raton. p.438-445.

Almeida-Val, V.M.F. & Val, A.L. 1995. Adaptação de Peixes aos ambientes de criação. *In:* Val, A.L. & Honczaryk, A. (Eds). *Criando peixes na Amazônia.* INPA. Manaus. p.45-59.

Andrade, P.C.M.; Tolentino, A.S.; & Freitas, C.E.C. 1993. Desenvolvimento de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) em gaiolas. *R. Univ. Am. Sér. Ci. Agr.* 2:21-30.

Andrews, J.W.; Takeshi, M. & Page, J.W. 1980. Effects of dietary cholecalciferol and ergocalciferol on catfish. *Aquaculture*, 19:49-54.

Araújo Lima, C. & Goulding, M. 1998. *Os frutos do tambaqui, ecologia, conservação e cultivo na Amazônia.* Araújo Lima, C. & Goulding, M. (Eds). Sociedade Civil Mamirauá, Tefé-AM. p.61-78.

Asca, J.M. 1985. *Alimentos: Aspectos bromatológicos e legais. Análise percentual.* Vol. 1. Unisinos Editora, São Leopoldo, RS. p.257-283.

Association of official analytical chemists (A.O.A.C.) 1975. *Official methods of analysis*. Washington D.C. 13th edition. 937p.

Barnett, J.B.; Cho, C.Y. & Slinger, S.J. 1982a. Relative biopotency of dietary ergocalciferol and cholecalciferol and the role of and requirement for vitamin D in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.* 112(11):2011-2019

Barnett, B.J.; Jones, G.; Cho, Y.G. & Slingler, S.J. 1982b. The biological activity of 25-hydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycolecalciferol for rainbow trout (Salmo gairdneri). *J. Nutr.* 112(11):2020.

Bayley, P.B. & Petrere Jr, M. 1989. Amazon fisheries: Assessment methods, current status and management options. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat.* 106:385-398.

Bell, P.A. 1978. The chemistry of the vitamin D. *In*: Lawson, D.E.M. (Ed.). *Vitamin D.* Academic Press, INC. (London) Ltd. London, Great Britain. p.1-12.

Björnsson, B.T.; Persson, P.; Larsson, D.; Jóhannsson, S.H. & Sundell, K. 1999. Calcium balance in teleost fish: and endocrine control mechanisms. *In:* Danks, J.; Dacke, C. Flik, G. & Gay, C. (Eds). *Calcium metabolism: Comparative Endocrinology.* BioScientifica Ltda, Bristol. p.1-10.

Bock, C.L.; Moki, D.A. & Cantelmo, O.A. 1998. Uso de farelo de soja e da farinha de peixe, como principal fonte protéica em dietas para alevinos de "tambaqui" (*Colossoma macropomum*), criados em viveiros. *Aquicultura Brasil 98, 2 a 6 de Novembro, Resumos/Abstrats.* Recife-PE p.23

Boyd, C.E. 1984. *Water Quality in warmwater fish ponds.* Agricultural Experiment. Station. 3th. Ed., Alburn University Alabama. p.119-247.

Brown, P.B. 1988. Vitamin D requirement of juvenile channel catfish reared in calcium-free water. *Diss. Abst. Int. PT. B-Sci. And Eng.* Vol 48 n0. 12.

Brown, P.B. & Robinson, E.H. 1992. Vitamin D studies with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) reared in calcium-free water. *Comp. Biochem. Physiol.* 103A(1):213-219.

Carneiro, D.J. 1981. Digestibilidade protéica em dietas isocalóricas para tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818) (Pisces, Characidae). Anais do *Simpósio Brasileiro de Aquacultura II*, p.78-80.

Carneiro Sobrinho, A.; Melo, R.R.; Silva, J.W.L. & Nobre, M.I.S. 1989. Resultados de um experimento sobre o cultivo de tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier 1818, na densidade estocada de 10000 peixes/ha. *Ciências Agronômicas* 20:25-31.

Carvalho, M.L. 1981. *Alimentação do tambaqui jovem (Colossoma macropomum) e sua com a comunidade zooplanctônica do Lago Grande – Manaquiri, Solimões – AM.* Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas. 91p.

Castagnolii, N. & Cyrino, J.E.P. 1986. *Piscicultura nos trópicos.* Ed. Manole. São Paulo, SP. p.76-137.

Castagnolii, N. 1992. *Piscicultura de água doce.* Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária UNESP. Campus de Jaboticabal. SP. p.21-155.

Chagas, E.C. 1998. *Efeito do ácido ascórbico (vitamina C) sobre a resistência ao estresse hipóxico em Colossoma macropomum Cuvier 1818.* Monografia

apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade do Amazonas, para obtenção do grau de Engenheira de pesca. 37p.

Champe, P.C. & Harvey, R.A. 1997. *Bioquímica Ilustrada.* Artes médicas, Porto Alegre, RS. p.325-348.

Chatterjee, I.B. 1973. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, 182:1271-1272.

Chaves, J.M. & Pecnnik, E. *apud* Pereira Filho, M.; Graef, E.W. & Storti Filho, A. 1987. Preparo e utilização de ingredientes produzidos em Manaus, no arraçoamento do matrinxã, *Brycon Sp.* I. Preparo dos Ingredientes. *In: Anais do 5º Congresso brasileiro de engenharia de pesca,1988.* Fortaleza/CE p.179-185.

Chen, P..S. & Bosmann, H.B. 1964. Effect of vitamin D_2 and D_3 on serum calcium and phosphorus in rachitic chicks. *J. Nutr.*, 83:133-139.

Deuel Jr, H.J. 1955. *The lipids, their chemistry and biochemistry.* Printed by Mack Printing Company, vol. II. Easton, USA. p.323-371.

Esteves, F. A. 1988. *Fundamentos de limnologia.* Ed. Interciência, Rio de Janeiro RJ. P. 216-236.

Falabella, P.G.R. 1994. *A pesca no Amazonas: Problemas e soluções.* 2ª edição. Impressa oficial do Estado. Manaus, AM, Brasil. 180p.

Fim, J.D.I. 1995. Sistemas integrado de cultivo entre animais e peixes. *In*: Val, A.L. & Honczaryk, A. (Eds.). *Criando peixes na Amazônia.* INPA. Manaus, AM. p.83-95.

Harper, H.A. 1982. *Manual de bioquímica fisiológica*. Harold A. Harper, Victor W. Rodwell, Peter A. Mayes (Eds.) e autores associados; Tradução de J. Reinaldo Magalhães; colaboração de Sandra M. Freeman. 5ª ed. Editora Atheneu, São Paulo – SP. pp. 155-624.

Henry, H.L. 1980. Regulation of vitamin D metabolism. *In*: Norman, A.W. (Ed). *Vitamin D, molecular biology and clinical and nutrition*. Marcel Dekker, INC. New York, USA. p.27-148.

Hidaka, A.; Suzuki, H.; Hayakawa, S.; Okazaki, E. & Wada. S. 1989. Conversion of provitamin D_3 to vitamin D_3 by monochromatic ultraviolet rays in fish dark muscle mince. *J. Food Sci.* 54(4):1070-1073.

Hilton, J.W. & Ferguson, H.W. 1982. Effect of excess vitamin D vitamin D on calcium metabolism in rainbow trout *Salmo gairdneri. J. Fish Biol.* 21:373-379.

Holick, M.F. & DeLuca, H.F. 1978. Metabolism of vitamin D. *In*: Lawson, D.E.M. (Ed). *Vitamin D.* Academic Press, INC. London, Great Britain. p.51-91.

Honda, E.M.S. 1974. Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. II. Alimentação de Tambaqui, *Colossoma bidens* (SPIX). *Acta Amazonica*, 4: p.47–53.

Joint FAO/WHO Expert Group on vitamin and mineral requirements 1970. *Requirements of ascorbic acid, vitamin D, vitamin B_{12}, folate, and iron.* Met in Geneva from 21 April to 2 May 1969. Wld Hlth Org. Techn. Ser., 1970, no. 452, 75p.

Junk, W.J. 1983. As águas da região Amazônica. *In*: Salati, E.; Shubart, H.O.R.; Junk, W. & Oliveira, A.E. (Eds.). *Amazônia: Desenvolvimento, integração e ecologia.* Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Editora Brasiliense. Brasília. p.45-100.

Krause, M.V. & Mahan, L.K. 1985. *Alimentos, nutrição e dietoterapia.* Editora Roca. São Paulo - SP. pp. 129-206.

Keiver, K.M.; Draper, H.H. & Ronald, K. 1988. Vitamin D metabolism in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *J. Nutr.* 118(3):332-341.

Larsson, D.; Björnsson, B. Th. & Sundell, K. 1995. Physiological concentrations of 24,25-dihydroxyvitamin D_3 rapidly decrease the *in vitro* intestinal calcium uptake in the Atlantic cod, *Gadus morhua. Gen. Comp. Endocrinol.* 100:211-217

Lawson, D.E.M. 1980. Metabolism of vitamin D. *In*: Norman, A.W. (Ed). *Vitamin D, molecular biology and clinical nutrition.* Marcel Dekker, INC. New York, USA. p.102-106.

Lehninger, A.L. 1990. *Princípios de bioquímica.* Ed. Sarvier, 6ª ed. São Paulo, SP. p.554-557.

Lovell, R.T. & Li, Y. 1978. Essentiality of vitamin D in diets of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Trans. Am. Fish Soc.* 107(6):809-811.

Lovell, T. 1989. *Nutrition and feeding of fish.* Lovell, T. (Ed.). Van Nostrand Reinhold. New York USA. p.29-40.

McNutt, K.W. & Haussler, M.R. 1973. Nutritional effectiveness of 12,-dihydroxycholecalciferol in preventing rickets in chicks. *J. Nutr.* 103(5):681-689.

Miller, E.R.; Ullrey, D.E.; Zutaut, C.L.; Baltzer, B.V.; Schmidt, D.A.; Vincent, B.W.; Hoefer, J.A. & Luecke, R.W. 1964. Vitamin D requirement of baby pig. *J. Nutr.*, 83:140-148.

National Research Council, 1977. Vitamins and minerals. In: Nutrient Requirements of Warmwater fishes. National Research Council. Subcommitee on warmwater fishes. National Academy of Sciences, Washington, D.C. p. 19-22.

Naw, I. 1981. Bioquímica fundamental para ciências biomédicas.: Isaias Naw, Aarow Fredman, Lelia Menunucci (Eds). Editora São Paulo McGraw-Hill do Brasil. p. 595 – 604.

O'Connell, J.P. & Gatlin, D.M. 1992. Interaction of dietary calcium and cholecalciferol on growth and mineral composition of the blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Aquaculture,* Growing toward the 21 st century *92:*173-174.

O'Connell, J.P. & Gatlin, D.M., 1994. Effects of dietary calcium and vitamin D_3 on weight gain and mineral composition of the blue tilapia (*Oreochromis aureus*) in low-calcium water. *Aquaculture,* 125(1-2):107-117.

Pereira Filho, M.; Graef, E.W. & Storti Filho, A. 1987a. Preparo e utilização de ingredientes produzidos em Manaus, no arraçoamento do matrinxã, *Brycon Sp.* I. Preparo dos ingradientes. *In*: *Anais do 5º Congresso brasileiro de Engenharia de pesca. Fortaleza/CE.* p.179-185.

Pereira Filho, M.; Graef, E.W. & Storti Filho, A. 1987b. Preparo e utilização de ingredientes produzidos em Manaus, no arraçoamento do matrinxã, *Brycon Sp.* II. Teste experimental. *In: Anais do 5º Congresso brasileiro de Engenharia de pesca. Fortaleza/CE.* p.187-199.

Phillips, T.A.; Summerfelt, R.C. & Clayton, R.D. 1988. Feeding frequency effects on water quality and growth of walleye fingerlings in intensive culture. *Prog. Fish Cult.* 60:1-8.

Rao, D.S. & Raghuramulu, N. 1995. Vitamin D and its related parameters in fresh-water wild fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111(2):191-198.

Rao, D.S. & Raghuramulu, N. 1996a. Food chain as origin of vitamin D in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114(1):15-19.

Rao, D.S. & Raghuramulu, N. 1996b. Lack of vitamin D_3 synthesis in *Tilapia mossambica* from cholesterol and acetate. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114(1):21-25.

Rao, D.S. & Raghuramulu, N. 1998. Vitamin D metabolism in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 120C:145-149.

Robertson, D.R. 1993. Comparative aspects of intestinal calcium transport in fish and amphibiams. *Zoological Science* 10:223-234.

Robinson, E.H.; LaBomascus, D.; Brown, P.B. & Linton, T.L. 1987. Dietary calcium and phosphorus requirement of *Oreochromis aureus* reared in calcium-free water. *Aquaculture*, 64:267-276.

Roubach, R. 1991. *Uso de frutos e sementes de florestas inundáveis na alimentação de Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) (Pisces, Characidae).* Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus Amazonas. 79p.

Saint-Paul, U. 1984. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalmidae. *Env. Biol. Fishes* 11(1):53-62.

Santos, G.M. 1981. Estudos de alimentação e hábitos alimentares de *Schizodon fasciatus* Agassiz, 1829, *Rytiodus microlepis* Kner, 1859 e *Rytiodus argenteofuscus* Kner, 1859, do lago Janauacá – AM. (Osteichthyes, Characoidei, Anostomidae). *Acta Amazonica* 11(2):267-283.

Schmidt-Nielsen, K. 1996. *Fisiologia Animal. Adaptação e meio ambiente.* (Ed). Santos, 5ª ed. São Paulo, SP. p.151-168.

Shiau, S.Y. & Hwang, J.Y. 1993. Vitamin D requirements of juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* X *O. aureus. Soc. Sci. Fish.*, 59(3):553-558.

Shubart, H.O.R. 1983. Ecologia e utilização das florestas. *In*: Salati, E.; Shubart, H.O.R.; Junk, W. & Oliveira, A.E. (Eds.). *Amazônia: desenvolvimento, integração e ecologia.* São Paulo: Brasiliense; Brasília: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, p.101-143.

Signorini, L.J. & Signorini, L.S. 1993. Mecanismo de ação scavenger – proteção antioxidante. *In*: Signorini, J. L.; Signorini, S.L. (Eds). *Atividade física e radicais livres: Aspectos biológicos químicos patológicos e preventivos.* Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. p.95-116.

Smith, N.J.H. 1979. *A pesca no rio Amazonas.* Conselho nacional de esenvolvimento científico e tecnológico/INPA. Manaus, AM. p.10-23.

Sioli, H. 1990. *Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais.* 2ª edição. Ed. Vozes, Petrópolis RJ, p.29-59.

Soares, M.G.M.; Almeida, R.G. & Junk, W.J. 1986. The trophic status of the fish fauna in Lago Camaleão, a macrophyte dominated floodplain lake in the middle Amazon. *Amazoniana,* 4(10):511-526.

Srivastav, A.K.; Tiwari, P.R.; Srivastav, S.K.; Sasayama, Y. & Suzuki, N. 1997. Vitamin D_3-induced calcemic and phosphatemic responses in the freshwater mud eel *Amphipnous cuchia* maintained in different calcium environments. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30(11):1343-1348.

Stryer, L. 1992. *Bioquímica.* Editora Guanabara Koogan S.A, 3ª Edição. Rio de Janeiro, RJ. p.259-472.

Sundell, K. & Björnsson, B. Th. 1990. Effects of vitamin D_3, 25(OH) vitamin D_3, 24,25$(OH)_2$ vitamin D_3 and 1,25$(OH)_2$ vitamin D_3 on the *in vitro* intestinal calcium absorption in the marine teleost, Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78:74-79.

Sundell, K.; Bishop, J.E.; Björnsson, B.Th. & Norman, A. 1992. 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 in the Atlantic cod: plasma levels, a plasma binding component, and organ distribution of a high affinity receptor. *Endocrinology*, 131(5):2279-2286.

Sundell, K.; Norman, A.W. & Björnsson, B.Th. 1993. 1,25$(OH)_2$ vitamin D_3 increased ionized plasma calcium concentrations in the immature Atlantic cod *Gadus morhua*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 91:344-351.

Sundell, K. Larsson, D. & Björnsson, B. Th. 1996. Calcium regulation by the vitamin D_3 system in teleosts, with special emphasis on the intestine. *In:* Dache, C.; Danks, J.; Caple, I. & Flik, G. (Eds). *The Comparative Endocrinology of Calcium. Regulation*. Journal of Endocrinology Ltd, Bristol. p.75–84.

Suzuki, H.; Hayakawa, S.; Wada, S.; Okazaki, E. & Yamazawa, M. 1988. Effect of solar drying on vitamin D_3 and provitamin D_3 contents in fish meat. *J. Agric. Food. Chem.* 36(4):803-806.

Swarup, K.; Das, V.K. & Norman, A.W. 1991. Dose-dependent vitamin D_3 and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 induced hypercalcemia and hyperphosphatemia in male cyprinoid (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 100(2):445-447.

Val, A.L. 1986. *Hemoglobinas de Colossoma macropomum Cuvier, 1818 (Characoidei, Pisces): Aspectos adaptativos. Ilha da Marchantaria, Manaus, Am.* Tese de Doutorado, PPG BTRN. INPA/FUA, Manaus, 112p.

Val, A.L. 1993. Adaptations of fishes to extreme conditions in fresh water. *In*: Bicudo, J.E. (Ed.). *The vertebrate gas transport cascade: Adaptation to environment and mode of life*. CRC Press. Boca Raton, p.43-53.

Val, A.L. 1996. Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of the Amazon. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. & Randall, D.J. (Eds.). Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon. INPA/Manaus, p.59-73.

Verdouw, H.; Van Echted, C.J.A & Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research* 12:397-402.

Wasserman, R.H. & Taylor, A.N. 1973. Intestinal absorption of phosphate in the chick: effect of vitamin D and other parameters. *J. Nutr.* 103(4):586-599.