10.30612/agrarian.v13i47.9912

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

Atividade das enzimas digestivas frente a restrição alimentar de peixes ornamentais

Activity of digestive enzymes against the dietary restriction of ornamental fish

Larissa Selini Dorce[1], Wesley Clovis Barbieri Mendonça, Mayara Schueroff Siqueira[2], Rudã Fernandes Brandão Santos[3], Rebeca Maria Sousa [1], Henrique Momo Ziemniczak[1], Claucia A Honorato[1]

Universidade Federal da Grande Dourados – FCA/UFGD, Rodovia Dourados / Itahum, Km 12 - Unidade II | Caixa Postal: 364 | Cep: 79.804-970 E-mail: Henrique.momo@hotmail.com, [2] Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, [3] Universidade Federal de Pernambuco, laboratório de enzimologia, Recife-PE

Recebido em: 25/05/2019 Aceito em:17/02/2020

Resumo: O objetivo deste trabalho foi de avaliar o perfil das enzimas digestivas no intestino anterior de beta (*Bettas splendens*) e o quinguio (*Carassius auratus)* alimentados e privados de alimentação. Os peixes foram alojados em um mesmo local climatizado a 27 ºC, submetidos a fotoperíodo de 12 horas, alimentados duas vezes ao dia por 21 dias. Foram utilizados 40 peixes betas machos com peso de 1,94±0,10 g e, alojados individualmente em aquários de três litros sendo um grupo foi submetido ao jejum, e outro recebeu alimentação até a saciedade (ração comercial extrusada - 35% PB). Foram utilizados 40 peixes quinguios com peso de 11,43±3,28 g. sendo mantidos em aeração constante, também subdividido em dois grupos alojados em oito aquários de 20 L em sistema estático, sendo um grupo submetido ao jejum e outro recebeu alimentação até a saciedade, (ração comercial extrusada - 32% PB). Os peixes betas ocorreram um aumento na atividade de lipase, amilase e protease para o tratamento com que recebeu alimentação e uma redução da lipase em tratamento jejum. O experimento com quinguios atividade da lipase e amilase são responsivas a presença de alimento no trato digestório e a protease é uma enzima constitutiva nesta espécie. Para os peixes betas as enzimas digestivas possuem um caráter indutivo e nos peixes quinguios a amilase e lipase digestiva apresentam um caráter indutivo enquanto a protease se apresenta constitutiva.

Palavras-chave: Carboidrato, lipídio, ornamentação, proteína, peixe

Abstract: The objective of this work was to evaluate the digestive enzymes in the intestines of beta (*Bettas splendens*) and quinguio (*Carassius auratus*) fed and deprived of food. A total of 40 male betas were used, weighing 1.94 ± 0.10 g, individual allopods in three-liter aquaria at 27 ºC and 12-hour photoperiod. One group was fasted, and the other was responsible for satiety, sometimes daily, with extruded commercial feed (35% CP) for a period of 21 days. Forty quinguian fish weighing 11.43 ± 3.28 g were used. You should have access to the temperature and temperature of 27oC and photoperiod of 12 hours. These were divided into two groups housed in eight 20 L aquaria with the static system. The group underwent fasting and the other group was responsible for satiety, sometimes daily, with extruded commercial commercialization (32% PB) for a period of 21 days. Experimentation with beta development in lipase, amylase and protease to the treatment that annulators and reduction in lipase in fasting. The experiment with lipase and amylase activity is responsible for the presence of food in the digestive tract and a protease is a constitutive enzyme in this species. For fish betas like digestive enzymes have an inductive characteristic and in the same falls, a digestive lipase enzyme has an inductive character while a protease is constitutive.

Keywords: Carbohydrate, lipid, ornamentation, protein, fish

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

Introdução

O comércio de peixes ornamentais é considerado hoje uma das atividades mais lucrativas da piscicultura e vem se expandindo rapidamente com o aumento na demanda mundial (Lima et al., 2001). Peixes ornamentais apresentam características, como coloração e formato variável tornando-os um atrativo ao comércio. Algumas das espécies de peixes ornamentais se encaixa nesta descrição, dentre elas o beta (*Bettas splendens*) e o quinguio (*Carassius auratus)* espécies consideradas ícone do aquarismo com grande popularidade e aceitação (Ribeiro et al., 2010).

Apesar da expressão econômica dos peixes ornamentais, poucas informações sobre alimentação e nutrição estão disponíveis e são baseadas nas recomendações de resultados obtidos com peixes de interesse comercial (Zuanon et al., 2011). Para garantir que um programa de alimentação tenha êxito, deve-se atentar para todas as etapas da nutrição animal.

Após a ingestão, o alimento sofrerá alterações físico-químicas ao longo do trato intestinal, para então ser absorvido e metabolizado de acordo com as exigências do animal (Ren et al., 2019). A distribuição das enzimas no intestino dos peixes varia com o hábito alimentar e a morfologia tecidual (Tengjaroenkul et al., 2000).

O valor nutritivo de um alimento não depende somente de sua composição nutricional, mas também da capacidade do animal digerir e absorver esses nutrientes, o que varia em função da espécie, das condições ambientais, da qualidade da ração (Heinitz et al., 2018).

Os alimentos ingeridos são constituídos em grande parte por moléculas de alto peso molecular, os nutrientes não podem ser absorvidos diretamente pela mucosa gastrintestinal, sendo necessária sua transformação em moléculas de baixo peso molecular. Esse processo é catalisado por enzimas digestivas secretadas para a luz do tubo digestório. Assim sendo, um dos fatores que limita a eficiência da absorção e conversão do alimento é a disponibilidade de enzimas digestivas (Sotoudeh e Mardani, 2017).

O estudo bioquímico-enzimático das enzimas digestivas torna-se imprescindível para o melhor entendimento da fisiologia da digestão e do metabolismo dos nutrientes. Essas informações geram subsídios para trabalhos na área de nutrição e possibilitam ajustes mais precisos na elaboração de dietas (Campeche et al., 2018). Ressalta-se, no entanto, que o primeiro passo neste ramo é avaliação da atividade das enzimas digestivas frente a presença de alimento no trato digestório.

A alimentação ou o jejum são situações as quais muitos teleósteos são bem adaptados, pois sobrevivem ao um jejum natural e voltam a se alimentar (Santos et al., 2018). Alguns trabalhos apontam frequência de alimentação com jejum intermitente sem prejuízos ao crescimento (Zuanon et al., 2004). Contudo, até o momento não descreveram as adaptações do trato digestório.

Portanto, este estudo teve o objetivo de avaliar o perfil das enzimas digestivas no intestino anterior de beta (*Bettas splendens*) e o quinguio (*Carassius auratus)* alimentados e privados de alimentação.

Materiais e Métodos

Foram realizados dois ensaios por um período de 21 dias com duas espécies de peixes ornamentais beta (*Bettas splendens*) e o quinguio (*Carassius auratus)* alimentados e privados de alimentação.

O ensaio com peixes betas - Foram utilizados 40 peixes machos com peso de 1,94 ± 0,10 g, alojados individualmente em aquários de três litros mantidos em laboratório aquecido com temperatura de 27 ºC e fotoperíodo de 12 horas de luz durante 21 dias. Estes foram divididos em dois grupos um submetido ao jejum, e outro recebeu alimentação até a saciedade, duas vezes ao dia, com ração comercial extrusada (35% PB) durante um período de 21 dias.

O ensaio com peixe quinguios - Foram utilizados 40 peixes com peso de 11,43 ± 3,28 g. Os peixes foram mantidos em condição laboratorial, com aeração constante, temperatura de 27ºC e fotoperíodo de 12 horas de luz. Estes foram divididos em dois grupos alojados em oito aquários de 20 litros sistema estático, aeração constante por um período de 21 dias. Estes foram divididos em dois grupos um submetido ao jejum e outro recebeu alimentação até a saciedade, duas vezes ao dia, com ração comercial extrusada (32% PB) durante um período de 21 dias.

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

Durante o período experimental os parâmetros da qualidade de água foram: temperatura 29 °C; oxigênio dissolvido de 5,6 ± 0,42 mg/L; pH de 7,4 ± 0,1 e condutividade 190,5 ± 1,5 $\mu S.cm^{-1}$. Ao final do período experimental, 20 peixes de cada tratamento foram transferidos para um recipiente contendo benzocaína (100mg/L) por 30 segundos Inoue et al. (2003). Os exemplares foram abatidos por secção medular sendo aferidos peso e coletado o trato digestório. O ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Centro Universitário da Grande Dourados/CEUA, protocolo: 003/14.

Para determinar a atividade enzimática digestiva, o trato digestório foi retirado e transferido para uma substância tampão (glicerol em tampão fosfato de sódio 20 mmol L-1/Tris 10 mmol L-1, pH 7,0 v/v) e processada em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem a 1.000 rpm, por aproximadamente 2 minutos, sob banho de gelo. O homogeneizado celular foi centrifugado a 13.400 *g*, por três minutos. Os sobrenadantes foram utilizados como fonte de enzima. A quantidade de sobrenadante utilizada no ensaio enzimático foram determinadas na etapa de padronização e ajustadas para valores adequados por ensaio.

Protease - Nos ensaios da atividade proteolítica ácida inespecífica de estômago foi utilizado o método de hidrólise de caseína (Walter 1984). A mistura de reação era composta de: 500µl de tampão Glicina/HCl 0,1M – pH 2,0, 500µl de caseína 1% como substrato inespecífico e 30µl de homogeneizado celular de estômago como fonte enzimática. Após 30 minutos a 25ºC, a reação era interrompida com 500µl de TCA 15% e o precipitado removido por centrifugação a 12.000 x *g* por quatro minutos para a leitura óptica do sobrenadante em 280nm. Tirosina foi usada como padrão e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µg de tirosina, por minuto (U), expressa por mg de proteína (U/mg proteína).

Lípase - A atividade de lípase não-específica foi ensaiada segundo metodologia adaptada (Albro et al., 1985). A reação era incubada em meio contendo: volume adequado de homogeneizado; 0,4mM de p-nitrofenil misturado em solução tampão 24mM de bicarbonato de amônio pH 7,8 e 0,5% Triton X-100. Após trinta minutos, as reações eram interrompidas pela adição de NaOH 25mM. A densidade óptica era então registrada a 405nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolizar 1 µmol de substrato $minuto^{-1}$ (U) e expressa por mg de proteína (UI).

Amilase - A atividade amilohidrolítica foi ensaiada segundo o método proposto por Bernfeld (1955) modificado. A mistura de reação continha: 1,0 ml de solução de amido 5%; tampão citrato/fosfato 0,2M (pH 7,0); 0,5 ml de solução de NaCl 0,5% como cofator enzimático e uma alíquota adequado de homogeneizado celular. A reação era incubada a 25 °C por 30 minutos e interrompida com 1,0 ml de solução 5% $ZnSO_4$: $Ba(OH)_2$ 0,3N. Posteriormente, a mistura de reação era centrifugada a 11.000 x g por 3 minutos e no sobrenadante determinada a concentração de glicose livre pelo método colorimétrico Park e Johnson (1949), em λ=690 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de açúcar redutor $minuto^{-1}$ (U) e expressa em U por mg de proteína (UI).

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), a 450nm, estimada com uma solução padrão de caseína 1 mg/mL.

Cada ensaio foi analisado em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (alimentados e privados de alimentação) e com vinte repetições. A análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan submetidos à análise de variância e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste *Tukey* a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

A presença de alimento no trato digestório foi eficiente na indução das atividades das enzimas digestivas do trato digestório de betas (Figura 1). Houve aumento significativo da atividade da lipase (Figura 1A), amilase (Figura 1 B) e da protease inespecífica (Figura 1 C). A perda de atividade das enzimas digestivas quando os animais foram submetidos ao jejum revelaram que a enzima com maior perda de atividade foi a

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

lipase 47,20% inferior aos alimentados (Figura 1D).

Figura A.

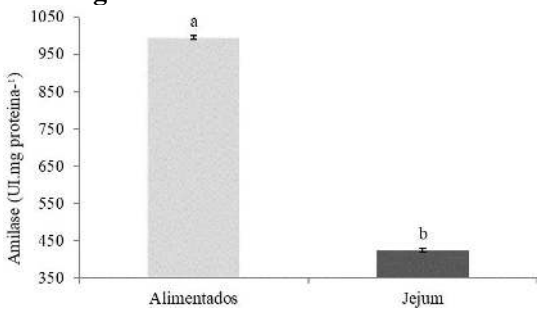


Figura B.

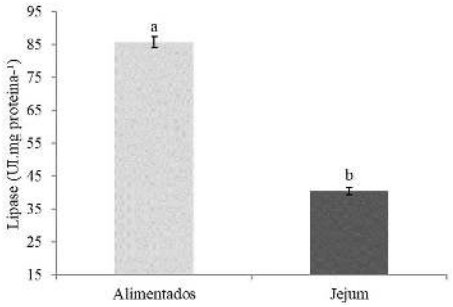


Figura C.

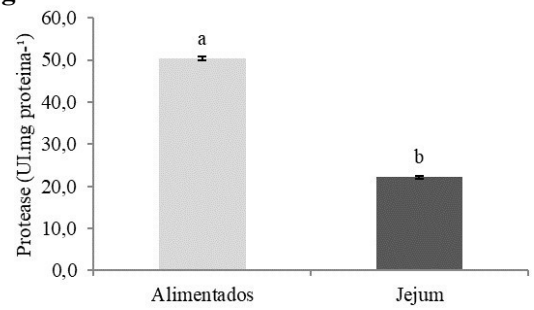


Figura D.

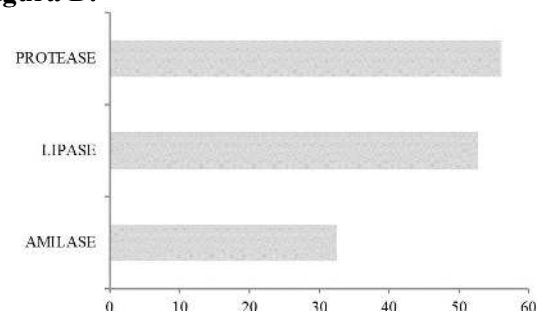


Figura 1. Atividade específica (UI/mg proteína) da protease (A), amilase (B), lipase (C), do trato digestório e percentual de perda da atividade das enzimas digestivas (D), de *Bettas* em resposta a alimentação e a privação de alimento. Letras distintas reportam diferença estatística pelo teste de *Tukey* (p>0,05)

As enzimas de carater indutivo apresentados pelos peixes betas permite sugrerir estudos que modulem a atividade principalmente da protease, com suplementação de aminoácidos que permitirão melhorar o desempenho e saude dos animais. O aproveitamento de dietas com suplementação de aminoácidos na forma sintética, induz a atividade das enzimas do trato digestório (Xu et al., 2017). Os resultados obtidos com aminoácidos parecem estar estreitamente relacionados aos alimentos utilizados, aos seus níveis de inclusão e ao valor nutricional de seus aminoácidos (Bekke et al., 2010; Ostaszewska et al., 2010). Descobertas recentes destacam que os transportadores de AA, como uma barreira seletiva para os AAs, têm um papel fundamental na resposta às mudanças nos AA intracelulares e extracelulares, fornecendo uma ligação crucial entre a disponibilidade de AAs e o anabolismo de proteínas (Dickinson e Rasmussen, 2013; Mingchun et al., 2019). O aumento de AAs intracelular regula a vias de sinalização de reguladores do crescimento celular (Wang et al., 2016; Xu et al., 2017) resultando em melhor desempenho produtivo.

Para os peixes quinguios a atividade da amilase e lipase digestivas foram superiores aos peixes alimentados quando comparados ao grupo submetido ao jejum (Figura 2 A, B). No entanto, a atividade da protease digestiva não demostrou responsividade a presença ou ausência de alimentos no trato digestório (Figura 2 C)

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

Figura A.

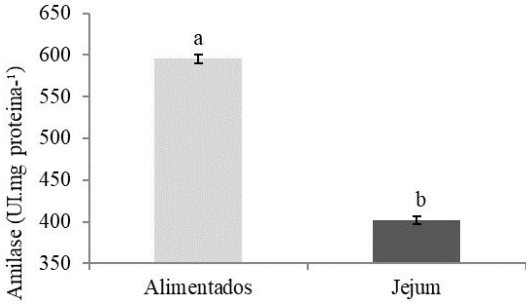


Figura B.

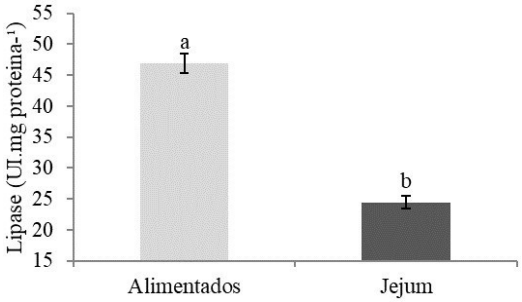


Figura C.

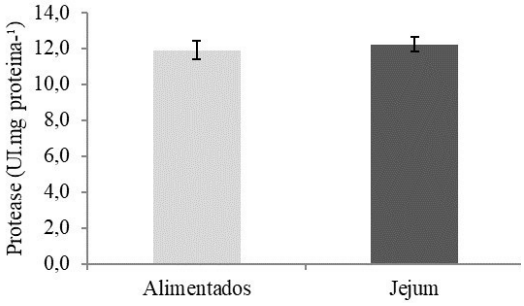


Figura D.

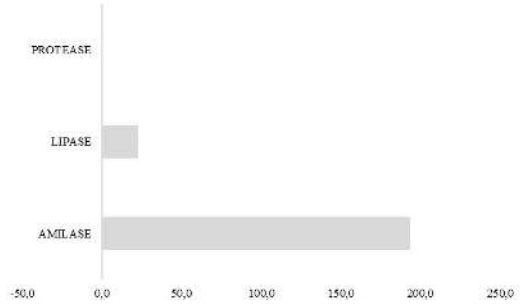


Figura 2. Atividade específica (UI/mg proteína) da protease (A), amilase (B) e lipase (C do trato digestório e percentual de perda da atividade das enzimas digestivas (D), Quinguios *(Carassius aurata)* em resposta a privação de alimento

A atividade da lipase e amilase dos quinguios submetidos a privação de alimento foi de 49,6% e 35,1% respectivamente, inferior aos alimentados. Para a atividade da protease não houve diferença significativa entre os grupos. A atividade da lipase e amilase são responsivas a presença de alimento no trato digestório e a protease é uma enzima constitutiva nesta espécie.

No entanto, observa-se que existem diferenças interespecíficas. A espécie *Carassius auratus* observa-se que a privação de alimento não é um fator que denigre a produção da atividade das proteases digestivas. A atividade proteolítica de quinguios é menos dependente da presença de reguladores, ou até mesmo do alimento, ainda que mesmo uma pequena diminuição ao longo do jejum seja observada. Este fato pode estar ligado a falta de células do sistema endócrino em alguma porção do trato digestório desta especie. Porém a relação entre a dieta, a estrutura e a função dos cecos pilóricos (principal local de digestão proteica no trato digestório) é muito complexa e ainda pouco entendida (Wang et al., 2016; Xu et al., 2017), necessitando assim de mais estudo.

A atividade constitutiva da protease dos peixes quinguios sugere que devemos dar maior atenção para indução da atividade da amilase e lipase digestivas. Podendo modular as formulações de dietas para o aumento destas fontes de alimentos como promotores de energia disponivel para atividades metabólicas.

Conclusão

Nos peixes betas as enzimas digestivas possuem um caráter indutivo. Os peixes quinguios a amilase e lipase digestiva apresentam um caráter indutivo enquanto a protease se apresenta constitutiva.

Referências

ALBRO, P. W.; HALL, R. D.; CORBETT, J. T. Activation of nonspecific lipase (EC 3.1.1.) by bile salts. **Biochemica et Biophysica Acta,** v. 835, n. 3, p. 477-490. 1985.

ALVAREZ-GONZÁLEZ, C.; MOYANO-LÓPEZ, F.; CIVERA-CERECEDO, R., CARRASCO-CHÁVEZ, V.; ORTÍZ-GALINDO, J.; NOLASCO-SORIA, H. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II: of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II:

Electrophoretic analysis. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 29-37. 2010.

BAKKE, S.; JORDAL, A. E. O.; GÓMEZ-REQUENI, P.; VERRI, T.; KOUSOULAKI, K.; AKSNES, A.; RØNNESTAD, I. Dietary protein hydrolysates and free amino acids affect the spatial expression of peptide transporter PepT1 in the digestive tract of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 156, n. 1, p. 48-55. 2010.

BERNFELD, P. Amylase a and b: colorimetric assay method. In: Colowich SP, Kaplan NO (eds) Methods in enzymology**. Academic**, New York, p 149-157. 1955.

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

CAMILO, R. Y. **Efeito da Adição de aminoácidos essenciais livres á dieta e da ausência de nutrientes na atividade de enzimas digestivas e no metabolismo intermediário de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*).** 2007. 56p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, São Paulo. 2007.

CAMPECHE, D. F.; ANDRADE, D. H.; SOUZA, A. M.; MELO, J. B.; BEZERRA, R. S. Dietary protein:lipid ratio changes growth, digestive enzyme activity, metabolic profile and haematological parameters in hybrid surubim *(Pseudoplatystoma fasciatum x Leiarius marmoratus)*. **Aquaculture Research***,* v. 49, n. 7, p. 2486-2494. 2018.

DE ALMEIDA, L. C.; LUNDSTEDT, L. M.; MORAES, G. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n. 6, p. 443-450. 2006.

DICKINSON, J. M.; E RASMUSSEN, B. B. Amino acid transporters in the regulation of human skeletal muscle protein metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 16, n. 6, p. 638-644. 2013

HEINITZ, M. C.; FIGUEIREDO S. C.; SCHULZ, C.; LEMME, A. The effect of varying dietary digestible protein and digestible non-protein energy sources on growth, nutrient utilization efficiencies and body composition of carp *(Cyprinus carpio)* evaluated with a two-factorial central composite study design. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 723-740. 2018.

HONORATO, C. A.; DE ALMEIDA, L. C.; CAMILO, R. Y; MORAES, G.; NUNES, C. D. S.; CARNEIRO, D. J. Dietary carbohydrate and food processing affect the digestive physiology of *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 857-864. 2016.

INOUE, L. A. K.; SANTOS, NETO. C.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxa *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 943-947. 2003.

LIMA, A. O.; BERNARDINO, G. E.; PROENÇA, C. E. M. Agronegócio de peixes ornamentais no Brasil e no mundo. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, p. 14-24. 2001.

OSTASZEWSKA, T.; DABROWSKI, K.; KAMASZEWSKI, M.; GROCHOWSKI, P.; VERRI, T.; RZEPKOWSKA, M.; WOLNICKI, J. The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.) **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology**, v. 157, n. 2, p. 158-169. 2010.

PARK, J. T.; JOHNSON, M. J. A submicro determination of glucose. **Journal Biology Chem**, v. 181, p. 140-151. 1949.

REN, M.; HE, J; LIANG, H; Ji. K.; Ge, X.; SUN, A.; PAN, L.; MASAGOUNDER, K. Use of supplemental amino acids on the success of reducing dietary protein levels for Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture Nutrition**, v. 25, p. 567-576. 2019.

RIBEIRO, A. F. S.; LIMA, M. T.; FERNANDES, C. J. Panorama do mercado de organismos aquáticos ornamentais. **Boletim Sociedade Brasileira de Limnologia**, v. 38, p. 15. 2010.

SANTOS, E. L.; SOARES, A. C. L.; TENÓRIO, O. L. D.; SOARES, E. C.; SILVA, T. J.; GUSMÃO JÚNIOR, L. F.; SANTOS, E. L. Desempenho de tambaquis (*Colossoma macropomum*) submetidos a restrição alimentar e a realimentação em tanques-rede, **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.7 0, n. 3, p. 931-938. 2018.

SOTOUDEH, E.; MARDANI, F. Antioxidant-related parameters, digestive enzyme activity and intestinal morphology in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* fry fed graded levels of red seaweed, Gracilaria pygmaea. **Aquaculture Nutrition***,* v. 24, n. 2, p. 777-785. 2017.

TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B. J.; CACECI, T.; SMITH, S. A. Distribution of intestinal enzymes activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182, n. 5-6, p. 317-327. 2000.

WALTER, H. E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In BERGMEYER, H. U. 5 ed. Methods of enzymatic analysis. Weinheim verlag chemie, 1984, p. 270-277.

WANG, Q.; HE, G.; MAI, K.; XU, W.; ZHOU, H. Fishmeal replacement by mixed plant proteins and maggot meal on growth performance, target of rapamycin signalling and metabolism in juvenile turbot *(Scophthalmus maximus* L.), **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 4, p. 752-758. 2016.

XU, D.; HE, G.; MAI, K.; WANG, Q.; LI, M.; ZHOU, H.; XU, W.; SONG, F. Effect of fish meal replacement by plant protein blend on amino acid concentration, transportation and metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 1169-1178. 2017.

ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L.; FURUYA, W. M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista. Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 165-174. 2011.

ZUANON, J. A.; ASSANO, M.; FERNANDES, J. B. K. Desempenho de Tricogaster *(Trichogaster trichopterus)* submetido a diferentes níveis de arraçoamento e densidades de estocagem. **Revista Brasileira de Zootecnia***,* v. 33, n. 6, p. 1639-1645. 2004.