



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Coordenação de Capacitação  
Divisão Apoio Técnico

**PIBIC**

**2.249**

**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA  
RELATÓRIO FINAL**

**UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS POR TAMBAQUIS  
(*Colossoma macropomum*) SUBMETIDOS ÀS DIFERENTES  
TEMPERATURAS**

**BOLSISTA: Adriele Liborio Freitas**

**ORIENTADOR(A): Márcio Soares Ferreira, Dr.**

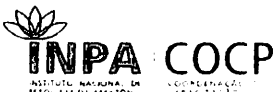
Relatório Final apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para a conclusão como participante do Programa de Iniciação Científica do INPA.

**Manaus – Amazonas  
2017**

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





## Título Trabalho do Bolsista: UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS ENERGÉTICOS POR TAMBAQUIS (*Colossoma macropomum*) SUBMETIDOS ÀS DIFERENTES TEMPERATURAS

### Resumo

As necessidades proteicas dos peixes são de duas a quatro vezes maiores que os de outros vertebrados. E um fator complicador para os piscicultores é que a necessidade proteica de uma mesma espécie de peixe pode variar em função do tamanho e idade do animal, e da temperatura da água, além de outros fatores que ainda não foram estudados. O presente estudo propõe a utilização da calorimetria indireta para mensuração do uso que o tambaqui faz dos seus substratos energéticos (carboidratos, proteínas e lipídeos) durante condições de alta temperatura. Durante o experimento os peixes foram mantidos em 12 aquários de 70 litros, com aeração e recirculação de água constante, sendo 5 exemplares em cada aquário para cada tratamento. Os aquários foram divididos em dois grupos, um deles aclimatados por 20 dias nas temperaturas de 28°C, e o outro em 32°C. Os animais aclimatados em temperatura mais alta apresentaram um aumento da taxa metabólica, como pode ser verificada pelo aumento do  $MO_2$ ,  $MCO_2$  e  $MNH_3$ . Apesar do aumento, a porcentagem de utilização de cada fonte energética, calculadas a partir de calorimetria indireta, se altera de forma bem significativa entre as temperaturas. Em 28°C há uma maior porcentagem de carboidratos sendo utilizado e em temperatura mais alta (32 graus) a porcentagem de carboidratos tem uma queda acentuada, e a porcentagem de utilização de lipídeos chega a dobrar. Esses resultados indicam que criação de tambaqui em altas temperaturas pode gerar um indivíduo mais magro, e que talvez seja possível adicionar mais lipídeos na ração para suprir sua demanda energética.

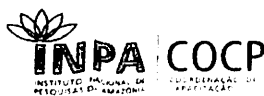
**Palavras Chave (no máximo 5)**

Mensuração, metabolismo, calorimetria, lipídeos.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES





Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
Coordenação de Capacitação  
Divisão Apoio Técnico

**Subárea: Multidisciplinar**

**Financiamento**

(PIBIC/CNPq ou PAIC/FAPEAM)

Data: 14/07/2017

Marcio S. Ferreira

Orientador(a)

Márcio Soares Ferreira, Dr.  
INPA-LEEM

Av. André Araújo, 2936-Petrópolis  
CEP: 69067-375-Manaus-AM-Brasil

Cidriete Hilário Freitas

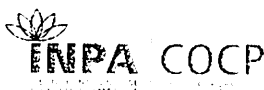
Bolsista

Apoio Financeiro:



FAPEAM

Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA  
E INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



## INTRODUÇÃO

A literatura mostra que as necessidades proteicas dos peixes são de duas a quatro vezes maiores que os de outros vertebrados. No entanto, essas demandas podem variar em função do tamanho e idade do animal, e da temperatura da água (Wilson, 2002). Trabalhos demonstram que mudanças na temperatura (Kieffer et al., 1998) e na velocidade da água de cultivo (Alsop et al., 1999), e a taxa de alimentação dos peixes podem interferir na preferência deles em catabolizar proteínas para a produção de energia, o que também se reflete nas suas necessidades proteica dietéticas.

Um fator complicador para os piscicultores é que, segundo bem estabelecido na literatura, a necessidade proteica de uma mesma espécie de peixe pode variar em função do tamanho e idade do animal, e da temperatura da água. Outros fatores externos provavelmente também afetam esses requerimentos, mas não foram estudados ou não estão disponíveis na literatura.

A simples suplementação da ração com mais proteínas nem sempre surte o efeito esperado, uma vez que a eficiência da sua retenção é determinada por um grande número de fatores endógenos e exógenos, incluindo a quantidade de alimento ingerido, nível energético e proteico, balanço e biodisponibilidade de aminoácidos, fatores genéticos e estágio de desenvolvimento do peixe, entre outros (Halver & Hardy, 2002).

Outro fator a ser levado em consideração na estimativa da concentração proteica ideal é a digestibilidade da proteína utilizada, que por sua vez é influenciada por vários fatores, como por exemplo, temperatura da água, salinidade, tamanho do peixe, quantidade ingerida, etc. (Wilson, 2002).

Desta forma, um dos pontos chaves que precisam ser decifrados para se aprimorar técnicas de alta produtividade na piscicultura é o uso que o animal faz de cada fonte energética em diferentes condições comuns de cultivo. A importância dos estudos da bioenergética dos peixes é prover a base para a formulação de dietas, e o desenvolvimento de modelos precisos e convenientes para prever o balanço energético dos animais baseado no peso, sexo, atividade, estado fisiológico, condições ambientais, e quantidade e qualidade dos nutrientes consumidos (Baldwin & Bywater, 1984).

Um exemplo de estudo de bioenergética é a calorimetria indireta, no qual se monitora as trocas gasosas (consumo de oxigênio e excreção de gás carbônico) dos animais, sendo o gasto energético estimado por estequiometria dos nutrientes catabolizados. No entanto, na maioria dos

estudos com peixes, devido à complexidade da aplicação da técnica, a mensuração da excreção de gás carbônico é ignorada, gerando resultados incompletos (Bureau et al., 2002). As medidas do consumo de oxigênio e excreção de CO<sub>2</sub> são usadas para o cálculo dos quocientes respiratórios, permitindo-se estimar a porção relativa de carboidratos e lipídeos utilizados para a manutenção energética.

Vários métodos de calorimetria indireta têm sido descritos para peixes, no entanto, na maioria dos estudos, as condições aplicadas aos peixes antes e durante a mensuração não são representativas das condições encontradas nas pisciculturas locais (Bureau et al., 2002).

O presente estudo propõe a utilização da calorimetria indireta para mensuração do uso que o tambaqui faz dos seus substratos energéticos armazenados (carboidratos, proteínas e lipídeos) durante condições de alta temperatura. O aprimoramento desta técnica poderá colaborar com o desenvolvimento da piscicultura regional, uma vez que poderemos descobrir as melhores técnicas de cultivo, e os melhores parâmetros físico-químicos da água, nos quais os peixes minimizem a utilização da proteína corpórea como substrato, passando a utilizar com mais intensidade os carboidratos e lipídeos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares analisados foram da espécie *Collossoma macropomum*, popularmente chamado de Tambaqui, que possuem uma grande importância comercial regional. Os animais foram adquiridos do viveiro do Sítio dos Rodrigues, em Presidente Figueiredo – AM. Com comprimentos iniciais de 8,98cm ± 1 e massa de 25,55g ± 12. Trazidos para o LEEM (Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular), localizado no INPA (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia), foram colocados em um aquário de 5000L, com aeração e circulação de água constante. Ficaram nestas condições para recuperação de estresse, por três semanas, com alimentação efetuada duas vezes ao dia até a saciedade aparente, e até o início dos experimentos.

Durante o experimento os peixes foram mantidos em 12 aquários de 70 litros, com aeração e recirculação de água constante, sendo 5 exemplares em cada aquário para cada tratamento. Estes aquários foram divididos em dois grupos, um deles aclimatados por 20 dias nas temperaturas de 28°C, e o outro em 32°C. Para a temperatura mais alta, 32°C, foi utilizado um aquecedor.

A alimentação durante o período experimental foi efetuada duas vezes ao dia, com ração 36% de proteína, até saciedade aparente, uma pela manhã e uma pela tarde. A quantidade de ração fornecida era pesada de acordo com o consumo anterior, inicialmente todos os aquários receberam 0,5g de ração. Esse procedimento facilitava estimar a quantidade aproximada de ração a ser fornecida diariamente, evitando sobras de comida que serviriam para degradar a qualidade da água. A ração era despejada na água em repouso, ou seja, a bomba que realizava a recirculação era desligada 2 minutos antes da alimentação e permanecia inativa até os animais se saciarem. Durante os períodos de alimentação os animais eram mantidos em ambiente silencioso, evitando o estresse, para que pudessem se alimentar bem.

Após o período de aclimatação, 6 peixes (um de cada aquário) de cada tratamento foram devidamente coletados e submetidos à câmara de respiração. Todos os peixes, dos dois tratamentos, foram aclimatados na câmara de respiração por 1 hora, contendo água com as mesmas características físico-químicas da água do tratamento de origem, e com uma bomba que injetava água dentro da câmara, permitindo que ela estivesse sempre oxigenada e livre de CO<sub>2</sub> e amônia. Em seguida, com o fluxo para dentro da câmara fechado, a água de dentro da câmara era coletada, e 11 minutos depois era coletada novamente. Isso permitia que, além da mensuração do consumo de oxigênio ao longo de 11 minutos, e que era feita de forma automática pelo equipamento Loligo System, a excreção de CO<sub>2</sub> e de amônia também fossem mensuradas ao longo do tempo. Após cada ciclo de 11 minutos de mensuração, o fluxo da câmara era aberto por 6 minutos, permitindo a reoxigenação da água, e possibilitando que os níveis de CO<sub>2</sub> e amônia caíssem. Esse procedimento foi repetido 4 vezes, e o valor final dos parâmetros foi gerado a partir da média das 4 análises.

Os valores de CO<sub>2</sub> excretados pelos peixes foram obtidos em um momento posterior ao experimento, a partir das análises da água coletada, e usando equipamento TOC/TIC Analyzer (analisador de carbônico orgânico e inorgânico). A análise da amônia total (Tamm = NH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) seguiu o método descrito por Lauff & Wood (1996), com auxílio de espectrofotômetro de microplaca. Os valores de uréia excretada foram indetectáveis pela mesma técnica, descrita por Lauff & Wood (1996), uma vez que o período de apenas 11 minutos não é suficiente para que haja concentração desta substância na água. A partir destas análises foi estimado o uso instantâneo de substratos (Kieffer 1998; Bureau 2002) e, a partir de peixes sobressalentes nos tanques de

aclimatação, foram coletados tecidos para análises posteriores de lactato, glicogênio total e lipídeo total nos tecidos muscular vermelho, muscular branco e fígado.

Os dados de consumo de Oxigênio, e excreção de Amônia e  $\text{CO}_2$ , foram analisados por meio de teste  $t$ , usando o pacote estatístico Sigma Plot 9.0 e nível de significância de 5%.

### Cálculo do uso instantâneo de substratos

O quociente respiratório ( $\text{RQ} = \text{MCO}_2/\text{MO}_2$ ) e quociente de nitrogênio ( $\text{NQ} = \text{MN}/\text{MO}_2$ ) foram determinados para cada tratamento, a partir das médias de  $\text{O}_2$  consumido,  $\text{CO}_2$  e amônia excretados, em cada um dos dois grupos. O uso de proteínas pode ser calculado a partir do cociente de nitrogênio ( $\text{MN}/\text{CO}_2$ ), baseando-se na fórmula  $\text{P} = \text{NQ}/0,27$ , onde  $\text{P}$  é a fração suportada pelas proteínas do total de substratos suportando  $\text{MO}_2$ , e 0,27 é o máximo teórico para  $\text{NQ}$ , ou seja, na hipótese de que toda a energia para o peixe estivesse sendo fornecida pelas proteínas. Os valores teóricos de  $\text{RQ}$  lipídeos e  $\text{RQ}$  carboidratos são, respectivamente, 0,71 e 1 (novamente são valores teóricos calculados na hipótese de 100% da energia para o peixe estivesse sendo fornecida por cada um destes substratos, mas que na prática, é impossível de acontecer).

Baseando-se nestes valores teóricos, Lauff and Wood (1996) propõem que,  $\text{RQ} = \text{P} * 0,93 + \text{C} * 1,0 + \text{L} * 0,71$ , e que é a mesma coisa que  $\text{RQ} = 0,81 \text{NQ} + 0,29 \text{C} + 0,71$ .

Uma vez que já temos o  $\text{NQ}$ , gerado a partir da análise da excreção de amônia, e o  $\text{RQ}$ , que é a relação entre  $\text{CO}_2$  excretado e oxigênio consumido, a equação pode ser resolvida por  $\text{C}$ , sendo  $\text{L}$  determinado por diferença ( $\text{L} = 1,0 - \text{P} - \text{C}$ ). Essas porcentagens de contribuição para o  $\text{MO}_2$  podem então ser convertidas para porcentagens baseadas no uso de carbono via  $\text{RQ}$ s específicos de cada substrato.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O  $\text{MO}_2$  (consumo de oxigênio) apresentou diferença estatística entre os tratamentos, sendo que os peixes dos tanques submetidos à temperatura mais elevada,  $32^\circ\text{C}$ , apresentaram o dobro do consumo de oxigênio realizado pelos peixes aclimatados em temperatura de  $28^\circ\text{C}$  (Figura. 1). Ou seja, conforme há o aumento da temperatura da água, maior a necessidade de oxigênio pelo peixe. Um dos problemas do consumo aumentado de oxigênio pelos peixes, é que em águas com

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



temperaturas mais elevadas há pouca concentração de  $O_2$ , o que poderia causar danos no metabolismo e no desenvolvimento dos animais viventes nessas condições de água. No entanto, estudos realizados com tambaqui mostram que eles possuem uma tolerância maior a hipóxia devido suas condições naturais de vida e desenvolvem adaptações morfológicas, como o aumento dos lábios, para a captação do gás oxigênio (Val et al, 1996). Outro problema é o fato de o peixe estar gastando mais energia para realizar a respiração, o que não é viável para os donos de viveiros. A energia em excesso utilizada para suprir a demanda de oxigênio poderia estar sendo utilizada para síntese de proteínas, por exemplo, o que resultaria em mais músculos, significando para o piscicultor mais produtividade.

Concomitantemente, a taxa de  $MCO_2$  (excreção de gás carbônico) apresentou diferença significativa entre as temperaturas. Em temperatura mais elevada,  $32^\circ C$ , a excreção de gás carbônico pelos peixes apresentou um aumento de 30% em relação à excreção de  $CO_2$  pelos peixes aclimatados em temperatura de  $28^\circ C$  (Figura. 2). O que faz todo sentido biológico, pois quanto maior o consumo de oxigênio na respiração maior a excreção de dióxido de carbono. Todavia, nem todo o dióxido de carbono excretado resulta de um mesmo substrato energético, podendo resultar da respiração de carboidratos, proteínas ou lipídeos (Lehninger et al, 2002).

Já é bem conhecido que o consumo de  $O_2$  e a excreção de  $CO_2$  tendem a aumentar em animais submetidos com o aumento da temperatura, ou seja, há um escalonamento da temperatura com a taxa metabólica (Clarke, 2004). Nos peixes, uma temperatura mais alta provoca uma maior ventilação e perfusão das brânquias, para que a oxigenação de todos os tecidos seja realizada de forma eficaz (Fernandes et. al, 2007), e essa é a forma utilizada para manter sua homeostase.

No que se refere à excreção de amônia, os resultados também apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Os animais do tratamento de maior temperatura ( $32^\circ C$ ) excretaram em torno de 15% de amônia a mais que os animais de menor temperatura ( $28^\circ C$ ) (Figura 3). Segundo Wood (2017) a excreção de resíduos de nitrogênio é altamente sensível à temperatura, visto que à medida que a temperatura aumenta, uma porcentagem crescente do metabolismo aeróbio é alimentada pela oxidação proteica. E em animais alimentados diariamente, como os peixes do presente estudo, o nível de síntese de proteínas também tende a aumentar com a temperatura (Fauconneau e Arnal, 1985). Um estudo realizado sobre os efeitos climáticos em truta-arco-iris (Wood, 2017) mostrou que a excreção de resíduos nitrogenados aumenta em conjunto com aumentos



na alimentação, assim como a síntese proteica e taxa metabólica aumentam juntamente com a temperatura. Portanto a temperatura pode aumentar de forma significativa a excreção de amônia pelo tambaqui, o que pode ser prejudicial em longo prazo, ou em sistemas pequenos de cultivo, apesar de essa espécie tolerar bem a amônia ambiental (Wood et al, 2017).

No geral, em temperatura mais alta, há um aumento da taxa metabólica como pode ser verificado pelo aumento do  $MO_2$ ,  $MCO_2$  e  $MNH_3$  (Figuras 1,2 e 3), no entanto, apesar do aumento, a porcentagem de utilização de cada substrato se altera de forma bem significativa. Em temperatura mais branda (28 graus), há uma maior porcentagem de carboidratos sendo utilizado (Figura 4), e em temperatura mais alta (32 graus), a porcentagem de carboidratos cai e há um aumento do uso de lipídeos (Figura 4). A utilização de carboidratos em alta temperatura tem uma queda em quase metade, a proteína diminui em torno de 20% e a utilização de lipídeos quase dobra.

A explicação mais parcimoniosa para o aumento da taxa de utilização de lipídeos como substrato energético em temperaturas mais altas, seria o fato que os lipídeos serem os substratos energéticos mais eficientes, ou seja, para cada molécula de lipídeo, muito mais energia é liberada em relação aos demais substratos, como carboidratos e proteínas. Ademais, os peixes geralmente possuem uma boa reserva lipídica, suficiente para dezenas de dias de produção energética sem necessitar reposição (Moyes and West, 1995). Desta forma, em condições de aclimação às temperaturas mais elevadas, onde a taxa metabólica aumenta, o mais provável é que o peixe passe a poupar substratos menos abundantes em detrimento da utilização dos lipídeos, mais abundantes e energeticamente mais eficientes. É provável que, nestas condições, ocorra até mesmo um aumento da taxa de absorção de lipídeos no intestino dos peixes, visando aumentar suas reservas energética, mas essa hipótese deverá ser confirmada em experimentos futuros.

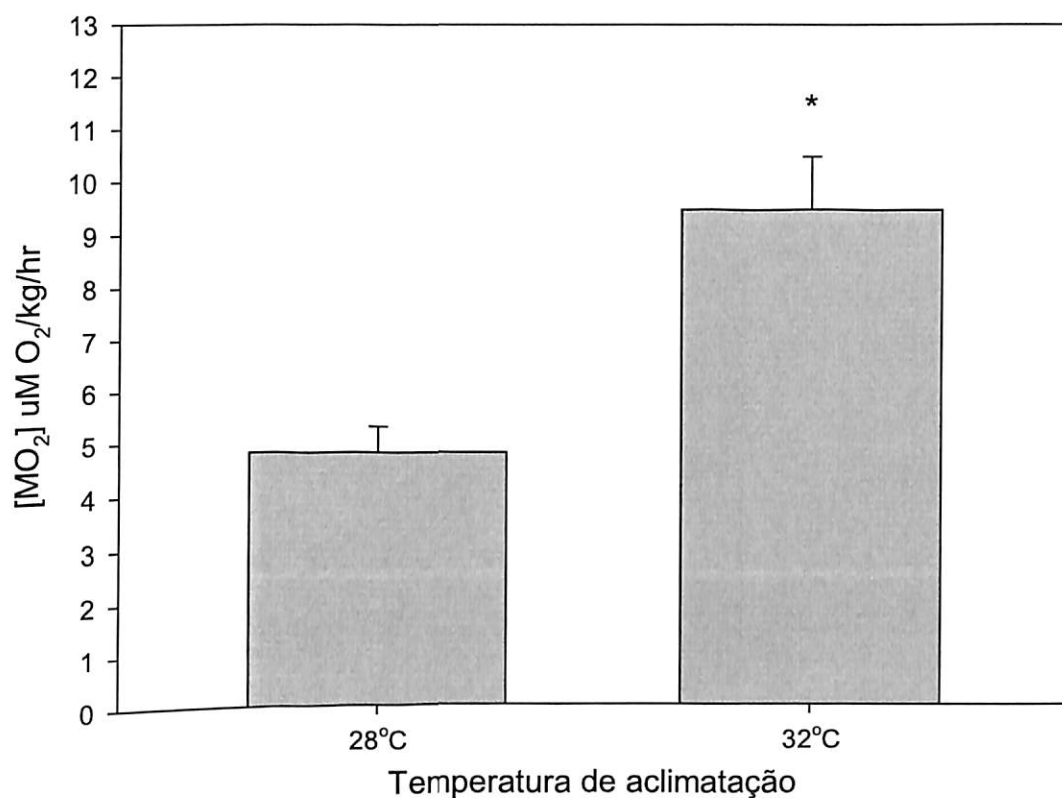


Figura. 1. Consumo de oxigênio mensurado por meio da câmara respirométrica. Dados expressos como média e erro padrão da média. Asterisco (\*) indica diferença estatística (P=0,002) por meio de teste *t*. N=6.

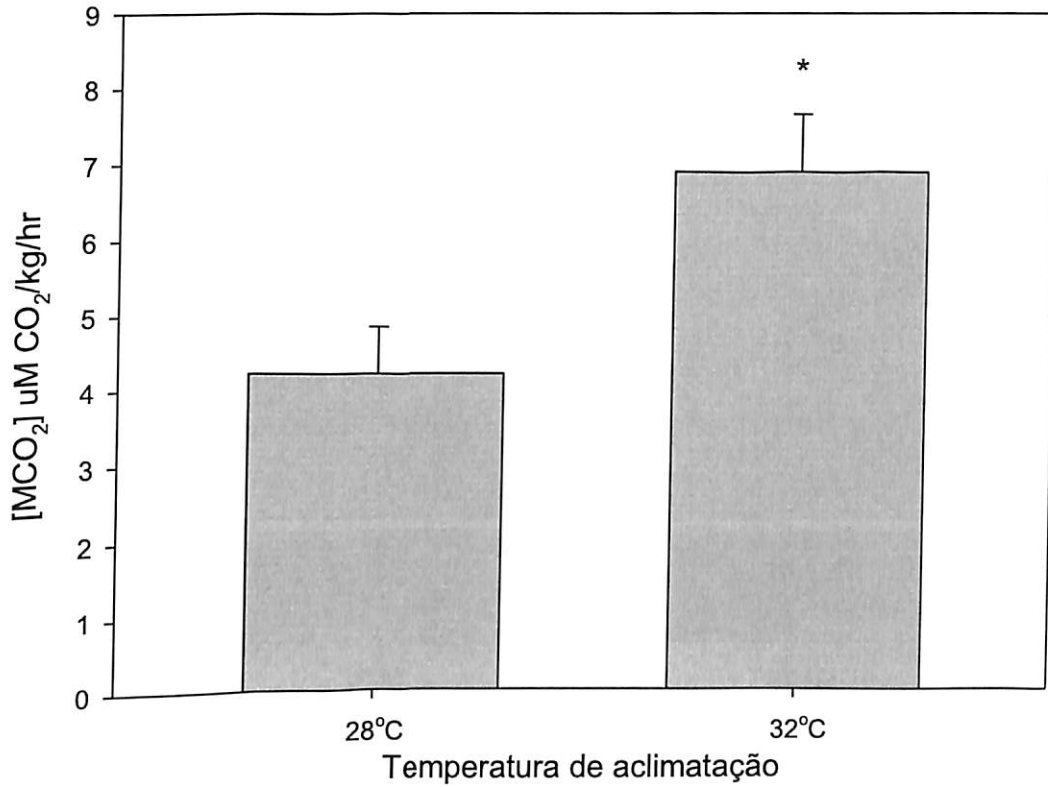


Figura. 2. Excreção de gás carbônico mensurado por meio de equipamento TOC/TIC Analyser. Dados expressos como média e erro padrão da média. Asterisco (\*) indica diferença estatística (P=0,022) por meio de teste *t*. N=6.

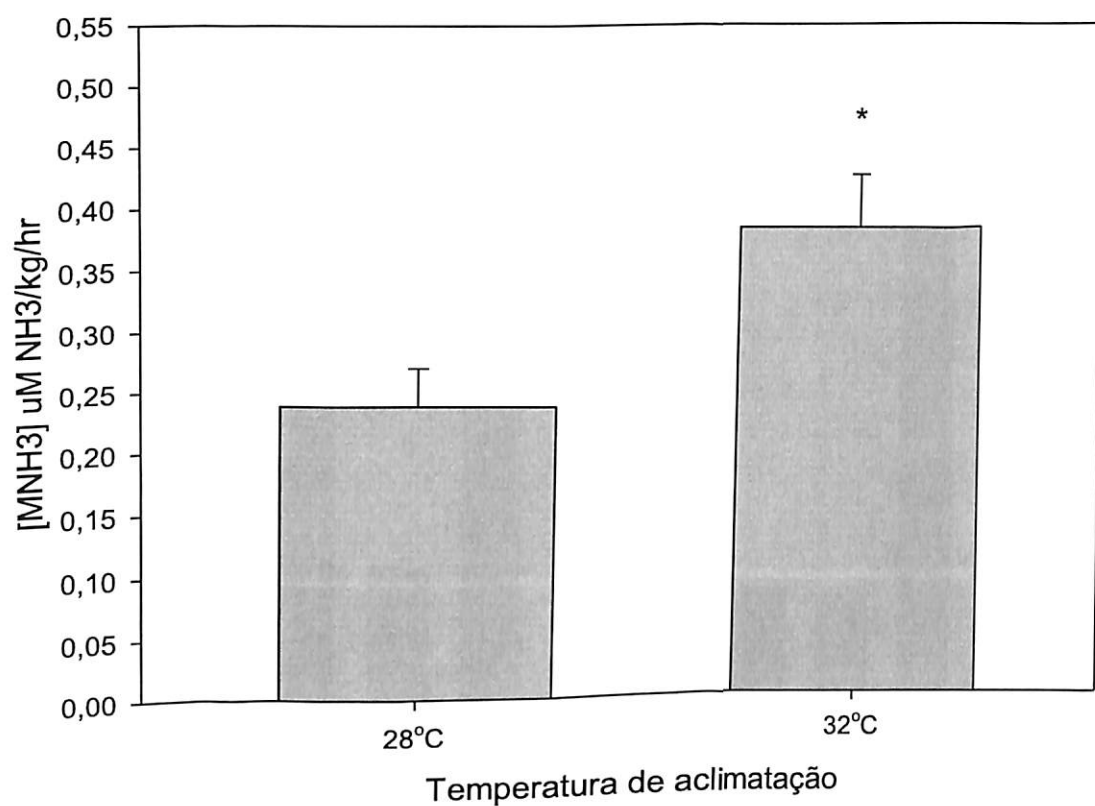


Figura. 3. Excreção de amônia mensurada a partir da técnica de Lauff & Wood (1996). Dados expressos como média e erro padrão da média. Asterisco (\*) indica diferença estatística ( $P=0,030$ ) por meio de teste *t*.  $N=6$ .

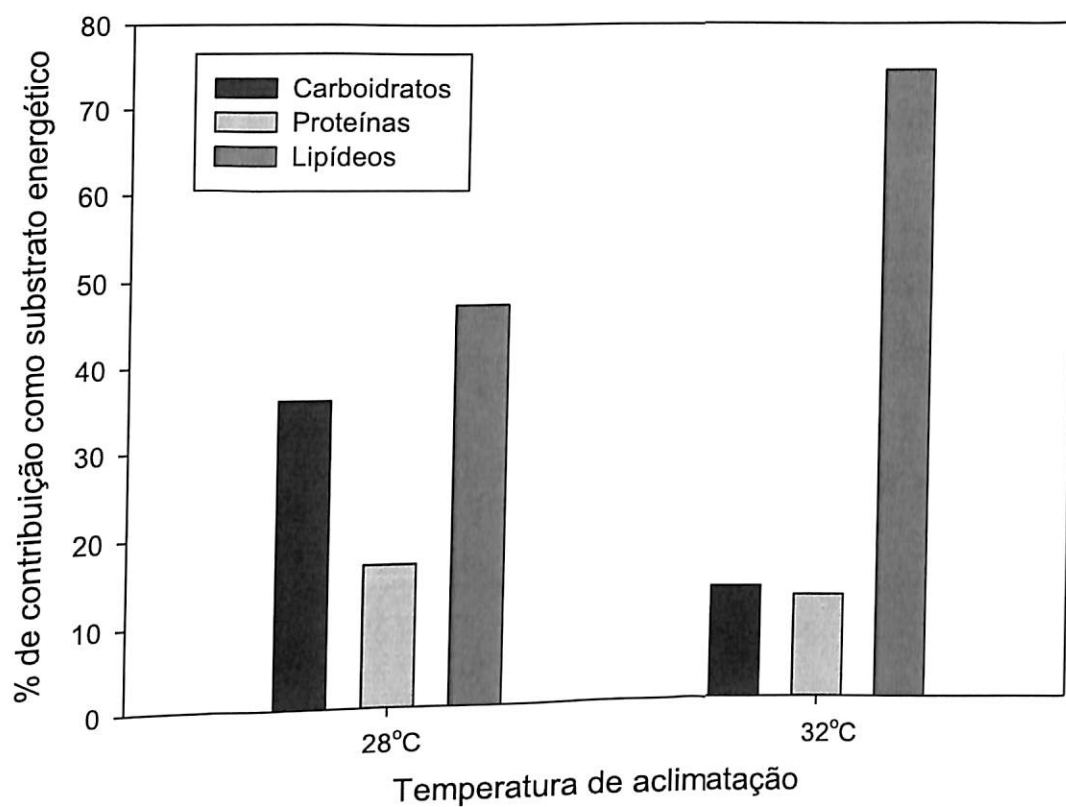


Figura 4. Uso instantâneo dos substratos energéticos em diferentes temperaturas. A calorimetria indireta foi baseada nos valores médios de  $MO_2$ ,  $MCO_2$  e  $MNH_3$ , ou seja, não representam uma análise estatística, e sim uma representação gráfica da estimativa de porcentagem.

## CONCLUSÃO

Concluimos que o tambaqui, quando criado em temperatura de 32 graus, aumenta significativamente o consumo de oxigênio, da excreção de CO<sub>2</sub> e da excreção de amônia. Isso indica um aumento global da taxa metabólica, no entanto, há uma drástica mudança nas proporções dos substratos energéticos utilizados, com predominância no uso de lipídeos como substrato energético. Os dados indicam que o cultivo em altas temperaturas pode gerar um peixe menos gordo, e que possivelmente maiores concentrações de óleo podem ser adicionadas à ração para suprir a demanda energética do peixe.

Apoio Financeiro:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



## REFERÊNCIAS

- Alsop, D. H.; Kieffer, J. D.; Wood, C. M. 1999. The Effects of Temperature and Swimming Speed on Instantaneous Fuel Use and Nitrogenous Waste Excretion of the Nile Tilapia. *Physiological and Biochemical Zoology* 72(4), 474–483.
- Baldwin, R. L. & Bywater, A. C., 1984. Nutritional energetics of animals. *Annual Review of Nutrition* 4, 101-114.
- Bureau, D. P., Kaushik, S. J. & Cho, C. Y., 2002. Bioenergetics In *Fish Nutrition* (Halver, J. E. & Hardy, R. W., eds.), pp. 1-59. USA.: Elsevier. FAO (2010).
- Clarke, A; Fraser, K. P. P. 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology*, 18:243-251.
- FAO – Food and Agriculture Organization. 2013. On-farm feeding and feed management in aquaculture. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 583. Rome.
- Fauconneau, B., and Arnal, M., 1985). In vivo protein synthesis in different tissues and the whole body of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Influence of environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* 82A, 179-187.
- Fernandes, M. N.; Rantin, F. T.; Glass, M. L.; Kapoor, B. G., 2007. *Fish respiration and environment*. Science Publishers. Jersey. 377pp.
- Halver, J. E. & Hardy, R. W., 2002. Nutrient flow and retention. In *Fish Nutrition* (Halver, J. E. & Hardy, R. W., eds.), pp. 755-770. USA: Elsevier.
- Kieffer, J. D.; Alsop, D.; Wood, C. M. 1998. A respirometric analysis of fuel use during aerobic swimming at different temperatures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 201,3123-3133.
- Lauff, R. F. & Wood, C. M., 1996. Respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during starvation in juvenile rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B* 165, 542-551.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M., 2002. *Lehninger Princípios de Bioquímica*, p. 465 – 485. *Oxidação de ácidos graxos*. 3. ed. São Paulo: Sarvier.

- Moyes, C.D., West, T.G., 1995. Exercise metabolism of fish. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. Elsevier, Amsterdam
- Val, A. L., Paula-Silva, M.N., Almeida-Val, V. M. F. 1998. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. *S. Afr. J Zoo* 1,33(2):107-114.
- Wilson, R. P. (2002). Amino acids and proteins. In *Fish Nutrition* (Halver, J. E. & Hardy, R. W., eds.), pp. 143-179. USA: Elsevier.
- Wood, C. M.; Souza-Neto, J. G.; Wilson, J. M.; Duarte, R. M.; Val, A. L. 2017. Nitrogen metabolism in tambaqui (*Colossoma macropomum*), a neotropical model teleost: hypoxia, temperature, exercise, feeding, fasting, and high environmental ammonia. *Journal of Comparative Physiology B*, 187:135-151.

Apoio Financeiro:



Realização:



MINISTÉRIO DA  
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,  
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

