**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA**
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**

# Aspectos fisiológicos e bioquímicos do tambaqui (C*olossoma macropomum*, Cuvier 1818) alimentado com dietas suplementadas por frutos e sementes de áreas alagáveis

Alzira Miranda de Oliveira

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

**Manaus – AM**
**2005**

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA**
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**

# Aspectos fisiológicos e bioquímicos do tambaqui (C*olossoma macropomum*, Cuvier 1818) alimentado com dietas suplementadas por frutos e sementes de áreas alagáveis

Alzira Miranda de Oliveira*

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

Orientador: Dr. Adalberto Luís Val
* Bolsista de mestrado da FAPEAM
Financiamento: CNPq

**Manaus – AM**
**2005**

Aos meus queridos e amados pais Aluisio Souza de Oliveira (*in memorian)* e Maria Gracinéia Souza Miranda pelo amor, força, carinho e confiança em mim sempre depositados, o que contribuiu para minha formação e engradecimento pessoal e profissional.

DEDICO

**FICHA BIBLIOGRÁFICA**

Oliveira, Alzira Miranda de

Aspectos fisiológicos e bioquímicos do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) alimentado com dietas suplementadas por frutos e sementes de áreas alagadas/ Alzira Miranda de Oliveira – Manaus, 2005. ix + 73p.

Dissertação de Mestrado - INPA/UFAM, 2005

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior. Manaus-Am.

1. Frutos e sementes 2. Alimentação 3. Tambaqui

CDD 597.5048a

**SINOPSE:**

Este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas do tambaqui alimentado com frutos e sementes de áreas alagadas. A suplementação, na proporção de 1:1, de semente de munguba e dos frutos embaúba, catoré, jauari e camu- camu resultou num crescimento positivo e parece ter protegido os animais do estresse oxidativo. Os parâmetros hematológicos estiveram dentro dos limites considerados normais e não foram detectados distúrbioS fisiológicos e danos celulares devido à alimentação.

**Agradecimentos**

A Deus por me fazer acreditar que a vida caminha para melhor e que todas as coisas que me acontecem são para o bem, ainda que revestidas de tristeza e dor.

A minha família que me apoiou ao longo dessa caminhada incentivando e dando força nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Dr. Adalberto Luís Val por acreditar no meu trabalho, pela orientação e conhecimentos valiosos que me fizeram crescer profissional e pessoalmente.

A Dra. Vera Val pelo apoio e incentivo para execução desse trabalho.

Ao Dr. Carlos Edwar de Carvalho Freitas pelos ensinamentos, incentivos, carinho e amizade demonstrados nos momentos mais difíceis da minha vida.

Ao Dr. Levy Gomes pela amizade, conversas e pelos alevinos cedidos.

Ao Dr. Rodrigo Roubach pela atenção e apoio dado quando necessário e a D. Inês Pereira pela ajuda nas análises.

A Dra. Ângela Varella pela amizade, ajuda e paciência ao longo do curso.

A Nazaré Paula e Angélica Laredo pela ajuda, convivência, carinho e amizade que fortaleceram meu trabalho.

A todos os amigos do LEEM: Christiane Oliveira, Adriana Chippari-Gomes, Nívia Lopes, Suely Oliveira, Roziete Araújo, Paulo Aride, Rubens Honda, Leonardo Rodrigues, Thiago Luís pela ajuda, apoio e momentos de descontração durante todo o período experimental e, em especial Ana Cristina, Katherine Vasquez, Rafael Duarte e Luciana Melhorança que sempre estiveram comigo, conversando, discutindo e ajudando, da melhor forma possível, durante todo a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da turma de 2003: Karen Prado, Vivien Antony, Aprígio Moraes, Leocy Cutrim, Rafaela Vicentini, Renato Soares, Gilberto Shwetner, Suelen Miranda, Ana Maria Dias que fizeram do mestrado a época mais hilária e mais emocionante da minha vida, demonstrando e renovando a amizade a cada dia e proporcionando dias cada vez melhores.

Aos amigos Fabíola Aquino, Flávia Kelly, Doney Vitor, André Bordinhon e Tassyane pelo apoio, carinho e amizade.

A Carminha e Elany pelo carinho e apoio.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que ajudaram de maneira direta ou indireta na realização e concretização deste trabalho. .

.

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*) FED WITH DIETS SUPPLEMENTED BY FRUITS AND SEEDS OF FLOODPLAINS.**


## Abstract

The high productivity of the floodplain areas of the Amazon in conjunction to the need of alternative food for confined fish, raise great interest in verifying the possibility of the use of regional fruits to reduce the costs of tropical fish farming. This study aimed to evaluate the potentiality of catoré (*Crataeva benthami*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), embaúba (*Cecropia latiloba*) and jauari (*Astrocaryum jauari*) fruits and munguba (*Pseudobombax munuba*) seed in the tambaqui (*Colossoma macropomum*) feeding, through the analysis of physiological and biochemical aspects of this fish species. The results showed that the fruits and the seed did not cause organic disequilibrium or growth impairment of the animals. However, it was observed that the diet supplemented with camu-camu and jauari presented larger similarity to the control group, emerging as alternatives among the tested diets.

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*) ALIMENTADO COM DIETAS SUPLEMENTADAS POR FRUTOS E SEMENTES DE ÁREAS ALAGÁVEIS.**


## Resumo

A alta produtividade da floresta alagada em associação a necessidade de alimentos alternativos para peixes confinados criou grande interesse em verificar a possibilidade do uso dos frutos regionais para reduzir os custos da piscicultura de peixes tropicais. Este estudo, objetivou avaliar a potencialidade dos frutos catoré (*Crataeva benthami*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), embaúba (*Cecropia latiloba*) e jauari (*Astrocaryum* jauari) e da semente de munguba (*Pseudobombax munguba*) na alimentação de tambaqui (*Colossoma macropomum*), a partir da análise dos aspectos fisiológicos e bioquímicos desta espécie de peixe. Os resultados mostraram que os frutos e a semente não causam desequilíbrio orgânico ou prejuízos ao crescimento dos animais. Contudo, foi observado que as dietas suplementadas com camu-camu e jauarí apresentaram maior similaridade ao grupo controle, surgindo como alternativas entre as dietas testadas.

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*) ALIMENTADO COM DIETAS SUPLEMENTADAS POR FRUTOS E SEMENTES DE ÁREAS ALAGÁVEIS**

**Índice**

**1. Introdução ..... 1**

1.2. Objetivo Geral ..... 11
1.2.1. Objetivos específicos ..... 11

**2. Material e Métodos ..... 12**

2.1. Obtenção dos animais ..... 12
2.2. Coleta dos frutos e semente ..... 12
2.3. Elaboração das dietas experimentais ..... 13
2.4. Protocolo experimental ..... 14
2.5. Variáveis físicas e químicas da água ..... 15
2.6. Análise de crescimento ..... 16
2.7. Procedimentos Analíticos ..... 17
2.7.1. Estresse natatório ..... 18
2.7.2. Parâmetros hematológicos ..... 18
2.8. Metabólitos ..... 20
2.9. Avaliação das enzimas antioxidantes ..... 21
2.10. Efeitos citotóxicos e genotóxicos ..... 23
2.11. Análise Estatística ..... 24

**3. Resultados ..... 25**

3.1. Qualidade da água ..... 25
3.2. Crescimento ..... 25
3.3. Performance Natatória ..... 28
3.4. Parâmetros hematológicos ..... 29
3.5. Metabólitos sanguíneos ..... 32
3.6. Avaliação das enzimas antioxidantes ..... 33
3.7. Avaliação de danos celulares ..... 35
3.8. Desempenho das dietas ..... 37

**4. Discussão ..... 39**

4.1. Crescimento ..... 39
4.2. Parâmetros hematológicos ..... 42
4.3. Metabólitos ..... 45
4.4. Avaliação das enzimas antioxidantes ..... 48
4.5. Avaliação de danos celulares ..... 52

**5. Conclusões ..... 55**

**6. Referências Bibliográficas ..... 57**

## 1. Introdução

A piscicultura é uma atividade que visa racionalizar o cultivo de peixes, exercendo particular controle sobre o crescimento, a reprodução e a alimentação destes animais (Galli & Torloni, 1985), oferecendo uma boa alternativa com maior rentabilidade e menor custo ambiental na produção de proteína animal em comparação com a pecuária (Castagnoli, 1992).

Na Amazônia, a piscicultura, uma prática milenar em vários países, encontra-se em estágio de desenvolvimento, embora esteja bem desenvolvida em outras regiões brasileiras (Val *et al.,* 2002). Na região, tem sido vista como uma atividade com grande potencial, considerando a existência dos estoques naturais de várias espécies com alto valor comercial (Val *et al*., 2002) e o desenvolvimento sustentável da região (Val & Honczaryk, 1995).

Por possuir carne bastante apreciada pela população local e por apresentar um declínio na captura em ambiente natural, a principal espécie criada na região Norte é o tambaqui, sendo cultivado em seis dos sete estados da região (Val *et al.,* 2002). Por este motivo, atrai um número relativamente grande de pesquisadores para estudar e propor meios para ampliar sua oferta no mercado e maximizar a sua produção (Araújo-Lima & Goulding, 1998).

O tambaqui (*Colossoma macropomum)* é o maior Characiforme da Bacia Amazônica (Goulding, 1980) e está amplamente distribuído na América do Sul (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Na natureza, alcança porte máximo em torno de 100cm de comprimento e até 30kg de peso (Goulding & Carvalho, 1982; Goulding, 1993; Araújo-Lima & Goulding, 1998).

No ambiente natural, o tambaqui é classificado por, como frugívoro exclusivo, quando adulto, e onívoro com tendência zooplanctofágo, na fase

jovem (Saint-Paul, 1984). Freeman (1995) considerou o tambaqui como o principal frugívoro da várzea. Isto foi confirmado por Silva (2003), ao analisar o trato digestório desta espécie, sugerindo que o zooplâncton só é consumido em uma época específica do ano, quando os itens de origem vegetal não estão disponíveis.

O consumo de frutos e sementes pelo tambaqui acontece, principalmente, na época de cheia quando há frutificação na floresta inundada (Goulding, 1980). Mais de 112 espécies de frutos e sementes, pertencentes a 36 famílias foram descritos como alimento do tambaqui (Silva, 1997). Dentre estas, destacam-se a munguba, a seringa e o jauarí, como as mais consumidas. Estima-se uma produção anual de cerca de uma tonelada ao ano para essas três espécies na planície do rio Solimões/Amazonas e seus afluentes de água barrenta a oeste da foz do rio Tapajós (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Waldhoff & Maia, 2000).

Estudos sobre a alimentação natural do tambaqui fornecem informações valiosas para elaboração de dietas artificiais (Pereira-Filho, 1995). As características observadas podem sugerir quais nutrientes devem ser incorporados para se aproximar da composição média natural, para que os animais apresentem bom desempenho (Carvalho, 1981; Roubach, 1991; Goulding, 1993; Silva, 1997; Araújo-Lima & Goulding, 1998; Mori-Pinedo *et al*., 1999).

Na tentativa de melhorar a alimentação artificial do tambaqui, foram testadas várias rações suplementadas com diferentes nutrientes, como a introdução de diferentes níveis de proteínas (Saint- Paul, 1990; Ximenes-Carneiro, 1991) e vitaminas (Chagas, 2001; Mendes, 2001; Aride, 2003).

Entretanto, apesar de apresentarem boas respostas fisiológicas e de crescimento, tornam os custos mais onerosos para produção.

O principal problema para maximizar a produção de tambaqui pelos criadores locais é a elaboração de uma dieta barata que inclua todos os nutrientes necessários (Pereira-Filho, 1995). Assim, foram realizadas tentativas para melhorar a dieta, do tambaqui, utilizando ingredientes regionais (Roubach & Saint-Paul, 1994; Silva, 1997; Mori-Pinedo *et al.*, 1999). Roubach & Saint Paul (1994) observaram que o tambaqui alimentado com munguba, seringa barriguda, embaúba e arroz *in natura*, apresentou crescimento menor do que aquele alimentado com ração elaborada. No entanto, os autores sugerem que dentre as dietas experimentais, a munguba foi a que apresentou melhor resultado.

Silva (1997) observou que a incorporação de frutos e sementes da Amazônia em rações, em substituição ao fubá de milho, elevou significativamente a digestibilidade de proteínas, lipídeos e carboidratos e melhorou a quantidade de energia da ração, sugerindo que estes produtos têm potencial como ingrediente para rações desta espécie. Mori-Pinedo *et al.* (1999) observaram que a farinha de pupunha pode substituir o fubá de milho nas rações para alevinos de tambaqui, sem prejudicar seu crescimento.

Segundo Alceste & Jory (2000), vários vegetais podem ser utilizados na alimentação de peixes pois, além de diminuir os custos da produção, também disponibilizaria aos animais uma fonte alimentar rica em vitaminas e outros importantes compostos com capacidades antioxidantes.

Antioxidantes são substâncias que previnem, interceptam ou reparam possíveis danos causados por radicais livres às células. Radicais livres são

átomos ou moléculas que possuem um elétron desemparelhado (número ímpar de elétrons) com alta reatividade química, especialmente como agente oxidante, pela tendência de adquirir o segundo elétron para estabilizar seu orbital de valência (Halliwell & Gutteridge, 1999; Picada *et al.*, 2003).

Atualmente, o termo radical livre foi substituído por espécies reativas de oxigênio (ERO), por incluir todas as espécies reativas, radicalares ou não, que contém oxigênio como os radicais hidroxil (HO•), ânion superóxido $O_2^{\bullet -}$, peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), oxigênio singlete ($^1O_2$) e ozônio ($O_3$) (Ferreira & Matsubara, 1997).

Normalmente, as ERO são produzidas nos seres vivos como conseqüência de diversos processos metabólicos que envolvem transferência de elétrons. Essa produção constante de ERO é acompanhada por uma contínua produção de agentes antioxidantes, que conseguem manter os níveis de ERO compatíveis com as funções celulares (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os antioxidantes são classificados de acordo com seu mecanismo de ação e divididos em enzimáticos e não-enzimáticos. Os enzimáticos são aqueles presentes naturalmente no organismo e os não enzimáticos são os que podem ser adquiridos por meio de dietas balanceadas, principalmente, a partir de vegetais (Fang *et al*., 2002; Picada *et al.,* 2003).

As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) que catalisam a redução das espécies reativas do oxigênio no meio intracelular. A SOD catalisa o oxigênio singlete em peróxido de hidrogênio e oxigênio e a CAT, o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Heffner & Repine, 1989).

Dentre os antioxidantes não-enzimáticos destacam-se as vitaminas, como o ácido ascórbico (vitamina C), o alfa-tocoferol (vitamina E) e o beta-caroteno (precursor da vitamina A), os flavonóides e outros detoxificantes. O ciclo redox da glutationa, por exemplo, ocorre naturalmente no organismo e age como um dos mais importantes processos de detoxificação disponibilizando ainda, a ação de várias enzimas que também agem como antioxidantes e detoxificantes, como a Glutationa-S-transferase (GST) (Picada *et al.*, 2003).

Vitaminas e flavonóides presentes nos vegetais, frutas e grãos mostram efeitos antioxidantes, atuando contra as agressões causadas pelos radicais livres (Bianchi & Antunes, 1999; Costa *et al*., 2000; Guo *et al*., 2003). Desta forma, alguns frutos amazônicos podem apresentar potencialidade como antioxidantes, pois são ricos em certas vitaminas. A pupunha (*Bactris gasipaes*), por exemplo, apresenta altos teores de β-caroteno (Yuyama *et al*., 2003) e o camu-camu pode apresentar até 3100mg/100g de polpa de vitamina C (Andrade *et al*., 1995; Yuyama *et al*., 2002).

Por outro lado, os vegetais podem deixar de apresentar papel benéfico por conter certas substâncias potencialmente tóxicas. De uma maneira geral, para se livrar dos predadores, os vegetais contêm uma série de substâncias químicas que podem causar distúrbios orgânicos. As toxinas, como são conhecidas estas substâncias, podem estar presentes nas folhas, frutos e sementes de todos os vegetais (Franke *et al.,* 2003).

De acordo com os resultados de Shah *et al.* (1998), ratos alimentados com dietas contendo extratos de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e pimenta (*Piper longum*) apresentaram redução nos níveis de hemoglobina [Hb]. Em peixes, os efeitos nocivos de vegetais incorporados na alimentação foram

observados em tilápias que receberam ração contendo níveis maiores que 33,3% de farelo de algodão. Neste caso foram notadas lesões microscópicas no fígado, o que caracteriza degeneração, necrose e infiltração peridural (Oioli *et al.*, 1992).

O algodão apresenta em sua composição, um pigmento chamado gossipol que pode atuar como um fator antinutricional ou tóxico, dependo do processamento a que for submetido, afetando vários processos metabólicos em animais monogástricos. Peixes, quando comparados a outros monogástricos, parecem apresentar mais tolerância a essa substancia (Martin, 1990). Nenhum efeito nocivo, entretanto, foi observado por Salaro *et al*. (1999) ao alimentar tilápia-do-nilo com dietas contendo 24% de farelo de algodão.

A soja é a principal fonte protéica de origem vegetal; porém, sua utilização pode ser limitada por apresentar fatores antinutricionais, como o inibidor da enzima digestiva tripsina e hemaglutininas, que provocam aglutinação e eritrócitos (Carratore *et al*., 1996). A diminuição no ganho de peso e na taxa de síntese protéica em alevinos de “catfish” alimentados com farinha de soja crua levou Lovell (1981) a atribuir o resultado negativo ao fator antitríptico da soja.

O farelo de cacau, um subproduto que contem um teor médio de proteína bruta de 15,3%, apresenta na sua composição, alguns fatores antinutricionais que podem influenciar o metabolismo do animal. Alcalóides, como theobromina, theofilina e cafeína, bem como o inibidor da tripsina são os três mais conhecidos (Sotelo & Alvarez, 1991). Pezzato *et al.* (1996) sugerem que o emprego do farelo de cacau na dieta de tilápia-do-nilo deve ser feito com

cautela, pois pode resultar em efeitos nocivos sobre o fígado, além de alterar o comportamento do animal, devido aos alcalóides presentes.

Alguns vegetais, consumidos pelo tambaqui em ambiente natural, também apresentam alguns fatores antinutricionais e potencialmente tóxicos. O arroz silvestre (*Oryza sativa*) apresenta em sua composição, inibidores de proteases, fitohemaglutininas e ácido fítico (Liener, 1980). Em sementes frescas de seringa comum (*Hevea brasiliensis*) foi encontrado até 0,09% de ácido prússico (Gohl, 1981) e no fruto da pupunha foram observadas duas substancias que inibem a digestão das proteínas e um ácido (provavelmente oxálico) que irrita a mucosa bucal (Clement, 1989).

De acordo com Tsukamoto & Takahashi (1992), a toxicidade dos alimentos de origem vegetal depende da concentração e das repostas fisiológicas de cada indivíduo, constituindo uma relação espécie-específica. Isto foi evidenciado em duas espécies de tilápias (*Oreochromis* sp. e *Tilapia guineensis*), alimentadas com dietas contendo 50% de farinha da semente do algodão e com torta de cacau que apresentou bom desempenho zootécnico (Jackson *et al*., 1982; Fagbenrgo, 1988; Mbahinzireki *et al*., 2001)

O desempenho da dieta é, por via de regra, avaliado pelos índices zootécnicos do animal, em função das medidas de peso e comprimento. Porém, este tipo de análise além de necessitar de um longo período de alimentação, não mostra efeitos adversos, sofridos pelo organismo devido à dieta.

Um curto período de alimentação com dietas experimentais pode ser insuficiente para o aparecimento de um bom resultado. Embora, Roubach (1991) tenha observado que o tambaqui alimentado com vegetais apresenta

menor crescimento que o controle, por meio da aplicação das dietas experimentais foi por um período de apenas 40 dias, sendo que o crescimento foi avaliado pela medida de peso e comprimento.

Segundo Weber *et al*. (2003), um curto período de alimentação com dietas experimentais pode ser insuficiente para o aparecimento de um bom resultado. Assim, estes autores sugerem que a análise de crescimento pode ser também obtido por meio da avaliação do crescimento instantâneo determinado pela proporção RNA: DNA. Esta análise consiste em verificar se está havendo síntese protéica uma vez que a quantidade de DNA nas células é constante, enquanto o RNA encontra-se aumentado quando há síntese protéica e diminuído na privação alimentar (Péragon *et al*., 2001; Weber *et al*., 2003).

O crescimento é um processo complexo onde atuam diferentes reações fisiológicas. Por isso, distúrbios fisiológicos causados por deficiências alimentares, podem causar alterações no equilíbrio fisiológico, interferindo no crescimento do animal (Almeida-Val & Val, 1995; Schmidt-Nielsen, 1996; Tavares-Dias *et al.*, 1999). O mesmo ocorre quando o animal é exposto a agentes estressores ambientais ou mesmo orgânicos.

Sob cultivo, o animal está exposto a várias situações estressantes (Tavares-Dias, 2001; Barton *et al.,* 2003; Gomes *et al*., 2003). Assim, uma outra maneira de avaliar estado nutricional é induzir o animal a situações estressantes e verificar de que maneira responde ao desequilíbrio fisiológico (Torres *et al*., 1986). Este tipo de distúrbio acontece quando há excesso na produção de radicais livres, que acaba superando os mecanismos de defesa naturais, provocando danos e disfunções nas células (Baynes & Dominiczak, 2000; Fang *et al.*, 2002; Picada *et al.*, 2003).

Val (2000; 2002) relata que os peixes realizam ajustes metabólicos em condições desfavoráveis. Em condições estressantes é comum observar mudança no comportamento, acompanhada de várias mudanças na fisiologia e na bioquímica do animal. O desequilíbrio orgânico causado pelo estresse pode causar alterações, por exemplo, nos valores de hematócrito (Ht), nas concentrações de hemoglobina ([Hb]) e no número de células vermelhas em circulação (RBC), indicando uma possível hemoconcentração ou hemodiluição causada por ajustes osmorregulatórios (Montero *et al*., 1999).

A hemoconcentração pode ser causada pelo aumento no consumo de oxigênio, que sugere um aumento na concentração de hemoglobina, transportadora de $O_2$ do sangue para os tecidos, para tentar suprir o aumento da demanda energética (Nikinmaa *et al.*, 1983). Além dessas modificações quantitativas, podem ocorrer ainda alterações qualitativas nos eritrócitos, como redução no seu tamanho além de um aumento na fragilidade nas membranas dessas células (Montero *et al*., 1999).

O estado nutricional dos peixes é o que determina seu crescimento e sua resposta a diferentes modificações ambientais (Baldisseroto, 2002). Um peixe bem alimentado pode responder de maneira diferenciada ao estresse promovendo, conseqüentemente, um bom crescimento. Assim, para se obter uma produção máxima na piscicultura, é necessário se considerar os diferentes fatores envolvidos, inclusive a alimentação. Um erro na escolha ou no preparo da ração, por exemplo, pode provocar um maior gasto na alimentação, reduzindo conseqüente o lucro (Baldisseroto, 2002).

Para o tambaqui, a incorporação de frutos, além de reduzir o custo na produção, pode viabilizar o uso de produtos regionais, consumidos em

ambiente natural. Por outro lado, a utilização dos frutos e sementes, pelo tambaqui é realizada apenas em um período do ano, por isso a utilização desses frutos deve ser analisada com cautela, uma vez que alterações em nível fisiológico e bioquímico podem inviabilizar o uso destes.

## 1.2. Objetivo Geral

Avaliar o uso de frutos e sementes de plantas, de áreas alagáveis da Amazônia, na alimentação de tambaqui (*Colossoma macropomum*), a partir da análise de aspectos de sua fisiologia e sua bioquímica.

### 1.2.1. Objetivos específicos

1. Analisar, de forma comparativa, o crescimento instantâneo do tambaqui alimentado com quatro frutos: camu-camu (*Myrciaria dubia*), catoré (*Crataeva benthami*), embaúba (*Cecropia latiloba*) e jauari (*Astrocaryum jauari*), e uma semente: munguba (*Pseudobombax munguba*) de áreas alagáveis da Amazônia

2. Avaliar a homeostase fisiológica do tambaqui por meio da determinação de parâmetros hematológicos, metabólicos e estresse natatório bem como possíveis efeitos genotóxicos causados pela alimentação com os frutos e semente citados acima.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Obtenção dos animais

Exemplares jovens de *Colossoma macropomum* foram adquiridos na Estação de Piscicultura de Balbina (Presidente Figueredo/Am) e transportados para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Nas dependências do laboratório, os peixes receberam um tratamento profilático e foram aclimatados por um período de 15 dias em tanques de 500l com aeração constante e renovação de água, sendo alimentados durante este período com ração comercial (26% de proteína bruta) *ad libitum*.

### 2.2. Coleta dos frutos e semente

Foram testados quatro frutos e uma semente que compõem naturalmente a dieta do tambaqui: os frutos catoré (*Crataeva benthami*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), embaúba (*Cecropia latiloba*) e jauari (*Astrocaryum jauari*) a semente de munguba (*Pseudobombax munguba*).

Para a coleta dos frutos e obtenção das sementes foram realizadas duas excursões ao Lago Catalão (lago de várzea), próximo de Manaus/AM. A primeira foi realizada com objetivo de verificar o período de frutificação dos frutos escolhidos (início de junho/2004) e a segunda, ocorrida no final do mês de julho de 2004, para coleta efetiva dos frutos.

No local, os frutos foram retirados manualmente, ou com auxílio de um podão, armazenados em sacos plásticos transparentes devidamente identificados e, guardados em caixa de isopor contendo gelo para sua conservação e redução da perda de suas propriedades nutricionais. Em

seguida, os frutos e a semente foram transportados para o laboratório (LEEM), onde foram armazenados em freezer –20ºC até a data da preparação das dietas.

### 2.3. Elaboração das dietas experimentais

Para a preparação das rações experimentais, os frutos de camu-camu (*M. dubia*), catoré (*C. benthami*) e embaúba (*C. latiloba*) foram cortados e moídos em moedor de carne elétrico. O fruto jauarí (*A. jauari*) passou por um processo de separação de polpa e semente e, após esse processo, a polpa foi também moída em moedor carne. Já o fruto de munguba (*P. munguba*) teve primeiramente sua casca retirada, seguida pela separação de suas sementes que então foram moídas.

Após esta fase, todos os frutos e a semente, *in natura*, foram misturados manualmente, na proporção de 1:1, à ração comercial (26% de proteína bruta) previamente moída. Em seguida foram repelletizados, secos em estufa à temperatura de 55ºC, por 12 horas e armazenados a –20ºC em porções devidamente etiquetadas. A composição centesimal dos frutos e da semente é apresentada na tabela 1.

Para o controle, foi utilizada 100% da ração comercial base (30,6% proteína bruta) que também foi moída, misturada manualmente e repelletizada nas mesmas condições descritas para rações teste. Depois de preparadas, tanto a ração controle como as rações teste (mistura da ração com os frutos e sementes), tiveram sua composição bromatológica determinada (tabela 2).

Tabela 1. Composição centesimal dos frutos e semente utilizados neste trabalho. Dados de Silva (2003).

| Tratamento | Umidade (%) | PB (%) | EE (%) | ENN (%) | FB (%) | MM (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Munguba** | 5,9 | 29,9 | 34,7 | 15,8 | 8,6 | 5,1 |
| **Embaúba** | 6,5 | 10,7 | 10,5 | 39,6 | 28,5 | 4,2 |
| **Catoré** | 3,1 | 8,6 | 6,1 | 45,5 | 31,4 | 5,3 |
| **Jauarí** | 3,4 | 5,1 | 11,0 | 45,6 | 32,5 | 2,4 |
| **Camu-camu** | 11,1 | 3,9 | 7,2 | 55,5 | 20,4 | 1,9 |

PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FB: fibra bruta; ENN: extrato não nitrogenado; MM: material mineral.

Tabela 2. Composição centesimal das rações controle e experimentais utilizados neste trabalho.

| Tratamento | Umidade (%) | PB (%) | EE (%) | ENN + FB (%) | MM (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| **Controle** | 7,9 | 30,6 | 3,5 | 44,6 | 13,4 |
| **Munguba** | 6,9 | 28,9 | 8,3 | 44,9 | 11,0 |
| **Embaúba** | 6,0 | 26,6 | 3,6 | 52,4 | 11,4 |
| **Catoré** | 10,6 | 25,7 | 3,2 | 49,7 | 10,8 |
| **Jauarí** | 7,0 | 25,1 | 3,5 | 53,3 | 11,1 |
| **Camu-camu** | 7,8 | 28,0 | 2,9 | 48,9 | 12,4 |

PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FB: fibra bruta; ENN: extrato não nitrogenado; MM: material mineral.

A alimentação dos animais submetidos aos tratamentos experimentais foi efetuada duas vezes ao dia (9:00 e 16:00), durante 30 dias, *ad libitum*.

### 2.4. Protocolo experimental

O experimento foi realizado em seis etapas, sendo que cada etapa consistiu na montagem de seis aquários de 60 litros, providos de aeração

constante e filtro biológico e mecânico, de acordo com os tratamentos (quatro frutos, uma semente e um controle).

As etapas foram consideradas réplicas (N=6) e foram montadas em intervalo de dois dias no mesmo horário e nas mesmas condições. Em cada aquário foram alocados oito juvenis de tambaqui pesando 30,67±3,01g e medindo 10,02±0,33cm.

### 2.5. Variáveis físicas e químicas da água

O monitoramento de algumas variáveis físico-químicas da água foi realizado diariamente, sendo avaliados o pH, medido por meio de um pHmetro Micronal B374, a temperatura e o oxigênio dissolvido na água, medidos com auxílio de um termo-oxímetro YSI modelo 55/12 FT. Além disso, foram monitorados semanalmente os níveis de amônia e nitrito, por estarem relacionados à composição da ração. A renovação da água dos aquários durante o período experimental foi realizada à taxa de 20% ao dia.

#### 2.5.1. Amônia

Os níveis de amônia foram determinados por ensaio colorimétrico segundo por Verdouw *et al.* (1978). O método consistiu na reação da amônia com salicilato de sódio e hipoclorito de sódio, utilizando como catalisador o nitroprussiato de sódio. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 650nm e as concentrações de amônia foram expressas em mg/L.

### 2.5.2. Nitrito

Para determinação do nitrito foi utilizada a técnica descrita por Boyd (1984), que consistiu na reação primária do nitrito com uma solução ácida de sulfanilamida em ácido clorídrico e, em seguida, uma reação do produto da reação anterior com n(1-naftil). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 543nm, sendo os resultados expressos em mg/L.

## 2.6. Análise de crescimento

### 2.6.1. Biometria e biomassa

No início de cada etapa experimental, oito animais foram medidos (comprimento padrão) em um ictiômetro apropriado com precisão de um milímetro e pesados em balança semi-analítica com precisão 0,01 grama. No final do período experimental, apenas dois animais de cada aquário (n=12), escolhidos aleatoriamente, foram medidos e pesados como descrito anteriormente e analisados.

### 2.6.2. Análise de proporção RNA/DNA

A quantificação de DNA total foi realizada de acordo com o método descrito por Labarca & Paigen (1980).

Para a extração do DNA total foram adicionados 9,5ml de água deionizada a 0,5g de músculo branco, em seguida homogeneizado utilizando o “Tissue Tearor” (Model 9985370). Transferiu-se 1ml do homogeneizado para um Eppendorff e acrescentou-se 0,5ml de ácido perclórico (PCA) 0,6M, mantendo-se os tubos a 4ºC de um dia para o outro. No dia seguinte, a solução foi homogeneizada com vortex e levada a descansar por 10min a 4ºC. A seguir, as

amostras foram centrifugadas por 15 minutos, 6000rpm, a 4ºC. Após descartar o sobrenadante, o pellete foi lavado duas vezes com 0,4ml de PCA 0,2N. A cada lavagem, centrifugou-se o tubo nas mesmas condições descritas acima.

Posteriormente, foi adicionado 0,8ml de hidróxido de potássio 0,3N, misturados imediatamente e incubados em um agitador a 37ºC, 30opm (Oscilações por minuto), por três horas. Prosseguiu-se a extração com a incubação das amostras por 5 minutos em gêlo e adição de 0,4ml de PCA 1,2N gelado e, descanso por 10 minutos. Seguiu-se centrifugação a 6000rpm, por 15 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e utilizado, posteriormente, para quantificação do RNA total. O pellete resultante foi enxaguado duas vezes com 1ml de PCA 0,2N gelado, sendo que a cada enxágüe, o sobrenadante foi adicionado ao anterior e, o pellete resultante foi congelado a –20ºC.

Para quantificar o DNA, o pellete foi descongelado e dissolvido em 1ml de hidróxido de potássio 0,1N e deixado em repouso de um dia para o outro. No dia seguinte, 20µl da amostra de DNA foram adicionados a 1980µl de água MiliQ. Essa solução foi quantificada no espectrofotômetro (Shimadzu UV240) em 260nm. Os resultados estão apresentados como µg de DNA/mg de tecido.

O RNA extraído foi descongelado e adicionados e lidos em espectrofotômetro (Shimadzu UV240), a 260nm. Os resultados estão expressos em µg de RNA/mg de tecido.

### 2.7. Procedimentos Analíticos

Ao final de cada etapa experimental, dois animais foram coletados aleatoriamente. Um dos animais foi submetido, primeiramente, a estresse

natatório (túnel de natação), enquanto o outro foi anestesiado com MS222 (5mg/l) e levado diretamente à coleta de sangue e tecidos. Após o teste natatório, o outro animal também foi anestesiado e teve uma amostra de seu sangue da veia caudal coletado por meio de seringas heparinizadas.

### 2.7.1. Estresse natatório

Este teste foi desenhado para determinar a velocidade crítica de natação (Ucrit). Por ser um teste de esforço, reflete o estado de saúde do animal, bem como sua capacidade anaeróbica, condições estas intimamente relacionadas ao estado nutricional do animal.

Para avaliar o desempenho natatório, um peixe de cada aquário foi exposto a uma velocidade mínima, a qual foi aumentada gradativamente até que o indivíduo atingisse a fadiga. O tempo e a velocidade em que o peixe chega à fadiga foram usados para calcular $U_{crit}$, por meio da fórmula apresentada a seguir, como descrito por Brett (1964).

$$\boxed{\mathbf{Ucrit = ui + (ti / tiii \times uii)}}$$

onde: ui = última velocidade da natação na qual o peixe suportou nadar; ti = tempo em que o peixe fatigou; tiii = período de tempo estipulado para cada velocidade; uii = velocidade em que o peixe fatigou.

### 2.7.2. Parâmetros hematológicos

As amostras de sangue foram obtidas por meio de punção da veia caudal com auxílio de seringas previamente heparinizadas.

#### 2.7.2.1. Hematócrito (Ht)

Para determinar o hematócrito (Ht), amostras de sangue foram transferidas para tubos de microhematócrito e centrifugadas a 12.000rpm durante 10min em centrífuga para microhematócrito FANEM Modelo 207N, sendo a leitura do porcentual (%) de sedimentação feita com o auxílio de uma escala padronizada.

#### 2.7.2.2. Concentração de hemoglobina ([Hb])

A concentração de hemoglobina ([Hb]) foi determinada segundo o método da cianometahemoglobina, descrito por Kampen & Zijlstra (1964). Para tanto, 15μl de sangue foram diluídos em 3ml de reagente Drabkin (KCN 0,5g; $KH_2PO_4$ 1,4g; $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0g; água destilada q.s.p. 1l). Após agitação, a absorbância das amostras foi determinada em 540nm em um espectrofotômetro Spectronic Genesis-2. Os valores da concentração de hemoglobina foram expressos em g/dl e obtidos a partir da fórmula:

$$\boxed{[Hb] = A_{540} x\ 0{,}146 x 201}$$

onde: A540 = valor da leitura na absorbância de 540nm; 0,146 = fator de correção; 201 = diluição das amostras

#### 2.7.2.3. Contagem do número de eritrócitos (RBC)

O número de eritrócitos foi estimado por meio da diluição das amostras de sangue em solução de formol citrato (3,8g de citrato de sódio; 2,0ml de formol 40% e água destilada q.s.p. 100ml) na proporção 1:200 (v/v). A contagem das células vermelhas circulantes (RBC) foi realizada em câmara de Neubauer, em microscópio óptico Motic Profissional em 40x, e o número total de eritrócitos foi

expresso em milhões de células por milímetro cúbico de sangue ($x10^6/mm^3$), calculado por meio da seguinte equação:

**RBC= nº de célulasxAxD**

onde: A= correção para a área analisada da câmara de Neubauer= 50;

D= fator de diluição

### 2.7.2.4. Determinação das constantes corpusculares

As constantes corpusculares volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinadas a partir dos valores correspondentes ao número de eritrócitos circulantes, ao hematócrito e à concentração de hemoglobina, de acordo com as seguintes fórmulas estabelecidas por Brow (1976):

**VCM ($\mu m^3$)= Htx10/RBC**

**HCM (pg)= [Hb]x10/RBC**

**CHCM (%)=[Hb]/Htx100**

## 2.8. Metabólitos

### 2.8.1. Glicose

A concentração de glicose sanguínea foi determinada com auxílio de medidor eletrônico de glicose sangüínea (Accu-Chek Advantage II). Para isso, 10$\mu$l de sangue total são colocados nas fitas de leitura do aparelho que, por

meio de uma análise eletroquímica da amostra, apresenta a concentração de glicose em g/dl.

### 2.8.2. Hemoglobina Glicosilada

A concentração de hemoglobina glicosilada no sangue (HbG) foi determinada por meio de um “kit” comercial Doles. Tal procedimento consistiu em misturar o sangue total a uma solução hemolisante. Em seguida foram transferidos 100µl do hemolisado para um tubo, com resina catiônica, e invertidos por 8 minutos em um homogeneizador hematológico. Após a separação da resina e da solução de hemoglobina foi calculada a porcentagem de Hb glicosilada por meio de leitura em espectrofotômetro Spectronic Genesis-2 em 405nm, conforme descrito pelo fabricante do “kit” utilizado.

## 2.9. Avaliação das enzimas antioxidantes

### 2.9.1 Preparação dos homogenados

Para as dosagens das enzimas Catalase e Glutationa-S-Transferase as amostras de fígado foram homogeneizadas, utilizando “Tissue Tearor” (Model 9985370), com tampão de homogeneização (Tris 20mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, Sacarose 0,5M, KCl 0,15M e PMSF 0,1mM) numa proporção 1:4 (tecido tampão).

### 2.9.2. Glutationa S-Transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi determinada pelo método descrito por Habig *et al.* (1974) e Habig & Jakoby (1981) utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1mM GSH (glutationa reduzida) e 1mM de CDNB (1-cloro-,4-dinitrobenzeno).

A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 340nm, em um espectrofotômetro Spectronic Genesis 2 . A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção molar do CDNB e as unidades serão expressas em $\mu$mol. $min^{-1}$. mg $proteína^{-1}$.

### 2.9.3. Catalase (CAT)

A catalase foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) em 240nm (Aebi, 1984). Para tanto, foi preparado um tampão para o meio de reação com peróxido de hidrogênio 10mM e tampão TE (Tris HCl 1M e EDTA 5mM), sendo as amostras diluídas 100x no tampão TE. Na leitura, 10$\mu$l de homogeneizado foram adicionados a uma cubeta de quartzo contendo 990$\mu$l de tampão de reação, misturadas por inversão e lidas em 240nm em um espectrofotômetro Shimadzu. Os resultados foram expressos em $\mu$mol. $min^{-1}$. mg $proteína^{-1}$.

### 2.9.4. Análise de Proteínas totais do tecido

A concentração de proteínas totais, no músculo, foi determinada pelo método do biureto modificado usando um “kit” comercial Doles. Tal procedimento consistiu em misturar 2,5ml do reagente de biureto com 50$\mu$l de homogeneizado da amostra, tendo como solução padrão a mistura de 2,5ml do reagente de biureto com 50$\mu$l de padrão. As soluções foram homogeneizadas e, em seguida, ficaram em repouso por 5min à temperatura ambiente. Após este procedimento, as amostras foram lidas em um espectrofotômetro Spectronic Genesis-2 em 550nm. A concentração de proteínas nas amostras está expressa em g/dl.

## 2.10. Efeitos citotóxicos e genotóxicos

### 2.10.1. Concentrações endógenas de produtos celulares oxidados (TBARS)

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada por meio do método descrito por Ohkawa (1979), que prevê a diluição de 100μl de plasma em 0,90ml de tampão Tris-HCl 60mM pH 7,4; 1,0ml de ácido tricloroacético (TCA) 30% e 1,0ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73%. Em seguida as amostras foram agitadas e aquecidas em banho-maria à 100ºC por uma hora. A seguir foram resfriadas, centrifugadas e lidas, utilizando um espctrofotômetro Spectronic Gênesis-2, em um comprimento de onda de 535nm. A concentração de produtos celulares oxidados está expressa em nmoles. $ml^{-1}$ de plasma.

### 2.10.2. Anormalidades nucleares eritrociticas (ANE)

As anormalidades nucleares eritrocíticas foram determinadas de acordo com a metodologia revista e modificada por Pacheco & Santos (1998). Esfregaços de sangue foram fixados e, depois de secos, corados com solução May-Grünwald por 2min e com solução May-Grünwald e água destilada na proporção 1:1 por 10min. Por fim, os esfregaços foram corados com Giemsa e água destilada (1:6) por 10min. Depois de corados, os esfregaços foram lavados e secos em temperatura ambiente. As lesões observadas foram identificadas como: micronúcleo (M), núcleo lobado (L), núcleo segmentado (S) e núcleo em forma de rim (K). Foram contadas 1000 células adultas, de cada indivíduo, com o auxílio do microscópio óptico da marca Motic com aumento de

100x. Os resultados estão expressos em porcentagem (%) de ANE, considerando a soma de todas as lesões (M+L+S+K) como 100%.

### 2.11. Análise Estatística

Todos os dados são expressos como média e erro padrão (SEM). A significância das diferenças foi analisada estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA, one-way), seguido de teste à posteriori de Tukey. Foi mantido o nível de significância de 5% para todas as análises (Zar, 1984).

## 3. Resultados

### 3.1. Qualidade da água

A média das variáveis físico-químicas da água (pH, oxigênio dissolvido e temperatura) analisadas neste estudo, se manteve dentro dos limites aceitáveis para manutenção dos peixes (Tabela 3). Os valores de pH, observados neste estudo, para os diferentes tratamentos, variaram de 5,89 a 6,07. Os níveis de oxigênio dissolvido variaram entre 3,81 e 4,9, sendo que o valor recomendado para tambaqui é de 3,0mg/l. A temperatura oscilou entre 27,42 e 27,99ºC (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de pH, oxigênio dissolvido e temperatura observados durante o período experimental.

| Tratamentos | pH | Oxigênio (mg/L) | Temperatura (ºC) |
|---|---|---|---|
| **Controle** | 6,07±0,06 | 4,09±0,15 | 27,49±0,24 |
| **Munguba** | 5,98±0,05 | 3,85±0,16 | 27,90±0,22 |
| **Embaúba** | 6,02±0,05 | 4,07±0,15 | 27,99±0,26 |
| **Catoré** | 6,07±0,06 | 3,91±0,13 | 27,76±0,26 |
| **Jauari** | 6,34±0,05 | 3,81±0,21 | 27,54±0,27 |
| **Camu-camu** | 5,89±0,06 | 4,04±0,16 | 27,42±0,24 |

### 3.2. Crescimento

Os exemplares de tambaqui alimentados com frutos e sementes regionais, neste trabalho, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e o controle para o peso e comprimento inicial e final, bem como para ganho de peso e taxa específica de crescimento (Tabela 4).

Tabela 4. Desempenho do tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentado com ração suplementada com frutos e sementes de áreas alagadas da Amazônia. Os valores estão expressos como média±SEM.

| **Índices** | **Controle** | **Munguba** | **Embaúba** | **Catoré** | **Jauarí** | **Camu-camu** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Peso Inicial (g) | 32,5±3,1 | 30,7±2,2 | 29,8±3,3 | 29,4±3,2 | 32,1±4,1 | 29,4±2,1 |
| Peso Final (g) | 44,0±4,8 | 34,2±3,4 | 38,4±3,7 | 40,1±3,3 | 41,4±2,3 | 41,5±3,7 |
| Comprimento inicial (cm) | 10,2±0,3 | 10,1±0,3 | 9,90±0,4 | 9,9±0,3 | 9,9±0,4 | 9,95±0,3 |
| Comprimento final (cm) | 11,0±0,3 | 10,3±0,2 | 10,8±0,4 | 10,8±0,4 | 11,1±0,3 | 10,9±0,3 |
| Ganho de peso (%) | 47,8±31,9 | 11,4±8,6 | 42,5±17,3 | 42,8±17,3 | 41,0±20,8 | 45,7±19,3 |
| G (SGR%) | 1,00±0,60 | 0,31± 0,26 | 0,87±0,62 | 1,08±0,37 | 0,96±0,50 | 1,1±0,43 |

O crescimento instantâneo, medido por meio da taxa RNA:DNA, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos testados e o controle (Figura1A). A quantidade de DNA, como esperado, apresentou homogeneidade entre os tratamentos variando entre 0,43±0,10 e 0,54±0,07, enquanto que a quantidade de RNA mostrou-se variada de acordo com a dieta empregada (Figura 1B e 1C).

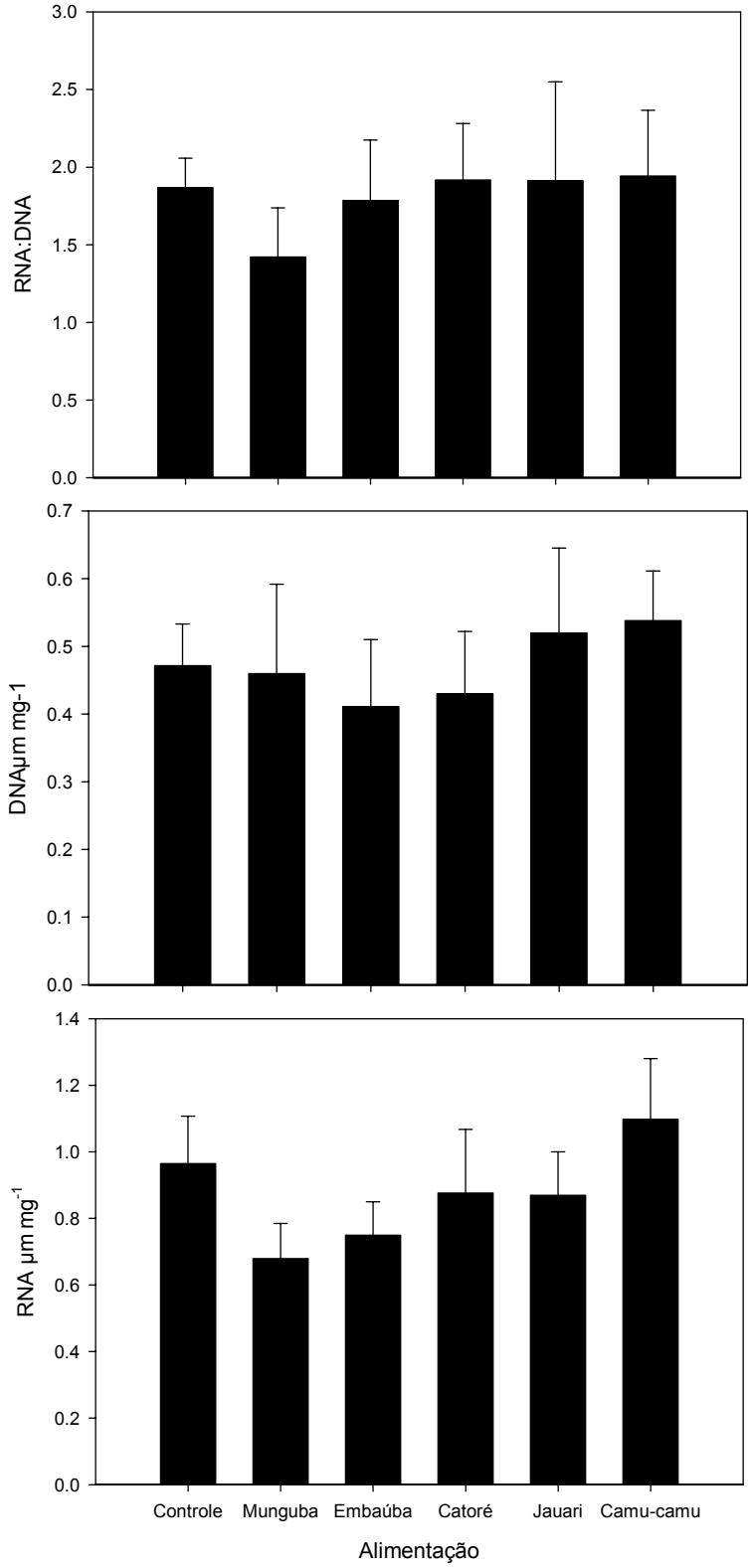


Figura 1. Relação do RNA:DNA (A) e valores de DNA (B) e RNA total (C) do tecido muscular de exemplares de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com ração suplementada com munguba, embaúba, catoré, jauari e camu-camu.

### 3.3. Performance Natatória

A velocidade crítica de natação para o tambaqui não apresentou diferença estatística entre as dietas experimentais e controle (Figura 2). A menor velocidade foi obtida pelos animais alimentados com dietas suplementadas por catoré (6,43±0,20) e a maior a suplementada por embaúba (6,88±0,40).

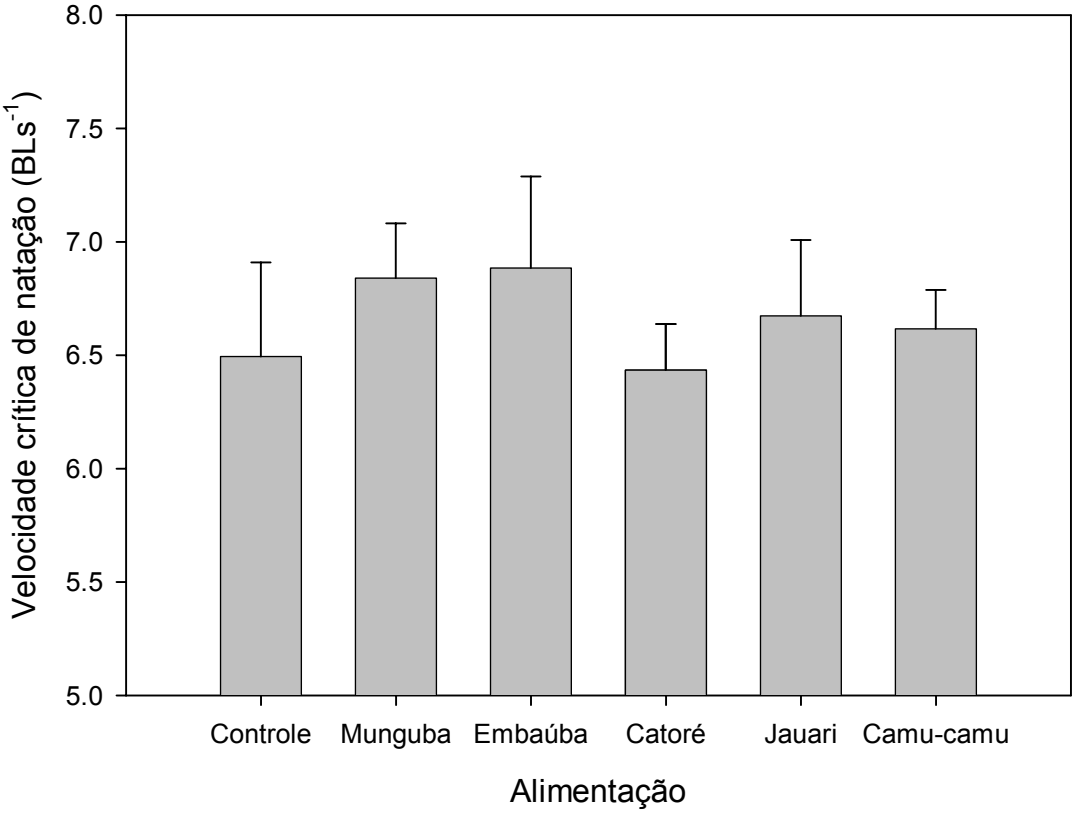


Figura 2. Valores de velocidade crítica de natação de exemplares de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com ração suplementada com munguba, embaúba, catoré, jauari e camu-camu.

### 3.4. Parâmetros hematológicos

Os valores correspondentes ao hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]) e número de eritrócitos (RBC) observados nos exemplares de tambaqui alimentados com ração comercial suplementada com munguba (*P. munguba*), embaúba (*C. latiloba*), catoré (*C. benthami*), jauari (*A. jauari*) e camu-camu (*Myrciaria* sp.) são apresentados na Figura 1. Os valores de Ht, [Hb] e RBC não apresentaram diferença significativa, entre os tratamentos experimentais, para os animais não submetidos ao estresse natatório. No entanto, os exemplares de tambaqui submetidos ao exercício apresentaram um pequeno aumento no hematócrito, em todos os tratamentos, com diferença significativa ($p<0,05$) para os animais alimentados com dieta contendo munguba, embaúba e catoré (Figura 1A).

Os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), calculados a partir dos índices hematológicos, não apresentaram diferença estatística entre as diferentes alimentações e entre os animais expostos ou não ao estresse natatório (Tabela 5).

Tabela 5.Valores de Volume Corpuscular Médio (VCM, $\mu m^3$), Hemoglobina corpuscular média (HCM, pg), Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM, %) e Hemoglobina glicosilada (HbG) de exemplares de C. macropomum alimentados com ração suplementada com munguba, embaúba, catoré, jauari e camu-camu

| Parâmetros | | Controle | Munguba | Embaúba | Catoré | Jauarí | Camu-camu |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| VCM | S.E. | 161,7+21,8 | 174+19,5 | 185,6+24,1 | 195,3+27,5 | 191,4+21,1 | 159,2+19,6 |
| | C.E. | 204,1+38,4 | 383,1+153,1 | 261,1+41,3 | 232,0+38,8 | 217+41,1 | 197,4+42,8 |
| HCM | S.E. | 46,9+9,6 | 43,5+8,5 | 41,7+5,3 | 50,1+4,8 | 44,0+5,9 | 44,8+8,0 |
| | C.E. | 47,6+13,3 | 61,1+6,2 | 50,1+8,1 | 54,4+11,0 | 45,9+6,9 | 47,1+14,5 |
| CHCM | S.E. | 28,7+4,9 | 24,9+3,4 | 24,1+3,9 | 27,2+3,0 | 23,0+1,9 | 26,9+2,5 |
| | C.E. | 22,7+2,0 | 20,6+4,2 | 23,0+3,8 | 24,7+3,7 | 22,4+1,4 | 24,8+4,0 |
| HbG | S.E. | 40,3+3,1 | 39,1+1,4 | 40,4+2,2 | 42,4+3,4 | 38,6+1,4 | 39,8+2,0 |
| | C.E. | 53,7+8,9 | 47,2+4,0 | 54,3+6,5 | 49,1+5,8 | 51,7+6,3 | 49,9+6,6 |

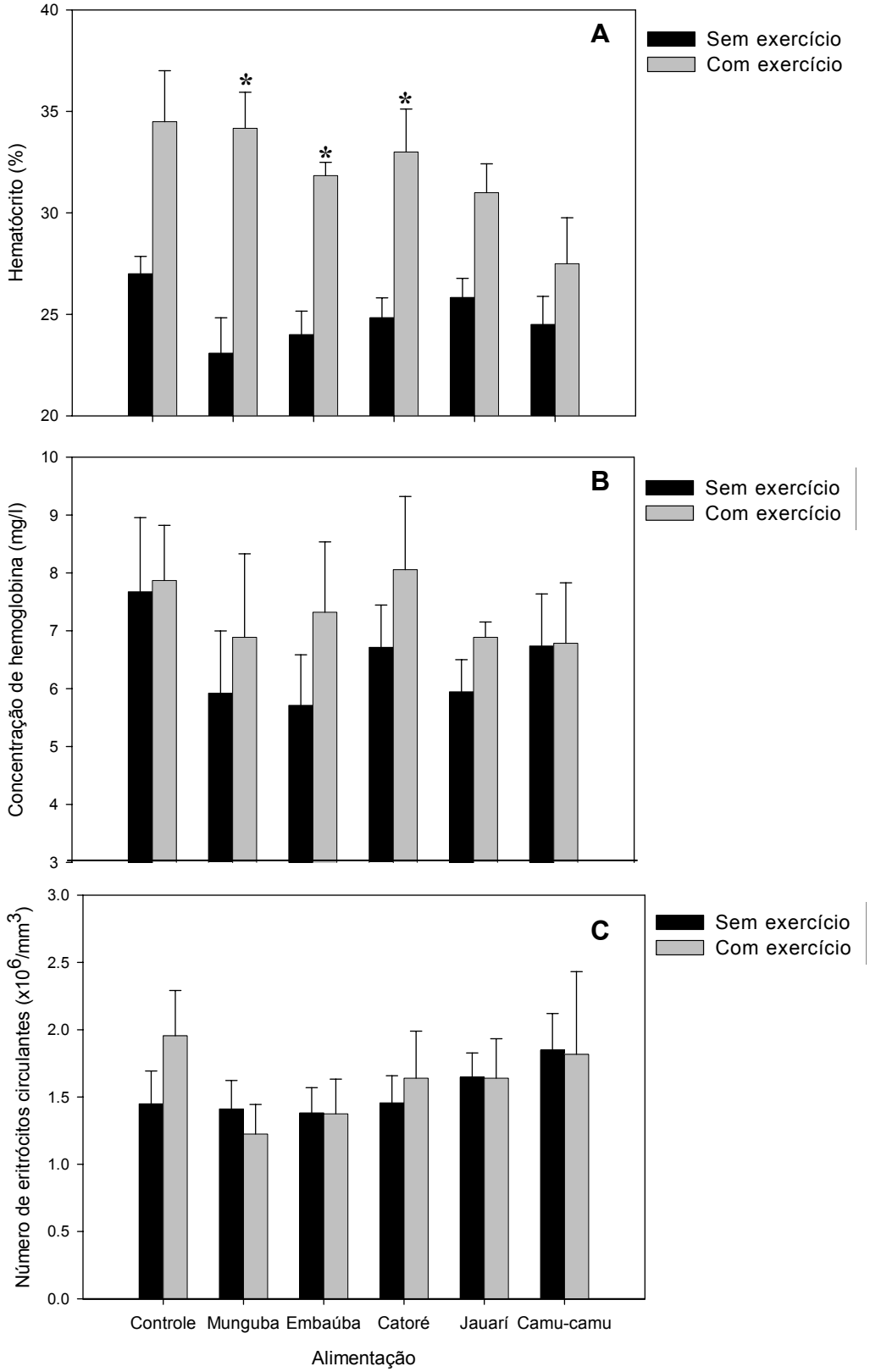


Figura 3. (A) Hematócrito (Ht); (B) Concentração de hemoglobina ([Hb]); (C) Número de eritrócitos (RBC) de exemplares de *C. macropomum* alimentados com ração suplementada com munguba, embaúba, catoré, jauari e camu-camu. * Indica diferença estatística significativa entre os animais alimentados com a mesma dieta, não submetidos ou submetidos ao estresse natatório ($p<0,05$).

### 3.5. Metabólitos sanguíneos

A concentração de glicose sanguínea nos exemplares de tambaqui submetidos ao estresse natatório apresentou-se aumentada em todos os tratamentos, com diferença significativa para cinco, dos seis tratamentos utilizados, inclusive o controle, sendo que somente os animais que receberam suplementação de camu-camu não apresentaram diferença na concentração sanguínea de glicose (Figura 4).

Aumento similar aos encontrados para a concentração de glicose no sangue foram observados para hemoglobina glicosilada (HbG), onde os animais submetidos ao túnel de natação apresentaram um discreto aumento, sem diferença significativa, em relação aos que não foram submetidos ao exercício em todos os tratamentos (Figura 5).

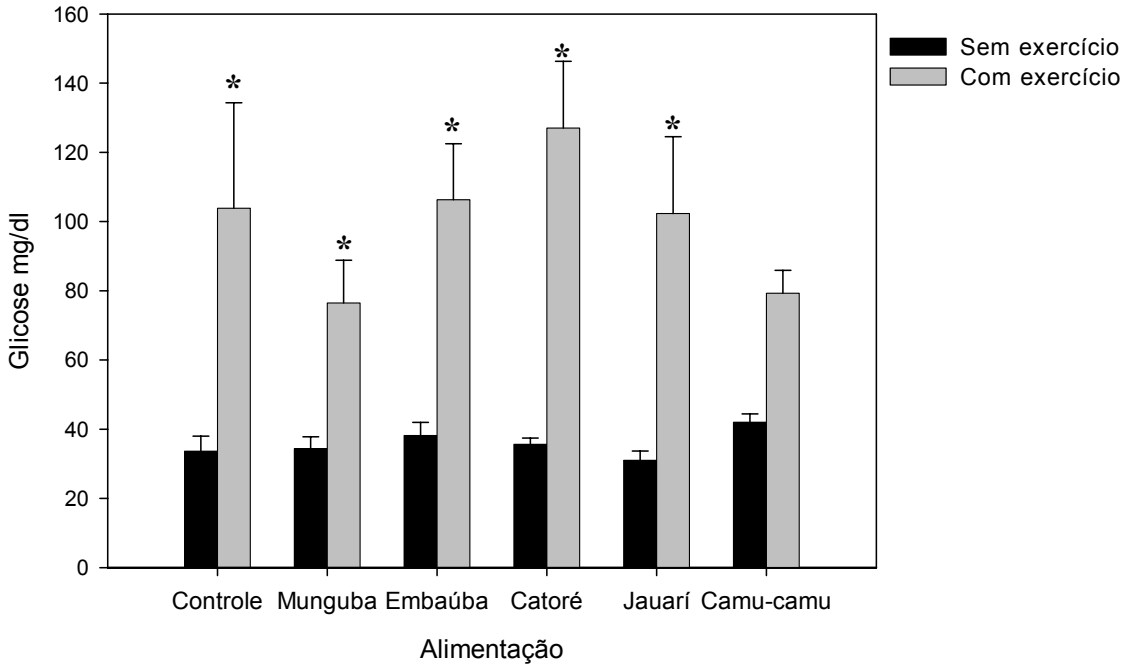


Figura 4. Níveis de glicose de exemplares de *C. macropomum* alimentados com ração suplementada com munguba, embaúba, catoré, jauari e camu-camu. * Indica diferença estatística significativa para os animais alimentados com a mesma dieta, não submetidos ou submetidos a exercício ($p<0,05$).

### 3.6. Avaliação das enzimas antioxidantes

A atividade da CAT nos animais que foram alimentados com dietas suplementadas com frutos e sementes, neste estudo, apresenta-se homogênea entre os diferentes tratamentos e o controle. A maior atividade foi observada nos animais alimentados com embaúba (0,90±0,24) e a menor atividade observada nos animais que receberam camu-camu (0,71±0,53) (Figura 6A). Para os animais submetidos ao estresse natatório, pode-se observar uma, discreta e sem diferença significativa, diminuição da atividade desta enzima para todos os animais, independente do tratamento, sendo os menores valores observados para os animais alimentados por dieta suplementada com munguba (0,36±0,9) (Figura 6A).

Diferente da atividade da CAT, a GST mostrou-se bastante variada entre os tratamentos e o controle. É possível observar (Figura 6) que a menor atividade aconteceu nos animais alimentados com munguba (27,2±7,2) e a maior para os animais que receberam suplementação com camu-camu (84,9±21,3) (Figura 6B). A exposição dos animais ao estresse natatório ocasionou tendência a um aumento na atividade desta enzima, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) para os animais alimentados com munguba e embaúba (Figura 6B).

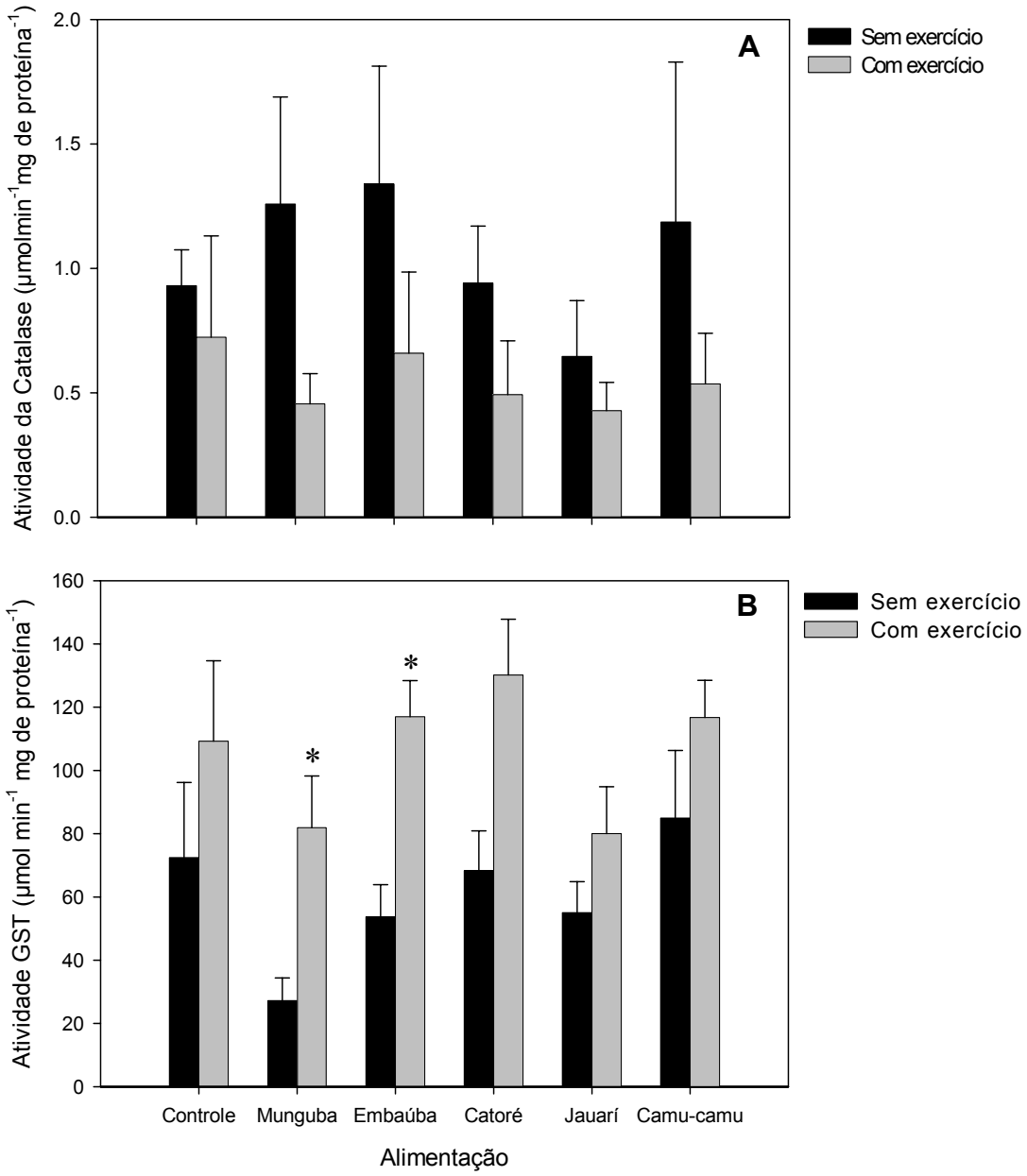


Figura 5. Valores da atividade das enzimas (A) Catalase (CAT) e (B) Glutationa -S-Transferase (GST) no fígado de exemplares de *C. macropomum* alimentados com ração suplementada com munguba, embaúba, catoré, jauari e camu-camu. * Indica diferença estatística significativa entre os animais alimentados com a mesma dieta, não submetidos ou submetidos ao estresse natatório ($p<0,05$).

### 3.7. Avaliação de danos celulares

A concentração endógena de produtos celulares oxidados (TBARS), avaliadas no plasma dos animais alimentados com as dietas experimentais, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos e o grupo controle. Os maiores valores observados foram para o controle (100,7±39,5) e camu-camu (97,6±35,0) e os menores para munguba (51,9±25,7) e embaúba (54,9±17,2). A exposição dos animais à natação forçada, parece não influenciar os níveis de TBARS, uma vez que os animais apresentaram uma heterogeneidade entre os tratamentos, com o menor valor apresentado para embaúba (67,3±18,6) e o maior para catoré (118,5±16,1) (Figura 7).

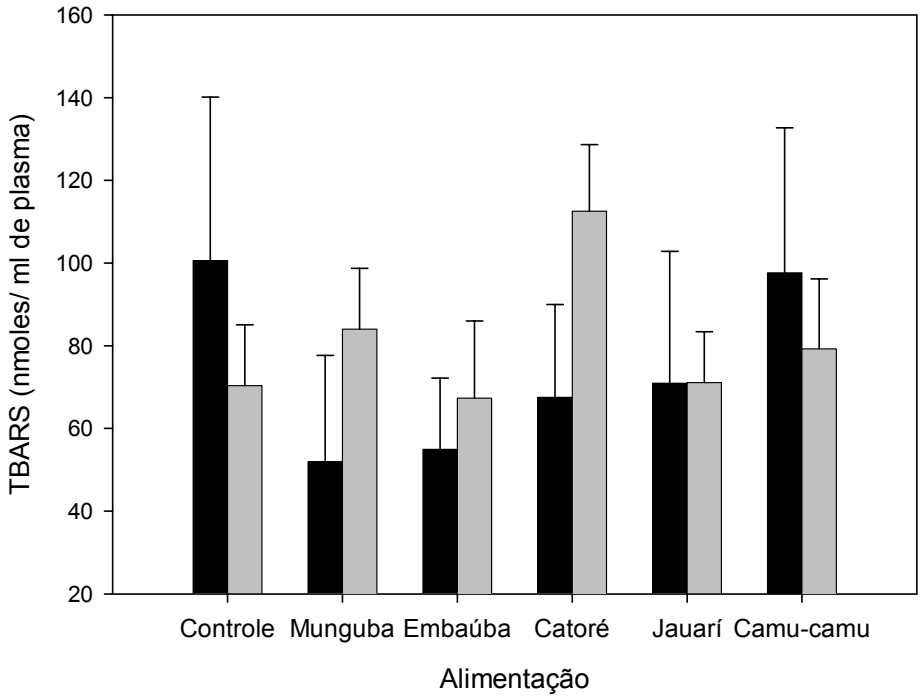


Figura 6. Concentração endógena de produtos celulares oxidados de exemplares de *C. macropomum* alimentados com ração suplementada com munguba, embaúba, catoré, jauari e camu-camu.

A porcentagem das anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE), também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos apesar de apresentar menores valores para os animais submetidos ao túnel de natação em três tratamentos (munguba, embaúba e camu-camu) e o controle (Fig. 8).

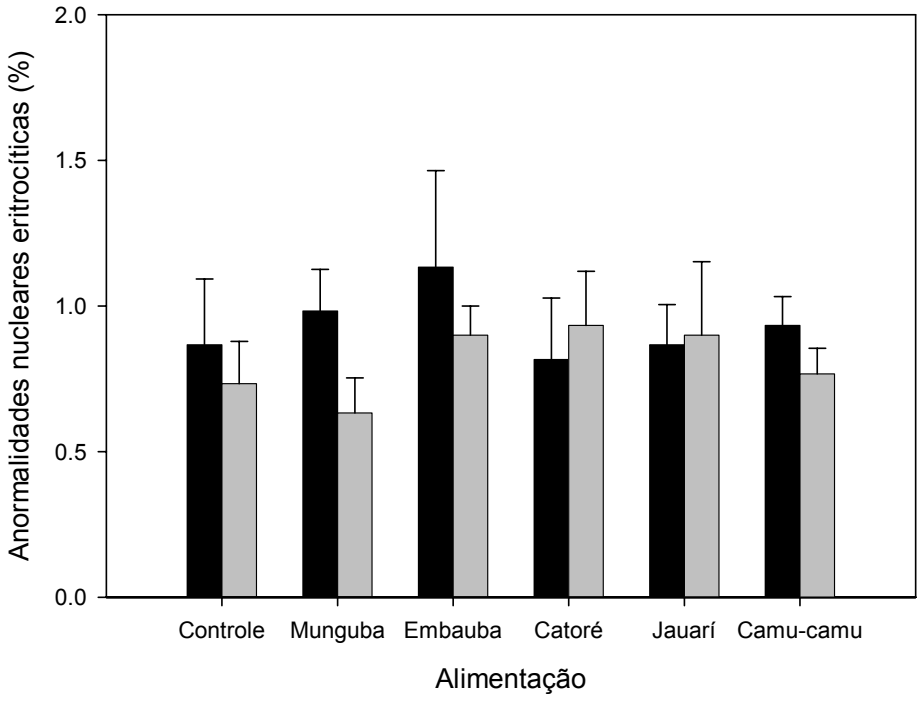


Figura 7. Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) de exemplares de *C. macropomum* alimentados com ração suplementada com munguba, embaúba, catoré, jauari e camu-camu.

### 3.8. Desempenho das dietas

As respostas fisiológicas e bioquímicas do tambaqui alimentado com dietas experimentais, suplementadas com os frutos de embaúba, catoré, jauarí e camu-camu e, com a semente de camu-camu encontram-se na Figura 9.

De acordo com o gráfico, é possível observar que as dietas ficaram divididas em quatro pequenos grupos, dependo da resposta fornecida pelas análises realizadas neste trabalho. Resumidamente, partindo do principio de que a melhor resposta seria obtida pelo grupo controle, apenas ração comercial, por meio do gráfico é possível observar que respostas similares, ou até melhores, foram obtidas pelo grupo alimentado com suplementação de camu-camu, mesmo quadrante, com uma relação de 59,59% (dimensões um e dois).

A suplementação da dieta por jauarí e por catoré também parece mostrar boas respostas fisiológicas e bioquímicas, isto é sugerido por se apresentarem no grupo controle, no grupo maior com 38,25% de relação (dimensão um). A embaúba parece não influenciar nas respostas aqui analisadas, mantendo níveis basais o que a mantém no centro do gráfico. Por outro lado, a implementação de sementes de munguba parece ser menos eficiente para um bom desempenho e saúde do tambaqui, aparecendo no gráfico de maneira isolada.

Assim, podemos a caracterizar que as dietas experimentais mostraram diferentes desempenhos, sendo o Camu-camu, Jauarí as dietas que obtiveram melhores respostas, o Catoré e a Embaúba os que obtiveram respostas intermediarias e a Munguba com respostas menos satisfatórias.

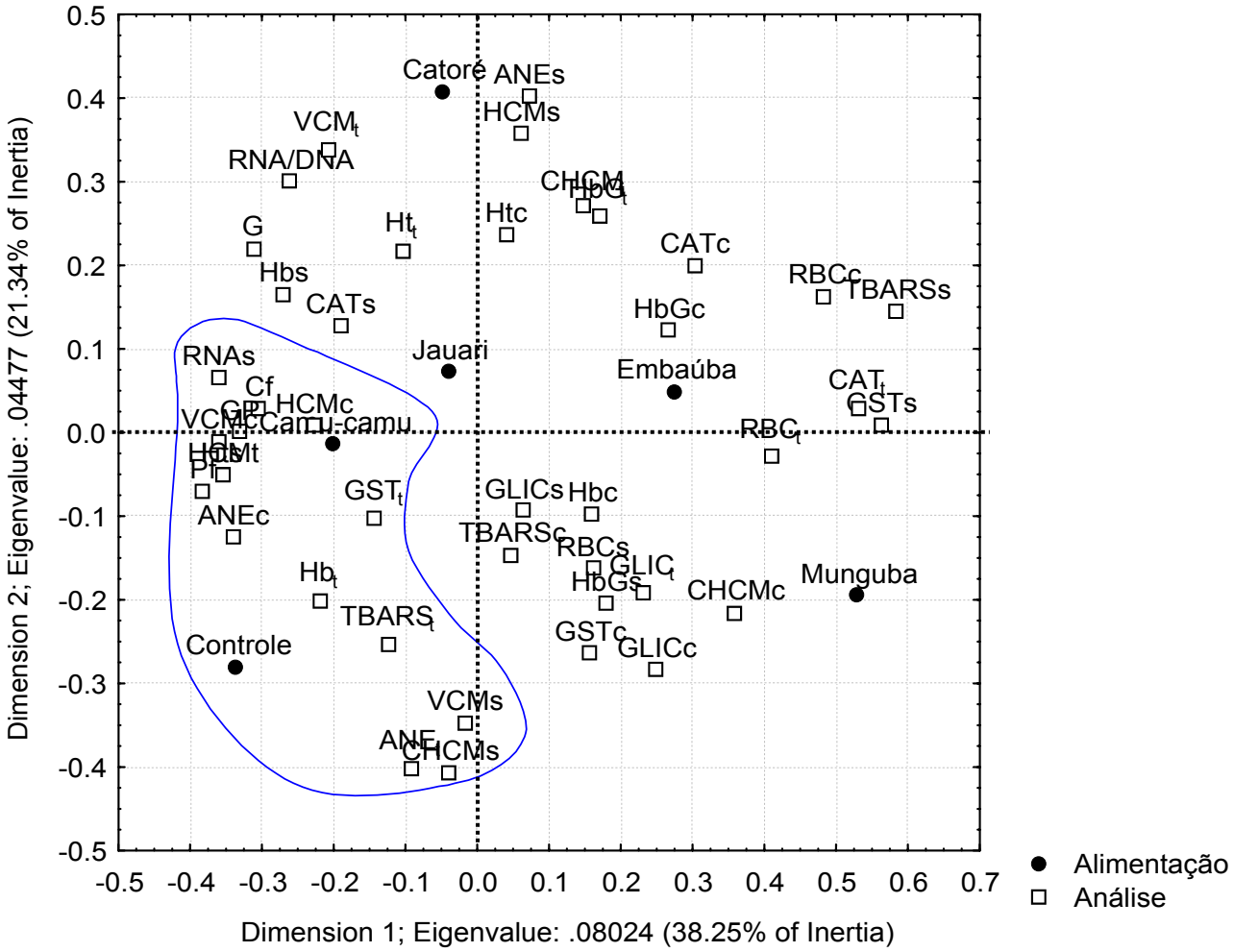


Figura 8. Desempenho das dietas suplementadas por munguba, embaúba, catoré, jauarí , camu-camu e controle sobre a fisiologia e bioquímica de exemplares de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

## 4. Discussão

### 4.1. Crescimento

O crescimento é um dos fatores indicativos da qualidade do alimento (Brett, 1979). Hepher (1993) reporta que o crescimento ótimo para os peixes é obtido quando há eficiência do alimento, suprindo a demanda energética do animal. Segundo Smith (1989), para peixes, essa demanda energética por unidade de peso, é menor do que as encontradas para outros animais como porco, galinha e boi, sendo descrito como o animal mais eficiente na conversão de alimento em tecido corpóreo (NRC, 1993).

Saint-Paul (1984) observou que juvenis de tambaqui alimentados com dietas com dois diferentes níveis de proteína bruta (27,5% e 42,1%) apresentaram ganho de peso de 0,85g/dia e 1,3g/dia, respectivamente, o que sugere que esses animais precisam de menos PB que outros animais. No entanto, a principal fonte de proteína na ração de peixes é a farinha de peixe que, devido a seu alto custo, há necessidade de se testar outras fontes protéicas. Neste sentido, o farelo de soja que apresenta ótimo perfil de aminoácidos e boa palatabilidade para a maioria dos peixes, tem sido utilizado (Viola *et al*., 1982; Fernandes *et al.*, 2001).

Viola *et al*. (1982), substituindo a farinha de peixe em até 45% não encontraram prejuízos no desempenho de carpas (*Cyprinus carpio*) e Fernandes *et al*. (2001) verificaram que o pacu do Pantanal (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com dieta contendo apenas farinha de peixe apresentou ganho de peso numericamente inferior (38,97) ao que recebeu suplementação de farinha de soja (43,75).

Além da soja, outras alternativas também foram testadas. Soares *et al.* (2000) e Soares *et al.* (2001) avaliaram o desempenho de piavaçu (*Leporinus macrocephalus*) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) quando alimentados com farelo de canola no lugar de farelo de soja na alimentação e observaram que o subproduto pode substituir o farelo de soja na ração em até 48,1% com um bom desempenho para os animais. Roubach & Saint-Paul (1994) após alimentarem juvenis de tambaqui com munguba, embaúba, seringa e arroz verificaram que os juvenis apresentaram melhores ganhos zootécnicos quando alimentados com dietas com 21,3% de proteína bruta encontrada na munguba.

Neste estudo, o desempenho do tambaqui não foi modificado pelas dietas testadas, em relação ao controle, entretanto; os valores de ganho de peso e taxa de crescimento específico variou de acordo com a quantidade de proteína da ração experimental. Apesar de não apresentar diferença estatística para os índices zootécnicos testados, as dietas que apresentaram melhor desempenho do tambaqui foram às dietas suplementadas com Camu-camu (28,0% PB), Jauarí (25,1% PB) e Catoré (25,1% PB).

A munguba apesar de apresentar um alto teor de proteína bruta (28,9%PB), proporcionou os menores índices zootécnicos, ainda que sem diferença significativa, discordando dos resultados obtidos por Roubach & Saint-Paul (1994). Esta diferença pode estar relacionada ao tipo de processamento deste item para fornecimento ao animal; os autores citados testaram a munguba *in natura* e, neste estudo, a munguba foi administrada na proporção de 1:1 com ração com 30,6% PB, o que deve ter favorecido um melhor resultado para este item, bem como para os outros frutos testados.

A taxa RNA:DNA é uma análise que tem sido proposta como uma medida sensível para verificar a taxa de crescimento de peixes juvenis em um curto período de tempo, dias ou semanas, partindo do princípio que a quantidade de DNA é a mesma em todas as fases da vida do indivíduo e que na fase de crescimento, o RNA encontra-se aumentado pela síntese protéica (Buckley & Lough, 1987; Chicharo *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2003).

Weber *et al*. (2003), ao comparar indivíduos juvenis e adultos de *Oncorhynchus mykiss* alimentados nas mesmas condições, observaram que os animais juvenis apresentaram maiores concentrações de RNA e taxa RNA:DNA que os adultos, corroborando os resultados acima citados que indicam que no crescimento há uma maior síntese protéica e, portanto, um maior crescimento.

Em contrapartida, para confirmar essa teoria, os mesmos autores, também analisaram *Oncorhynchus mykiss* com e sem privação alimentar e observaram que os animais alimentados apresentaram maior quantidade de RNA e uma maior taxa de RNA:DNA em relação aos peixes que passaram 18 e 32 dias de privação alimentar.

Gwak *et al*. (2003), analisando larvas de *Paralichthys olivaceus*, verificaram que esta espécie em condições nutricionais inadequadas no período pós-metamórfico apresentou uma tendência de diminuição da taxa RNA:DNA possivelmente pela suspensão da alimentação. Entretanto, apesar de apresentar excelentes resultados, em um curto período de tempo para várias espécies, Bisbal & Bengston (1995) não observaram diminuição na taxa RNA:DNA, em larvas de *Paralchthys dentatus,* após 72 horas de eclosão, sem alimentação.

O tamanho do indivíduo e a condição nutricional parecem ser, pelo menos para a maioria das espécies, os principais fatores responsáveis pela concentração de RNA e pela proporção RNA:DNA. Apesar desse teste não ter sido utilizado para verificar a eficácia da dieta, neste estudo, os resultados revelaram que o RNA e a proporção RNA:DNA parecem não serem alterados, no tambaqui, pelas diferentes alimentações.

Contudo, para um melhor entendimento de como esse mecanismo funciona para o tambaqui, e assumir que as dietas experimentais não afetam ou colaboram com o desempenho do tambaqui, é necessário analisar a concentração de RNA e taxa RNA: DNA em animais submetidos à privação alimentar, o que proporcionaria uma melhor e/ou maior precisão das questões aqui sugeridas. Dessa forma, o que podemos sugerir neste estudo é que as alimentações não ocasionaram nenhum desequilíbrio orgânico ao tambaqui, promovendo crescimento similar do animal.

### 4.2. Parâmetros hematológicos

A hematologia é uma ferramenta importante na avaliação do estado de saúde dos animais. Segundo Messier *et al.* (1987) e Tavares-Dias (1998), a análise dos parâmetros sanguíneos permite estimar, ainda que indiretamente, a condição nutricional do animal. Isto é proposto por que o sangue é o tecido que sofre alterações quando a saúde do animal se modifica (Blaxhall, 1972), inclusive pela decorrência de modificações na dieta do animal.

Na literatura, vários trabalhos utilizam os parâmetros hematológicos como indicadores do estado nutricional (Andersen, 1998; Kikuchi, 1999; Adham *et al.*, 2000; Chagas, 2001; Barros *et al.*, 2002; Aride, 2003). Adham *et al.* (2000) ao

analisar parâmetros hematológicos de “catfish” alimentados com dietas sem suplementação de vitamina C e com pequenos níveis de vitamina C na dieta, verificaram uma diminuição do hematócrito, característica da anemia.

Contudo, Andersen *et al*. (1998), não observaram diferença significativa para Ht, [Hb], RBC, VCM, HCM e CHCM em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) alimentado com ração suplementada com vitamina C. Padrão semelhante foi observado para espécies tropicais, sendo que exemplares de tambaqui alimentados com três níveis de ácido ascórbico (100, 200 e 200mg/ kg de ração) (Chagas, 2001) e com dois níveis de alfa-tocoferol (80 e 400UI /kg de ração) (Aride, 2003) não apresentaram diferenças significativas para Ht, [Hb], RBC.

A adição de pequenas quantidades de farinha da semente de algodão na dieta também não causou mudanças no Ht e na [Hb] em Salmão do atlântico (Barros *et al*., 2002). No entanto, como sugerido por Colin-Negreti (1996), o gossipol, um fator antinutricional da semente do algodão, em altas quantidades, aumenta a fragilidade das células vermelhas do sangue. Esta fragilidade foi constatada por Rinchard *et al* (2003) ao observar que salmão alimentado com quantidades crescentes de gossipol na dieta apresenta diminuição progressiva da quantidade de hemoglobina e hematócrito.

Neste estudo não foram observadas diferenças significativas para os valores de Ht, [Hb] e RBC, bem como para as constantes corpusculares VCM, HCM e CHCM entre os grupos que receberam dietas experimentais e o controle. Isto sugere que os frutos (embaúba, catoré, jauari e camu-camu) e a semente (munguba), na quantidade testada, não causam alterações nas variáveis sanguíneas do tambaqui.

É comum encontrar na literatura várias formas de avaliar o estado nutricional. A mais comum é quando o animal é exposto a situações estressantes que, dependendo das respostas, pode sugerir que uma e/ou outra dieta está protegendo o animal do desequilíbrio fisiológico (Torres *et al*.,1986). Hipóxia (Chagas, 2001), temperatura (Oliveira, 2001), privação alimentar (Carvalho, 1998; Adam *et al*., 2000) e velocidade crítica de natação (Ogata *et al*., 2002; MacFarlane *et al*., 2004) são alguns dos fatores estressantes, freqüentemente estudados.

Neste estudo, a velocidade critica de natação (Ucrit) foi utilizada como fator estressante para avaliar o estado nutricional do tambaqui. A concentração de hemoglobina e o número de eritrócitos, para os animais submetidos ao estresse natatório, apresentaram uma tendência de aumento para todos os tratamentos e o controle, sem diferenças significativas, que pode ter sido provocada pela tentativa de suprir a demanda metabólica de oxigênio.

O hematócrito apesar de apresentar tendência de aumento para todos o tratamentos e controle, apresentou diferença estatística significativa apenas para munguba, embaúba e catoré. E este aumento foi o responsável pela diminuição, mesmo sem diferença significativa, dos valores de VCM e o CHCM, quando os animais foram submetidos ao túnel de natação.

A natação é uma atividade física que exige uma alta demanda energética dos peixes, podendo aumentar ainda mais essa exigência de acordo com a especialidade locomotora da espécie (Webb, 1998). Tandon & Joshi (1976) observaram que os teleósteos marinhos apresentam uma relação inversa entre o tamanho dos eritrócitos e sua habilidade natatória, com reflexo na concentração de hemoglobina.

Espécies mais ativas apresentam maior número de eritrócitos e maior concentração de hemoglobina e menor volume celular, que é explicado pela alta demanda de oxigênio requerida pelo esforço de natação, para suprir a exigência metabólica (Moyes & West, 1995). Neste trabalho, a análise da [Hb] e RBC não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e grupo controle. Apenas o Ht mostrou-se alterado quando o animal foi submetido à natação forçada o que pode sugerir que houve uma tentativa de suprimento da demanda metabólica.

Em contrapartida, o desempenho hematológico dos animais pode ter apresentado boas respostas pela boa condição nutricional em que o animal se encontrava, em decorrência das dietas, o que pode ter minimizado o efeito causado pelo estresse.

### 4.3. Metabólitos

A ingestão de alimentos tem como finalidade fornecer energia para o metabolismo orgânico (Love & Black, 1990). Nos peixes, os carboidratos são estocados no fígado em forma de glicogênio que, dependo da demanda energética requerida, é degradado tendo a glicose como produto (Soengas & Moon, 1995).

A glicose é distribuída para os tecidos por meio do sangue, sendo os níveis elevados de glicose sanguínea encontrados quando ocorre uma redução na utilização desta, para produção de energia (Kaloyanni *et al.*, 1993), estímulo da glicogenólise por indução hormonal (Vijayan & Monn, 1992) ou, ainda em situações estressantes (Hochachka & Somero, 1984). A estação do ano, a

dieta e o tempo de ingestão da última alimentação também afetam seus níveis sanguíneos (Wedemeyer *et al*., 1990).

*Dicentrarchus labrax*, que recebeu alimentação contendo semente de ervilha, apresentou uma elevação nos níveis de glicose de acordo com o aumento dos níveis de sementes de ervilhas na dieta (Gouveia & Davies, 2004). Resultado similar foi observado por Omeregie (2001), depois de alimentar juvenis de *Labeo senegalensis* com sementes de manga na dieta. Apesar do aumento na glicose, as faixas encontradas estão de acordo com a faixa estabelecida como normal para os peixes e demonstraram que a elevação observada não interferiu no crescimento do animal.

Neste estudo, os níveis de glicose mantiveram-se constantes para as diferentes dietas experimentais e para o controle. No entanto, quando submetido ao estresse natatório, o tambaqui apresentou um aumento significativo em todos os tratamentos experimentais e controle, exceto na dieta contendo camu-camu.

A natação forçada para truta marrom causou um significativo aumento primário, medido pela elevação do cortisol e, secundário com o aumento de lactato e glicose (Hyrrãrinen *et al*., 2004). Padrão similar foi observado por Ortuño *et al.* (2002) em exemplares de *Sparus aurata* submetidos ao estresse natatório após terem sido alimentados com 100mg de vitamina C/kg de ração e 100mg de vitamina E/kg de ração separadamente e em conjunto. O mesmo autor relatou que os animais que receberam a suplementação vitamínica C e E, separadamente, reduziram em 33% a concentração de glicose plasmática e que o sinergismo das duas diminuiu em 50% os níveis plasmáticos desse metabólito em relação ao grupo controle, não exposto ao estresse natatório.

A ausência de diferença significativa para a concentração sangüínea de glicose nos exemplares de tambaqui alimentados com dieta contendo camu-camu pode estar relacionada à quantidade de vitamina C, que varia entre 2400 a 3100mg/100g de polpa (Andrade *et al*., 1995). Este resultado, comparado aos resultados obtidos por Henrique *et al.* (1998) para *Sparus aurata* alimentado com diferentes níveis de vitamina C (25, 50, 100 e 200mg/kg) e Chagas (2001) para tambaquis alimentados com 200 e 400mg de ácido ascórbico/kg de ração e expostos a hipóxia, apresentam o mesmo padrão, sugerindo que a vitamina C do camu-camu pode proteger o animal de situações estressantes, como o exercício forçado.

A hemoglobina glicosilada (HbG) é produto de uma glicosilação permanente da hemoglobina, que tem inicio nas hemáceas jovens e continua até o final da vida útil destas, por volta de 120 dias. Sua intensidade está relacionada ao nível de glicose sanguínea e, sua determinação indica, indiretamente, os níveis de glicose no período da glicosilação, ligação irreversível da glicose com a hemoglobina (Stryer, 1996). Em humanos, esta análise é indicada para monitorar diabéticos, principalmente quando os níveis de glicose apresentam-se inferiores a 160mg/dl.

Em peixes, a análise de hemoglobina glicosilada ainda não foi constatada. Entretanto, por ser uma análise diretamente relacionada à glicose pode ser uma ferramenta importante em trabalhos relacionados à alimentação e estresse, uma vez que a hemoglobina glicosilada pode estar alterada em até três meses após a glicosilação.

Os valores de HbG encontrados nos exemplares de tambaqui alimentados com as rações experimentais apresentaram uma padronização nas dietas

experimentais testadas e grupo controle. Da mesma forma, o aumento observado para os animais expostos ao túnel de natação, foi homogêneo entre todos tratamentos e o controle. Estes resultados indicam que a dieta não afetou o equilíbrio fisiológico, em nenhum momento do experimento. O aumento de HbG, mesmo sem diferenças estatísticas, nos animais expostos ao estresse natatório, alimentado com as diferentes dietas experimentais, corroboram os valores encontrados para a glicose na mesma condição estressante, mostrando que houve um aumento de glicosilação com o aumento da glicose, como descrito acima.

### 4.4. Avaliação das enzimas antioxidantes

Os teleósteos utilizam vários sistemas de defesa fisiológica quando desafiados pela dinâmica química do ambiente (Bonga, 1997). Em situações de estresse, o sistema de detoxificação é ativado para agir contra as modificações químicas e são essenciais para a sobrevivência dos organismos (Morow *et al*., 2004).

Neste sentido, o ciclo redox da glutationa, as enzimas que compõem seu metabolismo e as enzimas do sistema antioxidante exercem papel fundamental na defesa da célula (Rover-Júnior *et al.*, 2001). Segundo Schitzendubel *et al*. (2001) a glutationa, o ascorbato, a CAT e a SOD são de fundamental importância no controle das concentrações de $H_2O_2$ e $O_2^-$ nos animais.

A CAT é a enzima que decompõe rapidamente, em segunda instância, o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo encontrada principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Sua atividade está intrinsecamente relacionada a

com quantidade deste composto no organismo, uma vez que por meio da respiração é constantemente produzido (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Nos peixes, a atividade da CAT é baixa quando comparada a mamíferos e pássaros (Passi *et al.*, 2002). Segundo Wilhelm Filho *et al. (*1993), é comum observar acatalasemia nos eritrócitos dos peixes, já que estes organismos parecem utilizar as brânquias como um mecanismo alternativo para eliminação de $H_2O_2$. No fígado, a atividade desta enzima, pelo menos em peixes tropicais, parece ser maior (Wilhelm Filho & Marcon, 1996; Marcon & Wilhelm Filho, 1999).

De um modo geral, os valores observados para CAT e GST, no fígado do tambaqui neste estudo, foram opostos nas situações testadas, com e sem exercício. Os valores de CAT apresentaram-se menores para os animais expostos ao túnel de natação, enquanto que os níveis de GST foram maiores, para todos os tratamentos, nesta mesma situação.

Em estresse oxidativo, com o aumento das espécies reativas de oxigênio, também é esperado um aumento na atividade das enzimas que catalisam as ERO. Entretanto, Marcon (1995) observou que tambaqui submetido a estresse hipóxico e hiperóxico apresenta uma diminuição da CAT com um aumento paralelo da atividade da GPx, o que levou o autor a sugerir que houve uma compensação, contrabalanceando, os níveis de peróxido de hidrogênio no fígado.

O trabalho mútuo da Glutationa peroxidase (GPx) e Glutationa-S-Transferase (GST) junto com a Glutationa reduzida (GSH) decompõem o $H_2O_2$ e outros hidroperóxidos (Mak *et al.*,1996). A GST exerce um papel importante na catálise da conjugação de glutationa a diversos substratos eletrofílicos,

fazendo parte do complexo sistema de detoxificação de xenobióticos e espécies reativas (Dixton *et al*., 2002).

O efeito da composição da dieta sobre o sistema de detoxificação é extremamente limitado. No entanto, diferentes dos mamíferos, os peixes evoluíram em relação à dieta, a qual é sazonalmente variada. Dessa forma, o sistema de defesa pode ser um tanto variado de acordo com a energia e nutriente ingerido (Morow *et al*., 2004).

Stott & Sinnhuber (1978) verificaram que trutas alimentadas com dietas com diferentes níveis de proteínas (32 –62%) alteram as enzimas hepáticas associadas ao metabolismo de xenobióticos. Apesar disso, nenhuma alteração nos valores de CAT e GST foi verificada para esta mesma espécie quando alimentada com dietas isoenergéticas, variando na quantidade de proteínas e lipídeos, o que levou os autores concluírem que as rações testadas não apresentaram efeito negativo na fisiologia de detoxificação para trutas (Morrow *et al*, 2004).

As alimentações testadas, com os quatro frutos e a semente neste trabalho, apresentaram valores de CAT e GST variados. Esta variação pode ser indicada pelas diferentes composições das dietas, devido à composição química de cada fruto. A atividade da CAT no fígado dos animais que não foram expostos ao estresse natatório, alimentados anteriormente com dietas suplementadas por catoré, jauari e camu-camu, apresentou menores valores que o grupo controle. Por outro lado, depois de expostos ao estresse, os menores valores encontrados de CAT foram observados nos grupos controle, munguba e embaúba.

A atividade da GST com relação a diferentes dietas se mostrou variada, como já citado, apresentando menores valores para munguba, embaúba, catoré e jauarí. O estresse causado pela natação forçada elevou as concentrações desta enzima, como mostrado na figura 7, para todos os tratamentos, porém houve tendência a aumento para os animais alimentados com dietas suplementadas com embaúba e catoré, quando comparados ao grupo controle.

A capacidade antioxidante do organismo é naturalmente requerida pelas funções metabólicas normais, devido à respiração (Halliwell & Gutteridge, 1989). Em contrapartida, podem ser ainda mais solicitadas quando há exposição do animal, a agentes estressores. Assim, animais bem nutridos ou ainda alimentados com dietas contendo antioxidantes endógenos podem apresentar uma melhor resposta ao estresse (Bianchi & Antunes, 1999).

Neste estudo, os animais apresentaram níveis de CAT e GST bastante variados; entretanto, apenas as dietas contendo munguba e embaúba apresentaram diferenças significativas para os níveis de GST, entre os animais expostos ou não a condição estressante. Estes resultados sugerem que, ainda que os vegetais sejam fontes naturais de antioxidantes, as dietas com munguba e embaúba não parecem proteger os animais, contra os radicais livres favorecendo um aumento na enzima detoxificadora GST e que, as demais dietas experimentais podem ter fornecido fontes endógenas de antioxidantes minimizando a ação enzimática.

De um modo geral, os animais que menos apresentaram alterações nos níveis enzimáticos de CAT e GST, pelo estresse, foram os alimentados com camu-camu e jauari, o que pode indicar que estes frutos quando utilizados

como um complemento na alimentação do tambaqui, contribuem na redução do desequilíbrio da relação ao balanço pró e antioxidante.

### 4.5. Avaliação de danos celulares

A peroxidação lipídica decorre da ação das ERO sobre os ácidos graxos polinsaturados e fosfolipídios da membrana celular. Isto ocorre porque as espécies tóxicas ativam as fosfolipases que desintegram os fosfolipídios, causando vários efeitos deletérios, entre os quais a ruptura da membrana celular (Haliwell & Gutteridge, 1989).

Passi *et al.* (2004) sugerem que a peroxidação lipídica ocorre em todas as espécies de peixes de águas temperadas ou tropicais, mesmo sem estresse oxidativo, podendo estar vinculada a um decréscimo de antioxidantes devido à idade. Em trutas, estes autores, observaram um aumento significativo de TBARS em animais com dois e três anos, quando comparadas com as trutas mais jovens de três meses e um ano.

Em estresse oxidativo, os níveis de TBARS dos animais tendem a aumentar. Isto foi evidenciado em tambaqui exposto a hipóxia e hiperóxia (Marcon *et al.*, 1997). Por outro lado, tambaquis expostos a hipóxia, depois de terem sido alimentados por 60 dias com ácido ascórbico, mostraram tendência a diminuir os níveis de TBARS de acordo com o aumento no nível de vitamina C empregado (0, 100, 200 e 400mgAA/kg).

Neste estudo, os níveis de peroxidação lipídica apresentaram-se bastante variados entre as diferentes dietas. Embora não tenha sido observada diferença estatística, apenas os animais alimentados com a suplementação de munguba e catoré apresentaram resultados numericamente maiores para os

animais levados ao túnel de natação. Contudo, a peroxidação lipidica é um fenômeno que acontece naturalmente no organismo, onde as ERO agridem os ácidos graxos das membranas celulares, desintegrando-a e permitindo que essas espécies entrem na célula. Em situação estressantes, com o aumento na produção das ERO um aumento acentuado da peroxidação lipidica é esperado. Nesse sentido, é possível sugerir que houve uma certa proteção por parte das alimentações administradas, aos animais deste estudo.

Os frutos apresentam níveis consideráveis de vitaminas (Guo *et al*, 2003). Entre estas vitaminas, a vitamina C é uma das mais indicadas como fonte endógena de antioxidante. Assim, a diminuição nos níveis de TBARS encontrados, neste trabalho, para os tambaquis expostos ao exercício forçado, depois de alimentados com camu-camu, sugere que o alto teor de ácido ascórbico encontrado nesse fruto, pode ter protegido o organismo contra ao estresse oxidativo causado pelo exercício.

Em contrapartida, para os outros tratamentos testados neste estudo, os animais apresentaram níveis de peroxidação lipídica maiores, depois que os animais foram submetidos à natação forçada. Este fato, no entanto, não pode indicar que os outros tratamentos não protegem os animais, mas que talvez os níveis altos de vitamina C do camu-camu, pode ter melhor influenciado na resposta do animal.

A análise das anormalidades nucleares eritrocíticas tem sido geralmente utilizada como indicador genotóxico, para avaliar o efeito da exposição do animal a substâncias químicas (Pacheco & Santos, 1997). Por outro lado, os animais podem produzir anormalidades nucleares naturalmente, por um erro no processo de divisão celular (Heddle *et al*, 1991).

Neste estudo, os animais apresentaram um padrão similar, em relação a ANE, para as diferentes dietas. Entretanto, é importante mencionar uma discreta diminuição, das dietas contendo munguba, embaúba e camu-camu e o controle. Esse resultado pode estar intrinsecamente relacionado ao aumento no número de eritrócitos circulantes para esses animais, o que levou a uma diluição das anormalidades analisadas. Assim, se as anormalidades nucleares fossem causadas apenas por agentes tóxicos presente nos frutos, seria possível notar um aumento significativo ou uma tendência a aumento dessas anomalias, principalmente na situação estressante.

Deste modo, as avaliações dos danos ocasionados à célula, pela quebra celular, peroxidação lipidica, e pelas anomalias nucleares, neste estudo, indicam que a utilização de frutos regionais parece não ter ocasionado quaisquer danos aos exemplares de tambaqui.

## 5. Conclusões

1. O crescimento do tambaqui parece não ter sido influenciado pelas dietas experimentais. Entretanto os grupos experimentais alimentados com dieta contendo camu-camu e jauari apresentaram maior similaridade com o grupo controle (Vide Figura 8).

2. A velocidade crítica de natação (Ucrit) apresentou-se homogênea entre os tratamentos, mostrando não ser influenciada pela dieta.

3. As diferentes dietas não influenciaram na hematologia dos animais, quando não submetidos ao estresse natatório. Por outro lado, os animais submetidos à natação forçada apresentaram aumento significativo para o hematócrito, depois de alimentados com munguba, embaúba e catoré e mantiveram seus níveis normais quando alimentados com jauarí e camu-camu.

4. A dieta contendo camu-camu protegeu o tambaqui do estresse, analisado pelos níveis de glicose, o que sugere que a o camu-camu possa estar agindo como um importante agente protetor.

5. A enzimas antioxidantes apresentaram níveis heterogêneos para as diferentes dietas, apresentando um melhor efeito contra os radicais livres gerados pelo estresse nos animais alimentados com suplementação de jauarí e camu-camu.

6. As dietas experimentais não ocasionaram efeitos citotóxicos e genotóxicos nos tambaquis, mas uma melhor proteção, mesmo que aparente, foi observada pelos animais alimentados com embaúba, jauari e camu-camu.

7. Todas as dietas testadas apresentam potencial para incorporação na ração para alevinos de tambaqui, não apresentando efeitos nocivos aparentes à saúde e crescimento do animal.

8. A incorporação de camu-camu e jauari merecem destaque por apresentarem os melhores resultados (Figura 8).

## 6. Referências Bibliográficas


Adham, K.G.; Hashem, M.B.; Abu-Shabana, M.B. & Kamel, A.H. 2000. Vitamina C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. *Aquacult. Nutrit.*, 6: 129-139.

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Method. Enzym.*, 105: 121-126.

Alceste, C.C.; Jory, D.E. 2000. Tilápia – Alternative protein sources in tilapia feed formulation. *Aquacul. Maneg.*, 26 (4).

Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L. 1995. Adaptação de peixes aos ambientes de criação. *In*: *Criando peixes na Amazônia*. A.L. Val & A. Honczaryk (Eds.). p. 45-58.

Andersen, F; Lygren, B; Maage, A. & Waagbø, R.1998. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts . *Aquacult.*, 161: 437–451.

Andrade, J. S.; Aragão, C.G.; Galeazzi, M.A.M.; Ferreira, S.A.N. 1995. Changes in the concentration of total vitamin C during maturation and repening of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruits cultivated in the upland of brasilian central Amazon. *Acta Horticult.*, 370: 177-180.

Araújo-Lima, C.; Goulding, M. 1998. *Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. Sociedade Civil Mamirauá/CNPq. Tefé/Am, 187p.

Aride, P.H.R. 2003. Vitamina E em dietas para tambaqui (*Colossoma macropomum*): determinação dos níveis ideais, efeito sinérgico da

vitamina C, e interação com o ferro. Manaus/Am. *Tese de Doutorado*. INPA/FUA. 129p.

Baldisseroto, B. 2002. *Fisiologia de peixes apliocada à piscicultura*. Santa Maria. Ed. UFSM.

Barros, M.M.; Lim, C. & Klesius, P.H. 2002.Effect of soybean meal replacement by cottonseed meal and iron supplementation on growth, immune response and resistance of Channel Catfish (*Ictalurus puctatus*) to Edwardsiella ictaluri challenge. *Aquacult.*, 207: 263– 279.

Barton, B.A.; Haukenes, A.H.; Parsons, B.G. & Reed, J.R. 2003. Plasm cortisol and chloride stress responses in juvenile Walleyes during capture, transport and stocking procedures. *North Amer. Journ. Aquacult*., 65: 210-219.

Baynes, J.; Dominiczak, M.H. 2000. *Bioquímica médica*. Ed. Manole Ltda. Bela Vista, São Paulo.

Bianchi, M.L.P.; Antunes, L.M.G. 1999. Radicais livres e os principias antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*, 12 (2): 123-130.

Bisbal, G.A. & Bengston, D.A. 1995. Description of the starving condition of summer flounder, *Paralichthys dentatus*, early life history stages. *Fish. Bullet.*, 93: 217-230.

Blaxhall, P.C. 1972. The haematological assesement of the health of freshwater fish. A review of selected literature. *Journ. Fish Biol.*, 4: 593-604.

Bluckley, L.J.; Lough, R.G. 1987. Recent rowth, biochemical composition, and prey field of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod

(*Gadus morhua*) on Georges Bank. *Can. Jour. Fisher. Aquat. Scien.*, 44: 265 – 277.

Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.

Boyd, C.E. 1984. *Water quality in warmwater fish ponds.*Agricultural Experiment. Station. 3ª Ed. Alburn University Alabama. p. 119.247.

Brett, J.R. 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journ. Fish Res. Biol.*:1183 -1226.

Brett, J.R. 1979. Environmental factors and growth. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J. ; Brett, J.R. (Eds.), *Fish physiol.*, 8: 599 – 675. Nueva York: Academic Press.

Brow, B.A. 1976. *Hematology: principles and procedures*. 2ª ed. Philadelphia. Lea & Febiger.

Carratore, C.R.; Pezzato, L.E.; Pezzato, A.C.; Barros, M.M.M. & Ribeiro, P. 1996. *Pesq. Agrop. Bras.*, 31 (5): 369-374.

Carvalho, M.C.1981. Alimentação do tambaqui jovem (*Colossoma macropomum*) e sua relação com a comunidade zooplanctonica da Lago Grande- Manaquiri- Solimões- AM. *Dissertação de mestrado*. INPA/FUA. Manaus, AM. 91p.

Carvalho, S.R.1998. Efeito da privação alimentar sobre aspectos hematológicos e bioquímicos de *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae). *Relatório PIBIC*. INPA/FUA. Manaus, AM. 15p.

Castagnolli, N. 1992. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal. Ed. FUNESP.189p.

Chagas, E.C. 2001. Influência da suplementação do ácido ascórbico (vitamina C) sobre o crescimento e a resistência ao estresse em tambaqui

(*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818). Manaus/Am. Dissertação de mestrado. INPA/FUA. 80p.

Chicharo, M.A.; Chicharo, L.; Valdes, L.; Lopez-Jamar, E. & Re, P. 1998. Does the nutritional condition limit survival potential of sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1972) larvae off the north coast of Spain? RNA/DNA ratios and their variability. *Fisher. Resear.*, 39: 43 – 54.

Clement, C.R. 1989. Pejibaye. In: Nay Shaw & Wardowski (Eds.). *Fruits of tropical and subtropical origin, properties and uses*. Florida Science Source. p. 301 – 321.

Colin-Negrete, J.; Kiesling, H.E.; Ross, T.T.; Smith, J.F. 1996. Effect of whole cottonseed on serum constituents, fragility of erytrocyte cells, and reproduction of growing Holstein hoofers. *Journ. Sar. Scien.,* 79 (11): 2016 - 2020.

Costa, R.P.; Menedez, G.; Bricarello, L.P.; Elias, M.C.; Ito, M. 2000. Óleo de peixe, fitosteróis, soja e antioxidantes: impactos nos lipídios e aterosclerose. *Rev. Soc. Cardiol.*, 10: 819-832.

Dixon, D.P.; Lapthorn, A.; Edwards, R. 2002. Plant glutathione transferases. *Gen. Biol.*, 3: 1-10.

Fagbenro, O.A. 1988. Evaluation of defatted cocoa cake as a direct feed in the monosex culture of *tilapia guineensis* (Pisces: Cichlidae). *Aquacult.*, 73: 201-206.

Fang, Y.Z.; Yang, S.; Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrit.*, 18: 872-879.

Fernandes, J.B.K.; Carneiro, D.J.; Sakomura, N.K. 2001. Fontes e Níveis de Proteína Bruta em Dietas para Juvenis de Pacu(*Piaractus mesopotamicus*). *Rev. Bras. Zootec*., 30(3): 617-626.

Ferreira ALA, Matsubara LS. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Méd. Brás.,* 43(1):61- 68.

Franke, S.I.R.; Boeira, J.M.; Erdtmann, B; Henriques, J.A.P. 2003. Genotoxicidade de agentes sintéticos e naturais. *In*: *Genética Toxicológica*. J. Silva; B. Erdtmann & J.A.P. Henriques. (Eds.) Porto Alegre: Alcance. pp. 309-317.

Freeman, Z.J. 1995. Amazonian aquatic resources: fishery management and aquaculture development. Manaus/Am. *Dissertação de mestrado*. INPA/FUA. 121p.

Galli, L. F. & Torloni, C. E. *Criação de peixes*. 3ed. São Paulo: Nobel,1985.119p.

Gava, A.L. 1998. *Principios de tecnologia de alimentos*. São Paulo. 1ªEd. 8ª reimpressão.

Gohl, K., 1991. Seismic Wide-Angle Studies of Early Archean and Proterozoic Crust in Greenland, Minnesota, and Wyoming. *Ph.D. thesis*, University of Wyoming, Laramie, WY, 189 pp.

Gomes, L.C.; Araújo-Lima, C.A.R.M.; Roubach, R.; Chippari, A.R.; Lopes, N. P. & Urbinati, E.C. 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality os juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journ. W. Aquacult. Soc*., 34 (1): 76-84.

Goulding, M. 1980. *The fishes and the forest; Explorations in Amazonian natural history*. Univ. California Press, Berkeley and Los Angeles, 280p.

Goulding, M. 1993. Flooded forests of the Amazon. *Scient. Amer.*, 268 (3): 113 - 120.

Goulding, M.; Carvalho M.L. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae) an important Amazonian food fish. *Rev. Brasil. Zool.,* 107 - 133.

Gouveia, A.; Davies, S.J. 2004. Modulation of the post-prandial plasma glucose profile in juvenile European sea bass Dicentrarchus labrax fed diets varying in starch complexity. *Journ. Worl. Aquacult. Soc*. 35 (3): 392-400.

Guo, C.; Yang, J.; Wei, J.; Li, Y.; Xu, J.; Jiang, Y. 2003. Antioxidants activities of peel, pulp and seed fractions of commom fruits as determined by FRAP assay. *Nutrit. Resea.,* 23: 1719-1726.

Gwak, W.S.; Tsusaki, T. & Tanaka, M. 2003. Nutritional condition, as evaluated by RNA/DNA ratios, of hatchery-reared *Japanese flounder* from hatch to release. *Aquacult.*, 219: 503-514.

Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. 1974. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journ. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.

Habig., W.H. & Jakoby, W.B. 1981. Assays or differentiation of glutathione S-Tranferases. *Meth. Enzym.*, 77: 398 – 405.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford.

Heddle, J.A.; Cimino, M.C.; Hayashi, M.; Romagna, F.; Shelby, M.D.; Tucker, J.D.; Vanparys, P. & MacGregor, J.T. 1991. Micronuclei as na index of cytogenetic damage: Past, present, and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18: 277-291.

Heffner JE, Repine JE. 1989. Pulmonary strategies of antioxidant defenses. *Am. Rev. Respir. Dis.,* 140: 531-554

Henrique, M.M.F.; Gomes, E.F.; Gourllou- Coustans, M.F.; Oliva-Teles, A. & Davies, S.J. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus curata*. *Aquacult.*, 161: 415 – 426.

Hepher, B. 1993. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge: Cambridge University. 406p.

Hochachka, P.W. & Somero, G.N. 1984. Biochemical adaptation. Princeton Univ. Press. Princeton. 537p.

Hyvarinen, P.; Heinimaa, S.; Rita, H. 2004. Effects of abrupt cold shock on stress responses and recovery in brown trout exhausted by swimming. *Jour. Fish Biol.,* 64: 1015–1026.

Jackson, A.J.; Capper, B.S.; Matty, A.J. 1982. Evaluation of some plant proteins in complete diets for the tilapia *Sarotherodon mossambicus*. *Aquacult.*, 27: 97-109.

Kaloyianni, M.; Michaelidis, B. & Moutou, K. 1993. Effect of adenosine on glucose metabolism of *Rana ridibunda* erythocytes. *Journ. Experim. Biol.*, 177, p.41-50.

Kampen, E.J.; Zijlstra, W.G. 1964. Standardization of hemoglobinometry: II. The hemoglobincyanide method. *Clin. Chim. Acta*, 6: 538-544.

Kikuchi, K. 1999. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys oliĺaceusl*). *Aquacult.*, 179: 3–11.

Labarca, C.; Paigen, K. 1980. A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.*, 12: 344- 352.

Liener, I.J. 1980. *Toxic constituents of plants feedstuffs*. New

Love, R.M. & Black, D. 1990. Dynamics of stored energy in the North sea cold Gadus morhwa and cultured raimbow trout, *Salmo gairdineri*. *Comp. Physiol. Zool.*, 63, p. 630-638.

Lovell, T. 1981. How important is fish feed and nutrition. *Com. Fish farmer aquacult*., 7 (4), 36-37.

Mak, D.H.; Ip, S.P.; Li, P.C.; Poon, M.K. & Ko, K.M. 1996. Alterations in tissue glutathione antioxidant system in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.*, 162: 153-158.

Marcon, J.L. & Wilhelm Filho, D. 1999. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalmidae) from the Amazon. *Comp. Biochem. Physiol*., 123 (C): 257-263.

Marcon, J.L. 1995. Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazonicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum,* expostos a diferentes tensões de oxigenio. Uma abordagem comparativa. *Tese de doutorado*. INPA/FUA.BTRN. Manaus, 134p.

Marcon, J.L.; Oliveira, M.I. & Santos, A.C. 1997. Parametros do sangue de *Colossoma macropomum* cultivado na região de Manaus. Valores de referencia para o diagnostico da saúde de animais destinados ao cultivo. *Relatório final*. Manaus. FUA / CNPq. 37p.

Martin, S.D. 1990. Gossypol effects in animal feeding can be controlled. *Feedst.*, 62: 14-17.

Mbahinzireki, G.B.; Dabrowski, K.; Lee, K.J.; El-Saidy, D.; Wisner, E.R. 2001. Growth, feed utilization and body composition of tilapia (*Oreochromis* sp.) fed with cottonseed meal-based diets in a recirculating system. *Aquacult. Nutrit.*, 17: 189-200.

McFarlane,W.J; Cubitt, K.F.;Williams,H;Rowsell, D.;Moccia, R.; Gosine,R. & McKinley, R.S. 2004. Can feeding status and stress level be assessed analyzing patterns of muscle activity in swimming rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)?.*Aquacult.,* 239: 467–484.

Mendes, F.A. 2001. Efeito da vitamina D no ganho de peso e nos níveis de cálcio e fósforo inorgânico de *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasalmidae). Manaus/Am. *Dissertação de mestrado*. INPA/FUA. 63p.

Messier, F.; Huot, J.; Guodreault, F. & Tremblay, A. V. 1987. Reliability of blood parameters to assess the nutritional status of caribou. *Can. Journ. Zool.*, 65: 2413-2416.

Montero, D.; Marrero, M.; Izquierdo, M.S.; Robaina, L.; Vergara, J.M. & Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquacult.*, 171: 269 – 278.

Mori-Pinedo, L.A.; Pereira-Filho, M.; Oliveira-Pereira, M.I. 1999. Substituição do fubá de milho (*Zea mays*, L.) por farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*, H.B.K.) em rações para alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818). *Acta Amazon.,* 29(3): 447-453.

Morrow, M.D.; Higgs, D. & Kennedy, C.J. 2004. The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol*. 137 (C): 143-154.

Moyes, C.D. & West, T.G. 1995. Exercise metabolism of fish. In: Hochachka & Mommsen (eds.). *Bochemistry and molecular biology of fishes* . Vol. 4. Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Nikinmaa, M.; Soivio, A.; Nakari, T. 1983. Hauling stress in brown trout (Salmo-Trutta) - Physiological-responses to transport in freshwater or saltwater, and recovery in natural brackish water. *Aquacult*., 34 (1-2): 93-99.

NRC – National Research Council. 1993. Nutrient requeriments of fish. *Board on Agricult.*115p.

Ogata, H.Y.; Oku,H;Murai, T. 2002. Growth performance and macronutrient retention of offspring from wild and selected red sea bream (*Pagrus major*).*Aquacult.*, 206: 279–287.

Ohkawa, H. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analyt. Biochem.*, 95: 351-358.

Oioli, K.V.; Pezzato, L.E.; Silveira, A. C. & Luivizotto, M.C. 1992. Desempenho produtivo e alterações anatomopatológicas, resultantes da utilização do farelo do algodão na alimentação inicial da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Bol. Red Acuic. Amer. Latina*, 6: 7-9.

Oliveira, A.M.; Val, A.L.; Chagas, E.C. & Roubach, R. 2001. Efeito da temperatura sobre os parâmetros hematológicos de *Colossoma*

*macropomum* alimentado com vitamina C. *Relatório PIBIC*. INPA/FUA. Manaus-Am.

Omoregie, E. 2001. Utilization and nutrient digestibility of mango seeds and palm kernel meal by juvenile *Labeo senegalensis* (Antheriniformes: Cyprinidae). *Aquacul. Res.*, 32: 681 – 687.

Ortuño, J.; Esteban, M.A.; Meseguer, J. 2002. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (Sparus aurata L.). *Fish Shellf. Immunol*.,14:145 – 156.

Pacheco, M. & Santos, M.A. 1998. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on juvenile eel (*Anguilla anguilla). Ecotoxicol. Environ. Saf*., 38: 252-259.

Passi, S.; Ricci, R.; Cataudella, S.; Di Marco, P.; De Simone, F. & Rastrelli, L. 2002. Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different Mediterranean marine species of fish and shellfish. *Journ. Agric. Food Chem*., 50: 7314-7322.

Passi, S.; Ricci, R.; Cataudella, S.; Ferrante, I.; De Simone, F. & Rastrelli, L. 2004. Fatty acid pattern, oxidation product development and antioxidant loss in muscle tissue of rainbow trout and *Dicentrarchus labrax* during growth. *Journ. Agric. Food Chem*., 52: 2587-2592.

Peragón, J.; Barroso, J.B.; García-Salguero, L.; Hhiguera, M.D.L.; Lupiáñez, J.A. 2001. Growth, protein-turnover rates and nucleic acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development. *Intern. Jour. of Biochem.* & *Cell Biol.*, 33: 1227-1238.

Pereira-Filho, M. 1995. Alternativas para a alimentação de peixes em cativeiro. *In*: *Criando peixes na Amazônia*. A.L. Val & A. Honczaryk. (Eds.). p. 75-82.

Pezzato, L.E.; Oliveira, A.C.B.; Dias, E.; Barros, M.M. & Pezzato, A.C. 1996. Ganho de peso e alterações anatomopatológicas de tilápia-do-nilo arraçoadas com farelo de cacau. *Pesq. Agrop. Bras*. , 31 (5): 375-378.

Picada, J.N.; Kern, A.L.; Ramos, A.L.L.P.; Saffi, J. 2003. O estresse oxidativo e as defesas antioxidantes. *In*: *Genética Toxicológica*. J. Silva; B. Erdtmann & J.A.P. Henriques. (Eds.) Porto Alegre: Alcance. pp. 251-268.

Rinchard, J.; Lee, K.J.; Dabrowski, K.; Ciereszko, A.; Blom, J.W. & Ottobre, J.S. 2003. Influence of gossypol from dietary cottonseed meal on haematology, reproductive steroids and tissue gossypol enantiomer concentrations in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Nutrit*., 9:275-282.

Roubach, R. & Saint-Paul, U. 1994. Use fruits and seeds from Amazonian inundated forest in feeding trials with *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Pisces, Characidae). *Journ. Appl. Ichthyol.*, 10: 205-240.

Roubach, R. 1991. Uso de frutos e sementes de floresta inundáveis na alimentação de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Pisces, Characidae). Manaus, AM. *Dissertação de mestrado*. INPA/FUA: 79p.

Rover-Junior, L.; Höehr, N.F. & Vellasco, A.P. 2001. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanaliticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*, 24(1): 112 – 119.

Saint-Paul, U. 1984. Ecological and physiological investigations on *Colossoma macropomum*, a new species for fish culture in Amazonia. *Acuicul.*, 5 (3): 501-518.

Saint-Paul, U. 1991. The potential for *Colossoma* culture in Latin America. *Infor. Intern.*, 2 : 49 – 53.

Salaro, A.N.; Pezzato, L.E.; Barros, M.M. & Vicentini, C.A. 1999. Desempenho e espermatogênese de alevinos de tilápia alimentados com farelo ou farinha de algodão. *Pesq. Agrop. Brás.,* 34: 449-457.

Schmidt-Nielsen, K. 1996. *Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente. 5ª edição*. Ed. Santos, São Paulo. p. 151-168.

Schutzendubel, A.; Schwanz, P.; Teichmann, T.; Gross, K.; Langenfeld-Heyser, R.; Godbold, D.L.; Polle, A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content and differentiation in Scots pine roots. *Plant. Physiol.*, 127: 887 – 898.

Shah, A.H.; Al-Shareef, A.H.; Ageel, A.M.; Qureshi, S. 1998. Toxicity studies in mice of common spices, *Cinnamomum zeylanicum* bark and *Piper longum* fruits. *Plant F. Hum.Nutrit.,* 52: 231-239.

Silva, J.A.M. 1997. Nutrientes, energia e digestibilidade aparente de frutos e sementes consumidos pelo tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) nas florestas inundáveis da Amazônia Central. Manaus/Am. *Tese de Doutorado*. INPA/FUA. 142p.

Silva, J.A.M.; Pereira-Filho, M.; Oliveira-Pereira, M.I. 2003. Valor energético de espécies vegetais importantes na alimentação do tambaqui. *Acta Amaz.*, 33 (4), 687-700.

Smith, R.R. 1989. *Nutritional energetics, fish nutrition*. California. Ed. Academic Press. 28p.

Soares, C.M.; Hayashi, C.; Faria, A.C.E.A. & Furuya, W.M. 2001.Substituição da Proteína do Farelo de Soja pela Proteína do Farelo de Canola em Dietas para a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na Fase de Crescimento. *Rev. Bras. Zootec*., 30(4):1172-1177

Soares, C.M.; Hayashi, C.; Furuya, V.R.B; Furuya, W.M. & Galdioli, E.M. 2000. Substituição Parcial e Total da Proteína do Farelo de Soja pela Proteína do Farelo de Canola na Alimentação de Alevinos de Piavuçu (*Leporinus macrocephalus*, L.). *Rev. Bras. Zootec*., 29(1):15-22.

Soengas, J.L. & Moon, T. W. 1995. Uptake and metabolism of glucose, alanine and lactate by red blood cells of the American eel, *Anguilla rostrata. Journ. Envirom. Biol.* 198, p. 877-888.

Sotelo, A & Alvarez, R.G. 1991. Chemical composition of wild theobroma species and their comparasion to the cação bean. *Journ. Agricult. Food Chem*., 39: 1940-1943.

Stott, W.T., Sinnhuber, R.O., 1978. Dietary casein levels and aflatoxin-B1 metabolism in rainbow trout. *Abst. Pap. Am. Chem. Soc*. 176: 70-70.

Stryer, L. 1996. Bioquímica. 4ª. Ed. Editora Guanabara Koogan S.A. 961p.

Tandon, R.S. & Joshi, B.D. 1976. Total red and white blood cell count of 33 species of fresh water teleosts. *Z. Tierphysiol. Tierernährg. Futtrtmittelkde*, 37, 277-286

Tavares-Dias, M.; Sandrim, E.F.S.; Sandrim, A. 1998. Características hematológicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) Cuvier, 1818

(Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo: I. série eritrocitária. *Rev. Bras. Biol.* 58 (2): 197-202.

Torres, P.; Tort, L.; Planas, J. & Flos, R. 1986. Effects of confinement stress and additional zinc treatment on some blood parameters in the dogfish *Scyliorhinus caniculai. Comp. Biochem. Physiol.*, 83 (C), 89-92.

Tsukamoto, R.Y.; Takahashi, N.S. 1992. Falta de proteína para ração: Estrangulamento da aqüicultura no Brasil?. *Pan. Aqüicult.*, 8-9.

Val, A. L. & Honczaryk, A. A criação de peixes na Amazônia: um futuro promissor. In: *Criando peixes na Amazônia*. (Eds. Val, A.L. & Honczaryk, A.). Instituto de Pesquisas da Amazônia - INPA. Manaus – AM, Brasil, p. 1-5, 1995.

Val, A.L. 2000. Organic phosphates in the red blood cells of fish. C*omp. Biochem. Physiol*., 125(A): 417-435.

Val, A.L. 2002. Estresse em peixes – Ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: *Encontro Brasileiro de Patalogistas de Organismos Aquáticos, 7 Encontro Latino-Americano de Patalogistas de Organismos Aquáticos,* 3, Foz Do Iguaçu, PR, ABRAPOA, Anais, p.20.

Val, A.L.; Rolim, P.R.; Rabelo, H. 2000. Situação atual da aqüicultura no norte. In: Valenti, W.C.; Poli, C.R.; Pereira, J.A.; Borghetti, J.R. *Aqüicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília: CNPq. Misnistério da Ciência e Tecnologia. 247p.

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

Vijayan, M.M. & Moon, T.W. 1992. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food – deprived raimbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. Journ. Fish Aquat. Sci.*, 49: 2260 – 2266.

Viola, S.; Mokady, S.; Rappaport, U. 1982. Partial and complete replacement of fish meal by soybean meal in feeds for intensive sulture of carp. *Aquaculture*, 26: 223 – 232.

Waldhoff, D.; Maia, L. 2000. Production and chemical composition of fruit from trees in floodplain forests of Central Amazonia and their importance for fish production. *In*: *The Central Amazon Floodplain: Actual use and options for a sustainable management.* W.J. Junk; J.J. Ohly; M.T.F. Piedade & M.G.M. Soares(Eds.). Backhuys Publishers, Leiden, pp. 393-410.

Webb, P.W. 1998. Swimming. In: Evans, ???. Fish phisyology

Weber, L.P.; Higgins, P.S.; Carlson, R.I.; Janz, D.M. 2003. Development and validation of methods for measuring multiple indices of condition in juvenile fishes. *J.Fish Biol.*, 63: 637-658.

Wedemeyer, G.A.; Barton, B.A.; Mcleay, D.J. 1990. Stress and acclimatation. In: Schreck, C.B.; Moyle, P.B. (Eds). *Met. Fish Biol. Am. Fish.Soc.*, 451-490.

Wilhelm-Filho, D & Marcon, J.L. 1996. Antioxidants defenses in fish 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.* Manaus: INPA, 299-312.

Wilhelm-Filho, D; Giulivi, C.; Boveris, A. 1993. Antioxidant defense in marine fish. I:Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106 (C): 409 – 413.

Ximenes-Carneiro, A.R. 1991. Elaboração e uso de ensilado biológico de pescado na alimentação de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Dissertação de mestrado*. INPA/FUA. Manaus, AM. 81p.

York. 502p.

Yuyama, K.; Aguiar, J.P.L.; Yuyama, L.K.O. 2002. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. *Acta Amaz.*, 32(1): 169-174.

Yuyama, L.K.O.; Aguiar, J.P.L.; Yuyama, K.; Clement, C.R.; Macedo, S.H.M.; Favaro, D.I.T.; Afonso, C.; Vasconcellos, M.B.A.; Pimentel, S.A.; Badolato, E.S.G.; Vannucchi, H. 2003.Chemical composition of the fruit mesocarp of three peach palm (*Bactris gasipaes*) populations grown in Central Amazonia, Brazil. *Int. Journ. F. Scien. Nutrit*. 54 (1): 49-56.

Zar, J.K. 1984. *Biostatistical analysis*. 2ed. Pretice-Hall, New Jersey. 718p.