

LUÍS GUSTAVO TAVARES BRAGA

ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DA RÃ-TOURO
NA FASE PÓS-METAMÓRFICA

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia para obtenção
do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

LUÍS GUSTAVO TAVARES BRAGA

ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS DA RÃ-TOURO
NA FASE PÓS-METAMÓRFICA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 23 de julho de 2001

Prof^ª Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Conselheira)

Prof. Juarez Lopes Donzele
(Conselheiro)

Prof^ª Ana Lúcia Salaro

Prof^ª Neuza Maria Brunoro Costa

Prof. Ricardo Frederico Euclides
(Orientador)

À Energia Mágica vinda do Além.
Aos meus queridos pais, Augusto e Aylida.
Aos meus irmãos André e Renata.
Aos amigos de fé e irmãos camaradas.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa, por intermédio do Departamento de Zootecnia e da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e pelo suporte financeiro para realização da pesquisa.

Ao Professor Oswaldo Pinto Ribeiro Filho e ao Departamento de Biologia Animal, pela utilização do Ranário Experimental.

Ao BIOAGRO - Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, pela realização das análises laboratoriais.

Ao Professor e amigo Ricardo Frederico Euclydes, pela orientação e pelo apoio na realização do curso.

À Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela amizade, “orientação”, pelas sugestões e pela viabilização do trabalho no Laboratório de Enzimologia.

Ao Professor Juarez Lopes Donzele, pelo aconselhamento e pelas sugestões desde o curso de Mestrado.

Às Professoras Ana Lúcia Salaro e Neuza Maria Bruonoro Costa, pela amizade, pelo exemplo, pelas sugestões e pela participação na banca de defesa de tese.

Ao químico William Cardoso Lima, pela amizade e realização das análises laboratoriais com profissionalismo e precisão.

À Professora Eliane Menin, pela amizade e participação como orientadora na fase inicial do curso de Doutorado.

Aos colegas da Pós-Graduação em Zootecnia, pelo relacionamento e pela aprendizagem.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais desta Instituição, pela compreensão, pelo apoio financeiro e pela liberação para concretização da dissertação.

Aos colegas e professores do Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, pelo incentivo e convívio.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu desenvolvimento científico e realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUÍS GUSTAVO TAVARES BRAGA, filho de Augusto Candido Braga e Aylda Tavares Braga, nasceu a 30 de agosto de 1970, na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

Em agosto de 1993, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Em setembro de 1993, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na área de Nutrição de Monogástricos – Ranicultura no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, sendo submetido ao exame final de defesa de tese em janeiro de 1997.

Em março de 1997, iniciou o Programa de Doutorado em Zootecnia no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, onde realizou trabalhos na área de Nutrição de Monogástricos – Ranicultura.

Em agosto de 1999, foi efetivado pela Universidade Estadual de Santa Cruz, BA, onde atua como professor Adjunto no Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais.

Defendeu tese de Doutorado em 23 de julho de 2001, requisito necessário para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	x
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Digestibilidade de alimentos pela rã-touro	3
2.2. Atividade enzimática em organismos aquáticos	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Animais, instalações e manejo.....	15
3.2. Coleta e preparo do material	17
3.3. Determinação da atividade da tripsina	18
3.4. Determinação da atividade da amilase	19
3.5. Determinação da atividade da lipase	20
3.6. Determinação da concentração de proteína	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Atividade da tripsina utilizando ração comercial	22
4.2. Atividade da amilase utilizando ração comercial.....	26
4.3. Atividade da lipase utilizando ração comercial.....	30
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMO

BRAGA, Luís Gustavo Tavares, D.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2001. **Atividade de enzimas digestivas da rã-touro na fase pós-metamórfica.** Orientador: Ricardo Frederico Euclydes. Conselheiros: Maria Goreti de Almeida Oliveira e Juarez Lopes Donzele

Com o objetivo de se avaliar a atividade enzimática da tripsina, amilase e lipase no conteúdo intestinal da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), 320 animais com peso médio de 3,6 gramas foram distribuídos em baias-teste com temperatura e fotoperíodo controlados. As rãs selecionadas na fase pós-metamórfica receberam ração comercial extrusada *ad libitum*. Durante 87 dias de experimento, foram efetuadas 29 coletas em intervalos variando de 1 a 8 dias. As coletas do conteúdo intestinal foram feitas mediante a insensibilização das rãs em gelo e água e posterior isolamento do intestino delgado das mesmas. Após cada coleta, todo material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer, para ser liofilizado posteriormente. A determinação da atividade da tripsina foi realizada utilizando-se Benzoil-D, L-Arginina p-nitroanilida (D, L-BApNA) como substrato. Para os testes de atividade da amilase e lipase, foram utilizados KIT's enzimáticos comerciais, correspondentes a cada enzima. A atividade da tripsina foi registrada no primeiro dia de experimento, enquanto para

amilase e lipase isto aconteceu a partir do terceiro dia. A fase inicial é marcada pelo aumento da atividade da tripsina e amilase até alcançar estabilidade, quando os animais ainda estavam na fase de imago. Neste mesmo período, a rã-touro ainda possui baixa capacidade de hidrólise para lipase. No período subsequente até o final do experimento, a manutenção da estabilidade da atividade e atividade específica da tripsina e amilase foi contrastada pelo contínuo aumento destes parâmetros em relação à lipase. Pode-se concluir que a rã-touro apresenta capacidade para digestão de alimentos de origens protéica, amilásica e lipídica, sendo que, na fase inicial, recomenda-se a utilização de ração rica em proteína e, na fase seguinte, uso de maior quantidade de ingredientes contendo amido e lipídio.

ABSTRACT

BRAGA, Luís Gustavo Tavares, D.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2001. **Activity of digestive enzymes of the bullfrog in the post-metamorphic phase.** Advisor: Ricardo Frederico Euclides. Committee members: Maria Goreti de Almeida Oliveira and Juarez Lopes Donzele.

With the objective of evaluating the enzymatic activity of the trypsin, amylase and lipase in the intestinal content of the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), 320 animals with medium weight of 3.6 grams were distributed in stall-test with temperature and photoperiod controlled. The frogs, selected in the post-metamorphic phase they received commercial extruded diet *ad libitum*. For 87 days of experiment, 29 collections were made in intervals varying from one to eight days. The collections of the intestinal content were performed by the desensitization of the frogs in ice and water and subsequent isolation of the small intestine of the same ones. After each collection, all material it was frozen in liquid nitrogen and stored in freezer to be later liofilized. The determination of the activity of the trypsin was accomplished being used benzoil-D, L-arginine p-nitroanilide (D, L-BApNA) as substrate. For the tests of activity of the amylase and lipase commercial enzymatic KIT's were used, corresponding to each enzyme. The activity of the trypsin was registered in the first day of experiment, while for amylase and lipase this happened starting from the third day. The initial

phase is marked by the increase of the activity of the trypsin and amylase to reach a stability when the animals were still in the imago phase. In this same period, the bullfrog still possesses low hydrolysis capacity for lipase. In the subsequent period until the end of the experiment, the maintenance of the stability of the activity and specific activity of the trypsin and amylase was contrasted by the continuous increase of these parameters in relation to lipase. With these results it can be concluded that to bullfrog presents capacity for digestion of ingredients of protein, starch and lipid origin, and in the initial phase the use of rich diet is recommended in protein and in the following phase it can be opted for the use of larger amount of ingredients containing starch and lipid.

1. INTRODUÇÃO

O comércio mundial de carnes de rãs atinge, hoje, a ordem de dezenas de toneladas anuais, sendo a França e os Estados Unidos os principais países consumidores e importadores do produto. Os fornecedores de rãs para o mercado mundial, na maioria países asiáticos, além da criação em cativeiro, abastecem o mercado internacional com grandes quantidades de rãs capturadas em campos inundados e arrozais, que, nos últimos anos, vêm demonstrando sinais de esgotamento (LIMA et al., 1999).

Na última década, a criação de rãs em cativeiro atingiu ponto de destaque no panorama aquícola brasileiro, com produção anual média estimada em 200 toneladas. Porém, as dificuldades encontradas no manejo e nas instalações, aliadas aos problemas referentes à ração, vêm preocupando ranicultores e pesquisadores quanto ao futuro da ranicultura como atividade zootecnicamente viável. Os principais pontos que têm atrasado o desenvolvimento da criação de rã são: alimentação e nutrição, doenças e reprodução CULLEY Jr. et al. (1978). Quanto à comercialização da carne de rã, observam-se algumas dificuldades, pois não há continuidade de oferta do produto no mercado, em decorrência de fatores como baixo desempenho produtivo dos animais e fornecimento irregular de ração, entre outros.

Com o desenvolvimento da ranicultura, novas pesquisas na área de nutrição de rãs nas fases aquática e pós-metamórfica foram executadas. Porém, a falta de padronização de metodologias para obtenção de dados consistentes e pouca informação encontrada na literatura sobre alimentos e alimentação, principalmente, para a rã-touro, impediram a formulação de rações compatíveis com as exigências nutricionais desses animais, nas diferentes fases de desenvolvimento. Para alcançar esse objetivo, é preciso, antes, conhecer a biologia do animal e, então, aplicar tais conhecimentos em estudos de nutrição, considerando os ingredientes utilizados na confecção de dietas.

A eficiência de utilização dos alimentos está diretamente relacionada ao processo digestivo, no qual as enzimas têm papel fundamental. Portanto, o conhecimento do perfil enzimático do sistema digestivo da rã-touro permitirá a escolha de ingredientes adequados ao processo metabólico do animal.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a atividade enzimática das enzimas digestivas amilase, lipase e tripsina no intestino delgado da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) pesando entre 3,6 e 200 g.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Digestibilidade de alimentos pela rã-touro

Com o avanço da ranicultura nos últimos anos, ficou evidente a necessidade de encontrar subsídios técnico-científicos para suprir os anseios desta atividade. Assim como em outras produções zootécnicas, os trabalhos sobre nutrição também tornaram-se prioridade na ranicultura.

O nível de proteína utilizado nas formulações de rações comerciais utilizadas para alimentação de rã-touro encontra-se acima de 40%. O pequeno volume de ração demandado para a alimentação desses animais ainda não justifica a participação das fábricas de ração na realização de trabalhos sobre exigências nutricionais destes animais, visto que o comércio de ração para rãs representa uma parcela reduzida do volume total de ração comercializado anualmente no Brasil. As pesquisas geradas pelas Universidades e Institutos de Pesquisa na área de nutrição de girinos e rãs tiveram grande impulso apenas a partir da década de 80, com a introdução de ração (LIMA e AGOSTINHO, 1984) e uso larva de mosca (ALEIXO et al., 1984) como atrativo.

Segundo LIMA et al. (1994), os problemas relacionados com a nutrição e alimentação das rãs, tanto na fase aquática quanto na fase pós-metamórfica, são inexistência de identificação da forma adequada das rações nas diferentes fases de criação; falta de conhecimento das exigências nutricionais das rãs, que leva ao

uso de rações empíricas; além disso, as rações comerciais são produzidas em pequena escala, o que as tornam mais caras e com fornecimento irregular, e o manejo alimentar é muito variado.

LIMA e AGOSTINHO (1988), utilizando ração em forma de farelo na alimentação de rã-touro, encontraram ganho de peso médio de 75,8 gramas e estimativa de conversão alimentar de 6,17:1. O formato do cocho utilizado nesse experimento contribuiu para grandes perdas de ração e, conseqüentemente, aumento no valor de conversão alimentar. Em 1992, esses mesmos autores obtiveram melhores resultados de conversão alimentar (1,50 a 2,00:1,0) com ração de truta em peletes fornecida para rãs na fase de recria. BRAGA et al. (1995) constataram que a rã-touro apresentou resultados de conversão alimentar de 1,22:1 e 1,15:1, nas temperaturas de 25 e 30°C, respectivamente, quando alimentadas com ração de truta extrusada.

Nos trabalhos encontrados na literatura, relacionados com nutrição de rãs, observa-se a utilização de valores quantitativos de energia bruta e proteína bruta (PB) dos alimentos, para avaliar o desempenho dos animais na fase pós-metamórfica. MONTEIRO et al. (1988), que trabalharam com teores de proteína bruta na ração com valores de 25 a 48%, concluíram que a *Rana catesbeiana* requer, no mínimo, 48% de proteína bruta para seu crescimento. Resultados semelhantes foram encontrados por BARBALHO (1991) e STÉFANI (1995), trabalhando com a mesma espécie. Entretanto, WIRZ et al. (1992) não observaram diferenças significativas no ganho de peso da rã-touro alimentada com dietas contendo diferentes níveis protéicos (30, 35 e 40% de PB).

MAZZONI et al. (1992a), utilizando rações isocalóricas com 4.200 kcal/kg de energia bruta (EB) para analisar diferentes níveis de proteína (24, 30, 35 e 36% de PB), constataram que as rãs tiveram melhor desempenho quando alimentadas com ração de maior teor protéico. Em estudos posteriores, avaliando níveis de proteína e energia bruta para rã-touro, MAZZONI et al. (1992b) observaram que a ração contendo 45% de PB e 4.200 kcal/kg de EB proporcionou os melhores resultados de desempenho.

No entanto, sabe-se que, para estabelecer o real valor nutritivo dos alimentos, é necessário proceder a sua análise bromatológica, assim como a sua efetiva utilização pelo organismo animal, avaliada por meio de ensaio de crescimento.

Segundo CASTRO (1996), para os estudos de digestibilidade de alimentos com rã-touro na fase pós-metamórfica, é necessário um período de jejum mínimo de 48 horas antes de proceder à técnica de alimentação forçada. Além disso, devem ser levados em consideração a granulometria e o teor de fibra do alimento, assim como a idade do animal. Com o objetivo de aprimorar a metodologia para determinação dos valores de energia metabolizável (EM) de alimentos, BRAGA (1998) concluiu que a técnica de alimentação forçada deve ser executada em duas etapas, com intervalo mínimo de 48 horas, para eliminar os possíveis erros ocasionados pela retenção de alimento no intestino grosso dos animais.

Nos trabalhos realizados por CASTRO (1998), BRAGA (1998) e CASTRO et al. (1999a e b), alguns alimentos foram avaliados individualmente por meio da técnica de alimentação forçada, utilizando-se a rã-touro na fase pós-metamórfica em duas idades (imago e adulto). Com estes estudos foi possível avaliar o tempo de passagem do alimento no tubo digestivo dos animais, verificar a influência da idade na digestibilidade de alimentos e determinar os valores da energia metabolizável aparente e matéria seca aparentemente metabolizável dos alimentos (Tabela 1).

RIBEIRO FILHO (1999), estudando o desempenho da rã-touro entre 45 e 135 dias de idade, utilizando rações isoprotéicas com 45% de proteína bruta e diferentes níveis de EM (2850, 2950, 3050, 3150 kcal/kg), concluiu que a resposta dos animais alimentados com rações contendo 2950 kcal/kg de EM foi eficiente para ganho de peso, consumo de alimento, conversão alimentar e taxa de sobrevivência.

Tabela 1 - Valores de matéria seca aparentemente metabolizável (MSAM), energia metabolizável aparente (EMA) e energia metabolizável verdadeira (EMV) para rãs adultas

Ingrediente	MSAM (%)		EMA (kcal/kg)		EMV (kcal/kg)	
	A	B	A	B	A	B
Fubá de milho	68,05	62,97	2498	2645	2552	2686
Amido de milho	----	60,06	----	2204	----	2246
Óleo de soja	----	----	----	7358	----	7468
Farelo de soja	75,15	----	2780	----	2857	----
Farelo de trigo	71,16	----	2429	----	2510	----
Farelo de arroz	58,94	----	1452	----	1536	----
Farinha de peixe	82,69	34,97	3217	2242	3313	2352
Farinha de carne	60,10	----	1937	----	2278	----
Larva de mosca	----	56,99	----	3337	----	3498

A- Adaptação de CASTRO (1998).

B- Adaptação de BRAGA et al. (1998).

Estudos sobre o desempenho da rã-touro, avaliando níveis de inclusão de vitaminas C e E (STÉFANI, 1999a), níveis de extrato etéreo (SPERANZA, 1999) e utilização de aglutinantes em rações (STÉFANI, 1999b) demonstram maior refinamento das informações necessárias para se determinarem as exigências nutricionais da rã-touro nas diferentes fases de desenvolvimento.

2.2. Atividade enzimática em organismos aquáticos

A anátomo-fisiologia dos animais aquáticos e pecilotérmicos, como peixes e rãs, apresenta algumas peculiaridades em relação aos animais homeotérmicos. Os peixes e girinos economizam energia em relação aos animais homeotérmicos, pois eliminam nitrogênio na forma de amônia, não necessitando

do ciclo da uréia e, além disso, a pecilotermia lhes conferem alteração da temperatura corporal, de acordo com a temperatura ambiente, evitando o gasto de energia para a homeotermia.

Para garantir que um programa de alimentação tenha êxito, deve-se atentar para todas etapas da nutrição animal. Após a ingestão, o alimento sofrerá alterações físico-químicas ao longo do tubo digestivo, para então ser absorvido e metabolizado de acordo com as exigências do animal. As enzimas digestivas participam diretamente do processo da digestão por intermédio de estímulos neuro-endócrinos. Tais enzimas são secretadas e hidrolisam o alimento com elevado grau de especificidade, de forma que a proteína, o lipídio e o amido são quebrados em moléculas menores para serem absorvidas nos enterócitos, presentes na parede do intestino.

O estudo bioquímico-enzimático das enzimas digestivas torna-se imprescindível para o melhor entendimento da fisiologia da digestão e metabolismo dos nutrientes. Estas informações geram subsídios para os trabalhos na área de nutrição, possibilitando ajustes mais precisos na elaboração de dietas.

Segundo TROYER (1980), existem dois grupos de hidrolases que podem ser detectados histoquimicamente. O primeiro grupo pode ser demonstrado com o uso de substratos de baixo peso molecular, como normalmente se usa nos métodos histoquímicos. No segundo grupo, encontram-se as enzimas que hidrolisam moléculas de alto peso molecular, cujas atividades podem ser demonstradas apenas com o uso de técnicas que utilizam o filme de substrato. Dentre deste grupo de enzimas, encontram-se as proteases.

As principais proteases do trato digestivo são pepsina, tripsina e quimotripsina. A digestão protéica começa no estômago por ação da pepsina, que inicia rapidamente a hidrólise de proteínas pelas ligações peptídicas envolvendo o grupo carboxila de um resíduo aromático (fenilalanina, triptofano ou tirosina) e, de forma mais lenta, em ligações envolvendo outros resíduos. Para que esta enzima possa atuar de maneira efetiva, é necessário que o pH do estômago se mantenha em torno de 2 a 3. Contudo, apenas 10 a 15% das proteínas ingeridas são hidrolisadas neste órgão, sendo o resultado final da ação desta enzima a

produção de polipeptídeos, que sofrerão hidrólise adicional no intestino. As principais proteases encontradas no intestino são a tripsina e quimotripsina. O suco pancreático neutraliza o quimo ácido do estômago, garantindo o pH ótimo para ação destas enzimas no intestino. A enteroquinase presente na borda estriada dos enterócitos é responsável pela transformação do tripsinogênio em tripsina. Além disso, a própria tripsina hidrolisa o tripsinogênio e quimotripsinogênio em tripsina e quimotripsina, respectivamente. A tripsina atua nas ligações peptídicas que envolvem os grupos carboxila da arginina e lisina, enquanto a quimotripsina age, como a pepsina, principalmente nas ligações envolvendo aminoácidos aromáticos (SMITH et al., 1988).

A tripsina e a quimotripsina foi estudada em alguns Teleostei; de acordo com HJELMELAND e JØRGENSEN (1985), a tripsina é, provavelmente, a enzima-chave na regulação e no processo digestivo em peixes jovens. Estes autores relataram a utilização do radioimunoensaio como um método para quantificar tripsina e tripsinogênio em peixes. Os autores concluíram que os melhores resultados foram obtidos com a utilização do radioimunoensaio, juntamente com a técnica de atividade enzimática, em razão da presença de inibidores que, geralmente, não minimizam a ligação entre o anticorpo e a enzima.

SABAPATHY e TEO (1993), estudando a distribuição de enzimas digestivas e suas atividades no tubo digestivo de *Sigamus canaliculatus*, de hábito alimentar onívoro, e de *Latus calcarifer*, carnívoro, relataram a presença de tripsina ao longo do tubo digestivo na espécie onívora, ficando a presença desta enzima restrita ao intestino e cecos pilóricos, na carnívora. Nestas duas espécies também foi observada a capacidade de digestão de carboidratos.

NEVES (1996) detectou a presença de proteases não específicas precocemente no periblasto de larvas de trairão (*Hoplias cf. lacerdae*) e pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). No tubo digestivo, a atividade surgiu no trairão apenas no 15º dia. Não se detectou qualquer atividade no esôfago ou reto destas duas espécies. No trairão, a atividade mais intensa foi observada no intestino anterior, enquanto no pacamã foi maior no intestino posterior, mais precisamente em sua

porção terminal (ampola). No estômago, a atividade ocorreu principalmente na região glandular, mas foi sempre menos intensa do que nos intestinos das duas espécies. Estas observações, aliadas à presença de vitelo remanescente nas larvas que já se alimentavam, permitem inferir que, nestas espécies, o complexo enzimático digestivo se desenvolve precocemente, antes do final das reservas vitelínicas, o que facilita a adaptação destes animais às dietas artificiais. Esta evolução enzimática também foi detectada por RIBEIRO et al. (1999), trabalhando com *Solea senegalensis*. As atividades das enzimas pancreáticas e intestinais deste peixe exibiram um padrão característico do desenvolvimento dos animais: aumento durante os primeiros dez dias após a eclosão e o período entre o 21^o e 27^o dia correspondeu a um forte aumento na atividade da fosfatase alcalina, refletindo o desenvolvimento das membranas da borda em escova, indicando a aquisição do modelo adulto de digestão.

A composição da dieta pode influenciar a liberação e atividade das enzimas digestivas. NAGASE (1964) demonstrou que a atividade da tripsina e da amilase pode ser aumentada com dietas ricas em proteína e amido, respectivamente, não existindo adaptação para a lipase e pepsina. ONISHI et al. (1976) relataram mudanças nos níveis de protease e amilase, em carpa, após alimentação, comparando a frequência da administração do alimento. Os autores relataram, ainda, que a atividade da amilase acompanhou esse período, havendo, contudo, decréscimo temporário após cada alimentação. Por outro lado, REIMER (1982), estudando a adaptação das atividades das enzimas digestivas de *Brycon metanoptorus*, concluiu que a atividade da amilase, tripsina e lipase pode ser aumentada com dietas ricas em carboidratos, proteínas e gorduras, respectivamente; porém, a pepsina não mostrou mudanças da atividade com a dieta. Estes resultados são corroborados por CAHU et al. (1994), que verificaram aumento da atividade da amilase em larvas de “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*) alimentadas com dietas contendo 12% de amido, em relação às larvas que receberam alimento vivo.

O efeito da dieta na atividade das enzimas digestivas também foi encontrado em larvas de *D. labrax*, em um experimento executado por CAHU et

al. (1998), que sugeriram a presença de algas vivas na alimentação como ponto chave para o início das funções hidrolíticas das enzimas, assim como para o desenvolvimento das membranas na borda em escova do intestino delgado. Para o “goldfish” (*Carassius auratus*), a atividade da tripsina, três semanas após a eclosão, foi superior em larvas alimentadas com dieta contendo (50%) nauplios de *Artemia nauplii* e (50%) de ração, em comparação aos animais do tratamento contendo apenas nauplios (ABI-AYAD e KESTEMONT, 1994). De acordo com os autores, após este período, as larvas tinham desenvolvido completamente o trato alimentar, não sendo mais dependente das enzimas do alimento vivo e, dessa forma, puderam aproveitar melhor a proteína contida na ração. SEIXAS FILHO et al. (2000b), estudando a atividade enzimática da tripsina em piracanjuba (*Brycon ornignyanus*) e piauí (*Leporinus friderici*), onívoros, e surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*), carnívoro, concluíram que a atividade da tripsina foi semelhante nas duas últimas espécies, sugerindo que o surubim utiliza outras proteases, com mais intensidade, na digestão de proteínas. Os autores afirmaram, ainda, que a baixa atividade de tripsina no quimo do piracanjuba pode ser pelo hábito alimentar onívoro, com predominância a herbívoro desta espécie.

Em um experimento realizado por ZAMBONINO-INFANTE et al. (1997), utilizando larvas de “sea bass” (*D. labrax*), alimentadas com dietas isoenergéticas e isoprotéicas, com três níveis de substituição (0, 20 e 40%) da farinha de peixe previamente hidrolisada (75% di- e tripeptídios), observaram que o crescimento e a sobrevivência larval foram maiores nos tratamentos com 40% de substituição. A atividade da quimotripsina foi superior nos grupos alimentados com a farinha de peixe hidrolisada, indicando alta capacidade proteolítica do pâncreas. Em nível intestinal, as atividades das enzimas da borda em escova, aminopeptidase, maltase e γ -glutamil transpeptidase, aumentaram com a idade dos peixes.

MUKHOPADHYAY e ROUT (1996), avaliando os efeitos da suplementação de lipídio (óleo de girassol e óleo de bacalhau) em dietas isoprotéicas (43%PB) e isoenergéticas para carpa (*Catla catla*), verificaram que a

atividade da lipase intestinal foi significativamente maior nos peixes alimentados com a mistura das duas fontes de óleo em relação aos peixes que receberam as fontes isoladamente ou que não tinham óleo na dieta, sugerindo alto *turnover* lipídico no primeiro grupo. Para outra espécie de carpa (*Ciprinus carpio*), alimentada no período larval (até 21 dias) com dietas contendo níveis crescentes (20, 60 e 70%) de concentrado protéico de soja (CPS), verificou-se que a atividade específica da tripsina nas larvas decresceu com níveis de 60 e 70% de CPS, enquanto para amilase não se observou alteração (ESCAFFRE et al., 1997).

BASSOMPIERRE et al. (1998), estudando três fenótipos (iso-tripsinas) de salmão (*Salmo solar*), com base no desempenho dos peixes e na digestão *in vitro* da farinha de peixe processada sob três formas, verificaram que tais peixes apresentaram sensibilidades diferentes com relação à fonte protéica e, por isso, alterações dos ingredientes das rações comerciais podem influenciar diretamente o desempenho dos animais.

KAWAI e IKEDA (1973), trabalhando com larvas e juvenis de truta arco-íris, *Salmo gairdnerii*, investigaram o desenvolvimento das atividades de proteases, maltase e amilase no tubo digestivo dos peixes, após a eclosão e na fase de juvenis. Esses autores (1973) observaram alta atividade de protease nos ovos e grande decréscimo após a eclosão, sugerindo importante papel dessa enzima nesta fase. Por outro lado, a atividade trípica não apresentou mudanças significativas antes ou depois da eclosão. Contudo, 20 dias após, quando as larvas já haviam absorvido quase todo o vitelo e tendo começado a se alimentar, as atividades da tripsina e quimotripsina aumentaram consideravelmente, e no 60º dia estas enzimas apresentaram aumento gradual e semelhante.

Estudos anteriores com outros Teleostei demonstraram que a maior atividade da lipase acontece no final da porção anterior do intestino e diminui gradualmente em direção à sua porção final (AL-HUSSAINI, 1949). A atividade da lipase também foi maior no tubo intestinal de “catfish”, *Clarias batrachus* (MUKHOPADHYAY, 1977). VONK (1937) sugeriu que a presença da lipase no intestino se deve ao fato da possível adsorção das enzimas pancreáticas na mucosa intestinal. Contudo, mais recentemente, estudos histoquímicos

demonstraram que a mucosa intestinal de vários peixes Teleostei é capaz de secretar lipase (SASTRY, 1974). BORLONGAN (1990) relatou que a lipase é amplamente distribuída no tubo digestivo de “milkfish”, porém é maior nos extratos intestinais, com a porção anterior tendo maior atividade que a porção posterior. Este autor detectou quantidade significativa da atividade desta enzima em extratos do esôfago de “milkfish”, indicando um papel mais ativo desse órgão no processo digestivo. Também relatou que os maiores sítios de secreção de lipase no tubo digestivo de “milkfish” foram intestinos, pâncreas e cecos pilóricos e que a atividade da lipase intestinal foi máxima a 45°C, em pH 6,8 e 8,0, e da lipase pancreática a 50°C, em pH de 6,4 e 8,6.

Com relação à amilase digestiva, KITAMIKADO e TACHINO (1960) encontraram níveis menores dessa enzima em trutas arco-íris do que em carpa. FISH (1960) relatou que a atividade da amilase no tubo digestivo de tilápia foi muito maior que em perca. SPANHOF e PLANTIKOW (1983), trabalhando com truta arco-íris, observaram que a inclusão, na dieta, de produtos como amido solúvel aumentou o volume dos sucos intestinais e o nível de açúcar no sangue, assim como induziu a um prolongado aumento na atividade da amilase nos sucos intestinais. Por outro lado, a utilização do amido bruto na dieta reduziu a atividade da amilase nos sucos intestinais, diminuindo a hidrólise do amido. Ainda, a presença de amido na dieta acelera a passagem do quimo pelo intestino, reduzindo o tempo viável para sua digestão e absorção. Os mesmos autores, em 1983, sugeriram que esses efeitos são considerados importantes causas para baixa digestibilidade dos produtos de amido polimerizados.

Segundo SEIXAS FILHO et al. (1999), a diferença observada na atividade específica da amilase pancreática do piau e piracanjuba pode ter sido devido à morfometria e ao complexo arranjo de pregas da mucosa dos intestinos médios e posterior. Além disso, a atividade de amilase do surubim indica a possibilidade de uso de ração contendo carboidratos.

Informações a respeito do estudo da atividade enzimática em anfíbios são escassas na literatura. O pepsinogênio de algumas espécies desse grupo tem sido isolado, purificado e caracterizado. Informações sobre o peso molecular, a

composição aminoacídica e a posição dos sítios ativos têm sugerido homologia para tais zimógenos. Detalhe de seqüências aminoacídicas e estudos de cristalografia em raio-X têm suportado esta homologia através das estruturas primária, secundária e terciária similares dos pepsinogênios de anfíbios e de outras espécies (SHUGERMAN et al., 1982).

A evolução homóloga dos pepsinogênios foi melhor avaliada, em Anura, ao se isolar e caracterizar o pepsinogênio das glândulas esofágicas de *Rana catesbeiana*. Como outros pepsinogênios, este foi ativado pelo ácido clorídrico; a pepsina resultante teve atividade ótima entre pH 1,4 e 2,0 e foi irreversivelmente desnaturada a um pH igual a 7,0. As propriedades dos pepsinogênios gástrico e esofágico de rã-touro sugerem que estes têm origem ancestral comum (SHUGERMAN et al., 1982).

MIRALLA et al. (1994), avaliando a secreção de pepsina em *R. catesbeiana* nas diferentes estações do ano, concluíram que, no período de inverno, a concentração basal de pepsina diminui significativamente, sendo máxima no verão. Estudos *in vitro* com a mucosa gástrica desses animais, realizados por MARRONI et al. (1993), demonstraram que ocorre variação sazonal na secreção basal nas diferentes estações do ano e os maiores níveis de ácido foram encontrados no inverno. Neste mesmo período, houve redução significativa na secreção ácida, quando as rãs foram submetidas ao estresse osmótico.

Dois tipos de proteinases ácidas foram isolados em rã-touro por INOKUCHI et al. (1991 e 1994), sendo que o primeiro ocorre no esôfago e estômago e foi identificado como enzima do tipo pepsina. O segundo tipo de enzima existe tanto na larva quanto adulto e foi caracterizado como catepsina E. Os mesmos autores (1995) isolaram dois tipos de pepsinogênio da mucosa gástrica da rã-touro, os quais apresentaram diferenças na composição aminoacídica, imunogenicidade, seqüência do NH₂ terminal e sensibilidade à pepstatina. YAKABE et al. (1991) purificaram dois tipos de pepsinogênio da mucosa esofágica de *R. catesbeiana* e concluíram que são imunologicamente

indistiguíveis entre si e também quando comparados com o pepsinogênio humano, tendo o mesmo mecanismo de ativação.

STÉFANI (1996), trabalhando com rações isoprotéicas (30%PB) e isoenergéticas (4300 kcal/kg) com porcentagens crescentes de inclusão de carboidratos (35, 40 e 45%), constatou que a rã-touro, recebendo 35% de carboidrato apresentou maior porcentagem de proteína bruta na carcaça. A autora observou, ainda, que este animal utiliza o carboidrato como fonte de energia, sendo a proteína destinada para o crescimento corporal. Além disso, pôde-se inferir sobre a atividade amilásica desse animal na fase pós-metamórfica. No tocante à influência da dieta na estocagem de reservas energéticas, FARRAR e DUPRE (1983) verificaram que o conteúdo de glicogênio se eleva nos períodos precedentes ao inverno em *R. catesbeiana*, quando o animal está consumindo alimento. Nesse período, com o metabolismo elevado, as enzimas digestivas estão sendo liberadas para atuarem na digestão dos alimentos, garantindo o suprimento de carboidratos e lipídios utilizados para reserva energética do animal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais, instalações e manejo

Foram utilizados 320 exemplares de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) (Amphibia, Anura, Ranidae), provenientes do setor de recria do ranário Experimental do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram selecionados ainda na fase de girinos, sendo efetuado todo o trabalho de rotina de alimentação, triagem dos animais e troca de água ao longo desse período. As instalações e o manejo utilizados seguiram aqueles relatados por LIMA e AGOSTINHO (1992) para o sistema anfigranja.

Ao término do processo da metamorfose, quando os imagos estavam aptos para serem transferidos para o setor de recria, foi efetuada a última triagem para uniformização do peso do lote. Posteriormente, cada grupo de 80 animais com peso médio de 3,6 gramas foi alojado em quatro baias-teste suspensas, localizadas em salas com temperatura ambiente controlada ($27\pm 1,0^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas de luz. Para garantir maior conforto aos animais, foi colocado na parte seca do piso, área entre os cochos e a piscina, um tecido de algodão, o qual era umedecido diariamente. Este procedimento foi realizado durante as duas primeiras semanas do experimento.

Utilizou-se uma ração comercial extrusada (Tabela 2), fornecida *ad libitum* nos cochos, juntamente com larvas de *Musca domestica*, para estimular e condicionar as rãs ao consumo de alimento. Inicialmente, a quantidade de larvas oferecida foi de 30% do peso da ração, sendo reduzida gradativamente durante um período 30 dias até alcançar um valor de 5%. As trocas de alimento e água foram feitas diariamente pela manhã e semanalmente se efetuava uma limpeza mais criteriosa utilizando água e vassoura.

Tabela 2 - Composição e análise bromatológica da ração comercial

Composição básica	Eventuais substitutos
Farelo de soja	Farelo de arroz desengordurado
Quirera de arroz	Farelo de gérmen de trigo
Gordura animal estabilizada	Farelo de milho
Vísceras	Farinha de ossos calcinados
Farinha de carne (50%PB)	Fosfato bicálcico
Farinha de peixe (60%PB)	Óleo de peixe refinado
Protenose	Triguilho
Calcário calcítico	
Premix mineral ¹	
Premix vitamínico ²	
Protenose	
Análise bromatológica	
Matéria seca (%)	94,37
Energia bruta (kcal/kg)	4533
Proteína bruta (%)	42,04
Extrato etéreo (%)	9,72
Fibra bruta (%)	4,99

¹ Níveis de garantia por kg da ração: Mn, 80 mg; Z, 50 mg; Cu, 8 g; I, 3 mg; Fe, 60 mg

² Níveis de garantia por kg da ração: Vit A, 17000 UI; Vit E, 125 mg; Vit B₁, 20 mg; Vit B₂, 30 mg; Vit B₆, 20 mg; Vit C, 450 mg; Pantonato de cálcio, 80 mg; Vit D₃, 2500 UI; Ác. fólico, 2 mg; Colina, 2000 mg; Vit B₁₂, 10 mcg; Vit PP, 120 mg; Selênio, 0,30 mg; BHT, 170 mg.

3.2. Coleta e preparo do material

Para execução das análises de atividade enzimática de tripsina, amilase e lipase, três rãs foram amostradas das baias-teste em intervalos previamente estabelecidos, de modo a se obterem grupos de animais em diferentes faixas de peso ao longo de toda fase de desenvolvimento (Figura 01). Nos primeiros dez dias, as coletas do conteúdo do intestino delgado foram realizadas diariamente e, durante o restante do período experimental (77 dias), foram realizadas mais 19 coletas em intervalos crescentes, ou seja, cinco coletas para cada intervalo de dois, três e quatro dias, respectivamente, e quatro coletas com intervalos de oito dias. A última coleta correspondeu ao dia em que foi coletada a primeira rã com peso superior a 200 gramas, que corresponde ao peso comercial adotado pelos ranicultores.

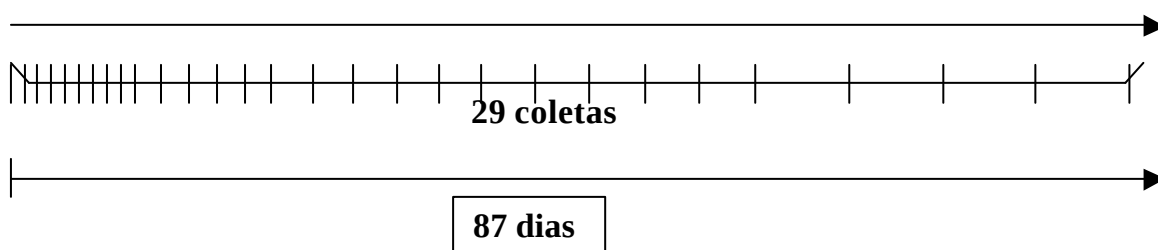


Figura 1 - Intervalos de coleta do conteúdo intestinal das rãs durante 87 dias de experimento.

Após a identificação, pesagem e insensibilização em água e gelo a 0°C, as rãs sofreram incisão longitudinal ventral para exposição das vísceras e isolamento do tubo digestivo, fazendo-se ligaduras duplas nas porções cranial e caudal do intestino delgado, para evitar perdas do quimo a ser coletado e analisado. Em seguida, efetuou-se a extirpação do intestino delgado e, com o auxílio de pinça e tesoura, retirou-se todo conteúdo deste órgão, o qual foi empacotado em papel alumínio, identificado com data de coleta, peso do animal, número da repetição e tipo de órgão.

Com o objetivo de garantir adequada interpretação dos resultados de atividade enzimática, fazia-se a retirada do quimo do intestino delgado apenas dos animais cujo estômago estava repleto de alimento, ou seja, a presença de alimento no estômago em quantidades similares entre as rãs sacrificadas assegurava proximidade do período de alimentação e sincronia na secreção e atuação das enzimas. Para paralisar qualquer tipo de reação após cada coleta, todo material devidamente embalado foi imerso em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer com temperatura de -40°C . No laboratório, todas as amostras foram liofilizadas e mantidas em freezer com temperatura de -20°C . As análises de atividade enzimática da tripsina, amilase e lipase foram realizadas no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO)-UFV.

3.3. Determinação da atividade da tripsina

Para a preparação das amostras do quimo, foi tomado 1 mg do material liofilizado e acondicionado em tubos plástico, dissolvido em 0,5 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi centrifugada a $35.000 \times g$, a 4°C , por 20 minutos. Posteriormente, uma alíquota do sobrenadante foi retirada para a determinação da atividade enzimática da tripsina.

A determinação da atividade da tripsina foi realizada pelo método descrito por ERLANGER et al. (1961), utilizando-se 500 μL Benzoil-D, L-Arginina p-Nitroanilida (D, L-BApNA) como substrato. Tomaram-se 300 μL da amostra, ou de seu solvente no caso do tubo controle, e acrescentaram-se 500 μL da solução do substrato $6,38 \times 10^{-4}$ M em tampão TRIS-HCl 0,10 M, pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl_2 e 1,0% de dimetilformamida, previamente equilibrada a 25°C . As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorção a 410 nm, em função do tempo, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o produto.

3.4. Determinação da atividade da amilase

A determinação baseia-se na hidrólise do amido pela amilase, com liberação de moléculas de glicose e dextrina. Pela adição de iodo, o amido não hidrolisado adquire coloração azul. A atividade de amilase é inversamente proporcional à intensidade de cor azul, sendo calculada pela comparação com um controle de substrato. A leitura de cor desenvolvida é realizada em 660 nm, em que apresenta maior estabilidade.

Para a preparação da amostra, foi retirado 1 mg do material previamente liofilizado, transferido para um tubo de tubos plástico de 1 mL e, em seguida, adicionou-se 0,5 mL de água deionizada. Após a agitação por cinco minutos, a mistura foi centrifugada a 7000xg por 10 minutos.

A análise da atividade da amilase foi feita utilizando-se o Kit enzimático da BIOCLIN, segundo a metodologia de CARAWAY (1959), modificada conforme descrição a seguir. Em tubos previamente identificados (controle e teste), foram adicionados 250 µL do reagente nº 1. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por dois minutos. Uma alíquota de 10 µL do material a ser analisado foi colocada apenas no tubo-teste, que foi agitado e novamente levado ao banho-maria a 37°C durante exatamente sete minutos e trinta segundos. Este procedimento também foi feito com o tubo controle. Decorrido este tempo, foram adicionados a ambos os tubos 250 µL de reagente de trabalho e 2 mL de água deionizada. Após agitação, as absorbâncias dos tubos controle e teste foram determinadas a 660 nm em espectrofotômetro DU-70 BECKMAN. O aparelho foi zerado com água destilada e para quantificar a atividade da amilase foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Unidades de Amilase/dL} = \frac{\text{Abs (Controle)} - \text{Abs (Amostra)}}{\text{Abs (Controle)}}$$

Uma unidade de amilase representa a quantidade da enzima que hidrolisa totalmente 10 mg de amido em 30 minutos a 37°C.

3.5. Determinação da atividade da lipase

A lipase atua hidrolisando os ésteres de glicerol, contendo ácidos graxos de cadeias longas (triacilgliceróis) em diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres. Durante a reação o substrato, em meio tamponado e estabilizado, adquire forma emulsionada (micelas), formando interfaces lipídio-água necessárias à ação da lipase, que, em presença do ácido ditionitrobenzóico, desenvolve uma coloração amarela, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da enzima.

Para análise da atividade da lipase foi utilizado o Kit enzimático da BIOCLIN. Tubos de ensaio correspondentes ao número de amostras a serem analisadas, incluindo as repetições, foram identificados como teste e os referentes ao branco, como controle. Foram colocados nos tubos controle e teste 500 µL do reagente nº1 (tampão) e 25 µL da amostra cuja preparação seguiu o procedimento descrito para análise da atividade da amilase. Em seguida, 25 µL do Inibidor Enzimático nº2 foram introduzidos apenas no tubo Teste e, na seqüência, 50 µL do Reagente de cor nº3 foram colocados em ambos os tubos. Após a mistura dos reagentes, os tubos foram levados à banho-maria a 37°C por dois minutos, para equilibrar a temperatura. Posteriormente, foram adicionados 50 µL do Reagente nº 4 (substrato) no tubo teste e, após nova mistura, os tubos foram novamente incubados a 37°C, sendo o tempo cronometrado por trinta minutos. Por último, foi introduzido 1,0 mL do Reagente nº 5 (acetona-PA) em todos os tubos, que, após homogeneização, foram levados ao espectrofotômetro DU-70 BECKMAN para determinação das absorvâncias a um comprimento de onda de 410 nm. O aparelho foi zerado com água destilada. Para os cálculos de atividade da lipase, foi utilizada equação a seguir:

$$\text{Lipase (UI)} = \frac{\text{Abs (Amostra)} - \text{Abs (Controle)}}{7} \times 1000$$

em que

Abs (Amostra) = absorvância da amostra obtida em espectrofotômetro; e

Abs (Controle) = absorvância do controle obtida em espectrofotômetro.

3.6. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína da amostra foi determinada utilizando a metodologia descrita por WARBURG e CHRISTIN (1941). Para obter os valores de atividade específica das enzimas digestivas no quimo, o valor da atividade de cada enzima foi dividido pelo valor da concentração de proteína obtido da respectiva amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade da tripsina utilizando ração comercial

Os valores médios ($n=3$) de atividade da tripsina no quimo da rã-touro encontram-se na Figura 2. A atividade da tripsina foi verificada desde o primeiro dia de coleta do quimo, evidenciando que a rã-touro tem capacidade de digerir a proteína imediatamente após a finalização do processo da metamorfose. Esta informação está coerente com o hábito alimentar desta espécie (considerada carnívora), que se alimenta preferencialmente de pequenos animais, como insetos e larvas, em condições de natureza.

Do 1^o ao 8^o dia, o valor da atividade da tripsina apresentou tendência crescente até atingir $366,96 \text{ nM.s}^{-1}$, com taxa de crescimento de $46,92 \text{ nM.s}^{-1}$ por dia. A partir deste ponto até o 18^o dia, com os imagos pesando 12,0 g (Figura 3), a tripsina manteve sua capacidade de hidrólise estável atingindo média igual a 379 nM.s^{-1} . Ainda no período considerado recria inicial, entre o 18^o e 32^o dia, os imagos apresentaram um segundo período de estabilidade para atividade desta enzima, cujo valor médio foi de 486 nM.s^{-1} , ou seja, 28% maior que o primeiro período. Entre o 35^o e 55^o dia de experimento, foi detectada grande variação nos valores de atividade da tripsina, que teve seu máximo ($611,57 \text{ nM.s}^{-1}$) registrado no 35^o dia. Este valor foi 92,77% maior do

que o menor valor deste período ($317,26 \text{ nM.s}^{-1}$), no qual as rãs estavam iniciando um aumento na velocidade de crescimento, passando de 44,21 para 85,23 g em 20 dias. Isto pode ser explicado pela possível variação ocorrida na quantidade de ração ingerida, assim como pelo intervalo de tempo entre a alimentação e o momento da coleta do quimo, o que confere valores variáveis à velocidade da atividade enzimática.

Do 63^o dia até o final do experimento, com as rãs adultas passando de 98,06 para 171,10 g em 26 dias, foi verificado aumento gradativo nos valores de atividade da tripsina, que passaram de 492,04 para 557,20 nM.s^{-1} . Este período correspondeu ao de maior atividade para tripsina, com valor médio de $524,10 \text{ nM.s}^{-1}$, e as rãs tiveram ganho de peso médio diário de 3,38 g, contra 0,67 e 1,07 g/dia observados no primeiro e segundo períodos de estabilidade, respectivamente.

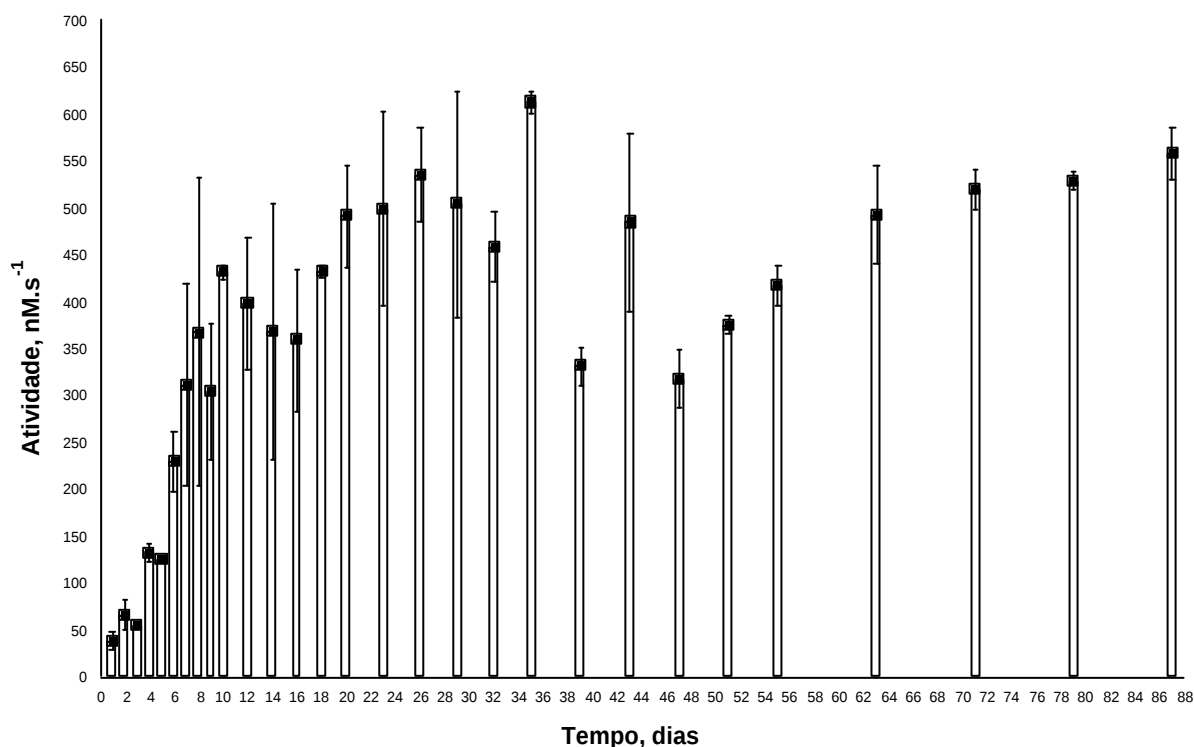


Figura 2 - Perfil da atividade da tripsina do quimo de rãs alimentadas com ração comercial.

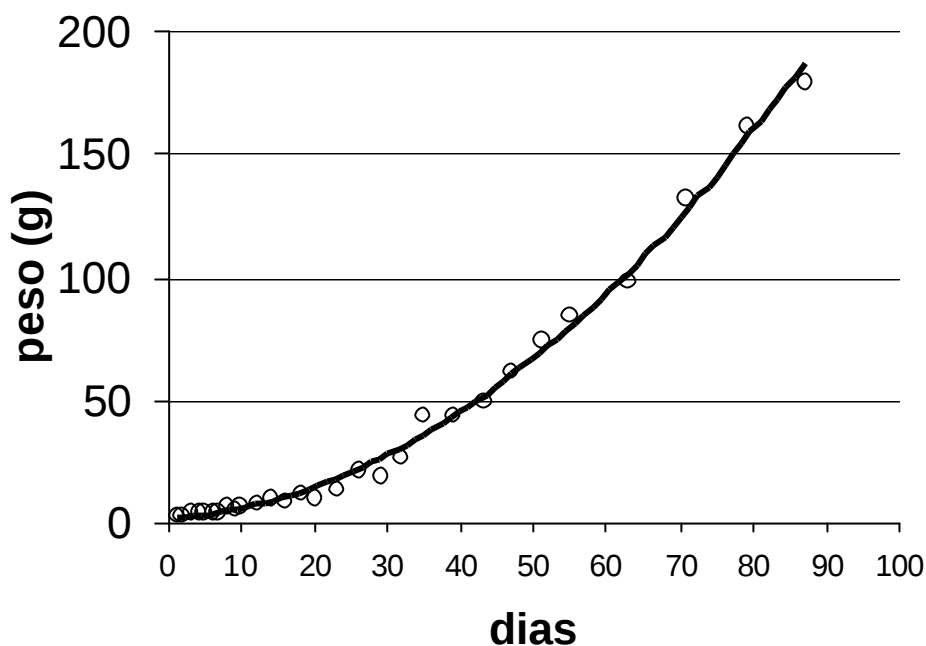


Figura 3 - Ganho de peso da rã-touro, durante 87 dias de experimento, alimentada com ração comercial.

Na Figura 4, encontram-se os valores de atividade específica da tripsina no quimo da rã-touro. Do 1º ao 12º dia, a atividade específica da tripsina no quimo variou de 100,39 a 1389,76 $\text{nM.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, ou seja, em 11 coletas realizadas foi registrada evolução da atividade específica desta enzima, a uma taxa de 107 $\text{nM.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}/\text{dia}$. O primeiro período de estabilidade da atividade específica da tripsina foi encontrado entre o 14º e 35º dia, com média de 826 $\text{nM.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, o que equivale a 57% do valor máximo observado durante as primeiras 11 coletas.

Do 39º dia, quando os animais apresentaram peso médio de 43 g, até o último dia do experimento, ocorreram oscilações nos valores da atividade específica da tripsina, cuja média foi de 878 $\text{nM.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. Este valor foi ligeiramente superior ao verificado no período entre o 14º e o 35º dia. A média encontrada a partir do sétimo dia até o final do experimento em todo período (890 $\text{nM.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) foi inferior ao relatado por SEIXAS FILHO et al. (2000b), quando trabalharam com surubim e obtiveram média de 1623 $\text{nM.s}^{-1}.\text{mg}^{-1}$.

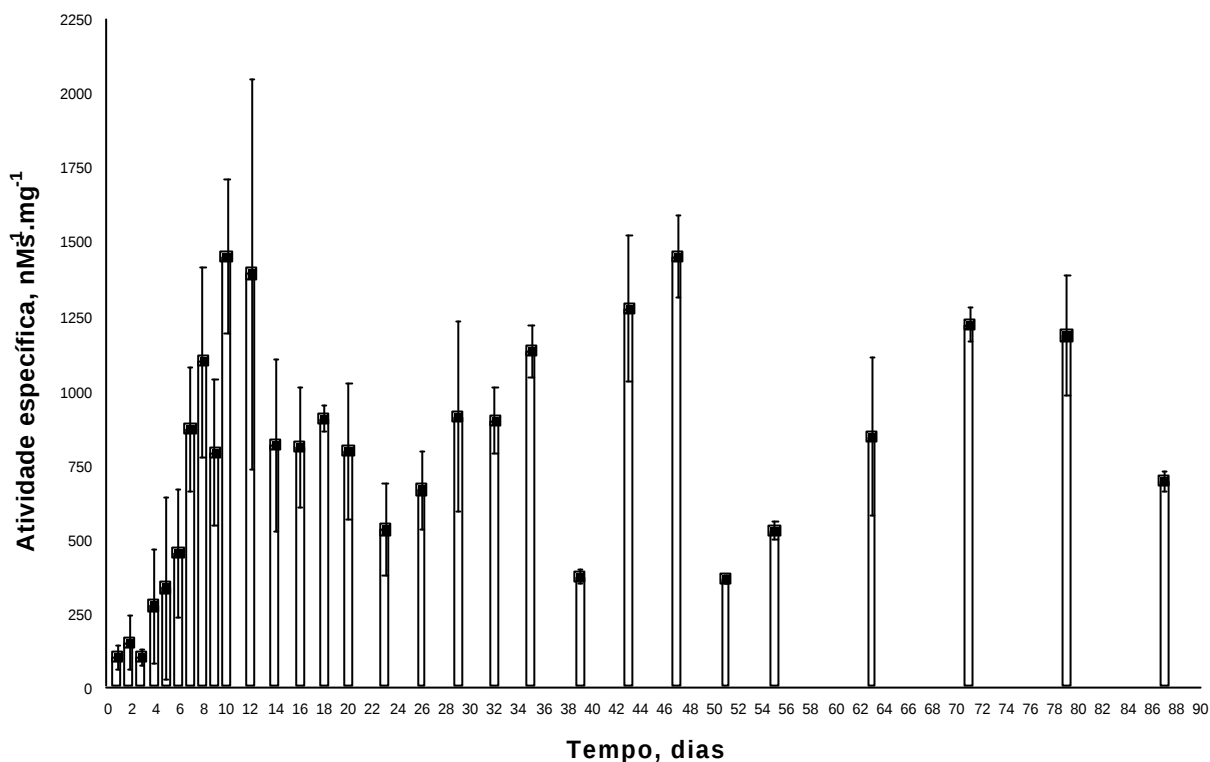


Figura 4 - Perfil da atividade específica da tripsina do quimo de rãs alimentadas com ração comercial.

Os valores médios de atividade trípica, em função do peso da rã-touro, são mostrados na Figura 5. A atividade da enzima foi crescente até o 7^o dia, quando foi detectado valor de 64,67 nM.s⁻¹.g⁻¹, com os animais pesando 4,41 g. Pode-se inferir que, nesta fase inicial, a secreção e atividade da tripsina dos imagos estavam sendo ajustadas em função do tempo, pois neste intervalo de sete dias o ganho de peso foi apenas de 0,81 g. Do 7^o ao 35^o dia, ocorreu inversão do comportamento da atividade da tripsina, em função do peso das rãs, ou seja, os valores decresceram a uma taxa média de 1,83 nM.s⁻¹.g⁻¹/dia, chegando ao valor de 13,40 nM.s⁻¹.g⁻¹. A capacidade de hidrólise das ligações peptídicas relacionadas à atuação da tripsina atingiu a estabilidade a partir do 39^o dia e manteve-se até o final do experimento com média de 5,03 nM.s⁻¹.g⁻¹. Nesse intervalo de 48 dias, as rãs tiveram ganho de peso de 135 g, enquanto na fase de ajuste da atividade da enzima foi apenas de 39,98 g.

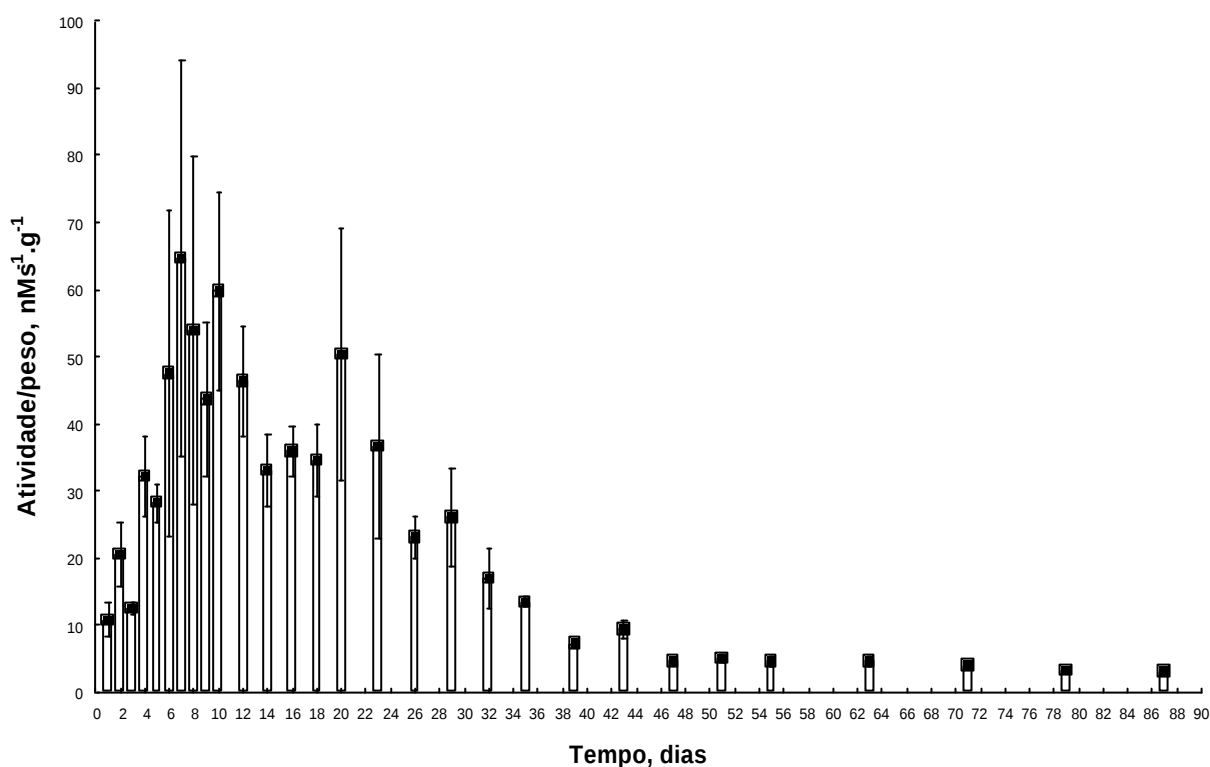


Figura 5 - Perfil da atividade da tripsina em relação ao peso das rãs alimentadas com ração comercial.

4.2. Atividade da amilase utilizando ração comercial

Na Figura 6 estão apresentados os valores médios de atividade da amilase no quimo da rã-touro ao longo dos 87 dias de experimento. Nos dois primeiros dias de coleta, não foi encontrada atividade de amilase, provavelmente devido à incapacidade da rã em secretar a enzima. O início do experimento coincidiu com o final da metamorfose, o que representa, entre outras mudanças anatômicas e fisiológicas ocorridas, o desenvolvimento do aparelho digestivo das rãs.

De acordo com as observações, a atividade da amilase na rã-touro foi evidenciada a partir do terceiro dia de coleta do quimo, com valor de 74,02 UI. Houve aumento da atividade até o quinto dia, cujo valor foi igual a 129,54 UI, equivalente a 175% do observado no primeiro dia. A média encontrada entre o quarto e o sexto dia (121,44 UI) foi próxima ao valor médio estabelecido entre 7^º e 87^º dia de experimento (137,44 UI), mostrando que o aparato enzimático para

secreção de amilase estava totalmente formado e a enzima, em plena capacidade de hidrólise, quando as rãs, ainda consideradas imagos, atingiram peso médio de 4,35 g, como pode ser observado na Figura 3. Isto pode ser confirmado ao se analisar a atividade em todo o período experimental, ou seja, durante as 29 coletas efetuadas, em apenas quatro oportunidades foram observados valores abaixo de 100 UI e por sete vezes foram encontrados valores de atividade superiores a 150 UI, que se concentraram entre o 8^o e 32^o dia de experimento.

Nas dez últimas coletas, realizadas do 35^o dia, com as rãs pesando 44,12 g, até o último dia, o valor médio da atividade da amilase no quimo foi de 122 UI. Esta informação confirma que as rãs estavam preparadas para digerir alimentos constituídos de amido desde a fase inicial de imago, permanecendo a velocidade de atividade da amilase estável em todo período restante até o animal atingir 179,1 g, com crescimento médio diário de 2,04 g. A capacidade da rã-touro em digerir e utilizar carboidratos provenientes da dieta já havia sido mencionada por STÉFANI (1996), o que demonstra um efeito economizador da proteína para obtenção de energia. Este fato pode ser confirmado nos trabalhos realizados por BRAGA et al. (1998) e CASTRO (1999a e b), que mediram os valores nutritivos de diversos alimentos de origem vegetal para rãs com peso médio de 25 g.

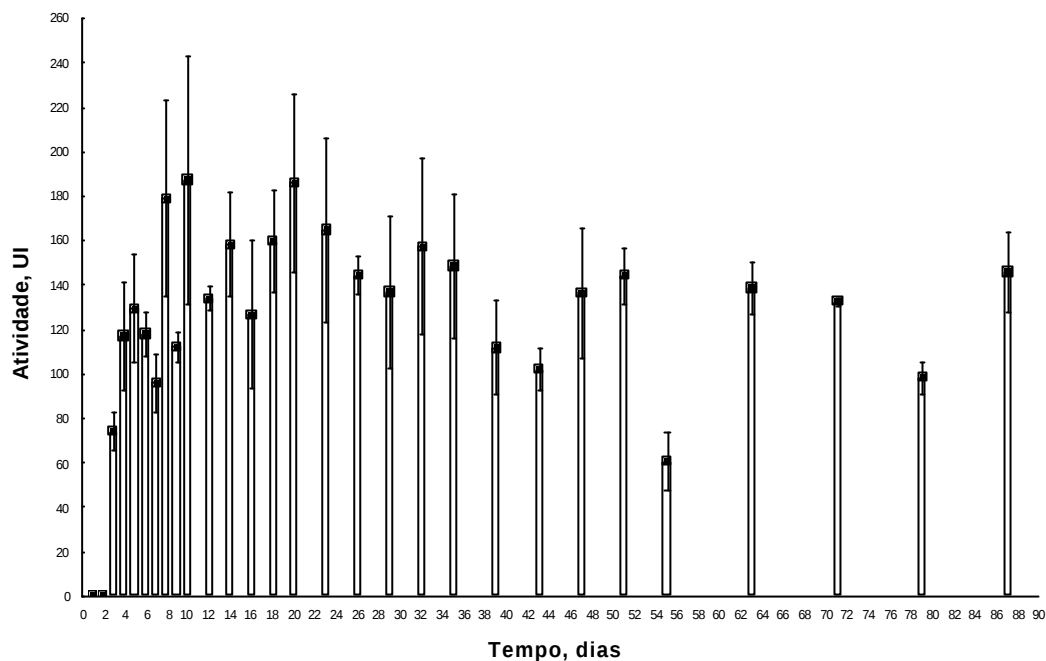


Figura 6 - Perfil da atividade da amilase do quimo de rãs alimentadas com ração comercial.

A atividade específica da amilase coletada no quimo das rãs está ilustrada na Figura 7. Analisando estes dados, notam-se duas fases de estabilidade distintas, sendo a primeira localizada entre o 2º e 9º dia, com valor médio foi de 7519 UI.mg^{-1} . Na outra fase, caracterizada por 20 coletas ocorridas durante 77 dias, registrou-se a média de 14688 UI.mg^{-1} , com aumento de 95% em relação à primeira fase. Este comportamento reforça as informações obtidas com a atividade da amilase, que teve sua estabilidade evidenciada ainda na fase de imago.

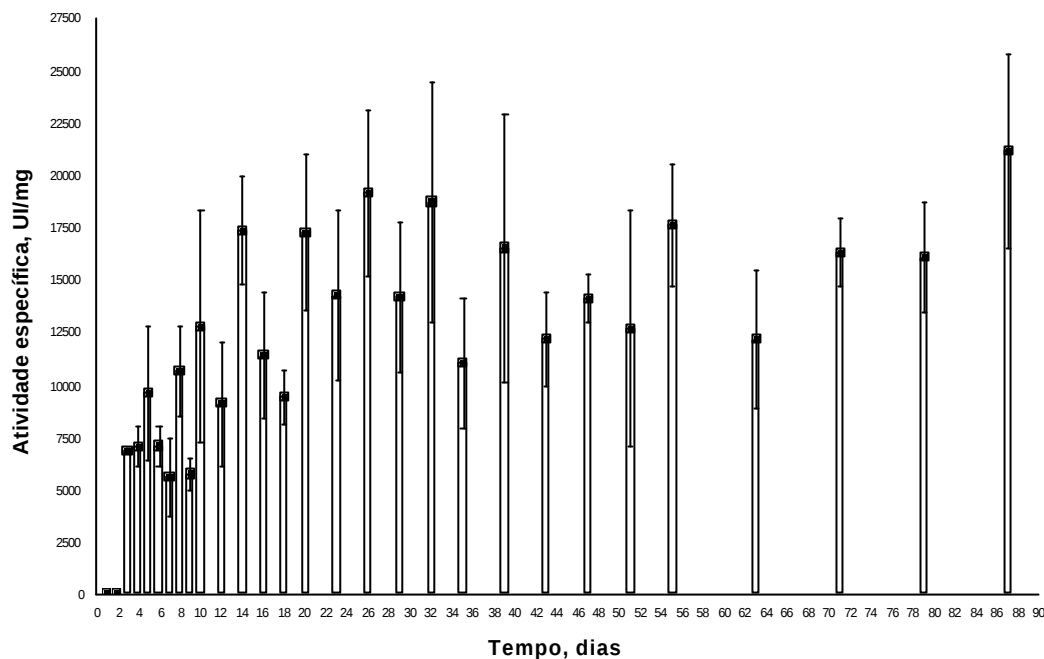


Figura 7 - Perfil da atividade específica da amilase do quimo de rãs alimentadas com ração comercial.

Os dados de atividade da amilase, em função do peso das rãs, estão apresentados na Figura 8. Ao analisar os dados, pode-se constatar diminuição nos valores deste parâmetro, à medida que as rãs ganharam peso, sendo destacados dois momentos com inclinações diferentes para esta redução. Na primeira etapa correspondida por 19 coletas feitas durante os primeiros 32 dias, a atividade da amilase em função do peso das rãs teve seu valor máximo (29,12 UI/g) no quarto dia de experimento, com as rãs pesando 3,98 g, e, na sequência, a taxa de redução diária foi de 0,83 UI/g até alcançar 5,84 UI/g. A segunda e última etapa de redução da atividade, em função do peso dos animais, aconteceu a partir do 35^o dia, com velocidade menor que na primeira etapa. Neste período de 52 dias, constatou-se diminuição de 0,05 UI/g por dia até atingir valor de 0,68 UI/g no 87^o dia. Com isto, pode-se verificar que, no período no qual as rãs tiveram maior crescimento, a velocidade da atividade desta enzima permaneceu estável,

demonstrando que esta espécie possui a secreção de amilase já estabelecida na fase inicial de desenvolvimento, com o peso dos animais inferior a 45 g.

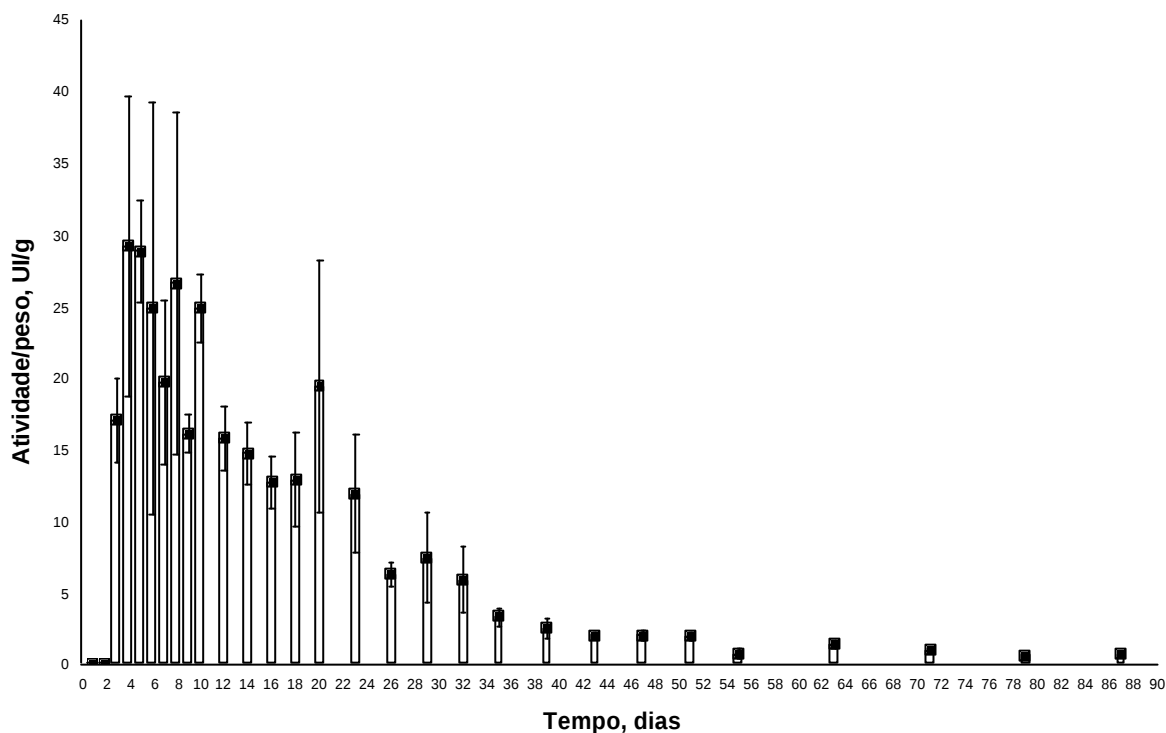


Figura 8 - Perfil da atividade da amilase em relação ao peso das rãs alimentadas com ração comercial.

4.3. Atividade da lipase utilizando ração comercial

Na Figura 9 estão ilustrados os valores médios da atividade da lipase no quimo da rã-touro alimentada com ração comercial durante 87 dias. A exemplo da amilase, não foi constatada atividade desta enzima nos dois primeiros dias de experimento. A hidrólise dos lipídios provenientes da dieta foi evidenciada a partir do terceiro dia, com os imagos pesando 4,25 g e valor de atividade igual a 3,46 UI. Este comportamento permaneceu constante até o 16^o dia, sendo a média do período de 6,64 UI. Parece que a rã-touro necessita de mais tempo para otimizar a atividade da lipase, quando comparada à amilase, pois apenas a partir do 18^o dia, quando os animais alcançaram peso médio de 12,0 g (Figura 3), a

atividade da lipase foi elevada para 20,94 UI, tendo aumento de 316,79% em relação ao período anterior. Isto mostra que a eficiência da rã-touro em digerir ingredientes ricos em lipídios começa aumentar após 18 dias depois de finalizado o processo da metamorfose, estando as rãs em local com temperatura ambiente dentro da faixa de conforto térmico para esta espécie.

As últimas 16 coletas ocorridas a partir do 18º dia são caracterizadas por aumento da atividade da lipase no quimo da rã-touro, sendo que em apenas quatro oportunidades foram detectados valores abaixo desta tendência. A taxa de crescimento diário foi de 0,58 g/dia, quando as rãs com peso médio de 179 g obtiveram velocidade de atividade para lipase de 61,02 UI, ou seja, à medida que os animais ganharam peso, a capacidade da lipase atuar na hidrólise de lipídios também foi elevada. A média deste período foi 556% maior que a determinada na primeira etapa, quando as rãs atingiram peso médio de 9,36 g.

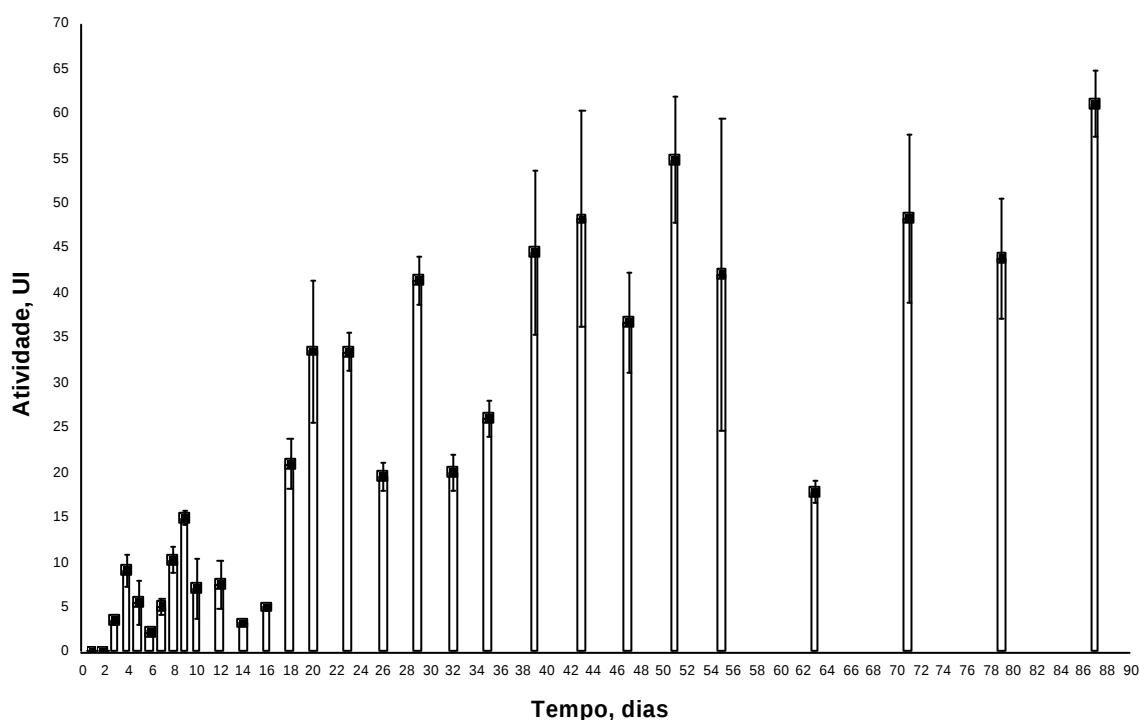


Figura 9 - Perfil da atividade da lipase do quimo de rãs alimentadas com ração comercial.

Os valores médios de atividade específica da lipase no quimo das rãs encontram-se na Figura 10. Quando se relaciona a atividade da enzima com a concentração de proteína no quimo das rãs, percebe-se que a lipase tem quatro etapas distintas de atuação, sendo as três primeiras representadas por períodos de estabilidade e a última, de evolução. Na primeira etapa, compreendida entre o 3º e 18º dia, foi identificada a menor média (217 UI/mg). A segunda etapa de estabilidade, com valor médio de 1167 UI/mg e 15 dias de duração, foi marcada pelo grande aumento da atividade específica da lipase em relação à primeira etapa. Na última etapa de estabilidade, observada entre o 39º e 55º dia de experimento, quando as rãs alcançaram peso médio de 85 g, a atividade específica aumentou 66,56% em relação à etapa anterior, apresentando média de 1943 UI/mg. Em seguida, o comportamento da enzima foi de aumento da atividade específica a uma taxa de 50 UI/mg/dia, sendo que na última coleta registrou-se o valor de 3101,86 UI/mg.

As variações ocorridas nos valores de atividade e atividade específica da lipase de rã-touro também foram detectadas no trabalho realizado por SEIXAS FILHO et al. (2000a), ao analisarem os dados obtidos com exemplares de surubim *Pseudoplatystoma coruscans*, com peso variando de 226 a 658 g.

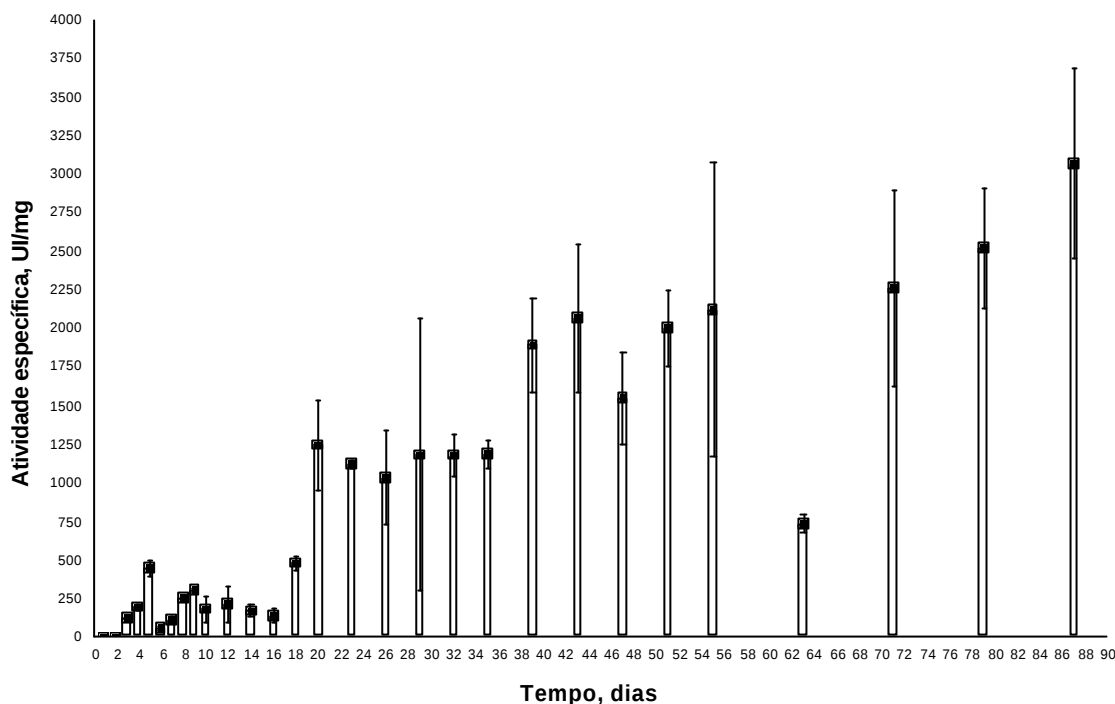


Figura 10 - Perfil da atividade específica da lipase do quimo de rãs alimentadas com ração comercial.

Os dados da atividade da lipase em função do peso rã-touro alimentada com ração comercial estão disponíveis na Figura 11. Pode-se observar variação da atividade da enzima, em função do peso das rãs nos primeiros 18 dias de experimento, o que coincide com o período de menor atividade da lipase. Provavelmente, isto ocorreu devido ao baixo desempenho da enzima nesta fase inicial, quando comparada com as etapas subseqüentes de atividade no quimo.

A partir do 20^o dia, quando foi registrado um valor médio foi de 3,22 UI.g⁻¹, os valores deste parâmetro apresentaram contínua redução, à medida que os animais ganhavam peso, sendo este comportamento mantido até o final do experimento, quando foi registrado um valor de 0,33 UI.g⁻¹ para rãs com peso médio de 179 g, ou seja, o aumento da atividade da lipase foi compensado com o crescimento das rãs a uma taxa superior. Esta capacidade restrita de digerir o lipido na fase inicial de vida rã também foi verificada por BRAGA et al. (1998), quando mediu o valor nutritivo do óleo de soja em imagos com 25 gramas. Com estes resultados, pode-se inferir sobre o uso restrito de ingredientes ricos em

gordura, com o objetivo de aumentar a quantidade de energia das dietas. Na elaboração de rações para animais adultos, o aumento da proporção destes ingredientes pode ser devido à melhor condição da rã em digerir lipídio.

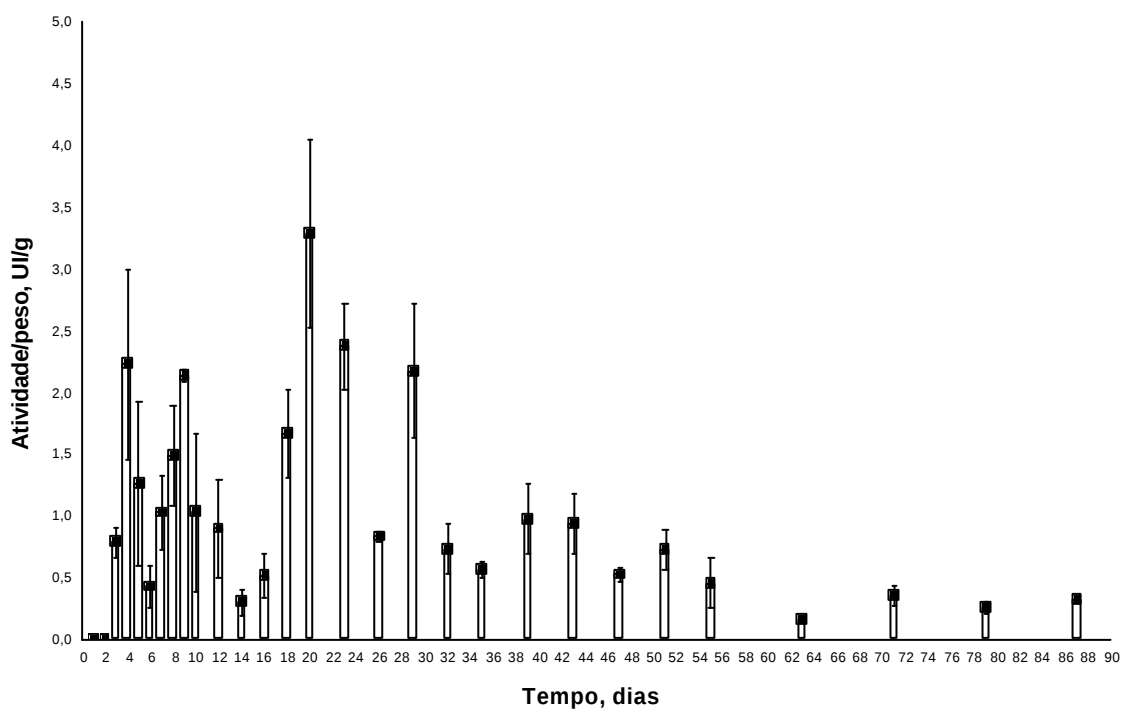


Figura 11 - Relação da atividade da lipase com o peso das rãs alimentadas com ração comercial.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O estudo foi conduzido com 320 exemplares de rã-touro distribuídos em baias-teste com temperatura e fotoperíodo controlados, objetivando-se avaliar a atividade específica da tripsina, amilase e lipase no quimo das rãs desde o final da metamorfose até o peso de abate, utilizando ração comercial extrusada com 42% de proteína bruta, que foi fornecida à vontade.

As rãs foram distribuídas em quatro baias-teste suspensas, sendo a temperatura e o fotoperíodo controlados. Diariamente, antes do arraçoamento das rãs, efetuava-se a limpeza das baias com troca da água das piscinas. Durante 87 dias de experimento, foram efetuadas 29 coletas do quimo, sendo dez realizadas em dias consecutivos a partir do primeiro dia, 15 distribuídas em cinco intervalos de dois, três, quatro dias, respectivamente e as quatro restantes em intervalos de oito dias. Três rãs foram sacrificadas por insensibilização em água e gelo para retirada do conteúdo intestinal, que foi congelado e liofilizado.

A determinação da atividade da tripsina foi realizada utilizando-se Benzoil-D, L-Arginina p-nitroanilida (D, L-BApNA) como substrato. Para os testes de atividade da amilase e lipase, foram utilizados KITS comerciais, correspondentes a cada enzima.

A atividade da tripsina foi registrada no primeiro dia de experimento, enquanto para amilase e lipase isto aconteceu a partir do terceiro dia. A fase inicial foi marcada pelo aumento da atividade da tripsina e amilase até alcançar estabilidade, quando os animais ainda estavam na fase de imago. Neste mesmo período, a rã-touro ainda possui baixa capacidade de hidrólise para lipase. No período subsequente até o final do experimento, a manutenção da estabilidade da atividade e atividade específica da tripsina e amilase foi contrastada pelo contínuo aumento destes parâmetros em relação à lipase. Concluiu-se que a rã-touro tem inicialmente maior capacidade para digerir alimentos protéicos e que rações destinadas a animais após a fase de imago podem ter maior quantidade de ingredientes contendo amido e lipídio, devido a aumento da capacidade de digestão, principalmente em relação ao lipídio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABI-AYAD, A., KESTEMONT, P. Comparison of the nutritional status of goldfish (*Carassius auratus*) larvae fed with live, mixed or dry diet. **Aquaculture**, v.128, p.163-176, 1994.
- ALEIXO, R.C., LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **Criação de moscas domésticas para suplementação alimentar de rãs**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1984. 12p. (Informe Agropecuário, 46).
- AL-HUSSAINI, A.H. On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits. I. Anatomy and histology. **Quart. J. Microsc. Sci.**, v.90, p.109-139, 1949.
- BARBALHO, O.J.M. **Exigência de proteína bruta de rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), na fase de terminação**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 55p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- BASSOMPIERRE, M., OSTENFELD, T.H., McLEAN, E., TORRISEN, K.R. In vitro protein digestion, and growth of Salmon Atlantic with different trypsin isozymes. **Aquaculture International**, v.6, p.47-56, 1998.
- BORLONGAN, I.G. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. **Aquaculture**. v.89, p.315-325, 1990.

- BRAGA, L.G.T., LIMA, S.L., DONZELE, J.L., CASTRO, J.C. Valor nutritivo de alguns alimentos para rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) na fase de recria. **R. Soc. Bras. Zootec.**, v.27, n.2, p.203-209, 1998.
- BRAGA, L.G.T., LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. Desempenho da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) submetida a diferentes temperaturas em baias teste do sistema anfigranja. In: INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY, 1., ENAR-ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 8., Viçosa, MG, 1995. **Anais...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1995. p.87.
- CAHU, C.L., ZAMBONINO-INFANTE, J.L., PÉREZ, A., QUAZUGUEL, P., GALL, M.M. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effects on digestive enzymes. **Aquaculture**, v.161, p.479-489, 1998.
- CAHU, C.L., ZAMBONINO-INFANTE, J.L. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. **Comp. Biocem. Physiol.**, v.109A, n.2, p.213-222, 1994.
- CARAWAY, W.T. A stable substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **Amer. J. Clin. Pathol.**, v.32, p.97-99, 1959.
- CARAWAY, W.T. A stable substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **Amer. J. Clin. Pathol.**, v.32, p.97-99, 1959.
- CASTRO, J.C., LIMA, S.L., DONZELE, J.L., BRAGA, L.G.T. Energia metabolizável de alguns alimentos utilizados em rações de para rãs. **R. Soc. Bras. Zootec.**, v.27, n.6, p.1051-1056, 1998.
- CASTRO, J.C. **Estrutura funcional do tubo digestivo e adaptação de uma metodologia para determinar os valores de energia metabolizável de alimentos para rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802).** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 120p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- CASTRO, J.C., SILVA, D.V., SANTOS, R.B. MONDENESI, V.F., ALMEIDA, E.F. Valor nutritivo de alguns alimentos para rãs na fase inicial de crescimento. In: ENAR-ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 10., 1999, São Miguel do Iguaçu, PR. **Anais...** São Miguel do Iguaçu-PR, 1999a. p.18.

- CASTRO, J.C., SILVA, D.V., SANTOS, R.B. MONDENESI, V.F., ALMEIDA, E.F. Valor nutritivo de alguns alimentos para rãs na fase de crescimento e terminação. In: ENAR-ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 10., 1999, São Miguel do Iguaçu-PR. **Anais...** São Miguel do Iguaçu-PR, 1999b p.19.
- CULLEY Jr., D.D., HORSEMAN, N.D., AMBORSKI, R.L. et al. Current status of amphibian culture with emphasis on UAL MEETING OF THE WORLD MARICULTURE. Nutrition, diseases and reproduction of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. In: ANNICULTURE SOCIETY, 9., 1978, Atlanta. **Proceedings...** Baton Rouge: Los Angeles, World Mariculture Society, 1978. p. 653-659.
- ERLANGER, B.F., KOKOWWSKY, N., CHEN, N. **Arch. Biochem. Biophy.**, v.95, p.271-278, 1961.
- ESCAFFRE, A.M., ZAMBONINO-INFANTE, J.L., CAHU, C.L., MAMBRINI, M., BERGOT, P., KAUSHIK, S.J. Nutritional value of soy protein concentrate for larvae of common carp (*Ciprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v.153, p.63-80, 1997.
- FARRAR, E.S., DUPRE, R.K. The role of diet storage by juvenile bullfrogs prior to overwintering. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.75A, p.255-260, 1983.
- HJELMELAND, K., JØRGENSEN, T. Evaluation of radioimmunoassay as a method to quantify trypsin and trypsinogen in fish. **American Fish Society**, v.114, p.619-621, 1985.
- INOKUCHI, T., KOBAYASHI, K.I., HORIUCHI, S. Acid proteinases of the fore-gut in metamorphosing tadpoles of *Rana catesbeiana*. **Comp. Biochem. Physiol.**, B., v.99B, n.3, p. 653-667, 1991.
- INOKUCHI, T., KOBAYASHI, K., HORIUCHI, S. Isolation of pepsinogen A from gastric mucosa of bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Comp. Biochem. Physiol.**, B, v.111B, n.1, p.111-117, 1995.
- INOKUCHI, T., KOBAYASHI, K., HORIUCHI, S. Purification and characterization of catheps in E type acid proteinase from gastric mucosa of bullfrog, *Rana catesbeiana*. **J. Biochem.**, v.115, n.1, p.76-81, 1994.

- KAWAI, S., IKEDA, S. Studies on digestive enzymes of fisheries - III Development of the digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juveniles stage. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, v.39, n.7, p.819-823, 1973.
- KITAMIKADO, M., TACHINO, S. Studies on the digestive enzymes of the rainbow trout - II. Proteases. **Bull. Soc. Sci. Fish.**, v.26, p.685-690, 1960.
- LIMA, S.L., CRUZ, T.A., MOURA, O.M. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa Ltda. 1999. 172p.
- LIMA, S.L., FIGUEIREDO, M.R.C., MOURA, O.M. **Diagnóstico da ranicultura: problemas, propostas de soluções e pesquisas prioritárias**. Viçosa, MG: Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura, 1994. 170p.
- LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **A criação de rãs**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 187p. (Coleção do agricultor - Pequenos animais).
- LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **Técnicas e propostas para alimentação de rãs**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1984. 11p. (Informe técnico 50).
- LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **A tecnologia de criação de rãs**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1992. 168p.
- MARRONI, N.P., MARRONI, C.A., RODRIGUES, M.I., MARQUES, M. Evaluation of gastric mucosa of na amphibiam *Rana catesbeiana* (Shaw) “in vivo” and “in vitro” at different seasons of the year and under the effect of stress. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.36, n.21, p. 273-282, 1993.
- MAZZONI, R., CARNEVIA, D., ROSO, A. et al. Estudio del porcentaje de proteína y la energía en el alimento peleteado para engorde de rana toro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 7., 1992, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: ENAR, 1992b. p.185.
- MAZZONI, R., CARNEVIA, D., ROSO, A. et al. Estudio del porcentaje de proteína en alimento peleteado para engorde de rana toro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 7., 1992, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: ENAR, 1992a. p.191.

- MIRALLA, M.R., MARRONI, N.P., RODRIGUES, M.I. Avaliação da secreção de pepsina em *Rana catesbeiana* (Shaw) nas diferentes estações do ano, sob o efeito do estresse e do jejum prolongado. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.37, n.1, p.23-35, 1994.
- MONTEIRO, E.S., LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. Avaliação de desenvolvimento de rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw) alimentadas com diferentes níveis de proteína. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 25., 1988. Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1988. p.77.
- MUKHOPADHYAY, P.K. Studies on the enzymatic activities related to varied pattern of diets in the breathing catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). **Hidrobiologia**, v.52, p.235-237, 1977.
- MUKHOPADHYAY, P.K., ROUT, S.K. Effects of different dietary lipids on growth and tissue fatty acid changes in fry of the carp *Catla catla* (Hamilton). **Aquaculture Research**, v.27, p.623-630, 1996.
- NAGASE, G. Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* (PETERS): digestive enzymes and effect on their activity. **Z. Vgl. Physiol.**, v.49, p.270-284, 1964.
- NEVES, C.A. **Estudo morfológico e histoenzimológico do desenvolvimento ontogenético do trato digestivo de larvas e alevinos de trairão (*Hoplias cf. lacerdae*) e pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)**. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais, 1996. 574p. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.
- ONISHI, T., MURAYAMA, S., TAKEUCHI, M. Changes in digestive enzyme levels in carp after feeding - III Response of protease and amylase to twice-a-day feeding. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, v.42, n.8, p.921-923, 1976.
- REIMER, G. Studies on the enzymatic activities in the gastrointestinal of the *Brycon metanoptoris*. **J. Fish Biol.**, v.21, p.637-642, 1982.
- RIBEIRO, L., ZAMBONINO-INFANTE, J.L., CAHU, C., DINIS, M.T. Development of digestive enzyme in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. **Aquaculture**, v.179, p.467-473, 1999.

- SABAPATHY, U ., TEO, L.H. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Latus calcarifer* 1993. **Journal of Fish Biology**, v.42, p.595-602, 1993.
- SASTRY, K.V. Histochemical localization of esterase and lipase in the digestive system of two teleost fishes. **Acta Histochemc.**, v.515, p.18-23, 1974.
- SEIXAS FILHO, J.T. OLIVEIRA, M.G.A. DONZELE, J.L. GOMIDE, A.T.M., MENIN, E. Atividade da lipase em quimo de três espécies tropicais de peixes Teleostei de água doce. **R. Soc. Bras. Zootec.**, v.29, n.1, p.2172-2180, 2000a.
- SEIXAS FILHO, J.T., OLIVEIRA, M.G.A., DONZELE, J.L. GOMIDE, A.T.M., MENIN, E. Atividade da tripsina em quimo de três espécies neotropicais de peixes Teleostei de água doce. **R. Soc. Bras. Zootec.**, v.29, n.6 p.06-14, 2000b. (suplemento 2)
- SEIXAS FILHO, J.T. OLIVEIRA, M.G.A., DONZELE, J.L. GOMIDE, A.T.M., MENIN, E. Atividade de amilase em quimo de três espécies tropicais de peixes Teleostei de água doce. **R. Soc. Bras. Zootec.**, v.28, n.5, p.907-913, 1999.
- SHUGERMAN, R.P., HIRSCHOWITZ, B.I., BHOWN, A.S. et al. A unique pepsinogen isolated from bullfrog esophageal glands. **Journal Biological Chemistry**, v.257, p.795-798, 1982.
- SMITH, E.M., HILL, R.L., LEHMAN, I.R., LEFKOWITZ, R.J., HANDLER, P., WHITE, A. **Bioquímica de mamíferos**. 7.ed., rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 620p.
- STÉFANI, M.V. Uso de aglutinantes nutritivos em rações para rações para girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 10., 1999, São Miguel do Iguaçu. **Anais...** Paraná: ENAR, 1999a. p.20.
- STÉFANI, M.V. **Metabolismo e crescimento da rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) alimentada com níveis crescentes de carboidratos**. Jaboticabal, SP: Universidade Estadual Paulista, 1996. 92p. Dissertação (Doutorado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista, 1996.

- STÉFANI, M.V. Níveis de proteína adequada ao crescimento da rã touro, *Rana catesbeiana* Shaw, 1802. In: INTERNATIONAL MEETING ON FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY, 1., ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 8., 1995. Viçosa, MG, 1995. **Anais...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1995. v.1, p.65.
- STÉFANI, M.V. MARTINS, M.L., MARCANTONIO, A.S. Efeito de diferentes níveis de vitamina C e E no desenvolvimento e sobrevivência de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 10, 1999, São Miguel do Iguaçu. **Anais...** Paraná: ENAR, 1999b. p. 21.
- TROYER, H. **Principles and techniques of histochemistry**. Boston: Little, Brown 7 Company, 1980. 431p.
- WARBURG, O.; CHRISTIN, W. Isohering und kristallisation des gôrungs ferments enolase. **Biochemistry Z.**, 310, p. 384-421, 1941.
- WIRZ, R.R., FONTANELO, D., SOARES, H.A., FREITAS, E.A.N., TEIXEIRA FILHO, A.R. Ganho de peso de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) criada a em gaiolas, com rações de diferentes níveis protéicos, consorciada com larvas de diptera (*Musca domestica*). **Bol. Inst. Pesca**, v.19 (único), p.83-88, 1992.
- YAKABE, E., TANJI, M., ICHINOSE, M., GOTO, S. et al. Purification, characterization, and amino acid sequences of pepsinogens and pepsins from the esophageal mucosa of bullfrog (***Rana catesbeiana***). **J. Biol. Chem.**, v.266, n.33, p.436-443, 1991.
- ZAMBONINO-INFANTE, J.L., CAHU, C.L., PERES, A. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larva development. **J. Nutrition**, v.127, p.608-614, 1997.