



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CÂMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FIBRAS MUSCULARES E ESTRESSE OXIDATIVO DE PINTADO AMAZÔNICO
ALIMENTADO COM NÍVEIS DE PROTEÍNA

Stephane Vasconcelos Leandro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus Universitário de Sinop, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Zootecnia.

Sinop, Mato Grosso

Agosto de 2020

STEPHANE VASCONCELOS LEANDRO

**FIBRAS MUSCULARES E ESTRESSE OXIDATIVO DE PINTADO AMAZÔNICO
ALIMENTADO COM NÍVEIS DE PROTEÍNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus Universitário de Sinop, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Maicon Sbardella

Coorientadoras: Profa. Dra. Valéria Dornelles
Gindri Sinhorin

Profa. Dra. Paula Sueli Andrade Moreira

Sinop, Mato Grosso

Agosto de 2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

L437f Leandro, Stephane Vasconcelos.
FIBRAS MUSCULARES E ESTRESSE OXIDATIVO DE
PINTADO AMAZÔNICO ALIMENTADO COM NÍVEIS DE
PROTEÍNA / Stephane Vasconcelos Leandro. -- 2020
xiv, 55 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maicon Sbardella.

Co-orientadoras: Valéria Dornelles Grindi Sinhorin e Paula
Sueli Andrade Moreira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso,
Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, Sinop, 2020.

Inclui bibliografia.

1. hipertrofia muscular. 2. nutrição. 3. piscicultura. 4. radicais

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: FIBRAS MUSCULARES E ESTRESSE OXIDATIVO DE PINTADO AMAZÔNICO ALIMENTADO COM NÍVEIS DE PROTEÍNA

AUTOR (A): MESTRANDO (A) **STEPHANE VASCONCELOS LEANDRO**

Dissertação defendida e aprovada em 14/08/2020.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. Doutor(a) Maicon Sbardella (Presidente Banca /Orientador)
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
2. Doutor(a) Ana Paula Silva Ton (Examinador Interno)
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
3. Doutor(a) Janessa Sampaio de Abreu Ribeiro (Examinador Externo)
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
4. Doutor(a) Danilo Henrique Aguiar (Examinador Externo)
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
5. Doutor(a) Fabrizia Sayuri Otani (Examinador Externo)
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal do Oeste do Pará
6. Doutor(a) Anderson Corassa (Examinador Suplente)
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

SINOP, 14/08/2020.



Documento assinado eletronicamente por **MAICON SBARDELLA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 14/08/2020, às 18:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabrizia Sayuri Otani, Usuário Externo**, em 15/08/2020, às 10:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **DANILO HENRIQUE AGUIAR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 18/08/2020, às 09:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **JANESSA SAMPAIO DE ABREU RIBEIRO, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 19/08/2020, às 09:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ANA PAULA SILVA TON, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 08/09/2020, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2750115** e o código CRC **0DBC2715**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser meu guia e protetor.

Dedico a minha família, por me amarem incondicionalmente, acreditarem no meu potencial e por todo investimento para que meus sonhos se realizassem.

Meu pai Edimar Rodrigues Leandro e minha mãe Edinalva Vasconcelos Leandro, que sempre deram o melhor de si para que eu e meus irmãos pudessemos crescer como pessoas e profissionais.

Aos meus irmãos Rodrigo Vasconcelos Leandro e Tiago Vasconcelos Leandro, por estarem comigo nessa jornada, vocês são os irmãos mais parceiros desse mundo e o melhor presente que recebi. Obrigada por tudo!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as bênçãos e livramentos concedidos.

À minha família, por sempre ter apoiado as minhas decisões e estar ao meu lado em todos os momentos.

À Universidade Federal de Mato Grosso/Câmpus Universitário de Sinop, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, Dr. Maicon Sbardella, pela confiança e dedicação.

Às minhas coorientadoras, Dra. Paula Sueli Andrade Moreira e Dra. Valéria Dornelles Gindri Senhorin, pelas oportunidades, pelos ensinamentos e pelo carinho concedido até aqui.

À Embrapa Agrossilvipastoril, que na responsabilidade do pesquisador MSc. Daniel Ituassu, acolheu e cooperou com o desenvolvimento da pesquisa.

À doutoranda Soraia Andressa, orientada do professor Jayme Aparecido Povh, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pela oportunidade de trabalhar em equipe nessa pesquisa com o Pintado Amazônico.

Ao Laboratório de Bioquímica (CUS/UFMT), especialmente à Profa. Valéria Dornelles Gindri Senhorin, pela orientação e parceria na realização das análises bioquímicas deste trabalho. Agradeço também aos discentes de iniciação científica, Ana Júlia, João Maurício e Andriele, que me ajudaram imensamente nas análises e se tornaram meus amigos.

Ao Laboratório de Histologia (CUS/UFMT), especialmente ao Prof. Danilo Henrique Aguiar, por acolher e cooperar com a realização das análises histológicas deste trabalho. Também agradeço especialmente ao Prof. Danilo e sua esposa professora Clarianna Martins

Baicere Silva, pelo cuidado que tiveram sempre que precisei de apoio emocional e da palavra de Deus.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia (UFMT/CUS), pela paciência e ensinamentos.

À professora Fabrizia Sayuri Otani (Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA), por ser uma grande amiga/mãe incentivadora.

À minha grande amiga Joseane Pereira, que sempre foi como uma irmã para mim.

À dona Claudina Turra, que me tinha mais que uma “inquilina”, pessoa linda que me acolheu e me fez sentir parte de sua família. Eternas saudades.

Ao casal Mara Regina e Antonio Roberto, por estarem sempre de braços abertos a me acolher.

À psicóloga Adriana Barbalho, pelo seu trabalho incrível.

Aos amigos e colegas que fiz na sala de estudos da Pós-graduação nesses dois anos, Ruth, Paulo, Joseph, Jussane, Ivanildo e Wesley.

À todos meus amigos Nádia, Andressa, Ianny, Marlon, Monique, André, Rafael, Maria Aparecida, Bruna, Gleice que durante esse período tiveram a preocupação de saber como eu estava e sempre me deram palavras de apoio, saibam que o carinho de vocês foi e é indispensável.

À todos vocês, meu muito obrigado!

EPÍGRAFE

“Se deres um peixe a um homem faminto, vais alimentá-lo por um dia.

Se o ensinares a pescar, vais alimentá-lo toda a vida. ”

Lao Tsé

BIOGRAFIA

Stephane Vasconcelos Leandro nasceu em 11 de novembro de 1993, no município de Itaituba, estado do Pará. Filha de Edinalva Vasconcelos Leandro e Edimar Rodrigues Leandro.

No ano de 2012, ingressou na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), município de Santarém, estado do Pará, onde cursou cinco semestres de disciplinas interdisciplinares dentro do Instituto de Biodiversidade e Florestas e, então, optou pelo Bacharelado em Zootecnia. No ano de 2014, realizou Mobilidade Acadêmica para cursar 3 semestres no curso de Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Câmpus Universitário de Sinop (CUS), na cidade de Sinop, estado de Mato Grosso.

Em 2016, realizou transferência definitiva para o curso de graduação em Zootecnia da UFMT/CUS, obtendo o título de Bacharel em Zootecnia em 28 de fevereiro de 2018. Durante a graduação realizou estágios voltados para a produção animal, com foco na produção de peixes.

Em 2018, atuou como Docente/Instrutora na Escola de Ensino Técnico do Estado do Pará, pelo Programa Nacional de Acesso ao Ensino Técnico e Emprego (PRONATEC).

Em 2018 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, nível mestrado, da UFMT/CUS, na linha de pesquisa em Produção e Nutrição Animal, na área de Nutrição de Peixes, sob orientação do Prof. Dr. Maicon Sbardela e co-orientação das Profas. Dra. Valéria Dornelles Gindri Senhorin e Dra. Paula Sueli Andrade Moreira.

Em 2019, se tornou especialista em Piscicultura: Sanidade e Desenvolvimento Sustentável, pela Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Em agosto de 2020, apresentou sua dissertação para obtenção do título de Mestre em Zootecnia pela UFMT/CUS.

RESUMO

LEANDRO, Stephane Vasconcelos. Dissertação de Mestrado (Zootecnia), Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus Universitário de Sinop, agosto de 2020, xiv, 55 f. **FIBRAS MUSCULARES E ESTRESSE OXIDATIVO DE PINTADO AMAZÔNICO ALIMENTADO COM NÍVEIS DE PROTEÍNA**. Orientador: Prof. Dr. Maicon Sbardella. Coorientadoras: Prof. Dra. Valéria Dornelles Gindri Sinhorin e Prof. Dra. Paula Sueli Andrade Moreira.

Na piscicultura, a proteína tem sido o macronutriente de maior custo nas dietas em sistemas de cultivo. A nutrição de peixes é a área da fisiologia que estuda a relação entre a ingestão de nutrientes e o desenvolvimento e metabolismo do animal. A dinâmica do metabolismo proteico é influenciada pelas necessidades nutricionais do organismo e a quantidade de proteína e energia ingeridas da dieta. O Pintado Amazônico é um híbrido resultante do cruzamento entre *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus*, tendo sido utilizado em sistemas de cultivo por apresentar crescimento rápido, conversão alimentar eficiente, bom rendimento de carcaça e ausência de ossos intramusculares. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de níveis de proteína digestível na dieta sobre a dinâmica de crescimento de fibras musculares brancas e estresse oxidativo no músculo do Pintado Amazônico. Foram utilizados 455 juvenis de Pintado Amazônico alimentados com dietas contendo sete níveis de proteína digestível (225; 250; 275; 300; 325; 350; e 375 g kg⁻¹) durante 75 dias. Ao final do experimento, os peixes foram submetidos à jejum alimentar de 24 horas, anestesiados e eutanasiados para coleta de amostras musculares. Foram determinados os efeitos linear e quadráticos dos níveis de proteína digestível na dieta sobre as variáveis de histologia das fibras musculares e concentração de metabólitos e estresse oxidativo no músculo. Conclui-se que altos níveis de proteína digestível na dieta do Pintado Amazônico, apesar de aumentar a concentração de proteína e aminoácidos livres no músculo, limitam a hipertrofia muscular e aumentam a exposição do tecido ao dano oxidativo.

Palavras-chave: hipertrofia muscular; nutrição; piscicultura; radicais livres.

ABSTRACT

LEANDRO, Stephane Vasconcelos. Masters dissertation (Zootecnia), Federal University of Mato Grosso, University Campus of Sinop, August 2020, xiv, 55 p. **MUSCLE FIBERS AND OXIDATIVE STRESS OF PINTADO AMAZÔNICO FED WITH DIETARY LEVELS.** Adviser: Prof. Dr. Maicon Sbardella. Co-advisers: Profa. Dra. Valéria Dornelles Gindri Sinhorin and Profa. Dr. Paula Sueli Andrade Moreira.

In fish farming, protein has been the most expensive macronutrient in diets. Fish nutrition is the physiology area that studies the relationship between nutrient intake and animal development and metabolism. The dynamics of protein metabolism is influenced by body's nutrient needs and dietary protein and energy intake. The Pintado Amazônico is a crossbred hybrid of *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus*, that has been farmed due to its growth rate, feed conversion efficiency, carcass yield and absence of intramuscular bones. This study aimed to evaluate the effect of dietary digestible protein levels on the growth dynamics and oxidative stress in the white muscle of Pintado Amazônico. Four hundred and fifty-five juveniles of Pintado Amazônico were fed diets with seven different digestible protein levels (225; 250; 275; 300; 325; 350; or 375 g kg⁻¹) for 75 days. At the end of the experiment, the fishs were fasted for 24 hours, anesthetized and euthanized to sample white muscle. The linear and quadratic effects of dietary digestible protein levels on the muscle fibers histology and concentration of metabolites and oxidative stress were determined. The results revealed that high dietary levels of digestible protein, despite increasing protein and free amino acids concentrations in the muscle, limits muscle hypertrophy and increase tissue exposure to oxidative damage in Pintado Amazônico farming.

Keywords: muscle hypertrophy; nutrition; pisciculture; free radicals.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Redução tetravalente da molécula de O_2 . Formação de compostos intermediários, espécies reativas ao oxigênio (EROs), como $O_2^{\bullet-}$ (ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), $OH^{\bullet}$ (radical hidroxila)..... 11
- Figura 2.** Resumo esquemático do minissistema de antioxidação (SOD, GPx, GSH, GSSG, GR, GST) na desintoxicação e reparo das células 12
- Figura 3.** Sequência de reações da peroxidação lipídica e formação de Malondialdeído (MDA).. 14

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Imagem de corte transversal das fibras musculares obtida em microscópio com aumento de 20x. 32
- Figura 2.** Efeito dos níveis de proteína digestível na dieta sobre a área celular média das fibras da classe 5 ($1133,73 - 11777 \mu m^2$) do Pintado Amazônico..... 36
- Figura 3.** Efeito dos níveis de proteína digestível sobre os níveis de aminoácidos livres (A) e concentração de proteínas totais (B) no tecido muscular do Pintado Amazônico 40
- Figura 4.** Efeito dos níveis de proteína digestível sobre os níveis de glicogênio (A) e glicose (B) no tecido muscular do Pintado Amazônico 43
- Figura 5.** Efeito dos níveis de proteína digestível sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (A), e da atividade da GST (B) no músculo do Pintado Amazônico..... 48

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (na matéria seca)	30
Tabela 2. Efeito dos níveis de proteína digestível (PD) na dieta sobre as médias de área celular e do número de células musculares do Pintado Amazônico	37
Tabela 3. Efeito dos níveis de proteína digestível (PD) na dieta sobre a concentração de proteínas totais, aminoácidos livres e amônia no músculo branco do Pintado Amazônico	41
Tabela 4. Efeito dos níveis de proteína digestível (PD) sobre a concentração de Glicogênio, Glicose e Lactato no músculo do Pintado Amazônico	44
Tabela 5. Efeito dos níveis de proteína digestível (PD) sobre a concentração de SRATB e Proteínas Carboniladas no músculo do Pintado Amazônico	46
Tabela 6. Efeito dos níveis de proteína digestível (PD) sobre a concentração de SOD, GSH e GST no músculo do Pintado Amazônico	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
 CAPÍTULO I - ESTUDOS DE NUTRIÇÃO PARA PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS BRASILEIROS	
1. REVISÃO DE LITERATURA	5
1.1. Estudos com Peixes Nativos Brasileiros: o caso do Pintado Amazônico ...	5
1.2. Nutrição de peixes	7
1.3. Crescimento muscular	9
1.4. Produção de radicais livres no metabolismo e estresse oxidativo	10
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
 CAPÍTULO II - FIBRAS MUSCULARES E ESTRESSE OXIDATIVO DE PINTADO AMAZÔNICO ALIMENTADO COM NÍVEIS DE PROTEÍNA.	
Resumo.....	25
Abstract	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Animais, manejo e dietas experimentais	29
2.2. Coleta de material biológico.....	31
2.3. Morfometria de fibras musculares.....	31
2.4. Proteínas, aminoácidos livres e amônia no músculo	33
2.5. Glicogênio, glicose e lactato no músculo	33
2.6. Parâmetros de dano oxidativo no músculo	34
2.6.1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)	34
2.6.2. Carbonilação de Proteínas	34
2.6.3. Complexo antioxidante	34
2.7. Análise estatística	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
3.1. Dinâmica do desenvolvimento de fibras musculares	36
3.2. Proteínas, aminoácidos livres e amônia	39
3.3. Metabólitos no músculo	42
3.4. Estresse oxidativo no tecido muscular	44
4. CONCLUSÃO	49
5. AGRADECIMENTOS.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO GERAL

A demanda global de fontes proteicas de origem animal para alimentação humana tem demonstrado expectativa de crescimento linear até 2030 (Rabobank, 2017). Segundo a FAO (2020), a produção total de peixes deverá crescer de 179 milhões de toneladas em 2018 para 204 milhões de toneladas em 2030. Esta perspectiva se deve ao aumento da população e do poder aquisitivo em países em desenvolvimento, onde o consumo de proteínas de alto valor biológico fica abaixo das recomendações dos comitês de saúde.

Apesar do pescado ser a fonte de proteína animal mais consumida no mundo (20,5 kg/habitante/ano) (FAO, 2020), o consumo de peixes pelos brasileiros ainda é baixo (9 kg/habitante/ano) (PEIXE-BR, 2020). O reduzido consumo tem sido atribuído principalmente ao elevado preço da carne de peixe (Araújo et al., 2015; Soares e Belo, 2015), reflexo de uma cadeia produtiva pouco estruturada e com custo elevado comparativamente às cadeias das carnes bovina, suína e aves (FAO, 2020). Porém, por possuir uma imensa costa litorânea e vastas bacias hidrográficas, o Brasil assume papel relevante com grande potencial como fornecedor de pescado a custo competitivo para o mercado interno e de exportação.

Em 2018, a produção da piscicultura brasileira foi de 722.560 toneladas (PEIXE-BR, 2020). A bacia Amazônica possui grande potencial para a piscicultura devido à abundância de recursos hídricos, clima favorável e diversidade de espécies nativas com potencial para produção e comercialização (Vogel et al., 2019). Dentre as espécies mais cultivadas e consumidas na Amazônia destacam-se os pintados e bagres (IBGE, 2015).

Os principais produtores de peixes nativos de água doce do Brasil estão na região Norte, com destaque para os estados de Rondônia, Tocantins, Roraima, Amazonas, Acre e Pará, e na região Centro-Oeste, se destaca o estado de Mato Grosso de peixes, especialmente com a produção do Pintado Amazônico (PEIXE-BR, 2020). O híbrido Pintado Amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) tem recebido especial atenção para os sistemas de cultivo por apresentar crescimento rápido (Lemos et al., 2018), eficiente conversão alimentar, bom rendimento de carcaça e ausência de ossos intramusculares (Baldisserotto e Gomes 2010), além de apresentar carne saborosa e de elevado valor nutricional (Fantini et al., 2013).

Na piscicultura, mais de 50 % do custo de produção se deve a alimentação, sendo a fração proteica da dieta um dos gargalos econômicos do cultivo de peixes (Li et al., 2020). Nos peixes, a fração proteica da dieta tem papel importante no metabolismo energético, sendo o substrato prioritário para produção de energia, deposição proteica e, consequentemente, no crescimento de peixes (Silva et al., 2009). Compreender a dinâmica do crescimento muscular e do metabolismo de peixes torna-se fator determinante para definição das necessidades proteicas visando a maximização da deposição de tecido muscular e, desse modo na qualidade da carne de peixes em sistemas de cultivo resultando em menor custo de produção (Kiessling et al. 1991; Fauconneau et al. 1997; Johnston et al. 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de níveis de proteína digestível na dieta sobre a dinâmica do crescimento de fibras brancas e parâmetros de estresse oxidativo no músculo do Pintado Amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram objetivos específicos deste estudo:

- Estudar os efeitos da composição das dietas sobre o crescimento muscular e estresse oxidativo em peixes cultivados (Capítulo I).
- Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo e histologia de fibras musculares brancas do Pintado Amazônico submetido a dietas com níveis crescentes de proteína digestível (Capítulo II).

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ESTUDOS DE NUTRIÇÃO PARA PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS BRASILEIROS

Este capítulo foi redigido de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus Universitário de Sinop, para publicação de Dissertação de Mestrado

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Estudos com Peixes Nativos Brasileiros: o caso do Pintado Amazônico

Na década de 30, o pesquisador Dr. Rodolpho Theodor Wilhelm Gaspar Von Ihering, após se maravilhar com as espécies nativas brasileiras, começou a pensar na domesticação de algumas espécies de peixes. Em 1934, juntamente com seus colaboradores, obtiveram sucesso na reprodução induzida das espécies *Rhamdia sp.* (bagre) e *Loricaria sp.* (cascudo), coletados nas águas do Rio Tietê. No ano de 1935, continuou o trabalho realizando hipofisacões de espécies nativas dos rios não perenes do estado do Ceará, e da curimatã-pacu e do piau verdadeiro, espécies originárias do rio São Francisco introduzidas nos açudes do Nordeste. O pesquisador, que faleceu em 1939, desenvolveu diversas pesquisas e criou junto ao Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) e a Divisão de Caça e Pesca do Ministério da Agricultura, algumas estações onde foram realizados vários estudos.

Nas décadas de 50 e 60 que se seguiram, os trabalhos na área de piscicultura no Brasil estiveram quase que exclusivamente voltados à continuidade das pesquisas realizadas pela equipe de Ihering nos anos 30, nas Estações do DNOCS. Posteriormente, a Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo e a Divisão de Caça e Pesca do Ministério da Agricultura e Pesca, foram os primeiros órgãos governamentais a investir na piscicultura de água doce (Cyrino et al., 2004). Deste então, muitos estudos em nutrição utilizando espécies nativas como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Buzollo et al., 2019; Reis et al., 2019; Silva et al., 2020), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Bachetta et al., 2019; Khan et al., 2020), surubins como o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* e *P. fasciatum*) (Lundstedt et al., 2003; Arslan et al., 2008;

Bicudo et al, 2012), jundiás (*Rhamdia quelen*, *Rhamdia* sp. e *Rhamdia voulezi*) (Melo et al., 2012; Santos e Meurer, 2018; Gomes et al., 2019), o pirarucu (*Arapaima gigas*) (Pedrosa et al, 2019; Cipriano et al., 2016), entre outras espécies com potencial para a piscicultura têm sido realizados no Brasil.

O Pintado Amazônico, muito apreciado pelo sabor e valor nutritivo da sua carne, tem sido utilizado em sistemas de cultivo por apresentar crescimento rápido, conversão alimentar eficiente, bom rendimento de carcaça e ausência de ossos intramusculares (Fantini et al., 2013). O Pintado Amazônico é um híbrido resultante do cruzamento entre duas espécies nativas, uma piscívora com tendência onívora *Leiarius marmoratus* (Sánchez et al., 2009) e uma carnívora *Pseudoplatystoma reticulatum* (Lemos et al., 2018). Estudos com o Pintado Amazônico indicam características de hábitos alimentares e histologia do trato gastrointestinal condizentes a de peixes onívoros (Baldisserotto e Gomes, 2010; Campos, 2010). Entretanto, apesar da similaridade com peixes onívoros (se alimentam tanto de matéria vegetal como animal), não há evidências na literatura de que o uso de dietas com características onívoras, poderia afetar a dinâmica dos processos metabólicos e oxidativos e o desenvolvimento muscular nesta espécie mesmo que possam suportar taxas de crescimento similares.

Estudos anteriores foram realizados com esse híbrido avaliando a taxa de passagem gastrointestinal de alimentos (Marques et al., 2015), o efeito de níveis de carboidratos e lipídeos sobre a composição corporal e histologia hepática (Prieto-Guevara et al., 2015), parâmetros fisiológicos e qualidade da carne sob diferentes métodos de abate (Maciel et al., 2014; Cassol et al., 2015), o ganho compensatório quando submetidos à restrição alimentar (Cotrim et al., 2016), o comportamento alimentar e auto-seleção de fontes de proteínas (Fortes-Silva et al., 2017), o estresse oxidativo e parâmetros

histológicos e metabólicos quando submetidos aos efeitos de herbicida à base de glifosato (Moura et al., 2017ab), efeito de níveis de pH da água sobre o crescimento e bem-estar (Lemos et al., 2018) e o coeficiente de digestibilidade aparente de uma fonte energética (farelo de milho) e três fontes proteicas (farinha de sangue; concentrado proteico de soja – SPC e grãos secos de destilaria com solúveis – GSDS) (Marques et al., 2019). Vale ressaltar que os estudos de Cotrim et al. (2016) e Marques et al. (2015; 2019) foram realizados dentro do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso em Sinop, Mato Grosso.

Baseado no seu potencial econômico, há grandes oportunidades para se explorar com esse híbrido. A presente revisão de literatura tem intuito de compreender a interação de diferentes níveis de proteína digestível na dieta sobre o desenvolvimento desse animal, a fim de orientar a formulação e preparo de dietas para as cadeias produtivas que investem na produção desse exemplar.

1.2. Nutrição de peixes

A nutrição de peixes consiste na área da fisiologia que estuda a relação entre os nutrientes da dieta e o metabolismo e desenvolvimento do animal (Baldisserotto, 2009). O grande desafio na produção de peixes tem sido a formulação de dietas que atendam às necessidades nutricionais das espécies e, conseqüentemente, resultem em maior lucro ao produtor e sustentabilidade ambiental.

A proteína representa o maior custo em formulação de rações para peixes. Compostas por combinações de aminoácidos, as proteínas desempenham papel central na estrutura e metabolismo dos organismos vivos (Sakomura e Rostagno, 2016), atuando

como componente estrutural, biocatalisadoras, hormônios no controle do crescimento, reprodução e manutenção dos organismos (Furuya et al, 2010), bem como fonte de energia. Para que os animais estejam em crescimento, a síntese proteica deve exceder a sua degradação, resultando em acréscimo de proteínas nos tecidos corporais (Millward, 1989; NRC, 2011).

As proteínas ingeridas na dieta são hidrolisadas durante a digestão para liberação de aminoácidos livres e pequenos peptídeos, que são absorvidos no intestino. Posteriormente à absorção, os aminoácidos podem ser usados em diversas vias metabólicas, podendo ser direcionados para a síntese de proteínas corporais e como precursores de outras substâncias (Cowey e Walton, 1989; Kaushik e Seiliez, 2010), bem como no metabolismo energético com oxidação dos aminoácidos para produção de ATP. Dentre os fatores que causam oxidação de aminoácidos, o desequilíbrio entre o suprimento de aminoácidos e sua utilização para a síntese de proteínas e o status energético do organismo parecem ser determinantes (NRC, 2011).

Peixes requerem níveis mais altos de proteínas na dieta comparado a outros vertebrados terrestres de produção/criação (Bowen, 1987; Kaushik e Seiliez, 2010). A proteína consumida pelo peixe é utilizada para a produção de energia para manutenção (catabolismo), e para a síntese de proteínas do corpo (anabolismo) (Carter, 2001). Do ponto de vista fisiológico, a utilização de proteínas como energia para peixes é interessante, já que no ambiente natural a disponibilidade de proteína em relação a carboidratos é maior, mas pensando em produção é mais viável economicamente destinar proteína para o crescimento muscular, e fazer uso de macronutrientes mais baratos como carboidratos e lipídeos para suprir a demanda energética (Hepher et al., 1989; Ellis and Reigh, 1996).

1.3. Crescimento muscular

A proporção de tecido muscular em relação a massa corporal em peixes é maior que em outros vertebrados (Santos, 2007). Em peixes, o tecido muscular representa de 30 a 80% do peso vivo, sendo constituído de unidades dispostas em série chamadas de miótomos (Weatherley e Gill, 1987; Zimmerman e Lowery, 1999).

Os teleósteos são peixes ósseos caracterizados por serem um dos grupos mais diversificados de vertebrados, apresentam ao longo da vida mudanças marcantes na estrutura e função do miótomo associadas ao aumento da massa corporal. O músculo desses animais possui uma conformação complexa, composta por fibras musculares multinucleadas, células miogênicas precursoras, nervos, tecido conjuntivo, fibroblastos, osteócitos esqueléticos, adipócitos e células capilares endoteliais (Johnston et al., 2011). Diferentemente de mamíferos onde o crescimento dos músculos pós-natal ocorre por hipertrofia dos miotubos (Johansen e Overturf, 2005), em peixes o crescimento pode ocorrer pelo aumento do número de fibras (hiperplasia), decorrente da proliferação de células miosatélites, e aumento do tamanho das fibras existentes (hipertrofia), perdurando esta dinâmica a vida toda do animal (Jonhston, 1982).

Os músculos dos peixes são extremamente plásticos e adaptáveis, contendo dois tipos principais de fibras agrupadas em músculo vermelho subdérmico, com metabolismo oxidativo e contração lenta, e músculo branco profundo, com metabolismo glicolítico e de contração rápida (Johnston et al., 1975, 1977). Segundo Zimmerman e Lowery (1999), o aumento do corpo dos peixes é resultado do crescimento das fibras musculares brancas já que essas podem compreender até mais de 90% do volume total do tecido muscular em peixes. Durante a vida desses animais, pode ocorrer uma gama de alterações adaptativas do sistema muscular, como a alteração da distribuição das fibras.

Em peixes, a desnutrição ou restrição de nutrientes pode resultar em atrofia muscular, destacando que o estado nutricional tem papel importante na regulação da massa muscular (Pezzato et al., 2001; Jagoe et al., 2002). Carboidratos e lipídios tem forte influência no metabolismo energético de peixes, atuando como combustíveis metabólicos (Moyes e West, 1995).

Segundo Baldisserotto (2013), há estreita relação entre a taxa de crescimento e o gasto energético em peixes, e que esse gasto é maior quando há maior taxa de crescimento, o que é destinado para a síntese de proteínas. Proporções crescentes de carboidratos podem fornecer energia suficiente para a manutenção energética desses animais e, assim, proteínas são poupadas para serem utilizadas na formação de tecido muscular (Houlihan et al., 1995; Magnoni et al., 2013).

Dietas com alta proporção de carboidratos em relação a proteínas tendem a aumentar a capacidade de utilização de glicose no músculo e melhorar a deposição de proteína muscular. Porém, o excesso ou desequilíbrio entre energia e proteína pode causar deposição de gordura visceral (Felip et al., 2012; Lundstedt et al., 2003).

1.4. Produção de radicais livres no metabolismo e estresse oxidativo

Nas décadas de 70 e 80, iniciaram-se os primeiros estudos realizados sobre as espécies reativas de oxigênio (EROs), das quais a maioria são radicais livres (Dillard et al., 1978; Davies et al., 1982; Jones et al., 1984). Portanto, radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica e são altamente reativos. Considerando as EROs, este elétron desemparelhado está centrado no átomo de oxigênio (Figura 1) (Halliwell, 1994). Em 1990, pesquisas

começaram a entender o papel das EROs como sinalizadores e reguladores das funções celulares (Sies, 1993; Jones et al., 1995).

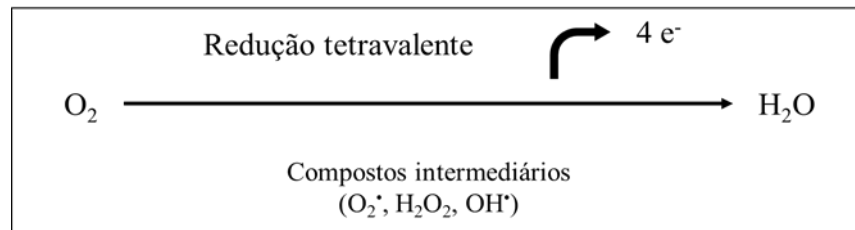


Figura 1. Redução tetraivalente da molécula de O_2 . Formação de compostos intermediários, espécies reativas ao oxigênio (EROs), como $O_2^{\bullet -}$ (ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), $OH^{\bullet}$ (radical hidroxila). (Fonte: Franco, 2007).

Espécies reativas de oxigênio são geradas constantemente nos organismos vivos aeróbicos em condições normais ou estressantes (Jiménez et al., 2012). Esses compostos causam danos aos tecidos e, por esta razão, sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos entram em ação para limitar a propagação desses danos (Jiménez et al., 2009).

Entre as enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion superóxido para oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Fridovich, 1995); a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) decompõem o peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água (Halliwell e Gutteridge, 2007); e a glutathiona redutase catalisa a redução da forma oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH) (Muñoz et al., 2000). A função da catalase, das peroxidases e da superóxido dismutase consistem em proteger o tecido animal contra os efeitos tóxicos do H_2O_2 formado durante o metabolismo celular (Araújo, 2008).

Entre os antioxidantes enzimáticos podemos ainda destacar as Glutathione-S-transferases (GSTs), que são uma superfamília de proteínas multifuncionais que catalisam a conjugação de glutathione reduzida a uma ampla gama de substratos, resultando na desintoxicação celular de variedade de substâncias exógenas e compostos endógenos. Eles também funcionam como proteínas de transporte (Frova, 2006). Juntos a SOD, GST, GR e GSH integram um sistema de defesa enzimático ao organismo contra as EROs (Figura 2) (Yan et al., 2008).

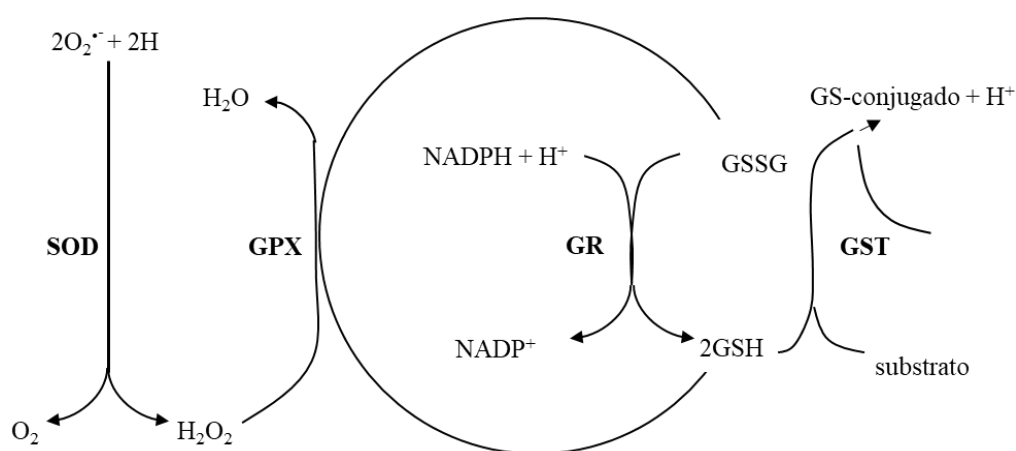


Figura 2. Resumo esquemático do minissistema de antioxição, desintoxicação e reparo.

Dois ânions superóxido ($O_2^{\bullet -}$) são reduzidos por SOD para formar oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), então o H_2O_2 é reduzido por GPx pela oxidação de duas moléculas de glutathione (GSH), formando dissulfeto de glutathione (GSSG) que posteriormente pode ser reduzido por GR sob consumo de NADPH. A GST catalisa a conjugação da glutathione com outras biomoléculas. Adaptado de Yan et al. (2008).

Quando a produção de EROs torna-se elevada a ponto de superar a capacidade de ação de antioxidantes, diversas biomoléculas dos tecidos corporais como lipídeos,

proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) são oxidados, gerando metabólitos que causam efeitos negativos à estrutura celular (Marnett, 2000; Stadtman e Levine, 2000; Halliwell, 2000).

O malondialdeído (MDA) é um metabólito gerado na peroxidação lipídica e um dos marcadores de dano lipídico, pois quando interage com o ácido tiobarbitúrico (ATB) forma um aducto conhecido por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (Figura 3) (Halliwell e Whiteman, 2004; Roberts e Morrow, 2002), enquanto as proteínas carboniladas são resultado da ação das EROs sobre as cadeias laterais dos aminoácidos presentes nas proteínas (Behrend et al., 2003; Mayne, 2003). Assim, o acúmulo de todos esses metabólitos levam a alterações bioquímicas e fisiológicas no organismo. Portanto, a composição e a utilização dos nutrientes da dieta refletem na concentração de metabólitos no músculo, o que poderá alterar o perfil metabólico (Lundstedt et al., 2003).

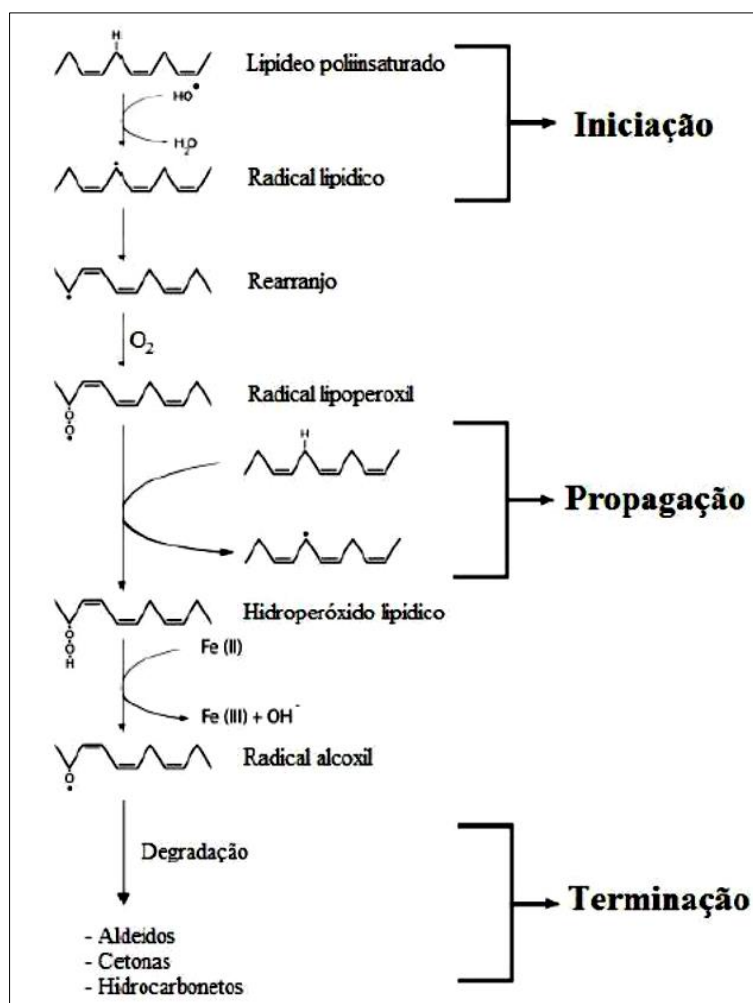


Figura 3. Sequência de reações da peroxidação lipídica. O radical hidroxil abstrai um hidrogênio e um elétron ($\text{H}^\bullet$) de um ácido graxo poliinsaturado (LH) ao reagir com os fosfolípidos das membranas celulares (fase de iniciação). A abstração do $\text{H}^\bullet$ leva a formação de H_2O e de um radical lipídico ($\text{L}^\bullet$), que sofre um rearranjo formando um dieno conjugado que ao reagir com oxigênio presente no meio, produz o radical lipoperoxil ($\text{LOO}^\bullet$) (fase de propagação). O $\text{LOO}^\bullet$ pode reagir com outro ácido graxo presente na membrana celular e abstrai um hidrogênio, produzindo hidroperóxido lipídico (LOOH) e um $\text{L}^\bullet$. A fase de terminação pode ocorrer por meio da decomposição de LOOH , $\text{LO}^\bullet$ e $\text{LOO}^\bullet$, formando aldeídos, como MDA (Malonildialdeído), cetonas e outros hidrocarbonetos (Mattos, 2009)

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O conhecimento sobre o mecanismo envolvido na relação entre a formulação da dieta e seus constituintes, o sistema oxidativo, a atividade metabólica e o desenvolvimento muscular tem sido um desafio importante para a compreensão da fisiologia de peixes e, conseqüentemente, elaboração de estratégias nutricionais e de manejo para sistemas intensivos de cultivo.

Diversos estudos com espécies nativas brasileiras e seus híbridos tem avaliado como a dieta pode influenciar o perfil metabólico e o crescimento muscular, e essa é a primeira vez que um estudo propõe avaliar a influencia da proteína digestível sobre a dinâmica de fibras musculares e perfil metabólito no músculo de um híbrido bastante apreciado na região Centro-Oeste que é o Pintado Amazônico. Além disso esse estudo abre um leque de oportunidades para novos pesquisadores avaliarem como nutrientes em dietas para esse híbrido podem afetar não somente o crescimento e perfil metabólico muscular como as respostas enzimáticas do trato digestivo desses peixes.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUÁRIO BRASILEIRO DA PISCICULTURA PEIXE BR 2020. Disponível em: <http://cerradoeditora.com.br/cerrado/wpcontent/uploads/2020/02/AnuarioPeixeBR2020.pdf>. Acesso Ago. 05, 2020.
- ARAUJO, J.M.A. 2008. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 4ª Edição- Viçosa, MG: Editora UFV, 596 p. ISBN 978-85-7269-351-6.
- ARAÚJO, D.M.; LINS, J.L.F.; TAVARES, A.S.; et al. 2015. **Aspectos de Aquisição e Consumo de peixes na Feira Livre de Porto Real do Colégio – Alagoas**. Boletim Instituto de Pesca, São Paulo, 41(4): 961 – 973.
- ARSLAN, M.; RINCHARD, J.; DABROWSKI, K. et al. 2008. **Effects of Different Dietary Lipid Sources on the Survival, Growth, and Fatty Acid Composition of South American Catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum*, Surubim, Juveniles**. Journal of the World Aquaculture Society, 39(1). February, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00133.x>

- BACCHETTA, C.; ROSSI, A.S.; CIAN, R.E.; et al. 2019. **Dietary β -carotene improves growth performance and antioxidant status of juvenile *Piaractus mesopotamicus*.** Aquaculture Nutrition. 2019;25:761–769. DOI: 10.1111/anu.12893
- BALDISSEROTTO, B. 2009. **Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura.** 2.ed. Santa Maria, Editora UFSM, 352p.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. 2010. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** 2.ed. Santa Maria, Ed UFSM.
- BALDISSEROTTO, B. 2013. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.** 3.ed. - Santa Maria: Editora da UFSM, 352p.: il. ISBN: 978.85-7391-198-5.
- BEHREND, L.; HENDERSON, G. and ZWACKA, R.M. 2003. **Reactive Oxygen Species In: Oncogenic Transformation.** Biochemical Society Transactions. Dec;31(Pt 6):1441-4. doi: 10.1042/bst0311441.
- BICUDO, A.J.A.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K.; et al. 2012. **Performance of juveniles of *Pseudoplatystoma fasciatum* fed graded levels of corn gluten meal.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v. 47(6):838-845, jun. 2012. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/63083/1/7411.pdf>
- BOWEN, S. H. 1987. **Dietary Protein Requirements of Fishes – A Reassessment.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 44(11):1995-2001. DOI: 10.1139/f87-244
- BUZOLLO, H.; SANDRE, L.C.G.; NEIRA, L.M.; et al. 2019. **Digestible protein requirements and muscle growth in juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*).** Aquaculture Nutrition. 25:669–679. DOI: 10.1111/anu.12888
- CAMPOS, J.L. 2010. **O cultivo do Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix & Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus Híbridos.** In: Espécies nativas para piscicultura no Brasil – Bernardo Baldisserotto e Levy de Carvalho Gomes (org) – 2 ed. rev. e ampl. – Santa Maria: Ed da UFSM.
- CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F.; KIESSLING, A.; et al. 2001. **Physiological effects of feeding.** In: Houlihan, D. F.; Boujard, T.; Joubling, M. (eds). Food intake in fish. Blackwell Science. Pp. 297-331.
- CASSOL, L.A.; MARTINS, M.A. and MACIEL, E.C.S. 2015. **Evaluation of Quality Parameters in the Meat of Pintado Amazônico, Female *Pseudoplatystoma fasciatum* × Male *Leiarius marmoratus*, Subjected to Different Slaughter Methods.** Journal of the world aquaculture society. Vol. 46, No. 5 October, 2015. doi: 10.1111/jwas.12212
- CIPRIANO, F.S.; LIMA, K.S.; SOUZA, R.H.B.; et al. 2016. **Digestibility of animal and vegetable protein ingredients by pirarucu juveniles, *Arapaima gigas*.** Revista Brasileira de Zootecnia, 45(10):581-586, © 2016 Sociedade Brasileira de Zootecnia. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-92902016001000001>
- COTRIM, T.S.; FORNARI, D.C.; ARAÚJO, C.V.; et al. 2016. **The compensatory**

- growth of skeletal muscle cells in Amazonian catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* female x *Leiarius marmoratus* male).** Scientific Electronic Archives Issue ID: Sci. Elec. Arch. 9:2 (2016). <http://dx.doi.org/10.36560/922016239>.
- COWEY, C.B.; WALTON, M.J. 1989. **Intermediary metabolism.** Pp. 259-329 in Fish Nutrition, Second Edition, J. E. Halver, ed. New York: Academic Press.
- CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M. et al. 2004. **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva.** Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. - São Paulo: TecArt.
- DAVIES, K.J.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; et al. 1982. **Free radicals and tissue damage produced by exercise.** Biochemical and Biophysical Research Communications. Volume 107, Issue 4, 31 August 1982, Pages 1198-1205. DOI: 10.1016 / S0006-291X (82) 80124-1
- DILLARD, C.J.; LITOV, R.E.; SAVIN, W.M.; et al. 1978. **Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation.** Journal Applied Physiology 45:927–932. <https://doi.org/10.1152/jappl.1978.45.6.927>
- ELLIS, S.C. and REIGH, R.C. 1996. **Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*).** Aquaculture, 97:383-394. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90330-A](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90330-A)
- FANTINI, L.E.; RODRIGUES, R.A.; NUNES, A.L.; et al. 2013. **In come from carcass of surubins *Pseudoplatystoma* spp. Produced in network tank and nursery.** Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal 14:538-545. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402013000300019>
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020.** Sustainability in action. Rome, 224 pp. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- FAUCONNEAU, B.; ANDRE, S.; CHMAITILLY, J.; et al. 1997. **Control of skeletal muscle fibers and adipose cells size in the flesh of rainbow trout.** Journal of Fish Biology 50:296–314. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01360.x>
- FELIP, O.; IBARZ, A.; FERNANDEZ-BORRAS, J.; et al. 2012. **Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes ([¹³C] starch and [¹⁵N] protein): effects of gelatinisation of starches and sustained swimming.** British Journal of Nutrition 107:834–844. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114511003709>
- FORTES-SILVA, R.; COSTA, L.S.; PAULINO, R.R.; et al. 2017. **Hybrid fish model (*Pseudoplatystoma reticulatum* ♀ 3 *Leiarius marmoratus* ♂) to study feeding behaviour: protein source self-selection and demand-feeding rhythms.** Aquaculture Research, 48:3705–3718. doi:10.1111/are.13196.
- FRANCO, L.D.P. 2007. **Dieta hiperlipídica e exercício físico: consequências sobre o metabolismo e a peroxidação lipídica - estudo em modelo animal.** [Dissertação Mestrado] Universidade Estadual Paulista

- FRIDOVICH, I. 1995. **Superoxide radical and superoxide dismutases**. Annu Rev Biochem. 1995; 64:97-112. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.
- FROVA, C. 2006. **Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives**. Biomolecular Engineering 23(4): 149-169, September 2006, . <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.020>
- FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; et al. 2010. **Tabelas Brasileiras para a Nutrição de Tilápias**. – Toledo: GFM, 100p.
- GOMES, R.L.M.; MORO, E.B.; SOSA, B.S.; et al. 2019. **SOURCES OF LIPIDS IN DIETS FOR SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) JUVENILES**. BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA 2019, 45(2): e.465. ISSN 1678-2305 online version. DOI: 10.20950/1678-2305.2019.45.2.465
- HALLIWELL, B. 1994. **Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence**. The Lancet Volume 344, Issue 8924, 10 de setembro de 1994, páginas 721-724. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92211-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92211-X)
- HALLIWELL, B. 2000. **Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come?** The American Journal of Clinical Nutrition , 72(5): 1082–1087, November 2000, <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.5.1082>
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. 2004. **Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?** British Journal of Pharmacology. 142(2):231-255. Published online 2004 May 20. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 2007. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press.
- HEPHER, B.; SHILO, M. and SARIG, S. 1989. **Principles of Fish Nutrition. In: Fish culture in warm water systems: problems and trends**. Boca Raton: CRC, 121-141.
- HOCHACHKA, P.W.; GUPPY, M.; GUDERLY, H.E.; STOREY, K.B. and HULBERT, W.C. Metabolic biochemistry of water-vs air breathing fishes: muscles enzymes and ultrastructure. Can. J. zool. 56:736-750, 1978.
- HOULIHAN, D.F.; CARTER, C.G. and MCCARTHY, I.D. 1995. **Protein synthesis in fish**. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Volume 4, 1995, Pages 191-220. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80011-1](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80011-1)
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2015. **Município, Sinop Mato Grosso, Brasil**. Disponível em: < <http://cidades.ibge.gov.br/painel/historico.php?codmun=510790> > Acesso em: Set. 21. 2019.
- JAGOE, R.T.; LECKER, S.H.; GOMES, M. et al. 2002. **Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation**. FASEB J 16: 1697–1712. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0312com>

- JIMÉNEZ, A.P.; HIDALGO, M. C.; MORALES, A. E.; et al. 2009. **Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in *Dentex dentex* fed on different dietary macronutrient levels.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 150, 537–545.
- JIMÉNEZ, A.P.; PERES, H.; RUBIO, V.C. et al. 2012. **The effect of dietary methionine and white tea on oxidative status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*).** The British Journal of Nutrition 108 (7): 1202-9 · julho de 2012. DOI: 10.1017 / S0007114511006556
- JOHANSEN, K.A and OVERTURE, K. 2005. **Quantitative Expression Analysis of Genes Affecting Muscle Growth During Development of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).** USDA-ARS, Hagerman Fish Culture Experiment Station, 3059F National Fish Hatchery Rd., Hagerman, ID 83332, USA. Marine biotechnology (New York, N.Y.).
- JOHNSTON, I.A.; WARD, P.S. and GOLDSPINK, G. 1975. **Studies on the swimming musculature of the rainbow trout I Fiber types.** J Fish Biol 7:451–458. doi:10.1111/j.1095-8649.1975.tb04620.x
- JOHNSTON, I.A.; DAVISON, W. and GOLDSPINK, G. 1977. **Energy metabolism of carp swimming muscles.** Journal of Comparative Physiology B 114 (2): 203-216. DOI: 10.1007 / BF00688970
- JOHNSTON, I.A. 1982. **Physiology of muscle in hatchery raised fish.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry Volume 73, Issue 1, 1982, páginas 105-124.
- JOHNSTON, I.A.; MANTHRI, S. e ALDERSON, R. 2002. **Effects of dietary protein level on muscle cellularity and flesh quality in Atlantic salmon with particular reference to gaping.** Aquaculture 210:259–283. doi:10.1016/S0044-8486(01)00862-6
- JOHNSTON, I.A.; BOWER, N.I. and MACQUEEN, D.J. 2011. REVIEW. **Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish.** The Journal of Experimental Biology 214, 1617-1628 © 2011. Published by The Company of Biologists Ltd doi:10.1242/jeb.038620.
- JONES, D.A.; JACKSON, M.J.; MCPHAIL, G. et al. 1984. **Experimental mouse muscle damage: the importance of external calcium.** Clinical Science (London, England: 1979), 29 Feb 1984, 66(3):317-322 DOI: 10.1042/cs0660317
- JONES, D.P.; KAGAN, V.E.; AUST, S.D.; et al. 1995. **Impact of nutrients on cellular lipid peroxidation and antioxidant defense system.** Fundamental and Applied Toxicology Volume 26, Issue 1, June 1995, Pages 1-7. <https://doi.org/10.1006/faat.1995.1069>
- KAUSHIK, S. J.; SEILIEZ, I. 2010. **Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish.** Aquaculture Research. 41:322-332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02174.x>

- KHAN, K.U.; GOUS, R.M.; SAKOMURA, N.K.; et al. 2020. **Modeling optimum levels of balanced digestible protein for adult pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and the development of an economic optimization procedure for different marketing strategies of the final yield.** *Aquaculture* 526 (2020) 735368. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735368>.
- KIESSLING, A.; STOREBAKKEN, T.; ASGARD, T.. et al. 1991. **Changes in the structure and function of the epaxial muscle of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age I-growth dynamics.** *Aquaculture* 93:335–356. doi:10.1016/0044-8486(91) 90225-V
- LEMOS, C.H.P.; CHUNG, S.; RIBEIRO, C.V.M. et al. 2018. **Growth and biochemical variables in Amazon catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum*♀ x *Leiarius marmoratus*♂) under different water pH.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2018) 90(4): 3573-3581 (Annals of the Brazilian Academy of Sciences) Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690. <https://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820180241>
- LI, X.; ZHENG, S. and WU, G. 2020. **Nutrition and metabolism of glutamate and glutamine in fish.** © Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2020. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02851-2>
- LUNDSTEDT, L.M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G. 2003. **Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 137, 331–339. doi:10.1016/j.cbpc.2003.12.003.
- MACIEL, E. C.S.; ALMEIDA FILHO, E. S.; BERTOLINI, W.; et al. 2014. **Evaluation of the Effects of Different Stunning Methods on the Stress Responses and Meat Quality of the Amazon hybrid surubim, *Pseudoplatystoma fasciatum* female × *Leiarius marmoratus* male.** *JOURNAL OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY*. Vol. 45, No. 1. February, 2014. doi: 10.1111/jwas.12095
- MAGNONI, L.J.; CRESPO, D.; IBARZ, A.; et al. 2013. **Effects of sustained swimming on the red and white muscle transcriptome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a carbohydrate-rich diet.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* Volume 166, Issue 3, November 2013, Pages 510-521 November 2013, Pages 510-521. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.08.005>
- MARNETT, L. J. 2000. **Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis.** 2000 Mar;21(3):361-70. doi: 10.1093/carcin/21.3.361.
- MARQUES, S. A. D.; FORNARI, D. C.; TON, A. P. S. 2015. **Determinação de tempo da taxa de passagem gastrointestinal de alimentos para o pintado amazônico.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA ZOOTEK 2015. DIMENSÕES TECNOLÓGICAS E SOCIAIS DA ZOOTECNIA, 25., 2015., Fortaleza. Anais... Fortaleza: SBZ, 2015. Disponível em: <<http://sis.gninus.com.br/uploads/zootec2015/documentos/c3110e3573e9f0a95b95de9f97491f58dec2cb2.pdf>>. Acesso em: 06 ago. 2020.

- MARQUES, S.A.D.; ZAMBAN, K.; FORNARI, D.C.; et al. 2019. **Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de pintado amazônico.** Capítulo 4, pag 380-386. Embrapa Agrossilvipastoril: primeiras contribuições para o desenvolvimento de uma Agropecuária Sustentável / Austeclínio Lopes de Farias Neto... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa, 2019. PDF (825 p.): il. color.; 21cm ISBN: 978-85-7035-905-6
- MATTOS, T.C.G. 2009. **Mecanismo da ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro.** Dissertação de mestrado em Química, UnB, Brasil.
- MAYNE, S.T. 2003. **Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research.** The Journal of Nutrition. 2003 Mar;133 Suppl 3:933S-940S. doi: 10.1093/jn/133.3.933S.
- MELO, J.F.B.; LUNDSTEDT, L.M.; MORAES, G. et al. 2012. **Effect of different concentrations of protein on the digestive system of juvenile silver catfish.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia Print version ISSN 0102-0935. vol.64 no.2 Belo Horizonte Apr. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000200027>
- MILLWARD, D.J. 1989. **The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover.** Aquaculture 79:1-28. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90441-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90441-9)
- MOURA, F.R.; LIMA, R.R.S.; CUNHA, A.P.S.; et al. 2017a. **Effects of glyphosate-based herbicide on pintado da Amazônia: Hematology, histological aspects, metabolic parameters and genotoxic potential.** Environmental Toxicology and Pharmacology 56 (2017) 241–248. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.019>.
- MOURA, F.R.; BRENTAGANI, K.R.; GEMELI, A.; et al. 2017b. **Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®.** Chemosphere 185 (2017) 445 e 451. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.030>.
- MOYES, C.D and WEST, T.G. 1995. **Exercise metabolism of fish.** In: Hochachka, P. W.; Mommsen, T. P. (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Volume 4, 1995, páginas 367-392. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80019-6](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80019-6)
- MUÑOZ, M.R.; CEDEÑO, J.; RODRÍGUEZ, W.P.; et al. 2000. **Measurement of reactive oxygen intermediate production in hemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*.** Aquaculture Volume 191, Issues 1–3, 20 November 2000, Pages 89-107. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00420-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00420-8)
- NRC – NATIONAL RESEACH COUNCIL. 2011. **Nutrient requeriments of fish and shrimp.** Washington, DC: National Academic Press.
- PEDROSA, R.U.; MATTOS, B.O.; PEREIRA, D.S.Pet al. 2019. **Effects of feeding strategies on growth, biochemical parameters and waste excretion of juvenile arapaima (*Arapaima gigas*) raised in recirculating aquaculture systems (RAS).** Aquaculture 500 (2019) 562–568. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.058>
- PEZZATO, L.E.; CASTAGNOLLI, N. and ROSSI, F. 2001. **Nutrição e Alimentação**

- de Peixes. aqu. ed. Viçosa-MG: CPT, 2001. v. 1. 72p.
- PRIETO-GUEVARA, M.J.; SILVA, R.F.; COSTA, L.S.; et al. 2015. **Effect of fixed feeding time on growth, body composition, and hepatic histology of hybrid catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) fed with carbohydrates and lipids ratios.** Revista Colombiana de Ciencias da Pecuária 28:83-92. Versão impressa ISSN 0120-06902015
- RABOBANK, 2017. **Global demand for animal protein 2015-2035.** Disponible: <http://www.lf.dk/~media/lf/for-medlemmer/sektioner-og-udvalg/erhvervsfjerkraesektionen/kongres-2017/1--nan-dirk-mulder.pdf?la=da>. Acess sep 13, 2019.
- RHEE, S. G. 1999. **Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger.** Exp. Mol. Med. 31 (2), 53–59. <http://dx.doi.org/10.1038/emm.1999.9>. (PubMed PMID: 10410302).
- REIS, Y.S.; LEITE, J.L.R.; ALMEIDA, C.A.L.; et al. 2019. **New insights into tambaqui (*Colossoma macropomum*) feeding behavior and digestive physiology by the self-feeding approach: effects on growth, dial patterns of food digestibility, amylase activity and gastrointestinal transit time.** Aquaculture 498 (2019) 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.054>
- ROBERTS, L.J. and MORROW, J.D. 2002. **Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation.** Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 59(5):808-20 · June 2002. DOI: 10.1007/s00018-002-8469-8 ·
- SAKOMURA, N.K. and ROSTAGNO, H.S. 2016. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos.** -- 2. ed. --Jaboticabal: Funep, 262 p.:il.,retrs. ISBN: 978-85-7805-154-9.
- SÁNCHEZ, J.A.M.; MOYETONES, F. and CERDÁ, M.J. 2009. **Influencia del contenido proteico en el crecimiento de alevines de bagre yaque, *Leiarius marmoratus*, alimentados con concentrados comerciales.** Zootecnia tropical: Maracay. Venezuela. v.27, n.02. versão impressa ISSN 0798-7269
- SANTOS, V.B. 2007. **Aspectos morfológicos da musculatura lateral dos peixes.** B. Inst. Pesca, São Paulo, 33(1): 127 – 135.
- SANTOS, H.K. and MEURER, F. 2018. **Nutrition and Feeding Aspects for Jundia (*Rhamdia quelen*).** Nutrition and Feeding. Reviews in Aquaculture (2020) 12, 299–309. <https://doi.org/10.1111/raq.12318>
- SEBRAE – SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. 2015. **Aquicultura no Brasil.** (Série Estudos Mercadológicos). Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf)> Acesso em: Abr. 17. 2020.
- SIES, H. 1993. **Review Strategies of antioxidant defense.** Springer, Berlin, Heidelberg.

https://doi.org/10.1007/978-3-642-78757-7_9

- SILVA, P.; VALENTE, L.M.P.; GALANTE, M.H.; et al. 2009. **Dietary protein content influences both growth and size distribution of anterior and posterior muscle fibres in juveniles of *Pagellus bogaraveo* (Brunnich).** J Muscle Res Cell Motil (2009) 30:29–39. © Springer Science+Business Media B.V. DOI 10.1007/s10974-009-9167-z
- SILVA, R.S.; LOPES, J.R.T.; SANTO, R.V.E.; et al. 2020. **Palm kernel meal (*Elaeis guineensis*) as a substitute for corn (*Zea mays*) in diets of Tambaqui (*Colossoma macropomum*).** Aquaculture Research. 2020;51:3358–3366. DOI: 10.1111/are.14671
- SOARES, L. and BELO, M.A.A. 2015. **CONSUMO DE PESCADO NO MUNICÍPIO DE PORTO VELHO-RO.** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p.3059.
- STADTMAN, ER and LEVINE, L. 2000. **Protein oxidation.** Ann N Y Acad Sci. 2000; 899:191-208. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x.
- VOGEL, E.; DECIAN, M.; SILVA, M.C.; et al. 2019. **Production of exotic fish and Brazilian hybrids in similar conditions: Are there considerable differences of environmental performance?** Aquaculture 513 (2019) 734422. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734422>
- WEATHERLEY, A. and GILL, H. 1987. **Biology of fish growth.** San Diego, CA: Academic Press.
- YAN, F.; YANG, W.; LI, X.; et al. 2008. **A trifunctional enzyme with glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Jun;1780(6):869-72. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.03.003.
- ZIMMERMAN, A.M. and LOWERY, M.S. 1999. **Hyperplastic Development and Hypertrophic Growth of Muscle Fibers in the White Seabass (*Atractoscion nobilis*).** Journal of Experimental Zoology 284:299–308. DOI: 10.1002 / (sici) 1097-010x (19990801) 284: 3 <299:: aid-jez7> 3.0.co; 2-6

CAPÍTULO II

ARTIGO DE PESQUISA

FIBRAS MUSCULARES E ESTRESSE OXIDATIVO DE PINTADO AMAZÔNICO ALIMENTADO COM NÍVEIS DE PROTEÍNA

Este capítulo foi redigido de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia para a submissão de artigo de pesquisa
(<https://www.scielo.br/revistas/rbz/iinstruc.htm>)

FIBRAS MUSCULARES E ESTRESSE OXIDATIVO DE PINTADO AMAZÔNICO ALIMENTADO COM NÍVEIS DE PROTEÍNA

Stephane Vasconcelos Leandro⁽¹⁾, Valéria Dornelles Gindri Sinhorin⁽²⁾, Danilo Henrique Aguiar⁽³⁾, Paula Sueli Andrade Moreira⁽⁴⁾, Soraia Andressa Dall' Agnol Marques⁽⁵⁾, Daniel Rabello Ituassú⁽⁶⁾, Ana Paula Silva Ton⁽⁷⁾, Anderson Corassa⁽⁸⁾, e Maicon Sbardella⁽⁷⁾

(1, 2, 3, 4, 7, 8 e 9) Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus Universitário de Sinop, Av. Alexandre Ferronato, nº1200 CEP: 78557-267 Sinop, MT, Brasil. ⁽¹⁾email: svl.zootecnista@gmail.com, ⁽²⁾email: valeriadgindri@gmail.com, ⁽³⁾email: dha.danilo@gmail.com, ⁽⁴⁾email: paula_moreira@ufmt.br, ⁽⁷⁾email: anatonn4@hotmail.com, ⁽⁸⁾email: corassa.ufmt@gmail.com, ⁽⁹⁾email: msbardella@gmail.com, ⁽⁵⁾Universidade Federal do Mato Grosso do Sul email: soraia.agnol@hotmail.com, ⁽⁶⁾Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria Agrossilvipastoril email: daniel.ituassu@embrapa.br.

RESUMO – Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de níveis de proteína digestível na dieta sobre a dinâmica de crescimento de fibras musculares brancas e estresse oxidativo no músculo do Pintado Amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*). Foram utilizados 455 juvenis de Pintado Amazônico alimentados com dietas contendo sete níveis de proteína digestível (225; 250; 275; 300; 325; 350; ou 375 g kg⁻¹) durante 75 dias. Ao final do experimento, os peixes foram submetidos à jejum alimentar de 24 horas, anestesiados e eutanasiados para coleta de amostras de músculo. Foram determinados os efeitos linear e quadráticos dos níveis de proteína digestível na dieta sobre o diâmetro das fibras musculares brancas, concentração de metabólitos e estresse oxidativo no músculo. Conclui-se que altos níveis de proteína digestível na dieta do Pintado Amazônico, apesar de aumentar a concentração de proteína e aminoácidos livres no músculo, limitam a hipertrofia muscular e aumentam a exposição do tecido ao dano oxidativo.

Palavras-chave: hipertrofia muscular, nutrição, piscicultura, radicais livres

MUSCLE FIBERS AND OXIDATIVE STRESS OF PINTADO AMAZÔNICO FED WITH DIETARY PROTEIN LEVELS

Stephane Vasconcelos Leandro⁽¹⁾, Valéria Dornelles Gindri Sinhorin⁽²⁾, Danilo Henrique Aguiar⁽³⁾, Paula Sueli Andrade Moreira⁽⁴⁾, Soraia Andressa Dall' Agnol Marques⁽⁵⁾, Daniel Rabello Ituassú⁽⁶⁾, Ana Paula Silva Ton⁽⁷⁾, Anderson Corassa⁽⁸⁾, and Maicon Sbardella⁽⁷⁾

(1, 2, 3, 4, 7, 8 and 9)Federal University of Mato Grosso, University Campus of Sinop, 1200 Alexandre Ferronato Avenue, CEP: 78557-267, Sinop, MT, Brazil. ⁽¹⁾email: svl.zootecnista@gmail.com, ⁽²⁾email: valeriadgindri@gmail.com, ⁽³⁾email: dha.danilo@gmail.com, ⁽⁴⁾email: paula_moreira@ufmt.br, ⁽⁷⁾email: anatonn4@hotmail.com, ⁽⁸⁾email: corassa.ufmt@gmail.com, ⁽⁹⁾email: msbardella@gmail.com, ⁽⁵⁾Federal University of Mato Grosso do Sul email: soraia.agnol@hotmail.com, ⁽⁶⁾Brazilian Agricultural Research Corporation Agrossilvipastoril email: daniel.ituassu@embrapa.br.

ABSTRACT – This study aimed to evaluate the effects of dietary digestible protein levels on the growth dynamics and oxidative stress of white muscle fibers of Pintado Amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*). Four hundred and fifty-five juveniles of Pintado Amazônico were fed with dietary digestible protein levels (225; 250; 275; 300; 325; 350; or 375 g kg⁻¹) for 75 days. At the end of the experiment, the fishs were submitted to 24-hour fasting, anesthetized and euthanized to muscle sample. The linear and quadratic effects of dietary digestible protein levels on the white muscle fibers diameter, concentration of metabolites and oxidative stress were determined. The results shown that high dietary levels of digestible protein, despite increasing the concentration of protein and free amino acids in the muscle, limited muscle hypertrophy and increased tissue exposure to oxidative damage in Pintado Amazônico.

Keywords: muscle hypertrophy, nutrition, pisciculture, free radicals

1. INTRODUÇÃO

Por questões de evolução adaptativa do metabolismo energético dos peixes, a proteína serve como substrato prioritário no metabolismo para a produção de energia (ATP), uma vez que fontes de carboidratos na dieta dos peixes é normalmente escassa no ambiente natural (Glencross et al., 2014). Contudo, em sistemas de cultivo de peixes, a fração proteica da dieta representa mais de 50% dos custos de produção (Li et al., 2020). Desta forma, o desenvolvimento de estratégias nutricionais com redução da inclusão de fontes proteicas garantindo a saúde dos peixes e a qualidade do produto final tem sido o grande desafio para redução de custos de alimentação em sistemas de cultivo.

Pesquisas em nutrição de peixes vêm sendo realizadas para a avaliação das necessidades nutricionais de peixes com base nas respostas de desempenho zootécnico (Furuya et al., 2010; Sakomura e Rostagno, 2016). Entretanto, a dinâmica do metabolismo proteico é influenciada pela relação entre as necessidades nutricionais do organismo e a quantidade de proteína e energia ingeridas através da dieta (Hepher, 1988).

Apesar da taxa de síntese e/ou degradação proteica ser mais elevada no fígado, o tecido muscular pode ser o principal compartimento de metabolismo proteico no organismo dos peixes por representar cerca de 60% do peso corporal (Walton e Cowey, 1982).

O perfil metabólico de utilização dos nutrientes nos diferentes

compartimentos corporais pode refletir-se na concentração e acúmulo de metabólitos nos diferentes tecidos (Lundstedt et al., 2004), podendo afetar seu status oxidativo dos tecidos.

Desta forma, conhecer a relação entre a dieta, o sistema oxidativo, a atividade metabólica e desenvolvimento muscular dos peixes torna-se fundamental para o desenvolvimento de estratégias de alimentação em sistemas de cultivo de peixes. Porém, são escassos os dados de literatura sobre a influência de fatores nutricionais no metabolismo oxidativo e, conseqüentemente, no desenvolvimento muscular das diferentes espécies de peixes.

O Pintado Amazônico, um peixe muito apreciado pelo sabor e valor nutritivo da sua carne, tem sido utilizado em sistemas de cultivo por apresentar rápido crescimento, eficiente conversão alimentar, bom rendimento de carcaça e ausência de ossos intramusculares (Fantini et al., 2013). É um híbrido entre a espécie piscívora com tendência onívora *Leiarius marmoratus* (Sánchez et al., 2009) e a espécie carnívora *Pseudoplatystoma reticulatum* (Lemos et al., 2018).

Estudos com o Pintado Amazônico indicam características de hábitos alimentares e histologia do trato gastrointestinal condizentes a de peixes onívoros (Baldisserotto e Gomes, 2010; Campos 2010). Entretanto, apesar da similaridade com peixes onívoros, não há evidências na literatura de que o uso de dietas com características onívoras poderia afetar a dinâmica dos processos metabólicos e oxidativos e o desenvolvimento muscular nesta espécie mesmo que possam suportar taxas de crescimento similares.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de níveis de proteína

digestível na dieta sobre a dinâmica de desenvolvimento de fibras musculares e estresse oxidativo no músculo branco do Pintado Amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é parte de Projeto de Pesquisa com Pintado Amazônico desenvolvido em parceria entre o Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Agrossilvipastoril) e o Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso.

O experimento foi realizado no Laboratório de Piscicultura da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Agrossilvipastoril), localizada na cidade de Sinop, Estado de Mato Grosso, Brasil. Os protocolos experimentais usados para este estudo foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil, (845/2017).

2.1. Animais, manejo e dietas experimentais

Os peixes foram alimentados com rações experimentais contendo sete níveis crescentes de proteína digestível (225; 250; 275; 300; 325; 350; ou 375 g kg⁻¹) e energia digestível de 3400 kcal kg⁻¹. As rações experimentais foram formuladas a base de farinha de peixe, concentrado proteico de soja, farinha de sangue e milho

considerando valores de digestibilidade desses ingredientes determinados para o Pintado Amazônico, determinados no estudo de Marques et al. (2019) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das rações experimentais (na matéria seca).

Ingredientes (%)	Proteína Digestível (g kg ⁻¹)						
	225	250	275	300	325	350	375
Milho ^a	56,09	45,59	37,50	37,16	34,23	13,00	21,25
Farinha de peixe ^b	20,00	20,00	20,00	30,00	35,00	40,42	42,01
CPC ^c	12,49	20,48	25,94	24,80	20,17	19,00	21,04
Óleo de soja	5,48	8,08	9,54	7,27	5,38	9,59	5,48
Farinha de sangue ^d	3,00	3,00	5,00	0,00	5,00	10,00	10,00
Fosfato bicálcico	1,83	1,74	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
Calcário calcítico	0,89	0,90	0,00	0,44	0,00	0,00	0,00
Premix ^e	0,20	0,20	2,00	0,20	0,20	0,20	0,20
BHT ^f	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Casca de Arroz ^g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,77	0,00
Composição analisada (%)							
Proteína bruta	25,76	31,99	31,87	28,85	36,93	38,85	45,16
Extrato etéreo	9,54	14,13	10,51	10,52	13,91	16,34	10,29
Matéria mineral	10,45	10,39	7,36	9,97	10,62	11,65	8,93
Energia bruta (kcal/kg)	4260	4540	4062	4370	4650	4810	4540
Matéria seca	92,94	93,38	92,64	93,14	93,60	93,78	92,72
Composição calculada (%)							
Proteína digestível	22,5	25,0	27,5	30,0	32,5	35,0	37,5
Energia digestível (kcal/kg)	3400	3400	3400	3400	3400	3400	3400
Amido	37,08	30,13	24,79	24,56	22,63	8,59	14,05
Gordura	9,39	11,58	12,73	11,25	9,66	13,41	9,82
FDN	7,76	7,52	7,26	7,09	6,21	3,7	4,86
FDA	2,28	2,51	2,64	2,56	2,19	1,55	1,9

(^a)Proteína bruta 6,82%, Extrato etéreo 2,94%, Matéria mineral 0,97%, Matéria seca 83,25%, Energia bruta 3610 kcal/kg

(^b)Proteína bruta 48,93%, Extrato etéreo 21,25%, Matéria mineral 23,77%, Matéria seca 95,40%, Energia bruta 4680 kcal/kg

(^c)Concentrado proteico de soja: Proteína bruta 55,89%, Extrato etéreo 0,22%, Matéria mineral 5,99%, Matéria seca 84,05%, Energia bruta 3960 Kcal/kg

(^d)Proteína bruta 62,72%, Extrato etéreo 0,05%, Matéria mineral 0,70%, Matéria seca 62,87%, Energia bruta 3520 kcal/kg

(^e)Suplemento Micromineral e Vitamínico, Tectron Nutrição e Saúde Animal, Toledo, Paraná, Brasil.

(^f)BHT, 12,25g.

(^g)Proteína bruta 2,65%, Extrato etéreo 0,77%, Matéria mineral 8,76%, Matéria seca 9,74%, Energia bruta 3750 kcal/kg

Para elaboração das rações experimentais, as inclusões dos ingredientes foram ajustadas nas rações para atendimento de níveis de proteína digestível

determinados para cada tratamento mantendo-se constantes os níveis de energia digestível entre as rações experimentais.

Foram utilizados 455 juvenis de Pintado Amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) em um experimento com delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos, cinco repetições e 13 peixes por unidade experimental. Os peixes apresentavam peso médio de $299,54 \pm 48,03$ gramas e comprimento médio de $27,69 \pm 1,20$ centímetros e foram distribuídos em tanques experimentais de 500 L, tendo sido aclimatados previamente às instalações por sessenta dias, seguidos por 75 dias de ensaio de alimentação. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e às 16:00 horas) até a saciedade aparente.

2.2. Coleta de material biológico

Ao final do ensaio de alimentação de 75 dias, os peixes foram submetidos à jejum alimentar de 24 horas. Foram selecionados aleatoriamente três peixes por tanque (15 por tratamento), anestesiados com óleo de cravo (50 mg L^{-1}) diluído em etanol (1:20), pesados individualmente e eutanasiados por secção medular para coleta de amostras do músculo esquelético estriado branco. Os peixes foram eviscerados e filetados e as amostras foram retiradas do tecido muscular da região medial e dorsal. Os fragmentos para análises bioquímicas foram conservados em ultrafreezer a -80°C e para análises histológicas em formaldeído tamponado 10%.

Os peixes amostrados para as análises tinham peso médio de $628,76 \pm 18,54$ gramas, comprimento médio $34,31 \pm 0,37$ centímetros e peso de carcaça eviscerada médio de $561,30 \pm 12,17$ gramas, com distribuição similar entre os tratamentos.

2.3. Morfometria de fibras musculares

Porções do músculo fixadas em formaldeído a 10% foram desidratados através de série graduada de etanol (70 a 95%). Posteriormente, as porções foram embebidas em historesina e seccionadas em 3 μm de espessura utilizando o aparelho micrótomo rotativo semi-automático da marca Leica modelo 2245. Essas seções foram reidratadas em água destilada e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE).

Para mensuração da área e número de fibras musculares, foram feitas imagens de cinco pontos distintos de cada lâmina, conforme Figura 1, e contadas o número de células e medidas a área de cada fibra muscular em secção transversal utilizando o software de Mioticam 2.0.

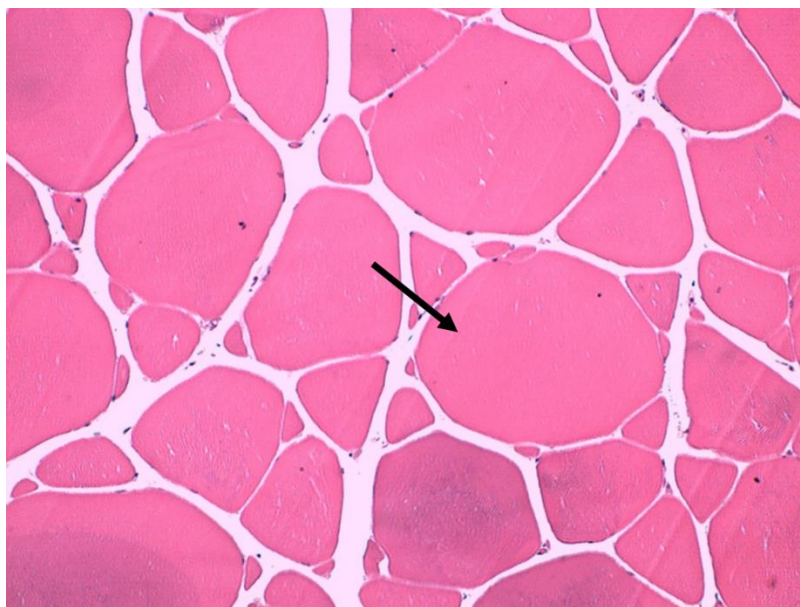


Figura 1. Imagem de corte transversal das fibras musculares obtida em microscópio com aumento de 20x. A imagem representa um dos pontos amostrados em uma lâmina. Observam-se fibras musculares (seta) utilizadas para a medida da área celular em μm^2 .

Para avaliar o padrão de crescimento hiperplásico e hipertrófico da

musculatura, as fibras musculares foram distribuídas em cinco classes de acordo com os quartis que se enquadrava a área da fibra muscular, adaptação da metodologia de Veggetti et al. (1990) e Valente et al. (1999).

2.4. Proteínas, aminoácidos livres e amônia no músculo

O conteúdo de proteínas foi determinado de acordo com Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina como padrão. Os resultados foram expressos em mg proteína g⁻¹ do tecido.

O teor de aminoácidos livres foi determinado pelo método de Spies (1957) utilizando-se de Ninhidrina 0,5% (diluída em álcool isopropílico) e a leitura de absorbância obtida em 570 nm e comparados a uma curva padrão de aminoácidos livres, sendo os resultados expressos em mmol de aminoácidos livres g⁻¹ tecido.

A amônia foi aferida pelo método de Gentzkow e Masen (1942), por espectrofotometria utilizando um comprimento de onda de 420 nm e os resultados foram comparados à uma curva padrão de amônia cujos dados foram apresentados em µmol amônia.g⁻¹ tecido.

2.5. Glicogênio, glicose e lactato no músculo

A concentração muscular dos metabólitos glicogênio, glicose e lactato foram determinadas por espectrofotometria e pelos métodos descritos por, respectivamente, Bidinotto et al. (1997); Dubois et al. (1956); e Harrower e Brown (1972).

Para a dosagem de glicogênio, as amostras foram realizadas no

comprimento de onda de 490 nm, sendo os resultados comparados à uma curva padrão de glicogênio e expressos em μmol de glicogênio. g^{-1} tecido.

Para a dosagem de glicose, as amostras foram realizadas no comprimento de onda de 480 nm, sendo os resultados comparados à uma curva padrão de glicose e expressos em μmol glicose. g^{-1} tecido.

Para a dosagem de lactato, a leitura das amostras foram realizadas no comprimento de onda de 570 nm, sendo os resultados comparados à uma curva padrão de lactato e representados como μmol lactato. g^{-1} tecido.

2.6. Parâmetros de dano oxidativo no músculo

Para análise dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo, os tecidos foram previamente descongelados, amostrados cuidadosamente sobre superfície gelada e pesados nas proporções recomendadas para cada análise.

2.6.1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram medidas utilizando o método descrito por Buege e Aust (1978). A concentração de SRATB foi expressa em nmol MDA. mg de proteína $^{-1}$, seguindo a curva de calibração para MDA.

2.6.2. Carbonilação de Proteínas

Para análise da proteína carbonilada, foi utilizado o método de Colombo et al. (2016). Os resultados foram expressos como nmol carbonil. mg de proteína $^{-1}$.

2.6.3. Complexo antioxidante

As atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e Glutathione-S-transferase (GST) e o antioxidante não-enzimático glutathione reduzida (GSH) no músculo foram mensurados seguindo as metodologias descritas por Misra e Fridovich (1972); Habig et al. (1974); e Sedlack e Lindsay (1968), respectivamente.

2.7. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o procedimento Glimmix do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), considerando os níveis de proteína digestível na dieta como fator principal e a amostra de músculo de cada peixe como unidade experimental. Todos os dados foram analisados para homogeneidade de variância residual, normalidade dos resíduos, linearidade e outliers. Dados influentes (outliers) foram removidos da análise quando excediam dois desvios padrão da média do resíduo.

Análise de regressão polinomial linear e quadrática foram realizadas para determinação do efeito dose-resposta dos níveis de proteína digestível da dieta sobre as variáveis resposta. Para os dados de histologia, o peso de carcaça eviscerada dos peixes foi incluído no modelo como covariável. Os efeitos linear ou quadrático ($P < 0,10$) foram plotados em gráficos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Dinâmica do desenvolvimento de fibras musculares

As fibras musculares com área entre 1133 e 11777 μm^2 (Classe 5), o aumento da concentração de proteína digestível na dieta diminuiu linearmente a área média das células ($Y = -278,82x + 8628,5$; $R^2 = 0,575$; $P = 0,055$; Figura 2).

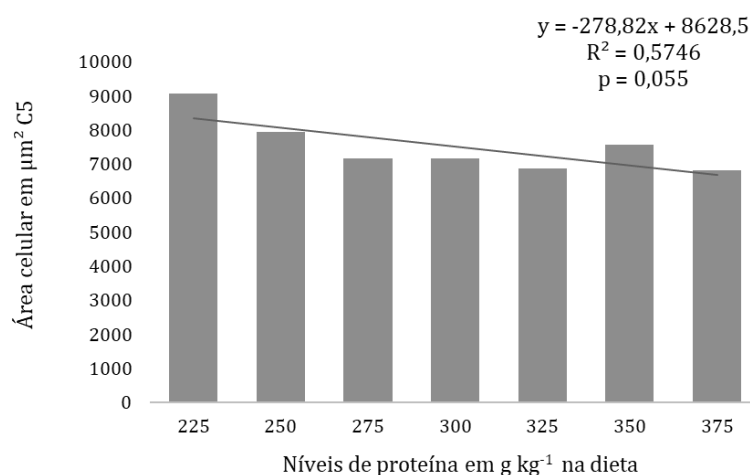


Figura 2. Efeito dos níveis de proteína digestível na dieta sobre a área celular média das fibras da classe 5 (1133,73 - 11777 μm^2) do Pintado Amazônico.

Não foram observadas diferenças para a área média das células das classes com área inferior a 1133,73 μm^2 e para a contagem do número de células musculares de fibra branca em função dos níveis de proteína digestível da dieta (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito dos níveis de proteína digestível (PD) na dieta sobre as médias de área celular e do número de células musculares do Pintado Amazônico.

Níveis de PD (g /kg ⁻¹)	Classe 1 (<11,4 μm^2)	Classe 2 (11,4 - 40,08 μm^2)	Classe 3 (40,08 - 230,18 μm^2)	Classe 4 (230,18 - 1133,73 μm^2)	Classe 5 (1133,73 - 11777 μm^2)
Área celular (μm^2)					
225	6,49	33,71	188,34	967,29	9079,19
250	6,79	30,86	197,97	969,99	7935,07
275	7,26	33,11	193,13	1056,96	7159,36
300	6,84	31,36	191,17	968,77	7158,85
325	6,71	30,68	202,8	1039,74	6871,71
350	6,38	32,20	206,19	957,68	7576,19
375	6,90	31,77	185,66	1016,65	6812,05
EPM ¹	0,8318	1,73	9,38	46,27	839,34
Efeito linear	0,968	0,491	0,679	0,623	0,055
Efeito quadrático	0,728	0,446	0,278	0,510	0,202
Número de células					
225	107,89	113,12	126,11	115,52	113
250	150,70	107,45	106,96	107,99	125,41
275	173,45	162,93	146,03	120,2	137,67
300	137,48	154,54	150,97	145,75	111,73
325	95,99	110,37	130,51	145,2	129,26
350	100,67	100,22	97,33	114,62	115,07
375	83,81	112,83	104,52	113,31	129,67
EPM ¹	51,58	28,07	23,25	18,38	11,24
Efeito linear	0,304	0,604	0,362	0,712	0,690
Efeito quadrático	0,338	0,179	0,142	0,120	0,703

¹EPM: Erro Padrão da Média.

Apesar de fatores como as condições de temperatura e salinidade da água, espaço, tempo de tanque, alimentação na fase inicial da vida poderem afetar a distribuição de número e tamanho dos miócitos na fase adulta (Hempel e Blaxter, 1961; Stickland et al., 1988), o aumento dos níveis de proteína na dieta resultaram

em redução do diâmetro médio das maiores células musculares com área entre 1133,73 e 11777,13 μm^2 (Classe 5), indicando uma redução de deposição proteica (hipertrofia) nas fibras musculares. O crescimento muscular hipertrófico resulta do equilíbrio entre a síntese e degradação proteica (Velez et al., 2016), sendo que quando a taxa de síntese excede a degradação de proteínas ocorre aumento da deposição de proteínas na fibra muscular, aumentando a massa muscular (hipertrofia) (Fuentes et al, 2012).

No presente estudo, a menor área das maiores fibras musculares com o aumento dos níveis de proteína digestível na dieta pode ser um indicativo de menor acúmulo de filamentos de actina e miosina nas fibras musculares. De fato, as dietas com maior concentração de proteína digestível continham menores concentrações de carboidratos em comparação com as dietas de menor concentração de proteína digestível, sugerindo utilização prioritária da proteína oriunda da dieta como substrato para produção de energia ao invés de síntese e acúmulo de proteína muscular nas dietas de alta proteína.

Felip et al. (2012), descreveram que a economia e direcionamento de aminoácidos da dieta para crescimento ao invés de oxidação para produção de energia (efeito poupador de proteínas) gera oportunidade para utilização de carboidratos na dieta de peixes como fonte de energia.

Quando a taxa de síntese excede a degradação de proteínas ocorre aumento da deposição de proteínas na fibra muscular, aumentando a massa muscular (hipertrofia) (Fuentes et al, 2012). Apesar de fatores como as condições de temperatura e salinidade da água, espaço, tempo de cultivo, alimentação na fase

inicial da vida poderem afetar a distribuição de número e tamanho dos miócitos na fase adulta (Hempel e Blaxter, 1961; Stickland et al., 1988), neste estudo o aumento dos níveis de proteína na dieta resultou em redução do diâmetro médio das maiores células musculares com área entre 1133,73 e 11777,13 μm^2 (Classe 5), o que pode ser um indicativo de menor acúmulo de filamentos de actina e miosina (atrofia) nas fibras musculares.

Contrariamente ao presente estudo, Silva et al. (2009) observaram que o aumento no teor de proteínas (20 a 60%) na dieta aumentou o recrutamento de fibras e área das fibras musculares de *Pagellus bogaraveo*. Assim como, foi observado aumento no peso corporal dos peixes, indicando que o aumento do diâmetro e recrutamento de fibras musculares naquele estudo pode ser reflexo do aumento na taxa de crescimento determinado pelos níveis de proteína na dieta.

3.2. Proteínas, aminoácidos livres e amônia

A concentração de aminoácidos livres ($Y = 0,4158x + 13,137$; $R^2 = 0,6801$; $P = 0,003$; Figura 3A) e de proteínas totais ($Y = 0,0761x + 1,4471$; $R^2 = 0,6868$; $P = 0,014$; Figura 3B) no tecido muscular do pintado amazônico aumentaram linearmente com o aumento de proteína digestível na dieta, enquanto a concentração de amônia no tecido muscular não sofreu influência das diferentes dietas (Tabela 3).

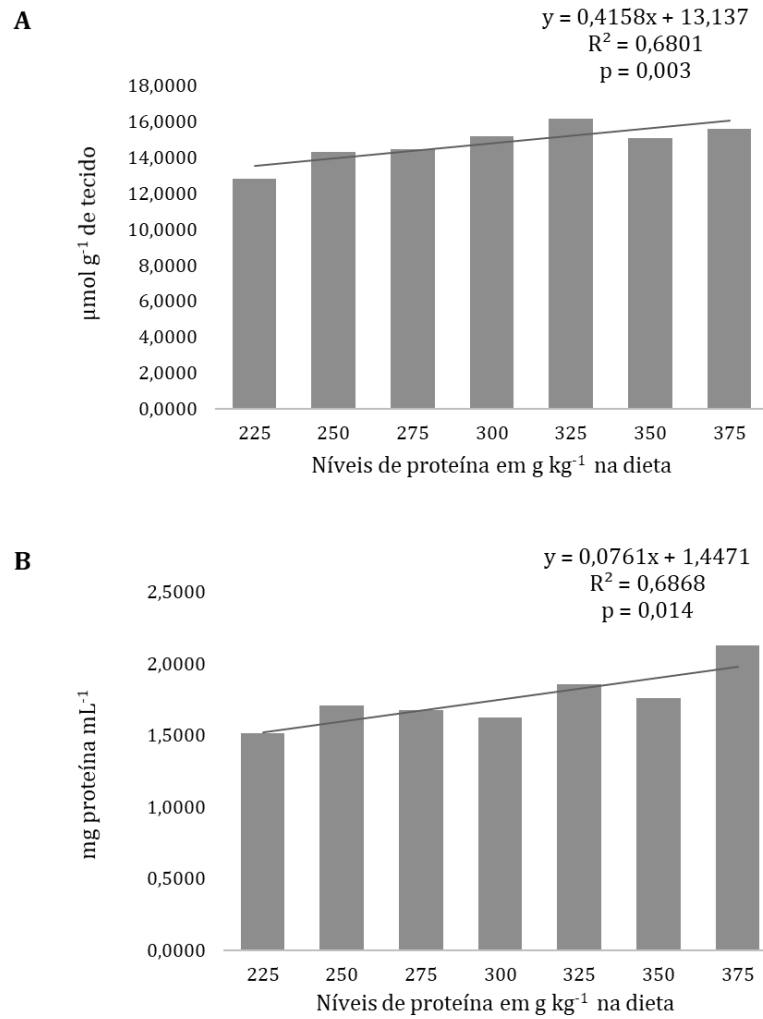


Figura 3. Efeito dos níveis de proteína digestível sobre os níveis de aminoácidos livres (A) e concentração de proteínas totais (B) no tecido muscular do Pintado Amazônico.

Tabela 3. Efeito dos níveis de proteína digestível (PD) na dieta sobre a concentração de proteínas totais, aminoácidos livres e amônia no músculo branco do Pintado Amazônico

Proteína Digestível (g /kg ⁻¹)	Proteínas Totais (mg proteína mL ⁻¹)	Aminoácidos Livres (μmol g ⁻¹ de tecido)	Amônia (μmol g ⁻¹ de tecido)
225	0,3980	12,80	0,0410
250	0,3407	14,31	0,0426
275	0,3232	14,44	0,0367
300	0,3945	15,20	0,0388
325	0,3371	16,17	0,0358
350	0,2648	15,07	0,0395
375	0,3130	15,59	0,0372
EPM ¹	0,038	0,708	0,0029
Efeito linear	0,0138	0,0028	0,2161
Efeito quadrático	0,4488	0,1058	0,4758

¹EPM: Erro Padrão da Média.

Kirchner et al. (2005) também observaram relação direta entre o teor de proteína na dieta e aminoácidos livres no tecido muscular de truta arco-íris. Por outro lado, Yamamoto et al. (2000) e Jiménez et al. (2009b) não verificaram relação dos níveis de proteína com os níveis de aminoácidos livres no músculo de truta arco-íris e *Dentex dentex*, respectivamente.

Em dietas com níveis de proteínas acima da necessidade para o desenvolvimento do animal, o excesso de proteínas é degradado a aminoácidos livres e convertido em energia no fígado, além de aumentar a gordura visceral e o aumento da produção de amônia no ambiente aquático, que gera efeitos negativos para o crescimento e saúde dos peixes (Wood, 1993). Neste contexto, no presente estudo, quando as dietas continham maiores níveis de proteína digestível observava-se redução da concentração de fontes de carboidratos nas dietas, fazendo com que o organismo tivesse menor disponibilidade de carboidratos

oriundos da dieta para uso no metabolismo energético, possivelmente, demandando maior degradação de proteína para produção de energia para uso no metabolismo energético.

Esta hipótese é reforçada com a observação de que, apesar do maior acúmulo de proteína e aminoácidos livres no músculo do Pintado Amazônico alimentado com dietas com maiores níveis de proteína, observou-se limitação da hipertrofia muscular. Adicionalmente, o perfil de proteínas na dieta pode influenciar a concentração de aminoácidos livres no músculo dos peixes. Xu et al. (2017) observaram que a substituição de farinha de peixe por proteínas vegetais na dieta (farinha de soja, farinha de glúten de milho, glúten de trigo e farinha de amendoim) reduziu a concentração de aminoácidos livres no músculo do *Scophthalmus maximus* L. Desta forma, sugere-se que o acúmulo de proteína total e aminoácidos livres no músculo associados à menores diâmetros de fibra muscular podem ser reflexo do perfil de aminoácidos da proteína da dieta e da disponibilidade de substratos para produção de energia no metabolismo energético.

3.3. Metabólitos no músculo

Os níveis de glicogênio ($Y = -0,2947x + 8,9597$; $R^2 = 0,6134$; $P = 0,0503$; Figura 4A) e glicose ($Y = -0,014x + 0,3949$; $R^2 = 0,4241$; $P = 0,0574$; Figura 4B) no tecido muscular diminuíram linearmente com o aumento de proteína digestível, enquanto o lactato não apresentou diferença ($P > 0,05$) em função dos níveis de proteína digestível (Tabela 4). Esses dados sugerem que em dietas com menores níveis de proteína digestível ocorreu aumento do acúmulo do glicogênio e glicose

muscular possivelmente como reflexo da maior concentração de carboidratos nas dietas comparativamente às dietas de maiores níveis de proteína digestível.

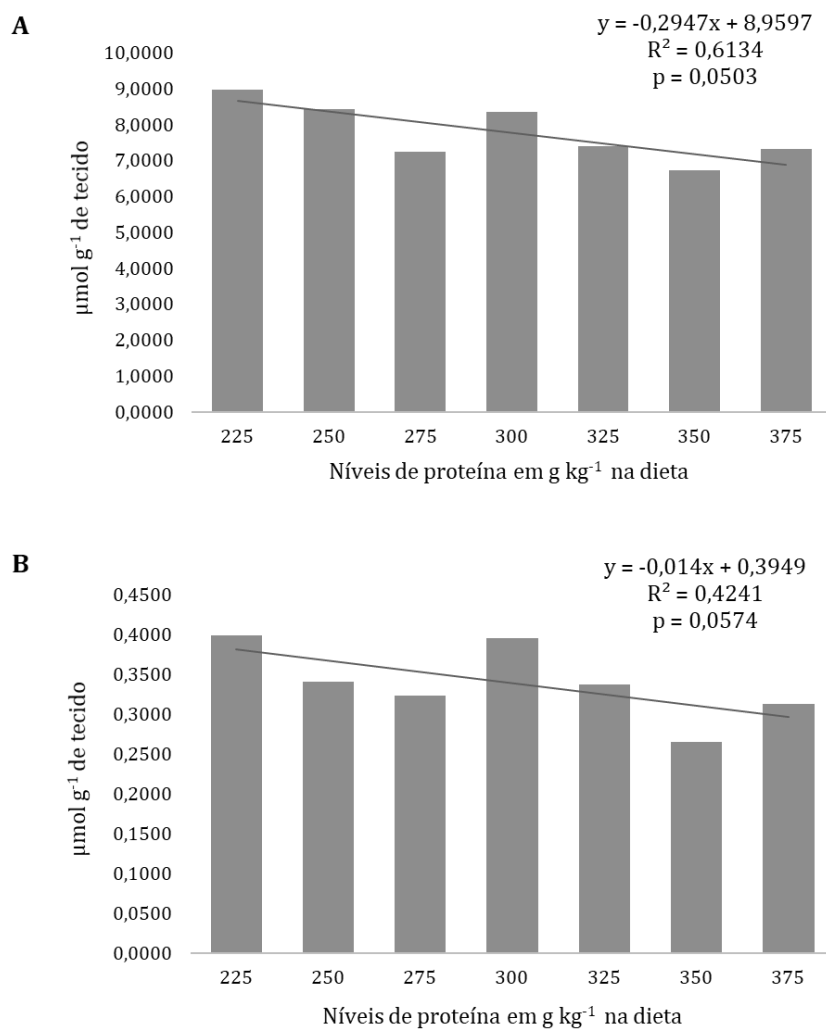


Figura 4. Efeito dos níveis de proteína digestível sobre os níveis de glicogênio (A) e glicose (B) no tecido muscular do Pintado Amazônico.

Tabela 4. Efeito dos níveis de proteína digestível (PD) sobre a concentração de glicogênio, glicose e lactato no músculo do Pintado Amazônico.

Proteína Digestível (g kg ⁻¹)	Glicogênio (μmol g ⁻¹ de tecido)	Glicose (μmol g ⁻¹ de tecido)	Lactato (μmol g ⁻¹ de tecido)
225	8,98	0,3980	5,49
250	8,44	0,3407	6,08
275	7,25	0,3232	5,59
300	8,36	0,3945	6,11
325	7,39	0,3371	5,25
350	6,72	0,2648	5,25
375	7,32	0,313	6,66
EPM ¹	0,782	0,038	0,71
Efeito linear	0,0503	0,0574	0,6866
Efeito quadrático	0,5664	0,9903	0,5651

¹EPM: Erro Padrão da Média.

O aumento de proteína com restrição de energia, favorece a degradação de proteína para produção de energia em detrimento da deposição proteica corporal (NRC, 2011). No presente estudo, a medida em que os níveis de proteína digestível aumentaram nas dietas o teor de amido reduziu, ocorrendo limitação de carboidratos para acúmulo de glicogênio como reserva energética muscular. Lin et al. (2018) também observaram que o aumento dos níveis de amido (5, 10 e 20%) na dieta do *Micropterus salmoides* resultaram em aumento do conteúdo de glicogênio muscular.

3.4. Estresse oxidativo no tecido muscular

A concentração de SRATB aumentou linearmente com o aumento de proteína digestível na dieta ($Y = 1,0543x + 7,0566$; $R^2 = 0,5986$; $P = 0,047$; Figura

5A). Por outro lado, as proteínas carboniladas não foram afetadas pelas modificações da dieta (Tabela 5). Álvarez et al. (1998) avaliaram níveis de proteína digestível para a truta-arco-íris (335; 339; 406 e 409 g kg⁻¹) e robalo (277; 342; 378 e 412 g kg⁻¹) e também demonstraram maior suscetibilidade do músculo à oxidação quando alimentados com altos níveis de proteína.

Jiménez et al. (2009a), ao avaliarem dietas para o Dentex dentex com diferentes proporções de macronutrientes (proteína: lipídio: carboidrato (43/16/28; 43/24/4; 38/19/28 e 38/24/13%), observaram que as dietas que tinham maior nível lipídico (24%) foram as que induziram a maior peroxidação lipídica. Desta forma, há evidências de maior processo de peroxidação lipídica em animais submetidos à dietas com maiores níveis de proteína digestível e menor concentração de carboidratos.

O dano nas células e, conseqüentemente, nos tecidos causado pela produção de EROs têm sido referenciado como estresse oxidativo, que consiste na incapacidade do sistema de defesa antioxidante composto por componentes enzimáticos e não enzimáticos em remover as EROs do organismo (Jiménez et al., 2009a; Venancio et al., 2013).

Durante o processo de peroxidação lipídica ocorre a conversão de EROs ativas em metabólitos secundários de menor reatividade pela ação do sistema antioxidante do organismo na fase de terminação da cadeia de reações de peroxidação lipídica (Sargent et al., 1999). Desta forma, o acúmulo no organismo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) tem sido utilizado como indicador da concentração de metabólitos secundários (por exemplo,

malondialdeído) do processo de lipoperoxidação (LPO). Além da peroxidação lipídica, o aumento das EROs ocasionam dano em proteínas com formação de grupos carbonil a partir da alteração da estrutura e função dos grupos amino dos aminoácidos presentes nas proteínas (Winston e Di Giulio, 1991; Schieber e Chandel, 2014).

Tabela 5. Efeito dos níveis de proteína digestível (PD) sobre a concentração de SRATB e Proteínas Carboniladas no músculo do Pintado Amazônico

Proteína Digestível (g kg ⁻¹)	SRATB (nmol MDA mg proteína ⁻¹)	Proteínas Carboniladas (nmol carbonil mg proteína ⁻¹)
225	10,84	0,3808
250	6,54	0,3262
275	8,34	0,3905
300	11,59	0,3633
325	14,01	0,3911
350	13,31	0,4192
375	14,28	0,3943
EPM ¹	2,94	0,05
Efeito linear	0,0465	0,3965
Efeito quadrático	0,6344	0,8674

¹EPM: Erro Padrão da Média.

As células são protegidas contra o dano oxidativo produzido pelas EROS por sistemas antioxidantes enzimáticos compostos pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Halliwell e Gutteridge, 1999). A superóxido dismutase (SOD) é um conjunto de enzimas que desempenhamdesempanham papel como antioxidantes e mecanismos de defesa primária as propriedades tóxicas de radicais superóxido (Halliwell e Gutteridge, 2017; Nwani et al., 2010).

A atividade da SOD e da GSH neste estudo não foram afetadas pelos

diferentes níveis de proteína digestível na dieta (Tabela 6). Um estudo realizado com *Pelteobagrus fulvidraco*, ao avaliarem diferentes níveis de proteínas e lipídeos na dieta (52:13; 52:9; 48:13; 48:9), observaram que a atividade da SOD aumentou, enquanto a da GSH reduziu com o aumento da proteína na dieta, e indicaram que os níveis elevados de proteína na dieta poderiam fornecer alto teor de aminoácidos para sintetizar enzimas antioxidantes imunológicas e assim garantir a estabilidade do sistema antioxidante para manter a saúde do animal (Zhang et al., 2018).

A atividade da GST no Pintado Amazônico diminuiu linearmente com o aumento de proteína digestível na dieta ($Y = -0,0066x + 0,1001$; $R^2 = 0,5847$; $P = 0,0001$; Figura 5B), enquanto a atividade da SOD e da GSH neste estudo não foram afetadas pelos diferentes níveis de proteína digestível na dieta (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito dos níveis de proteína digestível (PD) sobre a concentração de SOD, GSH e GST no músculo do Pintado Amazônico

Proteína Digestível (g kg ⁻¹)	SOD (UI SOD mg proteína ⁻¹)	GSH (μmol GSH mg proteína ⁻¹)	GST (μmol GS-DNB min ⁻¹ proteína ⁻¹)
225	9,85	0,0088	0,0865
250	9,87	0,0102	0,0826
275	10,31	0,0139	0,0803
300	10,22	0,0123	0,0900
325	9,09	0,0102	0,0832
350	9,06	0,0090	0,0449
375	9,67	0,0121	0,0495
EPM ¹	0,631	0,002	0,009
Efeito linear	0,3158	0,6899	0,0001
Efeito quadrático	0,8	0,3147	0,0311

¹EPM: Erro Padrão da Média.

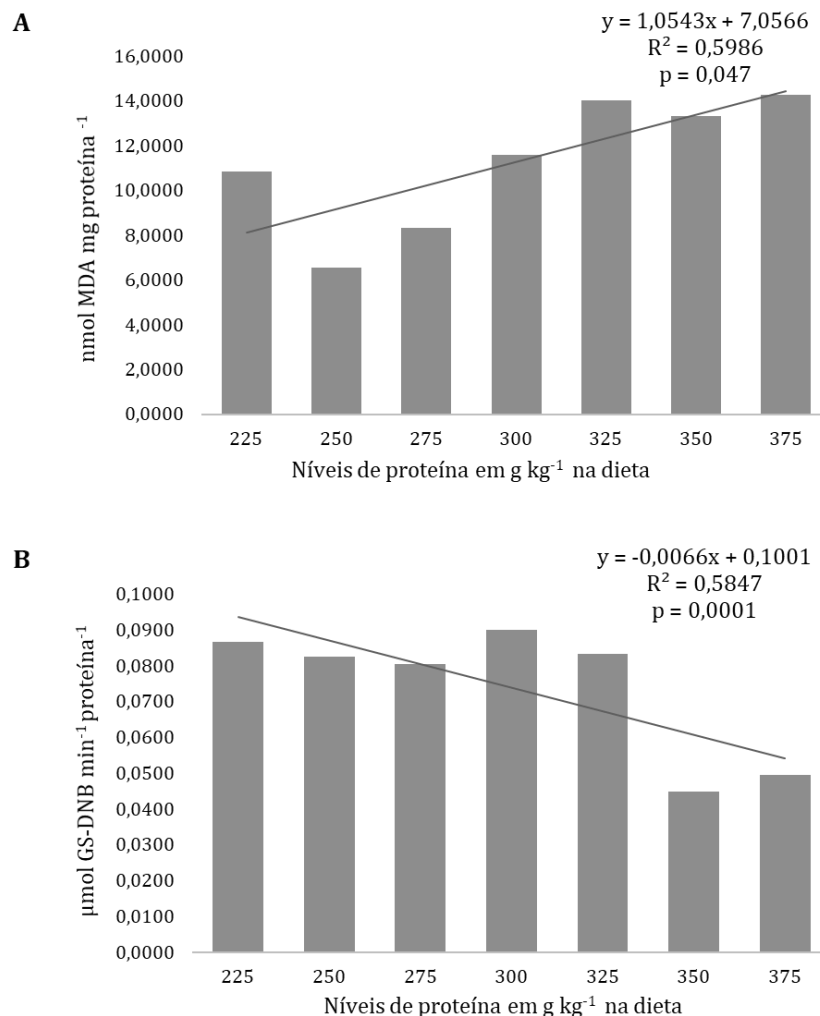


Figura 5. Efeito dos níveis de proteína digestível sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (A), e da atividade da GST (B) no músculo do Pintado Amazônico.

A glutathione-S-transferase (GST) conjuga glutathione reduzida (GSH) com xenobióticos como parte dos processos de desintoxicação, e a glutathione redutase (GR) garante que o GSH esteja sempre disponível como um importante antioxidante e como cofator para a GST (Halliwell e Gutteridge, 2017; Valko et al., 2007). Pode-se sugerirPodemos supor que a atividade atividade desta enzima esteja reduzida nosnas maiores níveis de proteína digestível doses uma vez que os resultados indicam quea maior quantidade de proteína na dieta foi utilizada para a produção

de energia. Como não foi gerado mais GSH e atividade de SOD não mudou, esta adaptação no metabolismo proteico do animal pode ter gerado um maior estresse o que foi representado neste estudo pelo aumento do SRATB.

4. CONCLUSÃO

Altas concentrações de proteína digestível na dieta do Pintado Amazônico aumenta a concentração de proteína e aminoácidos no músculo, limita a hipertrofia de fibras brancas e aumenta a exposição do tecido ao dano oxidativo comparativamente às dietas de menor concentração de proteína digestível.

5. AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso/Câmpus Sinop (UFMT/CUS), pela oportunidade de realização do curso de mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado. À Embrapa Agrossilvipastoril, na cooperação com o desenvolvimento da pesquisa. Ao Laboratório de Bioquímica (CUS/UFMT) por ceder espaço, material e protocolos para o ensaio bioquímico. Ao Laboratório de Histologia (CUS/UFMT) por ceder espaço, material e protocolos para o ensaio morfométrico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ, M.J.; LOPEZ-BOTE, C.J.; DÍEZ, A.; CORRAZE, G.; ARZEL, J.; DIAS, J.; KAUSHIK, S.J. e BAUTISTA, J.M. 1998. Dietary fish oil and digestible protein modify susceptibility to lipid peroxidation in the muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Br. J. Nutr. 80, 281–289. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114598001330>
- BALDISSEROTTO, B e GOMES, LC. 2010. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2.ed. Santa Maria, Ed UFSM.
- BIDINOTTO, PM.; SOUZA, RHS. e MORAES, G. 1997. Glicogênio hepático em oitopeixes teleósteos de água doce: um procedimento para determinações de micro amostras em campo. Bol.Tec. CEPTA 10, 53–60.
- BRADFORD, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry Volume 72, Issues 1–2, 7 May 1976, Pages 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BUEGE, JA e AUST, SD 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods. Enzymol. 52, 302e309. Methods Enzymol. 1978;52:302-10. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.
- CAMPOS, JL. 2010. O cultivo do Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix & Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus Híbridos. In: Espécies nativas para piscicultura no Brasil – Bernardo Baldisserotto e Levy de Carvalho Gomes (org) – 2 ed. rev. e ampl. – Santa Maria: Ed da UFSM.

- COLOMBO, G.; CLERICI, M.; GARAVAGLIA, ME.; GIUSTARINI, D.; ROSSI, R and MILZANI, A. 2016. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.*;1019:178–90. DOI: 10.1016 / j.jchromb.2015.11.052
- DUBOIE, M.; GILLES, KA; HAMILTON, JK; ROBERTS, PA and SMITH, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Division of Biochemistry, University of Minnesota, St. Paul, Minn. *Anal. Chem.* 28,350-358.
- FANTINI, LE.; RODRIGUES, RA.; NUNES, AL.; SANCHEZ, MSS.; USHIZIMA, TT. and CAMPOS, CM. 2013. In come from carcass of surubins *Pseudoplatystoma* spp. Produced in network tank and nursery. *Revista Brasileira de SaudeProduc ß ~ the animal* 14, 538-545. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402013000300019>
- FELIP, O.; IBARZ, A.; FERNANDEZ-BORRAS, J.; BELTRAN, M.; MARTIN-PEREZ, M.; PLANAS, JV and BLASCO, J. 2012. Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes ([¹³C]starch and [¹⁵N]protein): effects of gelatinisation of starches and sustained swimming. *British Journal of Nutrition* 107, 834–844. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114511003709>
- FUENTES, EN.; RUIZ, P.; VALDES, JA and MOLINA, A. 2012. Catabolic Signaling Pathways, Atrogenes, and Ubiquitinated Proteins Are Regulated by the Nutritional Status in the Muscle of the Fine Flounder. The Atrophy System in Fish Skeletal Muscle. | Volume 7 | Issue 9 | e44256. September 2012. OI: 10.1371 / journal.pone.0044256
- FURUYA, WM.; PEZZATO, LE.; BARROS, MM.; BOSCOLO, WR.; CYRINO, JEP.; FURUYA, VRB and FEIDEN, A. 2010. Tabelas Brasileiras para a Nutrição de Tilápias. – Toledo: GFM, 100p.
- GENTZKOW, CJ and MASEN, JM. 1942. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *Journal of Biological Chemistry*, 143: 531-544. <https://www.jbc.org/content/143/2/531.full.pdf>
- GLENCROSS, B.; BLYTH, D.; IRVIN, S.; BOURNE, N and WADE, N. 2014. An analysis of the effects of different dietary macronutrient energy sources on the growth and energy partitioning by juvenile barramundi, *Lates calcarifer*, reveal a preference for protein-derived energy. *Aquaculture Nutrition* (2014) 20; 583-594. DOI: 10.1111/anu.12111
- HABIG, WH.; PABST, MJ and JACOBY, WB. 1974. Glutathione S-Transferases THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION* *J. Biol. Chem.* 249, 7130e7139.
- HALLIWELL, B and GUTTERIDGE, JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press. Fifth Edition
- HALLIWELL, B and GUTTERIDGE, JMC. 2017. *Free Radicals in Biology and Medicine*.

Fifth Edition. Oxford University Press, 2015. Pp. xxxviii + 905. Price GBP 70.00 (paperback, ISBN 9780198717485), GBP 125.00 (hardback, ISBN 9780198717478). DOI: 10.1107/S2059798317004533

HARROWER, JR and BROWN, CH.1972. Blood lactic acid -a micromethod adapted to field collection of microliter samples J. Veterans Administration Hospital & Livermore, California 94550. Appl. Physiol. 32, 709-711, 1972.

Hempel G, Blaxter JHS.1961. The experimental modification of meristic characters in herring (*Clupea harengus* L.). J Cons Int Explor Mer 26:336-346

HEPHER, B. 1988. Energy pathways. In: Nutrition of Pond Fish. Cambridge: Cambridge University Press (ed.). 1988, p.64-101. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511735455>

JIMÉNEZ, AP.; HIDALGO, MC.; MORALES, AE.; ARIZCUN, M.; ABELLÁN, E and CARDENETE, G. 2009a. Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in *Dentex dentex* fed on different dietary macronutrient levels. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 150, 537-545. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.07.011>

JIMÉNEZ, AP.; HIDALGO, MC.; MORALES, AE.; ARIZCUN, M.; ABELLÁN, E and CARDENETE, G. 2009b. Use of different combinations of macronutrients in diets for dentex (*Dentex dentex*) Effects on intermediary metabolism. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 152 (2009) 314-321. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.11.002

KIRCHNER, S.; SEIXAS, P.; KAUSHIK, S and PANSEERAT, S. 2005. Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 140 333-340. DOI: 10.1016 / j.cbpc.2004.10.019

LEMOES, CHP.; CHUNG, S.; RIBEIRO, CVM and COPATTI, CE. 2018. Growth and biochemical variables in Amazon catfish (*Pseudoplatystoma reticulatum*♀ x *Leiarius marmoratus*♂) under different water pH. Anais da Academia Brasileira de Ciências (2018) 90(4): 3573-3581 (Annals of the Brazilian Academy of Sciences) Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820180241>

LI, X.; ZHENG, S and WU, G. 2020. Nutrition and metabolism of glutamate and glutamine in fish. © Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2020. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02851-2>

LIN, SM.; SHI, CM.; MU, MM.; CHEN, YJ and LUO, L. 2018. Effect of high dietary starch levels on growth, hepatic glucose metabolism, oxidative status and immune response of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. Fish and Shellfish Immunology 78 (2018) 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.046>

LUNDSTEDT, LM.; MELO, JFB and MORAES, G. 2004. Digestive enzymes and

metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 137. 331–339. doi:10.1016/j.cbpc.2003.12.003

MARQUES, SAD.; FORNARI, DC.; TON, APS. 2019. Determinação de tempo da taxa de passagem gastrointestinal de alimentos para o pintado amazônico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA ZOOTECH 2015. DIMENSÕES TECNOLÓGICAS E SOCIAIS DA ZOOTECNIA, 25., 2015., Fortaleza. Anais... Fortaleza: SBZ, 2015. Disponível em: <<http://sis.gnuius.com.br/uploads/zootech2015/documentos/c3110e3573e9f0a95b95de9f97491f58dec2cb2.pdf>>. Acesso em: 06 ago. 2020.

MISRA, HP and FRIDOVICH, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. The Journal of Biological Chemistry, 30 Apr 1972, 247(10):3170-3175 PMID: 4623845

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, DC: National Academic Press.

NWANI, D.; LAKRA, WS.; NAGPURE, NS.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B and SRIVASTAVA, SK. 2010. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch). Int J Environ Res Public Health. 2010 Aug; 7(8): 3298–3312.

SAKOMURA, NK and ROSTAGNO, HS. 2016. Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. -- 2.ed. --Jaboticabal: Funep, 262 p.:il.,retrs. ISBN: 978-85-7805-154-9.

SÁNCHEZ, JAM.; MOYETONES, F and CERDÁ, MJ. 2009. Influencia del contenido proteico en el crecimiento de alevines de bagre yaque, *Leiarius marmoratus*, alimentados con concentrados comerciales. Zootecnia tropical: Maracay. Venezuela. v.27, n.02. versão impressa ISSN 0798-7269

SARGENT, JR.; BELL, JG.; BELL, MV.; HENDERSON, RJ and TOCHER, DR. 1999. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In: Lahlou, B., Vitello, P. (Eds.), Aquaculture: Fundamental and Applied Research, Coastal and Estuarine. <http://www.agu.org/books/ce/v043/CE043p0103/CE043p0103.shtml>

SCHIEBER, M and CHANDEL, NS. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr Biol. 19 de maio de 2014; 24 (10): R453-62. doi: 10.1016 / j.cub.2014.03.034.

SEDLACK, J and LINDSAY, RH. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Analytical Biochemistry Volume 25, 1968, Pages 192-205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)

SILVA, P.; VALENTE, LMP.; GALANTE, MH.; ANDRADE, CAP.; MONTEIRO, RAF e ROCHA, E. 2009. Dietary protein content influences both growth and size

- distribution of anterior and posterior muscle fibres in juveniles of *Pagellus bogaraveo* (Brunnich). *J Muscle Res Cell Motil* (2009) 30:29–39. © Springer Science+Business Media B.V. DOI 10.1007/s10974-009-9167-z
- SPIES, JR.1957. Colorimetric procedures for amino acids. *Methods in Enzymology* Volume 3, 1957, Pages 467-477. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(57\)03417-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(57)03417-5)
- Stickland NC, White RN, Mescall PE, Crook AR, Thorpe JE. 1988. The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Anat Embryol (Berl)* 178:253–257
- VALENTE, LMP.; ROCHA, E.; GOMES, EFS.; SILVA, MW.; OLIVEIRA, R.A.; MONTEIRO, RAF and FAUCONNEAU, B. 1999. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. *J. Fish Biol., London*, v. 55, p. 675-691. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00710.x>
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, MTD.; MAZUR, M and TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
- VEGGETTI, A.; MASCARELLO, F.; SCAPOLO, PA and ROWLERSON, A. 1990. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural and morphometric study. *Anat. Embryol., Berlin*, v. 182, p. 1-10. DOI: 10.1007 / bf00187522
- VÉLEZ, EJ.; LUTFI, E.; AZIZI, SH.; PERELLÓ, M.; SALMERÓN, C.; RIERA-CODINA, M.; IBARZ, A.; FERNÁNDEZ-BORRÁS, J.; BLASCO, J.; CAPILLA, E.; NAVARRO, I and GUTIÉRREZ, J. 2017. Understanding fish muscle growth regulation to optimize aquaculture production. *Aquaculture* 467, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.004>
- VENANCIO, LPR.; SILVA, MIA and DA SILVA, TL. 2013. Pollutioninduced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles. *Ecotoxi. Environ. Safe.* 97, 1–9. DOI: 10.1016 / j.ecoenv.2013.06.035
- WALTON, MJ and COWEY, CB. 1982. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 73, n. 1, p. 59-79. DOI: 10.1016 / 0305-0491 (82) 90201-2
- WINSTON, GW.; DI GIULIO, RT. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* Volume 19, Issue 2, April 1991, Pages 137-161. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0166-445X(91)90033-6)
- WOOD, CM. 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Evans, D.H. (Ed.), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Ann Arbor, pp. 379–425.
- YAMAMOTO, T.; UNUMA, T and AKIYAMA, T. 2000. The influence of dietary protein and fat levels on tissue free amino acid levels of fingerling rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 182, 353–372. DOI: 10.1046 / j.1444-2906.2000.00049.x

XU, D.; HE, G.; MAI, K.; WANG, Q.; LI, M.; ZHOU, H.; XU, W and SONG, F. 2017. Effect of fish meal replacement by plant protein blend on amino acid concentration, transportation and metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture Nutrition. 2017;23:1169–1178. DOI: 10.1111/anu.12486

ZHANG, J.; ZHAO, N.; SHARAWY, Z.; LI, Y.; MA, J and LOU, Y. 2018. Effects of dietary lipid and protein levels on growth and physiological metabolism of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae under recirculating aquaculture system (RAS). Aquaculture 495 (2018) 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.004>