Carlos Eduardo Tolussi

**Influência da Temperatura no Crescimento e nas Respostas Fisiológicas do
Surubim do Paraíba *Steindachneridion paraguayae* (Siluriformes: Pimelodidae)
Criados em Cativeiro.**

São Paulo

2010

Carlos Eduardo Tolussi

**Influência da Temperatura no Crescimento e nas Respostas Fisiológicas do
Surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae)
Criados em Cativeiro.**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências na área de
Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Tolussi, Carlos Eduardo

Influência da Temperatura no Crescimento e nas Respostas Fisiológicas do Surubim do Paraíba *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) Criados em Cativeiro. 117 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. *Steindachneridion parahybae*; 2. Temperatura; 3. Crescimento; 4 Substratos Energéticos; 5. Ácidos graxos. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof(a).Dra. Renata Guimarães Moreira
Orientadora

Dedico este Trabalho:

A minha mãe Adelina e ao meu pai Francisco e para minha amada Aline, por todo o incentivo que me deram nessa jornada...Obrigado!

Agradecimentos

Primeiramente eu gostaria de agradecer a minha orientadora prof. Dra. Renata Guimarães Moreira, por ter me dado a oportunidade de ingressar nessa maravilhosa área científica e também por todo o auxílio, orientação e compreensão, ao longo da minha trajetória que se iniciou em Mogi das Cruzes e culminou neste trabalho. Quero agradecer também a confiança depositada em mim em alguns momentos “críticos” do experimento. Por estes e outros motivos eu gostaria de expressar minha gratidão e admiração por essa grande profissional na qual me espelho e me orgulho de ser orientado.

À CESP por ceder o espaço para a realização do experimento, em especial à sua piscicultura. Gostaria de agradecer em especial ao biólogo Danilo Caneppele por ter me auxiliado e me ensinado muito sobre aquicultura e muitas outras coisas que envolvem ou não o cultivo de peixes em cativeiro. Espero que a parceria CESP-LAMEROA se perpetue! Eu não posso deixar de agradecer à Lúcia e ao Edmur por todo auxílio e os demais funcionários, Ielso, que foi a pessoa que me acompanhou e me auxiliou ao longo do experimento, ao Benedito (Ditão), Vicente (Buiu), Cesar (Cesinha), Willian e o Milton (Miltinho), que me auxiliaram e me ensinaram muito sobre piscicultura.

Aos técnicos, funcionários, professores e amigos do Departamento de Fisiologia da USP pela colaboração, principalmente aos professores Carlos Arthuro Navas Iannini pela colaboração e ensinamentos e José Eduardo de Carvalho (Zezinho), pela colaboração, ensinamentos e ajuda no processo de análise do glicogênio e auxílio sempre que necessário, seja resolvendo problemas burocráticos; dividindo conhecimentos; participando de comissões, monitorias, disciplinas e Curso de Inverno; ou apenas nos distraindo durante o café e também a Isabel que me auxiliou muito tanto na em algumas análises quanto na liberação do dinheiro para as coletas.

Aos meus eternos companheiros do LAMEROA – Aline, Cristiéle por me aguentarem no laboratório e no aconchego do vosso lar (elas são integrantes da república CRISLIBERTA), Tiago, Vanessa, Amanda, Jaboti, Paulo, Jajá, Bruno, Renato, Larissa, Juliane e Carol, por me ajudarem a evoluir na minha profissão e fazer essa dissertação; pelos paredões, coletas, seminários, trabalhos em conjuntos, CAs, amarelinhos, vermelhinhos, churrascos, amigos secretos e etc, por me aguentarem

todos os dias (ou quase todos eles), já que nesses últimos 4 anos nosso convívio foi intenso e isso gera muito atrito, mas também muita amizade, mas no nosso caso a segunda alternativa foi a que prevaleceu. Obrigado gente! Eu admiro e gosto muito de vocês!

À galera de Mogi das Cruzes, Alê, Cristine, Débora, Tiago, Emy e Bruna e aos amigos Marcus e Gabriel pelas conversas de alívio ao estresse. À Roberta, por me aguentar na faculdade e também no seu lar (integrante da república CRISLIBERTA).

Aos eternos e grandes amigos do TAPAJURA, local onde nasci, cresci, formei uma parte da minha personalidade e por me orgulhar de não me lembrar quando nos conhecemos e por estarmos juntos até hoje. Muito obrigado Gustavo (Presunto), Gerson (Ger), Vanderlei (Bola), Fernando (Croata), Fulvio (Psyco), Tatiana, Mariana, Fabio (Binho), Bruno (Gorbarel), Guilherme (Picanha), Vitor, Alberto, Alexandre (Xandê) e Felipe (Balada) Jeferson (Jef), Alexandre (Xandê) e Jonathan (DNG). Além deles eu quero agradecer ao Ivan, que não é do TAPAJURA, mas que é um eterno e grandíssimo amigo.

Gostaria de agradecer especialmente aos meus pais Maria Adelina de Oliveira Tolussi e Francisco Carlos Tolussi, e minha irmã Renata Tolussi, por me incentivar, me educar e por me apoiar em toda a minha vida, inclusive para a elaboração dessa dissertação. Sem vocês eu não seria ninguém!

A minha querida e imprescindível Aline Dal' Olio Gomes, pelo incentivo, por me entender do início ao fim, pelo carinho e pelo auxílio pessoal e profissional. Eu te amo e te admiro muito, mas muito mesmo! Obrigado por estar ao meu lado!

Por fim quero agradecer a ABD e aos psicopedagogos Mário Ângelo e Pryscilla de Carvalho Durand, por me auxiliarem e me darem confiança para seguir em frente, pois se não fossem por eles eu não teria seguido em frente e não chegaria até aqui.

A minha profunda gratidão a todos aqui citados, pois, eles de uma maneira, mais ou não incisiva têm uma importância na realização deste trabalho

Índice

Lista de Abreviações.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
1 – Introdução.....	1
1.1 Bacia do Rio Paraíba do Sul e a Espécie Eleita.	3
2- Objetivos.....	7
2,1 – Objetivo Geral.....	7
2.2 – Objetivos Específicos.....	7
3 – Material e Métodos.....	7
3.1- Delineamento Experimental.....	7
3.2 – Parâmetros Zootécnicos.....	9
3.2.1- Fator de Condição.....	9
3.2.2- Crescimento Relativo (%)......	9
3.2.3- Taxa de Crescimento Específico (% diária).....	10
3.2.4- Eficiência Alimentar.....	10
3.2.5- Coeficiente de Variação.....	10
3.2.6- Sobrevivência.....	10
3.3- Sacrifício dos Animais e Obtenção das Amostras.....	10
3.4- Análises Metabólicas.....	10
3.4.1- Extração e Determinação de Proteínas Totais.....	11
3.4.2- Extração e Determinação de Lipídeos Totais.....	11
3.4.3- Separação das Classes Lipídicas e Metilação dos Ácidos Graxos.....	11
3.4.4- Medida da Concentração de Glicose e Glicogênio.....	11
3.5- Cortisol Plasmático>.....	12
3.6- Análises Estatísticas.....	12
4- Resultados.....	15

4.1- Ração Consumida, Qualidade e Temperatura da Água.....	15
4.2- Parâmetros Morfométricos, Ponderais e Zootécnicos.....	16
4.3- Índice Hepatosomático (IHS).....	20
4.3.1- Análises dos Substratos Energéticos no Fígado.....	23
4.3.2- Análises dos Substratos Energéticos no Músculo.....	24
4.3.3- Análises dos Metabólitos Plasmáticos.....	25
4.4- Análises dos Substratos com a Temperatura e a Ração Consumida.....	26
4.5- Análises dos Ácidos Graxos.....	28
4.5.1- Ácidos Graxos do Fígado.....	28
4,5.2- Ácidos Graxos do Músculo.....	37
4.5.3- Ácidos Graxos do Plasma.....	45
4.6- Cortisol Plasmático.....	49
5- Discussão.....	51
5.1- Ração Consumida, Qualidade e Temperatura da Água.....	51
5.2- Relações entre a Temperatura da água e os Dados Morfométricos e Parâmetros Zootécnicos.....	52
5.3-Relações entre a Temperatura da água e o Índice Hepatosomático.....	56
5.4 - Análises dos Substratos Energéticos.....	56
5.4.1- Lipídeos hepático, muscular e plasmático.....	56
5.4.2- Proteínas hepáticas e musculares.....	59
5.4.3- Glicogênio hepático e muscular e glicose plasmática.....	60
5.5 - Ácidos Graxos.....	63
5.5.1- Ácidos Graxos da Fração Polar.....	63

5.5.2- Ácidos Graxos da Fração Neutra.....	65
5.6 Cortisol Plasmático.....	68
5.7- Abordagem Teórica das Implicações da Temperatura nos Processos Fisiológicos do Surubim.....	71
5.8- Correlação entre os Resultados de Crescimento, Análises Metabólicas e Ácidos Graxos em uma Extrapolação para o Ambiente Natural.....	72
6- Considerações Finais.....	74
7- Referências Bibliográficas.....	107
8- Anexo I.....	88
9- Anexo II.....	104

Lista de Abreviações

AA – Ácido araquidônico

AG – Ácido Graxo

DHA – Ácido docosahexanóico

EPM – Erro Padrão da Média

EPA – Ácido eicosapentanoico

n3 – Ômega 3

n6 – Ômega 6

PUFA – Ácido Graxo Polinsaturado

SFA – Ácido Graxo Saturado

MUFA - Ácido Graxo Monoinsaturados

n -3 PUFA -Ácidos graxos polinsaturados n 3

n -6 PUFA - Ácidos graxos polinsaturados n 6

n -3/n-6 - Relação entre os ácidos graxos polinsaturados n3 e n6

Σ SFA - Somatória dos ácidos graxos saturados

Σ MUFA - Somatória dos ácidos graxos monoinsaturados

Σ PUFA - Somatória dos ácidos graxos polinsaturados

Σ n -3 PUFA- Somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 3

Σ n -6 PUFA - Somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 6

Σ n -3/n-6 – Relação da somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 3 e n6

NE -Ácido graxo não encontrado.

CV - Coeficiente de variação

CV Inicial - Coeficiente de variação no início do experimento

CV Final - Coeficiente de variação no final do experimento

K - Fator de condição

CR - Crescimento relativo

CE - Crescimento específico

EA - Eficiência alimentar

S – Sobrevivência

W_i – Massa corpórea inicial

W_f – Massa corpórea final

W_t – Massa corpórea total

L_t – Comprimento total

$\ln W_i$ – Logaritmo neperiano da massa inicial

$\ln W_f$ – Logaritmo neperiano da massa final

T_i – Temperatura inicial da água

T_f – Temperatura final da água

N_f – Número de peixes ao final do experimento

N_i – Número de peixes inicialmente estocados

Estufa – Grupo experimental no qual os tanques foram cobertos com estufa

Sem Estufa – Grupo experimental sem a cobertura de estufa

CESP – Companhia Energética de São Paulo

G6PDH – Glicose-6-fostato desidrogenase,

Resumo

As mudanças climáticas devido às ações antrópicas tendem a alterar diversos fatores ambientais, entre eles a temperatura. Um recente prognóstico sobre a elevação da temperatura menciona que em uma escala otimista a temperatura na Terra se elevará em 1,8°C até 2100. Esta alteração pode causar diversas modificações nos processos fisiológicos, justificando a realização de estudos para avaliar os efeitos da temperatura na fisiologia dos animais. A Bacia do Paraíba do Sul há muito tempo, vem sofrendo com ações antrópicas, culminando no risco de extinção de espécies endêmicas, sendo este o caso do surubim do Paraíba, *Steindachneridion parahybae*. Com a possível elevação da temperatura ambiental o risco de extinção da espécie pode se tornar ainda mais eminente, sendo assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar se a variação da temperatura da água, dentro dos valores previstos na escala otimista, de 1,8°C influencia o crescimento e as respostas fisiológicas dos juvenis de surubim do Paraíba. Foi estabelecido um modelo experimental no qual dois tanques foram cobertos com uma estufa de plástico (grupo Estufa) e outros dois tanques permaneceram sem cobertura (grupo Sem Estufa), com um número inicial de 100 peixes em cada tanque. Nos meses de setembro de 2009 (início), novembro de 2009, janeiro e março de 2010 foram realizadas biometrias em todos os animais, obtendo-se os dados morfométricos e ponderais, além de calcular os seguintes parâmetros zootécnicos: índice hepatossomático (IHS), fator de condição (K), crescimento relativo (CR), taxa de crescimento específico diária (CE), coeficiente de variação (CV), eficiência alimentar (EA) e sobrevivência (S). Amostras dos tecidos musculares e hepáticos, além do plasma foram coletadas em 5 animais de cada tanque experimental nas biometrias, sendo analisada a concentração de lipídeos, proteínas e carboidratos, perfil percentual de ácidos graxos da fração neutra (triglicérides) e polar (fosfolipídios). No plasma foi quantificada ainda a concentração de cortisol e glicose. Os animais do grupo Estufa, no qual a temperatura da água foi mantida cerca de 2°C acima do grupo Sem Estufa, apresentaram um maior incremento de massa corpórea em relação aos animais do grupo Sem Estufa, sendo o mesmo padrão observado para CR, CE e EA. Mesmo com um maior crescimento a concentração de lipídeos e proteínas tanto no músculo quanto no fígado foi igual entre os dois grupos, o mesmo ocorrendo com o glicogênio hepático. Por outro lado, o glicogênio muscular foi mais elevado na última coleta nos animais

mantidos em temperaturas mais baixas. Na fração polar, os animais de ambos os grupos apresentaram uma respostas de elevação da porcentagem de ácidos graxos saturados e uma queda de polinsaturados, provavelmente relacionado à adaptação homeoviscosa, devido ao gradual aumento da temperatura. Na fração neutra, observou-se que os animais mantidos nas temperaturas mais elevadas utilizaram uma porcentagem maior de ácidos graxos polinsaturados para a obtenção de energia, o que em longo prazo pode ser prejudicial nos processos reprodutivos. Estes resultados sugerem que a elevação da temperatura pode ter ocasionado uma maior atividade enzimática e/ou uma maior eficiência destas enzimas e consequentemente maior crescimento e eficiência alimentar nos animais do grupo Estufa. No entanto, os resultados não permitem estabelecer se o aumento temperatura seria benéfico em todas as fases de desenvolvimento para o surubim do Paraíba.

Abstract

The climatic changes due to anthropogenic actions tend to alter several environment factors, among them, temperature. A recent prognostic about the temperature increase mentions that in an optimistic level the earth temperature will raise 1.8°C until 2100. This change may cause many modifications on the physiological processes, justifying the studies to assess the effects of the temperature in animals' physiology. The Paraíba do Sul Basin, for a long time, has been suffering with the anthropogenic actions, culminating in the extinction risk of the endemic species. This is the case of surubim do Paraíba, *Steindachneridion parahybae*. With the possible rise in the environmental temperature, the risk of species extinction can be even more eminent, therefore, the aim of this study is to evaluate if the water temperature variation, within the values predicted in the optimistic level, i.e., 1.8°C influences in the growth and in the physiological processes of surubim do Paraíba juveniles. It was established an experimental design in which two ponds were covered with a plastic greenhouse (Greenhouse group) and another two ponds were kept without the plastic coverage (No Greenhouse group), with an initial population of 100 animals in each tank. In September/2009 (beginning), November/2009, January/2010 and March/2010 the biometrical parameters were registered in all animals in order to obtain the morphometric and weight data, and in addition, to calculate the following parameters: hepatossomatic index (HSI), condition factor (K), specific growth rate (SGR), daily specific growth rate (DSGR), coefficient of variation (CV), feed efficiency (FE) and survival (S). The muscle and liver samples, and also the plasma were collected from 5 fish from each experimental tank in each sampling, and the tissue concentration of carbohydrates, proteins and lipids, fatty acids percentage profile in the neutral (triglycerides) and polar (phospholipids) lipids fractions were measured. The cortisol and glucose concentration were also quantified in the plasma. The Greenhouse group animals, where the water temperature was kept around 2°C higher than the No Greenhouse group, showed an increased weight gain in relation to the animals of the No Greenhouse group, with the same result also found for SGR, DSGR and FE. Even with an increased growth, the proteins and lipids concentration both, in muscle and in the liver were unchanged between both groups, and the same occurred with the liver glycogen. However, the muscle glycogen was higher in the last sampling in the animals

that were kept in the lower water temperature. In the polar fraction, both groups presented an increase in the percentage of saturate fatty acids and a decrease in the polyunsaturated percentage, probably related with a homeoviscous adaptation, due to the gradual increase in temperature. In the neutral fraction, the animals kept in higher water temperature utilized a higher percentage of polyunsaturated fatty acids as energy source, that, in long-term may be prejudicial for reproduction. These results suggest that the increasing temperature could result in a higher enzymatic activity and/or a higher efficiency of these enzymes and consequently, increased growth and feed efficiency in Greenhouse group animals'. However, the results do not allow establishing whether the increasing temperature would be beneficial at all stages of development in the surubim do Paraíba.

1. Introdução

O clima da terra está mudando rapidamente e com isso, foi observado que a temperatura da superfície terrestre aumentou aproximadamente 0,6°C no último século, sendo essas duas décadas passadas as mais quentes desde 1891 (Houghton *et. al.*, 2001). De acordo com relatório do IPCC (do inglês *Intergovernmental Panel on Climate Change*) (2007), a projeção mais otimista relata uma elevação de 1,8 ° C na temperatura até 2100, o que também refletirá na elevação da temperatura dos sistemas aquáticos, atingindo diretamente as espécies aquáticas em todos os níveis ecológicos (IPCC, 2007). Segundo este mesmo relatório, 90% de todo o aquecimento global dos últimos cinquenta anos é de origem antrópica e, além disso, sugere-se que estas alterações sejam mais pronunciadas nos países em desenvolvimento (Marengo, 2008). Alterações climáticas, provenientes da ação antrópica, são consideradas as maiores e mais significantes ameaças ambientais que os ecossistemas em geral enfrentam (Dufek e Ambrizzi, 2007), e esta ameaça vêm aumentando significativamente (Wikelski e Cooke, 2006).

Alterações de temperatura decorrente das mudanças climáticas podem causar inúmeras consequências para várias espécies, prejudicando o desempenho do crescimento, elevando a mortalidade, alterando a sua distribuição geográfica com o tempo ou mesmo influenciando no sucesso na reprodução (Prötner, 2002). Sendo assim, a realização de estudos relacionados às respostas fisiológicas dos animais frente à influência humana nos sistemas naturais, seja por meio da exposição de poluentes no ambiente, ou devido à elevação da temperatura em uma região, são extremamente importantes para que se possa enfrentar esta nova realidade (Wikelski e Cooke, 2006). Sendo assim, são necessários estudos que tentem compreender como serão as respostas dos organismos frente a uma alteração da temperatura do seu ambiente.

Muitas respostas frente às alterações na temperatura já foram observadas, como é o caso das modificações na estrutura das membranas celulares, que estão relacionadas com a manutenção da fluidez da membrana celular, mantendo as atividades enzimáticas associadas à estas membranas e os processos de transporte, adequado para o funcionamento da célula (Hazel, 1984). A queda de temperatura pode comprometer a flexibilidade dos ácidos graxos e das proteínas das membranas, limitando sua

estabilização. A exposição aguda às baixas temperaturas é acompanhada por um aumento na porcentagem de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares e redução na porcentagem de ácidos graxos saturados. Uma revisão da literatura mostra que, de uma forma geral, animais que vivem em temperaturas mais baixas apresentam uma maior porcentagem de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) do que aqueles de clima tropical (Hazel e Willians, 1990). Estas variações alteram o ponto de fusão dos ácidos graxos esterificados nos fosfolípidios das membranas biológicas, alterando assim a permeabilidade das mesmas (Hazel, 1984).

A manutenção de uma temperatura ajustada aos processos homeostáticos também é muito importante para a manutenção de peixes no ambiente de cativeiro. Quando uma temperatura adequada para o cultivo de uma determinada espécie não é alcançada, a criação é geralmente inviabilizada, sendo bem estabelecido em estudos nestes locais que alterações na temperatura modificam diretamente a taxa metabólica nos peixes (Goldspink and Penney, 1982; Fauconneau, 1985; Olin e Decken, 1989), alterando a utilização e deposição dos substratos energéticos (Ibarz *et al.*, 2007). Alguns trabalhos já evidenciaram as relações entre estresse fisiológico devido a uma faixa de temperatura inadequada e o crescimento em diferentes espécies de peixes, sendo demonstrado que o aporte energético da alimentação e das reservas corporais são direcionadas às respostas fisiológicas de estresse, incluindo o custo associado à manutenção da homeostase (Barcellos *et al.*, 2000), que por sua vez, prejudica outros processos fisiológicos como a reprodução e o crescimento.

A definição de estresse foi proposta por Selye (1950), como uma resposta inespecífica do corpo sobre algum agente estressor. Desde então uma variedade de definições foram apresentadas (Pickering, 1981), mostrando que o estresse é uma resposta fisiológica a uma demanda, o estressor, e conceitos mais específicos sobre o tema, tendem a envolver uma cascata endócrina como parte desta resposta inespecífica (Schreck, 2010).

Schreck (2000) argumenta que a visão do conceito de estresse deve ser mais ampla, sendo respostas que consistem em um evento de cascatas fisiológicas que ocorrem quando o organismo está tentando resistir à morte ou restabelecer a homeostase frente a uma injúria. Mais recentemente Schreck (2010) menciona que a resposta ao estresse consiste em uma cascata de eventos fisiológicos, que são iniciados pela

percepção do um estressor e uma comunicação para o corpo que se dá via sistema nervoso central, agindo tanto via neural quanto hormonal. Primeiramente, os hormônios presentes nesta resposta são as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e aqueles liberados pelo eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, que são respectivamente o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula o hormônio corticotrófico (ACTH) e este por sua vez, estimula a produção de cortisol (Schreck, 2010).

As catecolaminas atuam diretamente no fígado, estimulando a glicogenólise para atender a demanda energética, já o cortisol exerce uma ação em longo prazo, catabolizando carboidratos, lipídeos e proteínas em diferentes tecidos (Mazeaud e Mazeaud, 1981). Devido a estas respostas, principalmente as geradas pelo cortisol, é comum relacionar a definição de estresse em algum modo com a eficiência energética (Emlen *et al.*, 1998), que pode fazer com que a energia que seria destinada para a realização de um processo fisiológico, como por exemplo para o crescimento, seja utilizada para a manutenção da homeostase, como foi dito acima.

1.1 Bacia do Rio Paraíba do Sul e a Espécie Eleita

A bacia do Rio Paraíba do Sul (Figura 1) abrange os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, estando em um isolado sistema fluvial com 57.000 Km² de extensão (Barroso *et al.*, 2005). Em 1950, o rio Paraíba do Sul foi considerado um dos rios com mais populações de peixes do estado de São Paulo (Machado & Abreu, 1952), tornando-o muito importante para a pesca neste período. Hoje em dia, a pesca econômica neste rio não tem mais importância comercial dado o quase desaparecimento de algumas espécies (Barroso *et al.*, 2005), devido à pesca, além de outros impactos, como a construção de barragens.

Figura 1 – Mapa da Bacia do Rio Paraíba do Sul. (<http://www.google.com.br/imgres?imgurl>).

Os impactos sobre os recursos hídricos do Vale do Paraíba remontam a própria história da ocupação humana na região (Hilsdorf & Petrere, 2002). A construção da Companhia Siderúrgica Nacional (CSN) em Volta Grande no Rio de Janeiro pode ser considerada como um marco significativo dos diversos impactos ambientais sobre a bacia do Paraíba do Sul, que se seguiram com a implantação de diversas indústrias no eixo da Rodovia Dutra que liga o Rio de Janeiro a São Paulo. Os inúmeros impactos que a Bacia do Rio Paraíba do Sul vem sofrendo decorrente da ocupação humana desde a década de 50 prejudicou todo ecossistema local, levando espécies ictíais a situações críticas de conservação (Machado e Abreu, 1952). Desta forma se torna necessária a realização de trabalhos em cativeiro com estas espécies ameaçadas, já que para obter o conhecimento da biologia de uma espécie é preciso compreender o funcionamento de alguns sistemas deste animal (Baldisserotto, 2002).

O conhecimento da fisiologia de uma espécie é um requerimento básico para que se possa cultivar essa espécie em cativeiro (Baldisserotto, 2002). Esse cultivo pode ter objetivos diversos, sendo principalmente realizado com objetivo econômico ou de conservação. A chamada “piscicultura de conservação” tem como principal foco o cultivo de espécies íctias que sofrem algum tipo de impacto antrópico e precisam ser reproduzidas e/ou produzidas para um futuro repovoamento. Este é o caso do surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*) espécie endêmica da Bacia do Paraíba do Sul. Este “peixe de couro” (sem escamas) e de médio porte possui um corpo achatado com o dorso preenchido por pequenas e alongadas manchas e seu hábito alimentar é carnívoro (piscívora). Além disso, o surubim apresenta olhos pequenos e pouco eficientes, porém sua percepção do meio ambiente é auxiliada principalmente pelos barbilhões, caracterizando-o como uma espécie com maior atividade noturna (Lundberg e Littmann, 2003; Burgess, 1989).

O surubim do Paraíba (Figura 2) é uma espécie reofílica, isto é, migra rio acima para se reproduzir (Burgess, 1989), e este comportamento, combinado aos impactos sofridos na Bacia do Rio Paraíba do Sul (principalmente as barragens), levou esta espécie à Lista Nacional das Espécies de Peixes Ameaçadas de Extinção (Brasil, 2004; Honji *et al.*, 2009), podendo até ser extinta devido às possíveis alterações na temperatura decorrente das alterações climáticas.

Figura 2 – Surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*).

Considerando-se os fatos mencionados, foi elaborada a hipótese de que a provável alteração da temperatura devido às mudanças climáticas pode tornar-se um agente estressor para o surubim do Paraíba, influenciando o crescimento, a utilização dos substratos metabólicos e o perfil dos ácidos graxos desta espécie. Estes estudos são importantes para que seja possível compreender como este animal responderia frente a esta provável nova realidade, além de proporcionar dados mais concretos para o estabelecimento de projetos visando à formação de reprodutores.

2. Objetivos

2.1 Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a influência da variação da temperatura da água no crescimento e nas respostas fisiológicas de juvenis de surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*) em cativeiro.

2.2 Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo proposto acima foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Analisar a curva de crescimento e os parâmetros zootécnicos dos animais em cultivo;
- Analisar a deposição de substratos energéticos (proteínas, lipídeos, carboidratos) em diferentes tecidos e no plasma;
- Analisar a composição do perfil dos ácidos graxos das membranas celulares e dos lipídeos de reserva;
- Analisar a concentração do cortisol plasmático como um indicador de estresse;

3. Material e Métodos

3.1 Delineamento Experimental

O presente projeto foi conduzido na piscicultura da CESP (Companhia Energética de São Paulo) localizada no município de Paraibuna no Estado de São Paulo, onde os surubins do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*) que participaram do experimento nasceram e permaneceram estocados em tanques de 2 x 5 metros (10 m²).

Antes do início do experimento, os tanques foram previamente esvaziados e limpos como medida profilática com a aplicação de cal (cerca de 20g/tanque). Em seguida, os tanques foram abastecidos e o pH da água foi monitorado, tendo como meta a manutenção do mesmo entre 7 e 7,5.

Para a condução do experimento, foi realizado no mês de setembro de 2009 uma biometria inicial, selecionando 400 animais com idade de 2 anos apresentando uma massa média de $38,9 \pm 0,29$ gramas. Além disso, mais 10 peixes com a mesma massa média dos 400 surubins selecionados foram sacrificados e amostras de plasma, músculo branco e fígado foram coletadas para análises metabólicas, de ácidos graxos e de cortisol plasmático (os detalhes destas análises serão abordados com mais detalhes posteriormente).

Os peixes selecionados na biometria inicial foram estocados em 4 tanques de alvenaria com área de 2 x 5 m cada (10 m^2), (mesma área do tanque em que os animais estavam antes do experimento) e foram cobertos por uma tela POLYSOMBRA, com uma área de 1,95m x 3,5m, que tinha como objetivo diminuir a incidência de luz em 70% (Figura 3). Os 4 tanques foram divididos em dois grupos experimentais, o grupo “Sem Estufa” e o grupo “Estufa”, que apresentava a mesma densidade de estocagem (10 animais/m^2 , totalizando 100 peixes por tanque).

No grupo Sem estufa, os tanques experimentais estavam expostos às condições de variações de temperatura, fotoperíodo e pluviosidade natural, já os tanques do grupo Estufa, foram cobertos com uma estufa transparente (Figura 3), que mantém a mesma variação de fotoperíodo do tratamento anterior, mas que manteria a temperatura da água aproximadamente 2°C a acima do grupo Sem Estufa (valor pré-definido em experimento piloto). Além disso, a entrada de água nos tanques de ambos os tratamentos foi monitorada para que se mantivesse em torno de 1L/40s, porém, após três semanas o fluxo de entrada de água era retomado aos padrões normais durante dois dias e após esse período o baixo fluxo de entrada de água era restabelecido. Para que não ocorresse uma possível queda do oxigênio dissolvido nos grupos experimentais, devido à possível elevação da temperatura, e/ou a baixa recirculação de água, foi utilizada uma bomba de ar eletromagnética de marca RESUN® (modelo ACQ – 008).

Ao longo do experimento, os animais foram alimentados *ad libitum*, conforme recomendação do fornecedor, com uma ração comercial extrusada. O plano de alimentação seguiu o sistema de arrazoamento para peixes nativos preconizado pela Purina e a ração oferecida foi a Nutripeixe TR45 com 45% de proteína bruta (o perfil de ácidos graxos da ração oferecida aos animais está apresentado na tabela 1). A ração era oferecida todos os dias às 16:00 horas.

Para certificar-se da manutenção da qualidade de água ao longo do experimento, foram monitoradas as concentrações de oxigênio dissolvido, temperatura e pH

diariamente, além das concentrações de amônia e nitrito, semanalmente (os protocolos para a determinação da concentração de amônia e nitrito estão apresentados no anexo I).

Diariamente, às 9:00 horas eram realizadas observações nos tanques experimentais para a retirada de possíveis sobras de ração e monitoramento dos parâmetros de qualidade de água descritos acima. A coleta de água para análise de amônia e nitrito também era realizada neste horário.

O experimento teve início em Setembro de 2009 com término em março de 2010, e ao longo deste período foram realizadas biometrias a cada 2 meses (setembro de 2009, novembro de 2009, janeiro de 2010 e março de 2010). Nessas coletas pelo menos 70% dos animais tiveram seus dados morfométricos (comprimento total e padrão) e ponderais registrados (Figura 4). A cada biometria, 5 peixes de cada tanque (em ambos os tratamentos) foram sacrificados e assim como na coleta inicial, foram obtidas amostras de músculo, fígado e plasma (Figura 5) com a finalidade de quantificar parâmetros metabólicos que serão descritos a seguir.

3.2 Parâmetros Zootécnicos

Os dados obtidos com as biometrias foram utilizados para o cálculo dos seguintes parâmetros:

3.2.1 Fator de Condição

$K = Wt/Lt^b$, onde:

Wt – Massa corpórea total

Lt – Comprimento total

b – coeficiente angular da regressão entre Wt/Lt

O fator de condição (Le Cren, 1951) é um indicador quantitativo do “bem estar” do peixe, refletindo condições alimentares recentes e/ou gasto de reservas em atividades cíclicas, possibilitando relações com condições ambientais e aspectos comportamentais das espécies (Vazzoler, 1996).

3.2.2 Crescimento Relativo (%)

$CR = (Wf - Wi) \times 100 / Wi$, onde:

Wf – massa corpórea final

Wi – massa corpórea inicial

3.2.3 Taxa de Crescimento Específico (% diária)

$TCE = \ln W_2 - \ln W_1 \times 100 / T_2 - T_1$, onde:

W_1 – Massa corpórea inicial (g) na data T_1 W_2 – Massa corpórea final (g) na data T_2

3.2.4 Eficiência Alimentar

$TCA = \text{ração consumida} / \text{incremento de biomassa}$

3.2.5 Coeficiente de Variação

$CV = \text{Derivação da média} / \text{média da massa} \times 100$

3.2.6 Sobrevivência

$\% S = N_f \times 100 / N_i$, onde:

N_f – Número de peixes ao final do experimento

N_i – Número de peixes inicialmente estocados

3.3 Sacrifício dos animais e obtenção das amostras

Os animais foram anestesiados com benzocaína (100mg/L) e uma amostra de sangue foi retirada a partir da vasculatura caudal, utilizando-se seringas heparinizadas. O sangue total foi centrifugado e as amostras de plasma estocadas em gelo seco. O fígado e uma porção da musculatura epaxial foram retirados, e imediatamente congelados também em gelo seco. As amostras foram mantidas congeladas em freezer – 80°C até o processamento.

3.4 Análises metabólicas

Para as análises metabólicas, os tecidos hepáticos e musculares foram submetidos à extração e determinação dos lipídeos e proteínas totais, concentração de glicogênio e

perfil dos ácidos graxos dos triglicerídeos e dos fosfolipídios. No plasma, foram realizadas análises de lipídeos totais, perfil dos ácidos graxos e concentração de glicose.

Os protocolos das análises metabólicas (proteínas, lipídeos, glicogênio e glicose), assim como o perfil dos ácidos graxos são apresentadas com mais detalhes em anexo.

3.4.1 Extração e determinação de proteínas totais

As proteínas totais dos tecidos (fígado e músculo) foram previamente precipitadas e solubilizadas de acordo com o método proposto por Milligan e Girard (1993) e em seguida determinadas utilizando o método descrito por Lowry *et al.*, (1951). A determinação de proteínas totais foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm, contra uma curva padrão de albumina sérica bovina (*serum bovine albumine*, SIGMA).

3.4.2 Extração e determinação de lipídeos totais

Os lipídeos totais dos tecidos foram extraídos com uma solução de clorofórmio: metanol: água (2:1:0,5) (Folch *et al.*, 1957) (com exceção do plasma, que não necessita de extração) e dosados pelo método colorimétrico da sulfo-fosfovanilina (Frings *et al.*, 1972). A concentração dos lipídeos totais foi determinada em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 540 nm contra uma curva padrão de óleo de fígado de bacalhau (*Cod liver oil fatty acid methyl esters*, SIGMA).

3.4.3 Separação das classes lipídicas e metilação dos ácidos graxos

Uma porção do extrato lipídico dos tecidos foi utilizada para a determinação do perfil de ácidos graxos. A partir deste extrato, foi feita a separação dos lipídeos polares e neutros em cromatografia de camada delgada. As frações foram metiladas com cloreto de acetila e armazenadas sob uma atmosfera de nitrogênio. O perfil dos ácidos graxos foi realizado por cromatografia gasosa, utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a um ionizador de chama (FID) (Varian GC 3900) e a identificação dos ácidos graxos foi feita com base nos tempos de retenção dos ácidos graxos, utilizando-se um padrão composto de metil ésteres (FAME) (SUPELCO 37 *components*).

3.4.4 Medida da Concentração de Glicose e Glicogênio

A medida da concentração do glicogênio hepático e muscular assim como da glicose plasmática foi realizada com meio do método enzimático. Para obtenção dos

dados de glicogênio dos tecidos mencionados acima foi descontada a concentração de glicose livre no tecido pelo método Keppler e Decker (1974).

3.5 Cortisol Plasmático

Para que se possa inferir em alguma condição de estresse, foi determinada a concentração de cortisol no plasma dos animais dos 2 grupos experimentais.

Para que os resultados de cortisol obtidos não fossem mascarados pelo manejo, os peixes coletados dos tanques experimentais eram levados imediatamente ao anestésico, sendo que este processo demorava em torno de 2 minutos. Este hormônio foi determinado com o uso de kits de elisaimunoensaio da marca ADALTIS e a leitura dos resultados foi realizada em leitora de microplaca (*Molecular Devices*, modelo SpectraMax 250), no comprimento de onda de 450 nm.

3.6 Análises estatísticas

Os valores de comprimento total e da massa corpórea, além das análises metabólicas, do perfil dos ácidos graxos e do cortisol plasmático dos grupos experimentais, foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) para verificar a existência de diferenças estatísticas entre os resultados. As análises foram conduzidas utilizando-se o software Sigma Stat for Windows (Jandel Corporation®). Os dados obtidos nos cálculos dos parâmetros zootécnicos foram analisados pelo Teste-t (independente) do programa BioEstat 5.0.

Para a obtenção dos gráficos de regressão, os dados foram plotados no programa Excel e as retas de regressão, assim como os coeficientes de correlação (R^2) foram obtidos com base na inclinação da reta. As correlações de Pearson foram consideradas significativas quando $R^2 < 0.3$.

Figura 3 – A- Tanques experimentais: à esquerda do grupo Estufa e à direita do grupo Sem Estufa. A seta indica a tela POLYSOMBRA.

Figura 4 – Biometria do surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*) (A) e ao anestésico (benzocaína) (B).

Figura 5 - Retirada dos tecidos para as análises metabólicas do surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*) ao longo do experimento, setembro de 2009 (A), novembro de 2009 (B), janeiro de 2010 (C) e março de 2010 (D). As setas indicam a presença de tecido adiposo na região abdominal

4. Resultados

Os resultados apresentados em forma de gráficos estão presentes ao longo do texto, já os expostos em tabela estão no anexo II

4.1. Ração Consumida, Qualidade e Temperatura da Água

Ao longo do experimento o oxigênio dissolvido e o pH mantiveram-se adequados para o cultivo da espécie. A tabela 2 mostra os valores de dureza, fosfato, nitrogênio, alcalinidade total e matéria orgânica, que assim como os dados de oxigênio dissolvido e o pH apresentaram-se dentro dos padrões para o cultivo em cativeiro.

A concentração de amônia na água do tanque de ambos os grupos experimentais se manteve constante na maior parte do experimento com uma leve elevação ao final do período de cultivo para valores próximos a 0,35 mg/L (Figura 6). Para o nitrito, observou-se uma queda no mês de janeiro de 2010, na qual, o valor do grupo sem Estufa chegou 0,01 e 0,02 para o grupo Estufa, porém, em ambos os tratamentos a concentração de nitrito elevou-se, tornando semelhante aos valores encontrados no início do experimento (Figura 7).

Figura 6 - Concentração de amônia na água dos tanques dos grupos experimentais (Estufa e Sem Estufa) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final).

Figura 7 – Concentração de nitrito na água dos tanques dos grupos experimentais (Estufa e Sem Estufa) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final).

A temperatura da água ao longo do experimento variou em média de 20 (temperatura média da mínima registrada) a 25,7°C (temperatura média da máxima registrada) ao longo do experimento. Quando observada a temperatura ambiente, que era medida diariamente às 9:00 horas, o grupo Estufa apresentou uma temperatura cerca de 2°C mais elevada que o grupo Sem Estufa ao longo do experimento (Tabela 3).

A quantidade de ração oferecida aos animais foi de 5 gramas/dia/tanque no início do experimento para cada grupo, com a ingestão desta quantidade até o mês de novembro, quando a média de ração ingerida foi elevada para 15 gramas/dia/tanque em ambos os grupos. Ao decorrer do experimento essa média foi se elevando, chegando em 50 gramas/dia/tanque ao final do experimento como pode ser observado na tabela 4.

4.2 Parâmetros Morfométricos, Ponderais e Zootécnicos

Com os tanques experimentais do grupo Estufa apresentando uma média de temperatura de cerca de 2°C mais elevada ao final do experimento, a massa corpórea foi estatisticamente maior quando comparada aos animais do grupo Sem Estufa. Esta diferença pode ser notada já na segunda biometria (novembro de 2009) e permaneceu ao longo do experimento. Quanto à elevação de massa corpórea dentro dos grupos, ao longo do experimento, foi observado um aumento estatístico significativo, após a

terceira biometria (janeiro de 2010) em ambos os grupos, ocorrendo isso novamente apenas para o grupo Estufa na última biometria (março de 2010). O grupo Sem Estufa, ainda apresentou um queda significativa na média de massa corpórea no mês de novembro que em relação ao início, resultando em uma diferença estatística entre os dois grupos experimentais que permaneceu até o final do experimento (tabela 5).

O comprimento corpóreo também seguiu a mesma tendência ocorrida para a massa corpórea, com diferença estatística entre os grupos experimentais a partir de janeiro de 2010, que permaneceu até o final do experimento. Com relação ao incremento do comprimento dentro dos grupos experimentais, o grupo Estufa apresentou uma elevação estatisticamente significativa e gradual a partir de novembro de 2009 até o final do experimento. No grupo Sem Estufa esta elevação ocorreu em janeiro de 2010 e com uma elevação em março (Tabela 5).

Quando confrontado os dados da massa corpórea dos grupos com a média de temperatura da água, é possível observar que a maior amplitude térmica do grupo Estufa em relação ao grupo Sem Estufa relaciona-se com a maior massa corpórea atingida pelos animais. Porém, é possível observar também que na coleta de novembro de 2009 a temperatura média entre os grupos experimentais já existia, mas não houve elevação da sua massa corpórea dos animais mantidos na estufa em relação ao início do experimento, e ocorreu neste período, uma queda da massa corpórea, como já relatado, para os animais do grupo Sem Estufa (Figura 8). É possível observar também que a temperatura permaneceu praticamente constante (Tabela 3) no grupo Sem Estufa entre as coletas de janeiro e março de 2010 e a massa corpórea não se elevou estatisticamente (Figura 8).

Figura 8 – Relação entre a temperatura média da água dos tanques experimentais dos grupos Sem Estufa (barras pretas) e com Estufa (barras verdes) com a massa corpórea destes grupos (Sem Estufa – linha azul; Estufa – linha vermelha) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final).

A comparação de massa corpórea com a quantidade de ração consumida demonstra que tanto no início do experimento, quanto no mês de outubro a quantidade de ração foi de 5 g/dia/tanque, já no mês de novembro esta quantidade triplicou (15g/dia/tanque), mesmo assim, o grupo Estufa manteve a sua massa e houve uma queda no grupo Sem Estufa, em relação ao início do experimento. Após a elevação da quantidade de ração ingerida, a massa corpórea elevou-se nos animais do grupo Estufa e para os animais do grupo Sem Estufa este aumento não ocorreu entre os meses de janeiro de março (Figura 9 e Tabelas 4 e 5).

Figura 9 – Relação entre a quantidade média ração consumida (barras verdes) em ambos os grupos experimentais com a massa corpórea (g) dos grupos com estufa (linha vermelha) e sem estufa (linha azul) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final).

Os resultados dos parâmetros zootécnicos estão expostos na tabela 6. Assim como foi observado para massa corpórea e comprimento, os animais do grupo Estufa demonstraram um melhor desempenho zootécnico que os animais do grupo Sem Estufa, apresentando valores significativamente maiores de crescimento relativo e específico (CR e CE) e eficiência alimentar (EA). No entanto, o coeficiente de variação de massa final (CV final) não variou assim como o indicador quantitativo do “bem estar” do animal, o fator de condição (K). Quanto à sobrevivência (S), o grupo Estufa não apresentou mortalidade, já o grupo Sem Estufa apresentou, porém estes resultados não foram estatisticamente diferentes entre os grupos experimentais.

Foi analisada a correlação entre a massa corpórea e a temperatura (Figuras 10A e B), utilizando-se a correlação de Pearson. Estes resultados demonstraram que houve uma correlação moderada em ambos os grupos (0,49 para os animais do grupo Sem Estufa e de 0,65 para os animais do grupo Estufa).

Figura 10 – Correlação entre os valores logaritimizadas da massa corpórea e a temperatura da água ao longo das coletas realizadas no experimento (setembro/09, novembro/09, janeiro/10 e março/10) do grupo Sem Estufa (A) e do grupo Estufa (B).

4.3 Índice Hepatossomático (IHS)

O IHS, que representa a porcentagem da massa do fígado em relação à massa corpórea total do animal, apresentou diferenças estatísticas significativas apenas dentro do mesmo grupo experimental ao longo do experimento (Figuras 11). Os animais do grupo Sem Estufa assim como aqueles do grupo Estufa apresentaram uma elevação do IHS, na coleta de janeiro de 2010, que se manteve até março do mesmo ano. Este

padrão semelhante encontrado no grupo entre os grupos refletiu em valores estatisticamente iguais, quando comparado os dois grupos experimentais em suas respectivas coletas.

Figura 11 – Índice Hepatosomático (%) dos animais dos grupos Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial – barra preta) a março de 2010 (coleta final). (média ± EPM). ^{a,b} Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo.

4.3.1 Análises dos Substratos Energéticos no Fígado

Nas análises metabólicas hepáticas, a concentração de lipídeos totais nos animais do grupo Sem Estufa e Estufa apresentou exatamente o mesmo padrão temporal, com uma elevação no mês de novembro de 2009 em relação ao início do experimento, seguida de uma queda gradual com o prosseguimento do trabalho, que culminou em valores estatisticamente iguais entre o início e o final do experimento (setembro de 2009 e março de 2010) (Figura 12). Estes resultados não corroboram os valores de IHS, já que neste índice houve uma elevação após a coleta realizada em janeiro de 2010 em relação aos valores iniciais.

Figura 12- Concentração de lipídeos hepáticos (mg/g) dos animais dos grupos Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final) (média $\pm$ EPM). ^{a,b,c} Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo.

A concentração de proteínas totais hepáticas foi igual entre os grupos experimentais em suas respectivas coletas. Quando avaliado dentro dos grupos experimentais ao longo do tempo, os animais de ambos os grupos experimentais mantiveram suas concentrações iguais até janeiro de 2010, apresentando uma elevação dos valores na última coleta (março de 2010) (Figura 13).

Figura 13- Concentração de proteína hepática dos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial) a Mar/2010 (coleta final) (média $\pm$ EPM). ^{a,b} Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo.

A concentração de glicogênio hepático, assim como os demais substratos energéticos apresentaram valores semelhantes entre os animais dos dois grupos experimentais, com uma tendência de queda após o mês de novembro de 2009 em ambos os grupos (Figura 14).

Figura 14- Concentração de glicogênio hepático (mg/g) dos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final) (média $\pm$ EPM).

De uma forma geral, analisando-se padrão de deposição dos substratos energético em ambos os grupos é possível notar que os lipídeos totais apresentam uma elevação já em novembro de 2009 em relação ao início do experimento e uma constante queda até o final do período (Figura 12). No entanto, esse padrão se inverte tanto para as proteínas totais, quanto para o glicogênio, com estes, apresentando uma tendência de elevação na coleta realizada em janeiro de 2010 quando comparada às coletas iniciais e que se confirma estatisticamente em março deste mesmo ano (Figuras 13, 14).

Estes padrões observados para as proteínas totais e para o glicogênio sugerem uma relação com a elevação do IHS em ambos os experimentos, nos quais os valores deste índice apresentaram-se estatisticamente superiores quando comparados ao início do experimento, na coleta de janeiro de 2010 (Figura 11).

4.3.2 Análises dos Substratos Energéticos no Músculo

A concentração de lipídeos totais musculares não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais em suas respectivas coletas, porém em ambos os grupos foi observada uma elevação destes valores já na coleta de novembro de 2009 (Figura 15), ocorrendo uma queda gradual até o final do período experimental, seguindo o mesmo perfil temporal apresentado pelo fígado.

Figura 15- Concentração de lipídeo muscular (ng/g) nos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (média $\pm$ EPM). ^{a,b,c} Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo.

A concentração de proteínas musculares também apresentou o mesmo padrão da proteína hepática, com uma tendência não significativa de queda nos meses de novembro e janeiro e uma elevação na coleta de março de 2010 e não havendo diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 16).

Figura 16- Concentração de proteínas musculares (mg/g) dos animais dos grupos Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial) a Mar/2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM). ^{a,b}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo.

A concentração de glicogênio muscular não apresentou o mesmo padrão de elevação observado no fígado. Ao longo do experimento os animais do grupo Sem Estufa, na coleta de novembro, apresentaram valores mais elevados em relação ao início do experimento e também em março de 2010. Quando se faz a comparação entre os grupos experimentais, observa-se que em novembro de 2009 os animais do grupo Sem Estufa apresentam concentrações mais elevadas do que os animais mantidos no grupo Estufa (Figura 17), mas esta diferença não se manteve ao longo do experimento.

Figura 17- Concentração de glicogênio muscular dos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial – barra preta) a Mar/2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM). ^{a,b}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo. *indica diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais em sua respectiva coleta.

4.3.3 Análises dos Metabólitos Plasmáticos

A concentração de lipídeos plasmáticos apresentou um padrão semelhante ao encontrado no fígado e no músculo, ou seja, houve uma elevação em novembro de 2009 em relação ao início do experimento e, após este período, uma queda gradual, não havendo diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (Figura 18).

Figura 18- Concentração de lipídeo plasmático (mg/mL) dos grupos Estufa e Sem Estufa ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). ^{a,b} Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo.

A concentração de glicose plasmática só apresentou diferença estatística dentro dos grupos experimentais, com uma tendência de elevação da concentração desse substrato que se confirma estatisticamente no mês de março nos animais de ambos os grupos (Figura 19).

aba

b

b

Figura 19- Concentração de glicose plasmática (mg/mL) nos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (média $\pm$ EPM). ^{a,b} Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo experimental ao longo do tempo.

4.4 Análises dos Substratos com a Temperatura e a Ração Consumida

É possível observar que a temperatura interferiu de alguma maneira no aumento da massa corpórea dos surubins, mesmo que a correlação de Pearson tenha demonstrando uma correlação considerada apenas como moderada.

As Figuras 20A e B (grupo Sem Estufa e grupo Estufa, respectivamente) mostram uma relação da ração ingerida com a concentração de lipídeos musculares e hepáticos. É possível observar que os valores da concentração deste substrato energético se elevam em novembro de 2009, período no qual a quantidade média de ração oferecida foi baixa em relação às quantidades oferecidas nos meses seguintes.

As figuras 21A e B (grupo Sem Estufa e grupo Estufa, respectivamente) estão apresentando uma relação da temperatura da água com a concentração de lipídeos musculares e hepáticos. Nota-se nesta figura que após a segunda coleta (novembro de 2009) houve apenas uma elevação média de 1°C entre novembro e a coleta final (março de 2010) para ambos os grupos experimentais, porém neste período aconteceu uma alteração estatística nas concentrações de lipídeos, o que contraria o que ocorreu entre a primeira e a segunda coleta, mesmo um aumento de temperatura neste intervalo em torno de 2°C.

Figura 20 – Relação entre a quantidade média de ração consumida (g) (linha verde) pelos animais do grupo Sem Estufa (A) e Estufa (B) com a concentração de lipídeos musculares (barra azul) e hepáticos (barra marrom) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (média $\pm$ EPM).

Figura 21 – Relação entre a temperatura média da água (°C) (linha preta) no grupo Sem Estufa (A) e Estufa (B) com a concentração de lipídeos musculares (barra azul) e hepáticos (barra marrom) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (média $\pm$ EPM).

4.5 Análises dos Ácidos Graxos

Os resultados do perfil de ácidos graxos serão apresentados em forma de gráficos e tabelas (anexo II). Os gráficos apresentam os valores percentuais da somatória de ácidos graxos saturados (Σ SFA), monoinsaturados (Σ MUFA) e polinsaturados (Σ PUFA). As tabelas apresentam estes valores, juntamente com as porcentagens identificadas de cada ácido graxo.

4.5.1 Ácidos Graxos do Fígado

A análise dos ácidos graxos da fração polar hepática dos animais de ambos os grupos mostrou um aumento da porcentagem dos SFAs no mês de janeiro de 2010 em relação ao início do experimento, valor este que se elevou ainda mais em março deste mesmo ano. Em ambos os grupos essas variações se deram devido às alterações dos ácidos graxos C16:0 e C18:0 que se elevaram gradativamente do início até o final do experimento. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas na porcentagem dos SFAs entre os animais dos dois grupos experimentais (Tabela 7 e Figura 22).

A porcentagem dos MUFAs na fração polar do tecido hepático dos animais do grupo Sem Estufa não apresentou diferença estatística ao longo do período experimental, já no grupo Estufa os animais apresentaram uma redução da porcentagem desses ácidos graxos em março, quando os animais foram comparados com aqueles da coleta realizada em janeiro de 2010. O valor percentual do mês de janeiro gerou uma diferença estatística significativa também entre os grupos experimentais naquele período, sendo que o grupo Estufa apresentou a maior porcentagem de MUFA, que continuou mais elevada no final do experimento (Tabela 7 e Figura 23). Estes resultados foram em decorrência principalmente da elevação do C18:1n9 nos animais do grupo Estufa, no mês de janeiro de 2010.

Concomitantemente à elevação dos SFA ao longo do experimento, houve uma queda no percentual de PUFA na fração polar hepática dos animais coletados em março de 2010 nos dois grupos experimentais (Tabela 7 e Figura 24). Esta queda se deu principalmente às reduções na porcentagem do ácido graxo docosaheptaenóico C22:6n3 (DHA), que acarretou além da queda da Σ PUFA, como também da somatória dos

ácidos graxos polinsaturados da série n3 (Σ PUFAS n3). A somatória dos ácidos graxos polinsaturados da série n6 (Σ PUFAS n6) também se reduziu no mês de março, porém não houve um ácido graxo único responsável por esta redução, mas sim pequenas reduções na porcentagem de vários ácidos graxos (Tabela 7).

Figura 22- Perfil da somatória de ácidos graxos saturados da fração polar do fígado dos animais do grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial) a Mar/2010 (coleta final). ^{abc}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre as coletas, dentro do mesmo grupo experimentais (Média $\pm$ EPM).

Figura 23- Perfil da somatória de ácidos graxos monoinsaturados da fração polar do fígado dos animais no grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial-barra preta) a Mar/2010 (coleta final). ^{ab}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre as coletas, dentro do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

Figura 24- Perfil da somatória de ácidos graxos polinsaturados da fração polar do fígado dos animais do grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial – barra preta) a Mar/2010 (coleta final). Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre as coletas, dentro do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

As figuras 25, 26 e 27, além apresentar as porcentagens de Σ SFA, Σ MUFA e Σ PUFA respectivamente e as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais em suas respectivas coletas, quando estas ocorreram, apresentam também os valores de temperatura da água ao longo do experimento. É possível notar que com a elevação da temperatura ao longo do experimento os ácidos graxos saturados aumentam e os polinsaturados diminuem, demonstrando que para esses dois grupos de ácidos graxos, em ambos os grupos experimentais ocorre a mesma resposta nas membranas dos hepatócitos. Entretanto, para os monoinsaturados os grupos experimentais apresentaram diferenças significativas, sendo estas maiores para os animais do grupo Estufa nas coletas realizadas em janeiro e março de 2010.

Figura 25 - Perfil da somatória de ácidos graxos saturados da fração polar do fígado dos animais nos grupos Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa – linha verde) – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM).

Figura 26- Perfil da somatória de ácidos graxos monoinsaturados da fração polar do fígado dos animais nos grupos Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa – linha verde) – Set/2009 (coleta inicial) a Mar/2010 (coleta final). *Indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais de acordo com sua respectiva coleta (Média $\pm$ EPM).

Figura 27- Perfil da somatória de ácidos graxos polinsaturados da fração polar do fígado dos animais nos grupos Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa- linha verde) – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM).

Para a fração neutra do fígado, a Σ SFA, apresentou uma elevação ao longo do experimento, na qual os animais do grupo Sem Estufa apresentaram diferença significativa em relação ao início do experimento, a partir da coleta de janeiro de 2010. Nos animais mantidos no grupo Estufa, o aumento de SFA ocorreu já na segunda coleta (novembro de 2009) e os valores se mantiveram elevados até o final do experimento (Tabela 8 e Figura 28). Os ácidos graxos fundamentais para essa elevação foram o C16:0 para o grupo Estufa e o C16:0 e C18:0 para o grupo Sem Estufa (Tabela 8).

A Σ MUFA demonstrou diferentes padrões ao longo do tempo nos dois grupos experimentais. Os animais do grupo Sem Estufa demonstraram uma tendência de queda do início do experimento até a coleta de janeiro de 2010 e esta diminuição foi significativa na última coleta, em março de 2010. Por outro lado, os animais do grupo Estufa apresentaram uma elevação da porcentagem de MUFA ao final do experimento, em relação ao início e à coleta de janeiro/2010 (Tabela 8 e Figura 29). O ácido graxo que influenciou tais resultados foi o C18:1n9, que seguiu o mesmo padrão da somatória dos ácidos graxos monoinsaturados.

Esta diferença nos padrões de Σ MUFA acarretou valores inversos na Σ PUFA. Os animais do grupo Sem Estufa apresentaram uma queda dos PUFA já na coleta de

novembro de 2009, com valores que se mantiveram em janeiro de 2010, porém houve um aumento significativo na coleta seguinte (março de 2010). Já nos animais mantidos no grupo Estufa, o mesmo padrão no início do experimento foi mantido até a coleta de janeiro, no entanto, na coleta seguinte ocorreu uma queda das porcentagens dos PUFA totais, quando comparado aos animais do início do experimento (setembro de 2009) (Tabela 8 e Figura 30). A diminuição observada no grupo Sem Estufa é influenciada pela Σ PUFA n3, principalmente pelo o ácido graxo eicosapentaenóico, C20:5n3 (EPA) e o C22:6n3 (DHA). Para o grupo Estufa tanto a Σ PUFA n3 (principalmente o DHA) quanto a Σ PUFA n6 (principalmente o ácido linolêico, C18:2n6, LA) influenciaram essas alterações (Tabela 8).

Figura 28- Perfil da somatória de ácidos graxos saturados da fração neutra do fígado dos animais no grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial-barra preta) a março de 2010 (coleta final). ^{ab}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os animais do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

Figura 29- Perfil da somatória de ácidos graxos monoinsaturado da fração neutra do fígado dos animais no grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial-barra preta) a março de 2010 (coleta final). ^{ab}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os animais do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

Figura 30- Perfil da somatória de ácidos graxos polinsaturados da fração neutra do fígado dos animais no grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial – barra preta) a março de 2010 (coleta final). ^{ab}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os animais do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

Na comparação entre os grupos experimentais, a Σ SFA apresentou uma diferença estatística entre os grupos na coleta realizada em novembro, quando os animais do grupo Estufa apresentaram porcentagens mais elevadas de SFA na fração neutra do fígado, contudo, esta diferença não foi mantida no restante do experimento. É

possível observar também que com o gradual aumento da temperatura há uma elevação na porcentagem desses ácidos graxos no fígado de ambos os grupos (Figura 31).

Figura 31- Perfil da somatória de ácidos graxos saturados da fração neutra do fígado dos animais nos grupos Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa- linha verde) – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). * Indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais de acordo com sua respectiva coleta (Média $\pm$ EPM).

Devido à elevação da Σ MUFA na fração neutra hepática dos animais do grupo Estufa e a queda percentual desses ácidos graxos nos animais do grupo Sem Estufa, ocorrida na coleta de março, houve uma diferença estatística significativa entre os dois grupos, tendo por consequência o grupo Estufa maior porcentagem de MUFA. Além disto, observar-se na Figura 32, que a diferença de temperatura entre os grupos fez com que houvesse uma maior porcentagem destes MUFA nos animais mantidos em temperaturas mais elevadas (grupo Estufa) e menor acúmulo destes ácidos graxos na fração neutra hepática dos animais mantidos no grupo Sem Estufa.

O inverso da Σ MUFA ocorreu na Σ PUFA, ou seja, os valores percentuais desses ácidos graxos são estatisticamente maiores na fração neutra hepática dos animais do grupo Sem Estufa em relação aos animais do grupo Estufa na coleta realizada em março de 2010. Desta forma, a temperatura mais elevada ao final do experimento resultou em um menor acúmulo de PUFA e maior acúmulo de MUFA na fração neutra do fígado dos surubins jovens (Figura 33).

Figura 32- Perfil da somatória de ácidos graxos monoinsaturados da fração neutra do fígado dos animais nos grupos Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média da água dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa- linha verde) – Set/2009 (coleta inicial) a Mar/2010 (coleta final). *Indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais de acordo com sua respectiva coleta (Média $\pm$ EPM).

Figura 33- Perfil da somatória de ácidos graxos polinsaturados da fração neutra do fígado dos animais nos grupos Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais – (Estufa – linha preta; Sem Estufa- linha verde) Set/2009 (coleta inicial) a Mar/2010 (coleta final). *Indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais de acordo com sua respectiva coleta (Média $\pm$ EPM).

4.5.2 Ácidos Graxos do Músculo

Os resultados da análise de ácidos graxos da fração polar do músculo foram semelhantes com os encontrados na fração polar do fígado. A Σ SFA apresentou em ambos os grupos experimentais um crescente aumento na membrana do músculo desses animais. Os ácidos graxos C18:0 e C16:0 foram os principais responsáveis por esta elevação em ambos os grupos (Figura 34).

Figura 34- Perfil da somatória de ácidos graxos saturados da fração polar do músculo dos animais no grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial – barra preta) a Mar/2010 (coleta final). ^{ab}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os animais do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

A Σ MUFA do grupo Sem Estufa apresentou o mesmo padrão dos valores percentuais da Σ SFA, com uma elevação dos ácidos graxos em janeiro e a manutenção no mês de março de 2010, sendo o C18:1n9 o principal ácido graxo responsável por essas alterações (Tabela 9). Já os animais do grupo Estufa não apresentaram diferenças estatísticas no perfil de MUFA na fração polar do músculo ao longo do experimento (Figura 35).

Figura 35- Perfil da somatória de ácidos graxos monoinsaturados da fração polar do músculo dos animais no grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial – barra preta) a março de 2010 (coleta final).

^{ab}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os animais do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

A Σ PUFA apresentou valores inversos aos encontrados na Σ SFA, com uma queda significativa na porcentagem desses ácidos graxos a partir do mês de janeiro, que se manteve no mês de março de 2010 para ambos os grupos. Os PUFA n3, principalmente o DHA, foram os principais responsáveis por este padrão de variação. Além disso, a Σ PUFA n6 também apresentou diminuição na porcentagem presente na fração polar muscular, mas apenas no mês de janeiro em relação ao início do experimento. Nos animais do grupo Sem Estufa, pequenas alterações em ácidos graxos específicos resultaram em variações na Σ PUFA n6, enquanto que nos animais mantidos no grupo Estufa, ácidos graxos de cadeia longa como o C20:4n6 e o C22:5n6 foram responsáveis pelas principais alterações na Σ PUFA n6 das membranas musculares dos animais (Tabela 9 e Figura 36).

Figura 36- Perfil da somatória de ácidos graxos polinsaturados da fração polar do músculo dos animais no grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial – barra preta) a março de 2010 (coleta final). ^{ab} Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os animais do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

Comparando a Σ SFA da fração polar muscular dos animais dos grupos experimentais, em suas respectivas coletas, não foram observadas diferenças estatísticas. E assim como foi observado no fígado, com a elevação da temperatura da água ao longo do experimento houve a elevação da porcentagem destes ácidos graxos (Figura 37).

Figura 37- Perfil da somatória de ácidos graxos saturados da fração polar do músculo nos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa-

linha verde) – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM).

Da mesma forma, a Σ MUFA também não apresentou diferença estatística significativa na fração polar muscular entre os animais dos diferentes grupos experimentais. Adicionalmente, não houve nenhuma relação entre a elevação ou queda da porcentagem destes ácidos graxos com a elevação da temperatura ao longo do experimento (Figura 38).

Figura 38- Perfil da somatória de ácidos graxos monoinsaturados da fração polar do músculo dos animais no grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa- linha verde) – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM).

A Σ PUFA também não apresentou diferenças estatísticas significativas na fração polar muscular dos animais dos grupos experimentais, quando comparados em suas respectivas coletas. Assim como na fração polar do fígado, com a elevação da temperatura houve uma queda nos valores percentuais destes ácidos graxos na fração polar do músculo em ambos os grupos experimentais (Figura 39).

Figura 39- Perfil da somatória de ácidos graxos polinsaturados da fração polar do músculo dos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média da água dos respectivos grupos (Estufa – linha preta; Sem Estufa- linha verde) – Set/2009 (coleta inicial) a Mar/2010 (coleta final).(Média ± EPM).

A Σ SFA da fração neutra do músculo dos animais do grupo Sem Estufa não apresentou diferenças estatísticas significativas entre as coletas. Já nos animais do grupo Estufa, houve uma elevação da porcentagem desses ácidos graxos na coleta de janeiro de 2010, e posteriormente se restabeleceram aos valores aqueles do início do experimento. O ácido graxo C16:0 foi o responsável por estas modificações nos valores encontrados na Σ SFA (Figura 40 e Tabela 10). Para a Σ MUFA na fração neutra do tecido muscular não houve diferenças estatísticas significativas entre os animais dos diferentes grupos experimentais (Figura 41).

Figura 40- Perfil dos ácidos graxos saturados da fração neutra muscular dos animais do grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial – barra preta) a Mar/2010 (coleta final). ^{abc}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os animais do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

Figura 41- Perfil dos ácidos graxos monoinsaturados da fração neutra muscular dos animais do grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial – barra preta) a Mar/2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM).

Para a Σ PUFA da fração neutra muscular, os animais do grupo Sem Estufa não apresentaram diferenças estatísticas durante o período experimental, já nos animais mantidos no grupo Estufa houve uma queda significativa da Σ PUFA neste tecido na coleta de janeiro que se manteve em março de 2010 (Figura 42). Esta alteração na Σ PUFA dos animais do grupo Estufa se deu devido à queda na porcentagem de Σ PUFA n3 que se iniciou em novembro de 2009, principalmente no DHA. Já a Σ PUFA n6 se

mantteve elevada na fração neutra do músculo dos animais no mês de novembro de 2009, com uma posterior queda nos meses seguintes em que foram realizadas as biometrias (Tabela 10).

Figura 42- Perfil dos ácidos graxos polinsaturados da fração neutra muscular dos animais do grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial-barra preta) a março de 2010 (coleta final). ^{ab}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os animais do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

Na comparação entre os grupos experimentais, a Σ SFA apresentou uma diferença significativa na coleta realizada em janeiro de 2010, na qual os animais do grupo Estufa apresentaram valores percentuais mais elevados que os animais do grupo Sem Estufa. No entanto esta diferença foi pontual, não ocorrendo nos demais períodos experimentais. Além disso, como observado na Figura 43, assim como no tecido hepático, existe uma tendência de elevação de ácidos graxos saturados com a elevação da temperatura para ambos os grupos experimentais, porém este resultado não é estatisticamente significativo nos animais do grupo Sem Estufa.

Figura 43- Perfil dos ácidos graxos saturados da fração neutra muscular dos grupos Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais – (Estufa – linha preta; Sem Estufa- linha verde) Set/2009 (coleta inicial) a Mar/2010 (coleta final). *indicam as diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais de acordo com sua respectiva coleta (Média $\pm$ EPM).

A Σ MUFA (Figura 44) da fração neutra muscular não apresentou diferença estatística entre os animais dos grupos experimentais e também não houve nenhuma relação com a elevação da temperatura no período do experimento com as porcentagens encontradas para esses tipos de ácidos graxos.

Figura 44- Perfil dos ácidos graxos monoinsaturados da fração neutra muscular dos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa- linha verde) – Set/2009 (coleta inicial) a Mar/2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM).

No músculo a Σ PUFA da fração neutra, assim como a Σ MUFA, não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, porém há uma tendência de queda dos ácidos graxos polinsaturados dos animais do grupo Estufa (Figura 45).

Figura 45- Perfil dos ácidos graxos polinsaturados da fração neutra muscular dos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa – linha verde) – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM).

4.5.3 Ácidos Graxos do Plasma

As análises percentuais da Σ SFA plasmáticos ao longo do experimento em cada grupo experimental mostraram que apenas os animais do grupo Estufa apresentaram diferença estatística significativa ao longo do experimento. Nos animais deste grupo, houve um aumento da porcentagem de SFA em março de 2010, e já com uma tendência deste aumento a partir de janeiro do mesmo ano (Figura 46). Assim como nos tecidos o ácido graxo C16:0 foi o principal responsável por esta alteração nos animais do grupo Estufa (Tabela 11).

Para os Σ MUFA ambos os grupos experimentais apresentaram o mesmo padrão, como uma diminuição significativa em novembro de 2009 e um posterior aumento em janeiro relação à coleta anterior. Em março há um restabelecimento dos valores percentuais em relação à todas as coletas no grupo Sem Estufa, diferentemente do grupo

Estufa que mantém o seu valor no último mês do experimento, maior inclusive do que o valor observado em novembro de 2009 (Figura 47). O C18:1n9 foi o ácido graxo responsável pela menor concentração da Σ MUFA em novembro (Tabela 11).

Figura 46- Perfil da somatória de ácidos graxos saturados no plasma dos animais do grupo Sem Estufa (barra azul) e Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial–barra preta) a Mar/2010 (coleta final). ^{ab}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

Figura 47- Perfil da somatória de ácidos graxos monoinsaturados plasmáticos nos animais do grupo Sem Estufa (barra azul) e Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Set/2009 (coleta inicial) a Mar/2010 (coleta final). ^{ab}Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM)

Os valores encontrados na Σ PUFA demonstram uma queda no mês de janeiro, ao contrário do que ocorreu com a Σ MUFA. Os valores obtidos em novembro foram mantidos constantes em relação ao início do experimento e em seguida diminuíram no mês de janeiro nos dois grupos experimentais. Nos animais do grupo sem Estufa, os valores foram gradativamente se restabelecendo e ao final do experimento se mantiveram semelhantes aos valores iniciais. Nos animais do grupo Estufa, os valores ao final do experimento continuaram mais baixos do que no mês de novembro, mas se restabeleceram em relação à coleta inicial (Figura 48). A queda nos animais do grupo Estufa se deu principalmente devido à Σ PUFA n6, que apresentou uma diminuição apenas na coleta de março, porém é possível identificar uma tendência de redução dos seus valores já em janeiro de 2010, sendo o ARA o principal ácido graxo responsável pelo resultado observado na Σ PUFA e também na Σ PUFA n6 (Tabela 11).

Figura 48- Perfil da somatória de ácidos graxos polinsaturados plasmáticos nos animais do grupo Sem Estufa (barra azul) e do grupo Estufa (barra vermelha) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial – barra preta) a março de 2010 (coleta final). Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os animais do mesmo grupo experimental (Média $\pm$ EPM).

Na comparação dos grupos experimentais em relação às suas respectivas coletas, a Σ SFA não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos em nenhuma coleta, assim como na Σ MUFA (Figuras 49 e 50).

Figura 49 - Perfil da somatória de ácidos graxos saturados plasmáticos dos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa- linha verde) – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM).

Figura 50 - Perfil da somatória de ácidos graxos monoinsaturados plasmáticos nos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa- linha verde) – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM).

A Σ PUFA também não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, contudo esses ácidos graxos mostram uma leve tendência de aumento de seus valores percentuais na coleta realizada em novembro de 2009 (Figura 51).

Figura 51 - Perfil da somatória de ácidos graxos polinsaturados plasmáticos nos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento e a temperatura média dos respectivos grupos experimentais (Estufa – linha preta; Sem Estufa – linha verde) – Setembro de 2009 (coleta inicial) a março de 2010 (coleta final). (Média $\pm$ EPM).

4.6 Cortisol Plasmático

Como já foi mencionado na metodologia o indicador de estresse escolhido neste trabalho foi o cortisol plasmático. Os resultados deste parâmetro quando se comparam às coletas dentro de um mesmo grupo experimental mostram que os animais do grupo Sem Estufa não apresentaram variações na concentração de cortisol. Por outro lado, nos animais do grupo Estufa houve a uma elevação da concentração deste hormônio nos animais da coleta de janeiro de 2010, em relação às duas coletas anteriores e uma manutenção na coleta seguinte (março de 2010), que também se mantiveram iguais às coletas realizadas em setembro e novembro de 2009. Na comparação da concentração de cortisol plasmático entre os grupos experimentais, em suas respectivas coletas, foi observado que na coleta de janeiro de 2010 os animais do grupo Estufa apresentaram valores mais elevados que os animais do grupo Sem Estufa. No entanto esta diferença foi pontual e não se manteve nas demais coletas (Figura 52).

Figura 52- Concentração de cortisol plasmático (µg/dL) nos animais do grupo Estufa (barra vermelha) e Sem Estufa (barra azul) ao longo do experimento – Setembro de 2009 (coleta inicial – barra preta) a março de 2010 (coleta final). ^{ab} Letras diferentes representam diferença estatística dentro do mesmo grupo experimental; * Indica diferenças entre os grupos experimentais em uma determinada coleta ($P < 0,05$) (Média $\pm$ EPM).

5. Discussão

5.1. Ração Consumida, Qualidade e Temperatura da Água

Os valores dos parâmetros físico-químicos tais como o oxigênio dissolvido pH e os compostos nitrogenados, podem influenciar nos processos fisiológicos dos animais (Aragão e Araújo, 2006). Desta forma o monitoramento da qualidade da água foi de grande importância para demonstrar que a temperatura foi o único fator que pode ter influenciado nos parâmetros zootécnicos, nos processos metabólicos e no perfil dos ácidos graxos dos animais envolvidos no experimento. Tanto o oxigênio quanto o pH, assim como os valores de dureza, fosfato, nitrogênio, alcalinidade total e matéria orgânica apresentaram-se adequados para o cultivo de animais da família Pimelodidae como jundiá (*Rhamdia* sp.) e o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Baldiasserotto e Gomes, 2005), sendo estes resultados possivelmente adequados também para o surubim.

Em relação à toxicidade da amônia, existem muitos fatores que devem ser levados em consideração para assegurar que os valores encontrados sejam tóxicos para os surubins. Segundo Ruyet *et al.* (1997) o tamanho do animal tem influência na sensibilidade a este composto tóxico, sendo assim, é difícil assegurar o limite da concentração de amônia capaz de causar danos fisiológicos. Contudo, de acordo com Boyd (1990) e Lemarié *et al.* (2004) é sugerido que para animais de água doce, o limite tóxico está entre 0,05 mg/L e 0,2 mg/L, sendo letal acima de 0,4 mg/L. Ao longo do experimento foram observadas concentrações abaixo de 0,2 mg/L, com a exceção da coleta realizada em março de 2010 no grupo Estufa (Figura 6) em que o valor chegou a 0,3 mg/L, contudo não foi observada mortalidade e nem queda do crescimento dos animais deste grupo experimental neste período, o que se sugere que esta concentração de amônia não foi prejudicial aos animais.

Da mesma forma que a amônia o nitrito também apresenta a sua toxicidade variada entre as espécies de peixes, porém de acordo com Boyd (1990), de forma geral as concentrações seguras dessa substância na água doce estão entre 0,02 e 0,1 kg/L, que corresponde aos valores encontrados em ambos os grupos experimentais ao longo do experimento.

Mesmo a qualidade da água estando adequada para o cultivo do surubim do Paraíba, outros fatores podem ter influenciado nos processos avaliados neste experimento. A falta experiência de como a espécie se comportaria após o manejo

(principalmente no início do experimento), aliada à baixa circulação da água (1L/40s) nos tanques experimentais, gerou uma preocupação com a suposta quantidade de ração que não fosse ingerida pelos animais e que poderia comprometer a qualidade da água. Devido a estes fatos a quantidade de ração oferecida nos primeiros meses do experimento (setembro até novembro de 2009) foi insuficiente (Tabela 4), e não adequada para um bom desempenho da espécie, como será abordado mais adiante.

Com foi observado, a elevação da temperatura entre os grupos experimentais e ao longo do experimento (Tabela 3) não interferiu nos parâmetros de qualidade da água, porém entre os meses de setembro e novembro, mesmo com a elevação da temperatura em torno de 1,0° para o grupo Estufa e 1,5°C para o grupo Sem Estufa, os resultados obtidos nesse período, e que serão discutidos com mais detalhes posteriormente, não foram o previamente esperado, demonstrando que a insuficiente quantidade de alimento ingerido pelos animais interferiu nos resultados apresentados até aquele momento. Mediante a este fato é possível analisar a influência da temperatura nos processos fisiológicos e nos parâmetros zootécnicos isoladamente, apenas após o mês de novembro de 2009.

5.2. Relações entre a Temperatura da água, Dados Morfométricos e Parâmetros Zootécnicos

Withers (1992) define a temperatura como uma medida da movimentação molecular média, ou seja, se as moléculas de um sistema vibram mais rapidamente, maior será a temperatura. Esta característica física da temperatura faz com que as velocidades das reações químicas aumentem com o aumento da temperatura, devido a isso, a atividade metabólica de um animal está relacionada diretamente com a sua temperatura corpórea (Randall *et al.*, 2000). Dentro de um determinado limite a temperatura causa efeitos em vários processos fisiológicos, como no metabolismo e no crescimento, agindo mais precisamente na atividade e no funcionamento das enzimas, tendo como principal característica a diminuição da energia de ativação, que é o mínimo de energia requerida para que uma reação ocorra (Hochachka e Somero, 2002).

Por suas características físicas e as implicações mencionadas acima, a temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes para a manutenção da homeostase de um organismo, já que ela afeta todos os aspectos fisiológicos, por influenciar nos processos que envolvem propriedades físicas das moléculas e das macromoléculas biológicas

(Evans e Claiborne, 2006). Devido a este fato os animais comumente elegem uma temperatura preferida, utilizando uma variedade de estratégias, que incluem migrações sazonais tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres, migrações verticais diurnas em habitat marinho e de água doce e, além disso, uma seleção de um período do dia mais apropriado para o forrageamento e predação em animais terrestres (Hochachka e Somero, 2002).

O conhecimento da temperatura adequada para o crescimento é vantajoso na aquicultura já que economiza tempo e recursos financeiros, promovendo o aumento da produção e consequentemente da produtividade (Jobling, 1997). Diversos experimentos documentaram o efeito da temperatura sobre o crescimento em diversas espécies tais como, *Piaractus mesopotamicus* (Anelli *et al.*, 2004); *Oreochromis niloticus* (Azaza *et al.*, 2007); *Oreochromis mossambicus* (Campinho *et al.*, 2004); *Oncorhynchus kisutch* (Larsson e Berglund, 2005); *Scophthalmus maximus* (Van Ham *et al.*, 2003), em que os animais expostos a temperaturas mais elevadas apresentaram um maior crescimento. Estes resultados também foram observados no teleósteo tropical, a piabanha (*Brycon insignis*), que apresentaram um maior incremento de massa quando a temperatura dos tanques experimentais estava acima dos 20°C (Tolussi *et al.*, 2010). Por outro lado, é preciso mencionar que uma demasiada elevação da temperatura pode causar efeitos deletérios ou minimizar os crescimentos dos animais estudados. Um estudo que comprova este fato foi realizado com o “European sea bass”, *Dicentrarchus labrax* submetidos a diferentes temperaturas (13, 16, 19, 22, 26 e 29°C), e os resultados do experimento mostraram que os animais expostos a temperatura de 26°C obtiveram os valores de massa final estatisticamente maiores em relação aos outros gradientes experimentais, inclusive ao grupo submetido à temperatura de 29°C (Person-Le Ruyet *et al.*, 2004).

No presente trabalho, os resultados observados mostraram que a temperatura da água do grupo Estufa foi 2°C mais elevada do que a temperatura da água do grupo Sem Estufa (Tabela 3). Esta diferença acarretou em um maior incremento de massa corpórea e do comprimento dos animais em relação ao grupo Sem Estufa (Tabela 5), demonstrando que, o valor máximo médio de temperatura alcançada no experimento (24,6°C) não é prejudicial ao crescimento do surubim do Paraíba e ainda proporciona o melhor desempenho dos animais.

No início do experimento, período no qual a quantidade de ração foi aquém das necessidades dos animais, os peixes do grupo Estufa mantiveram a sua média de massa corpórea inalterada, já os animais do grupo Sem Estufa apresentaram uma redução na massa corpórea, mesmo com os animais consumindo inteiramente a ração oferecida e com a elevação da temperatura nos dois grupos (Tabela 4 e Tabela 5). Este resultado corrobora com a hipótese de que a temperatura afeta de maneira direta os processos fisiológicos, pois este parâmetro abiótico pode ter um efeito no ganho de peso dos peixes independentemente da influência da ingestão de alimento, eficiência alimentar, fator de crescimento e na densidade de estocagem (Wang *et al.*, 2009). Este efeito da temperatura parece ter ocorrido no presente experimento, já que os animais do grupo Estufa não apresentaram decréscimo de sua massa corpórea, que pode estar relacionado com uma otimização dos processos metabólicos dos animais deste grupo em relação aos animais do grupo Sem Estufa. Além disso, os animais do grupo Estufa apresentaram valores estatisticamente maiores para os parâmetros zootécnicos CR, CE e EA, sendo que estes resultados podem estar relacionados diretamente com a temperatura mais elevada a que os animais deste grupo experimental foram expostos.

A influência da temperatura nos parâmetros zootécnicos em teleósteos já foi demonstrada em estudos anteriores, como para o bacalhau (*Gadus morhua*) em que os animais submetidos à temperatura de 16 e 14⁰C apresentaram um maior CR que os animais expostos a temperaturas de 10 e 12⁰C; e animais submetidos a 16⁰C apresentaram maior EA (Kling, 2007). Já para o “European sea bass”, *Dicentrarchus labrax*, o melhor resultado de CR e EA foi observado em animais submetidos à temperatura de 22⁰C (Gardeur *et al.*, 2001).

Por ser um importante fator abiótico, a temperatura afeta diretamente a sobrevivência, crescimento e eficiência alimentar (Jobling, 1997), como pode ser observado neste experimento com o surubim do Paraíba, no qual os animais do grupo Estufa apresentaram uma maior CR e EA. Este resultado demonstra a importante ação que a temperatura pode apresentar sobre os processos fisiológicos dos animais, sendo possível que a sua ação possa estar relacionada a diferentes fatores, como uma absorção mais eficiente dos alimentos assim como uma otimização da atividade enzimática, que pode ser corroborado com os resultados de eficiência alimentar e a manutenção da massa corpórea dos animais do grupo Estufa. Além disso, a temperatura influencia a liberação dos hormônios envolvidos no crescimento como o hormônio de crescimento

(GH), como já foi observado em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), que apresentou uma alteração na concentração deste hormônio independentemente do estado nutricional do animal com a modificação da temperatura (Gabillard *et al.*, 2003).

O conhecimento dos efeitos diretos e indiretos da temperatura na fisiologia dos organismos, aliado aos resultados observados de baixa ingestão de ração e, conseqüentemente uma estagnação do incremento de massa corpórea, justificam a moderada correlação de Pearson entre a temperatura e o crescimento dos animais. Estes dados sugerem que o efeito da temperatura, mais intenso no grupo Estufa foi importante para o crescimento dos animais, porém outros fatores como a quantidade de ração ingerida, a qualidade adequada da água, dentre outros, também são importantes no cultivo do surubim do Paraíba em cativeiro.

Considerando-se a sobrevivência, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais e as mortes ocorridas no grupo Sem Estufa (2%) não podem ser relacionadas à menor temperatura, já que os animais não apresentaram comportamentos típicos de intolerância térmica, que consiste em não responder a estímulos quando ameaçados (Beitibger *et al.*, 2000).

Os valores de K (Tabela 6), que é um indicador quantitativo de bem estar do animal, também não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais, sendo que os valores encontrados em ambos os grupos foram muito próximos (0,090 para os animais do grupo Sem Estufa e de 0,08 para os animais do grupo Estufa). Comparando-se estes valores com os valores de K de outras espécies de mesma família (Pimelodidae), os resultados para o surubim do Paraíba foram menores, quando comparados com o mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) (Almeida e Nuñez, 2009) que apresentou valores próximos a 1,14, porém maiores que para o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) que apresentou valores que chegaram a 0,05 (Mateus e Petrere, 2004). Isto demonstra a grande amplitude dos valores K observados nesta família de siluriformes. Com esses resultados, aliado com os demais parâmetros zootécnicos pode-se sugerir que os valores encontrados são adequados para esta espécie em ambos os grupos experimentais.

Os valores de CV também não apresentaram diferença entre os grupos, indicando que a taxa de crescimento foi homogênea nos dois tratamentos. Geralmente com o crescimento pode haver há uma maior diferença na massa corpórea entre os animais pertencentes a um grupo, elevando-se então o CV em decorrência do estabelecimento de

hierarquias (Lambert e Dutil, 2001). Alguns trabalhos mostram que o CV dos animais se elevou com o aumento da temperatura, como por exemplo, em *Dicentrarchus labrax* (Person-Le Ruyet *et al.*, 2004). Resultados diversos em relação ao CV demonstram que para que este parâmetro seja homogêneo, diferentes fatores como, a espécie estudada, o seu comportamento e a densidade de estocagem utilizada, devem ser levados em consideração (Tolussi *et al.*, 2010), demonstrando que para o surubim do Paraíba, as condições de tratamento (temperatura, densidade de estocagem), aliadas ao comportamento da espécie mantiveram-se adequadas para o cultivo.

5.3 Relações da Temperatura da água e o Índice Hepatosomático

A temperatura mais elevada na água do grupo Estufa acarretou um maior crescimento, porém, não causou alterações no IHS entre os animais dos dois grupos (Figura 11), no entanto, os valores de IHS se elevaram ao longo do experimento em ambos os grupos. O fígado, assim como o coração e outros tecidos apresentam uma tendência à hipertrofia quando há uma queda na temperatura, fazendo com que haja uma elevação da capacidade metabólica, mesmo não havendo uma alteração na capacidade enzimática (Baldisserotto, 2002). No presente experimento, possivelmente, ocorreu o contrário à aclimação a baixas temperaturas. A elevação da IHS pode ter ocorrido devido a continua elevação da temperatura da água de em ambos os grupos, mas esta diferença de temperatura encontrada entre os tanques do grupo Estufa e Sem Estufa pode não ter sido suficiente para ocasionar uma resposta distintas entre os animais dos grupos experimentais.

5.4 Análises dos Substratos Energéticos

5.4.1 Lipídeos hepático, muscular e plasmático

Os resultados das análises dos lipídeos hepáticos, musculares e plasmáticos demonstram que a temperatura não influenciou na concentração deste substrato energético (Figuras 12, 15 e 18), sugerindo que os animais utilizaram esse substrato energético para a manutenção da homeostase e também para outros processos como o crescimento, em quantidades igualitárias, mesmo com as diferenças de temperatura.

A principal função dos lipídeos nos peixes é o armazenamento e o fornecimento de energia metabólica em forma de ATP, provindo da β -oxidação (Sargent *et al.*, 1989; Froyland *et al.*, 1998; Tocher, 2003). Os lipídeos, especificamente os ácidos graxos são

a fonte de energia metabólica preferida para o crescimento, reprodução e natação em peixes marinhos (Tocher, 2003). Esta preferência na utilização de lipídeos como substrato energético, também pode ser observada no surubim do Paraíba, em ambos os grupos, independente da temperatura, principalmente nas coletas de janeiro e março de 2010 (Figuras 11 e 15), em que houve uma queda substancial desse substrato nos dois tecidos analisados e no plasma. Esta utilização está possivelmente associada à atividade das enzimas relacionada com a oxidação de lipídeos como a hidroxiacil-CoA-desidrogenase, bem como na diminuição atividade da enzima glicose-6-fostato desidrogenase que aumenta a síntese de lipídeos (Montero *et al.*, 1999).

É possível observar que da coleta inicial até a coleta de novembro (período no qual houve uma quantidade inadequada de ração oferecida) houve uma elevação significativa deste substrato no músculo, fígado e plasma (Figura 20 A e B). Por esse resultado é possível sugerir que houve um transporte plasmático desse substrato para esses tecidos. Outro fator que corrobora esta hipótese foi que em novembro de 2009 foi a única coleta em que os surubins do Paraíba não apresentaram gordura mesentérica.

Segundo Sheridan (1994) os lipídeos em peixes teleósteos são estocado principalmente no músculo vermelho, fígado e mesentério, sendo este último o principal local de armazenamento. Essa informação, aliada às concentrações de lipídeos encontradas, juntamente com os dados de incremento de massa corpórea em ambos os grupos, sugerem que do início do experimento até a coleta realizada em novembro de 2009, devido a baixa quantidade de alimento oferecido, o surubim do Paraíba mobilizou as suas reservas lipídicas do mesentério para o fígado e músculo e, provavelmente para outros órgãos, fazendo com que houvesse uma elevação deste substrato na coleta de novembro de 2009 nos tecidos analisados. Entretanto esta energia foi utilizada apenas para a manutenção da homeostase desses animais, já que não houve crescimento neste período.

Com a adequação da quantidade de ração oferecida e a elevação da temperatura (Tabelas 4 e 3), houve uma diminuição significativa da concentração de lipídios no plasma, indicando uma queda na mobilização dessa molécula para o músculo e fígado, assim como uma redução na concentração desse substrato nesses tecidos ao longo do experimento (coleta de janeiro e março – Figura 19). Isto sugere que os lipídeos armazenados nestes tecidos foram utilizados, como a principal fonte de energia metabólica. Já nas coletas de janeiro e março foi possível observar um grande acúmulo

de gordura mesentérica em ambos os grupos experimentais, o que corrobora com a hipótese de que esses substratos armazenados nos próprios tecidos são suficientes para a manutenção da homeostase do animal. É importante destacar que a afirmação sobre os processos de mobilização deste substrato energético, assim como carboidratos e proteínas, que serão discutidos posteriormente, só é possível mediante a investigação da atividade das enzimas envolvidas nas vias de síntese e quebra destas moléculas.

Alterações no metabolismo de lipídeos devido a variações de temperatura foram observadas em “sea bream” (*Sparus aurata*), nos quais a concentração de lipídeos totais diminuiu no mesentério, no músculo e o IHS diminuiu, com a queda da temperatura. Este resultado está relacionado com a utilização de sua reserva energética que culminou em um decréscimo da sua massa corpórea (Ibarz *et al.*, 2007). Por outro lado, esta relação de variações da temperatura com alterações nos substratos energéticos não foi observada para o salmão (*Oncorhynchus kisutch*), que não apresentaram diferenças na deposição de lipídeos quando foram expostos a diferentes temperaturas (Larsen *et al.*, 2001).

No presente experimento, o período entre setembro e novembro de 2009, assim como no experimento mencionado acima, com “sea bream”, os animais foram expostos a dois distintos desafios (baixa alimentação para os surubins e queda de temperatura para os “sea bream”), porém a resposta quanto à concentração de lipídeos foi a mesma no músculo, e na deposição no mesentério, o que indica que neste caso estas duas espécies apresentaram a mesma resposta quanto ao metabolismo de lipídeos frente a diferentes estressores, podendo indicar que a análise do metabolismo de lipídeos juntamente com outras análises endócrinas e metabólicas pode ser uma ferramenta importante para se avaliar o estresse em peixes.

Em resumo, a redução da concentração dos lipídeos hepáticos e musculares após novembro de 2009 e os dados de crescimento e concentração de proteínas e glicogênio que serão discutidos posteriormente, demonstram que os surubins do Paraíba utilizaram esse substrato energético como a principal fonte de energia para a manutenção de sua homeostase e crescimento. Existe uma forte relação genética entre o crescimento e a deposição de lipídeos, que aumenta de acordo com a aceleração do crescimento dos peixes (Kause *et al.*, 2003; Neira *et al.*, 2004). Foi observada uma alta deposição de lipídeos no surubim do Paraíba apenas no mesentério, porém no período em que houve esta elevação, a quantidade de ração oferecida aos animais era adequada, a qualidade da

água era ideal para o cultivo da espécie, assim como a faixa de temperatura observada em ambos os grupos experimentais, mostrando que estes não foram fatores desafiadores para os peixes que participaram do experimento. Além disso, os animais estavam em uma ambiente lântico o que poderia proporcionar também um acúmulo deste substrato na região visceral, devido à natação menos intensa.

5.4.2 Proteínas hepáticas e musculares

A diferença de temperatura entre a água dos tanques experimentais não acarretou em diferenças estatísticas significativas na concentração de proteínas totais (Figuras 13 e 16), no entanto, os animais de ambos os grupos experimentais apresentaram uma elevação significativa da concentração protéica na coleta de março de 2010 nos tecidos analisados. Este resultado foi contraditório ao ocorrido em *Rhamdia quelen*, no qual a elevação da temperatura acarretou na diminuição deste substrato no fígado, porém no músculo há um aumento (Lermen *et al.*, 2004).

Segundo Tobin (2006), o crescimento dos peixes é um processo dinâmico e os componentes composicionais (substratos metabólicos) variam ao longo da vida, sendo diretamente relacionada à idade dos animais. É possível observar que houve uma relação inversa entre a concentração de lipídeos e proteínas no mês de março e 2010, como já foi constatado em juvenis de truta arco-íris (Gjerde e Schaeffer 1989; Tobin *et al.*, 2006) e de piabanha (*Brycon insignis*) (Tolussi *et al.*, 2010). Esta relação inversa encontrada entre esses dois substratos energéticos pode ser também relacionada com a progressiva elevação da temperatura, assim como foi observado em *Morone saxatilis*, que aumentou sua capacidade de oxidação de lipídeos nas fibras musculares (Egginton e Sidell, 1989). No entanto, este fato isolado não pode explicar o que ocorreu com estes dois substratos ao longo de experimento no presente trabalho, já que a quantidade de ração parece ter sido muito importante para os resultados gerados.

Correlações genéticas e fenotípicas entre as porcentagens de lipídeos e proteínas observadas em peixes de grande massa corpórea sugerem que esses dois substratos se correlacionam negativamente (diminuição de um e elevação do outro), como foi previamente documentado em truta arco-íris por Gjerde and Schaeffer (1989). Além disso, a temperatura não é o único fator que pode alterar estes processos, já que análises genéticas em truta arco-íris demonstraram que a composição dos peixes pode ser fortemente relacionada à deposição de lipídeos (Tobin *et al.*, 2006) e por tanto a sua

oxidação também pode variar de acordo com a concentração desta molécula e formulação da ração. Os resultados encontrados no presente trabalho, aliados aos dados da literatura sugerem que o surubim do Paraíba utilizou prioritariamente a energia proveniente dos lipídeos para a síntese protéica que acompanha o crescimento, o que pode ser evidenciado pelo aumento da deposição protéica nos tecidos ao longo na coleta de março de 2010, sendo que a temperatura não afetou este padrão metabólico o que pode sugerir juntamente como os dados de mortalidade que as temperaturas observadas para no presente experimento não são prejudiciais para o surubim do Paraíba.

O aumento da concentração de proteínas que ocorreu apenas em março pode ser relacionado com o aumento do consumo de alimento, e consequentemente o crescimento, na fase anterior a este período, assim sugere-se que caso a quantidade de ração oferecida aos animais fosse adequada desde o início do experimento, as concentrações de proteína poderiam ter se elevado já nos meses anteriores.

5.4.3 Glicogênio hepático e muscular e glicose plasmática

O surubim do Paraíba apresentou valores de glicogênio muscular e hepático de 70 e 110mg/g respectivamente. Este maior valor observado no fígado relaciona-se ao fato de que uma vez formado este substrato, neste tecido nos peixes, ele é mobilizado com relativa dificuldade, enquanto que no músculo o glicogênio é rapidamente utilizado como fonte de energia (Ottolenghi *et al.*, 1984; Janssens e Lowrey, 1987).

O glicogênio hepático pode ser rapidamente mobilizado durante um período de estresse, modulado pelas catecolaminas (Ottolenghi *et al.*, 1984; Janssens e Lowrey, 1987), contudo isto não ocorreu no momento em que a quantidade de ração oferecida foi abaixo do adequado para o cultivo da espécie (Figura 14), demonstrando a grande importância dos lipídeos como o principal substrato energético em condições de cultivo como o apresentado no presente experimento (boa qualidade da água e alta concentração de oxigênio dissolvido).

Os dados do presente trabalho demonstraram que a baixa quantidade de ração oferecida influenciou na concentração de glicogênio muscular dos animais mantidos fora da estufa (grupo Sem Estufa), com valores mais elevados no mês de novembro de 2009 em relação a março a aos valores iniciais (Figura 17). Os resultados sobre a influência da temperatura no metabolismo de carboidratos são muitos escassos (Moreira *et al.*, 2008). Foi observado que em carpas o aumento da temperatura melhorou a

digestibilidade do amido (Médale *et al.*, 1999), contudo a atividade da glicose-6-fostato desidrogenase, (G6PDH), elevou-se em *Sparus aurata*, após 20 dias de experimento quando os animais foram expostos a uma temperatura de 8°C (Ibarz, *et al.*, 2007), assim como foi observado para carpa que também apresentaram elevação das atividades enzimáticas em baixas temperaturas (Shikata *et al.*, 1995).

Observando a literatura, seria plausível descartar que no presente experimento, os animais do grupo que apresentou uma menor temperatura da água (Sem Estufa) podem ter apresentado uma diminuição na atividade de alguma(s) enzima(s) da via da glicogenólise, que pode ter gerado uma quantidade de energia menor que por sua vez pode ter comprometido os processos fisiológicos para a manutenção da homeostase, causando uma perda da massa corpórea. Todavia, somente com os resultados observados no presente trabalho, torna-se difícil fazer uma análise abalizada que se explique tais resultados de glicogênio muscular, sendo necessário, a realização da atividade enzimática de algumas enzimas chaves no processo glicogenólise.

A glicose do plasma ao longo do experimento apresentou uma tendência de elevação que se confirmou estatisticamente no mês de março de 2010 (Figura 18). Em *Rhamdia quelen*, a concentração de glicose elevou-se para os peixes expostos a temperatura mais elevada durante 21 dias (Lermen *et al.*, 2004). Tal resultado pode ser comparado com o ocorrido no presente experimento, sobretudo quando se analisam as duas últimas coletas do experimento. Porém, estudos prévios já haviam verificado um aumento da glicemia no inverno em relação ao verão (Nace *et al.*, 1964), assim como foi encontrado em *Ictalurus melas*, nos quais não foi encontrada uma relação sazonal da concentração de glicose plasmática, porém os valores elevaram-se com a queda da temperatura (Ottolenghi *et al.*, 1995; Sun *et al.* 1995).

Observando os resultados de fígado, músculo e plasma dos animais de ambos os grupos experimentais, é provável que em temperaturas mais elevadas o aumento do consumo de alimento (janeiro e março de 2010) tenha contribuído para uma maior absorção dos carboidratos (elevação da glicemia plasmática – Figura 18), seguida de uma possível atividade mais elevadas das enzimas envolvidas na degradação e/ou absorção de carboidratos (tendência de queda após novembro de 2009 no fígado – Figura 14), como por exemplo, a hexoquinase que atua catalizando a primeira fosforilação da glicose, formando glicose 6-fosfato, durante o processo de glicólise, a enzima piruvatoquinase que cataliza a glicólise formando piruvato a partir de

fosfoenolpiruvato e a lactato desidrogenase que catalisa a reação de redução do piruvato em lactato em condições anaeróbias (Nelson e Cox, 2005). Estas alterações podem estar relacionadas com a diferença de crescimento encontradas entre os grupos experimentais, sendo então importante a realização da medição da atividade destas enzimas.

Correlacionado os valores de glicogênio, proteínas e lipídeos hepáticos tanto dos animais do grupo Estufa quanto dos animais do grupo Sem Estufa com os resultados de IHS, observa-se que houve uma elevação deste índice em janeiro de 2010 para ambos os grupos, devido principalmente a queda significativa que ocorre com os lipídeos totais entre janeiro e março de 2010 (Figura 12), porém, apenas os dados dos substratos energéticos não são suficientes para explicar os resultados do IHS observados, já que a concentração média de lipídeos é muito baixa no período de janeiro de 2010 (em torno de 20 mg/g). Além disso, esta molécula é hidrofóbica, ou seja, não se mistura com a água e por consequência contribui pouco para variações na massa hepática (Schmidt-Nielsen, 2002). Mesmo tendo as proteínas como principal substrato hepático ao final do experimento (em torno de 200 mg/g), é muito difícil relacionar os seus resultados com o IHS, já que o fígado não é um órgão de armazenamento de proteína e sim exportador.

Os jovens de surubim criados em cativeiro, sob as condições de qualidade da água e ração adequada apresentaram o lipídeo como o principal substrato energético e as proteínas foram os substratos com um maior acúmulo no tecido muscular e hepático, independente da temperatura. Este fator abiótico pode ter influenciado na eficiência de utilização das três moléculas (proteína, lipídeos e glicogênio) e/ou na otimização da absorção desses componentes da ração, já que houve um maior crescimento e conversão alimentar no grupo exposto a temperaturas mais elevadas.

Mesmo com a temperatura afetando diretamente a relação de lipídeos e proteínas, foi possível analisar por meio desses resultados que após a implementação de uma quantidade adequada de ração, a concentração de lipídeos decaiu nos tecidos analisados (Figuras 12 e 15), e uma elevação na concentração de proteína ocorreu. Bolivar e Newkirk (2002); Kause *et al.*, (2005), mencionam que os programas de criação em cativeiro estão obtendo sucesso com o melhoramento do crescimento em peso úmido, sendo importante a composição corporal para a eficiência da produção do animal, com o objetivo de que os peixes cultivados convertam a ração ingerida em crescimento muscular (Tobin *et al*, 2006). Esta relação é muito importante para uma criação visando

a produção, porém, ela também é importante em sistemas de produção voltados para a conservação, como a manutenção de banco de reprodutores.

5.5 Ácidos Graxos

5.5.1 Ácidos Graxos das Frações Polares

Os ácidos graxos são formados por meio de uma ligação de ácidos carboxílicos com uma cadeia de hidrocarboneto de 4 a 24 átomos de carbono, estando presente em todos os organismos como componentes das gorduras (triglicerídeos) e das membranas celulares. Estas moléculas são encontradas na forma esterificada por alcoóis (glicerol, esfingosina ou colesterol), porém eles também são encontrados em baixas quantidades na forma não esterificada, que são os ácidos graxos livres (Koolman e Roehm, 2005).

Sabe-se que a conformação física das membranas celulares pode ser alterada com a modificação da temperatura. Em temperatura fisiológica, as rotações em torno das ligações simples carbono-carbono propagam livremente a movimentação das cadeias de ácidos graxos, que resulta em uma relativa fluidez mantendo a membrana na fase líquida, cristalina (Hazel, 1995). Quando a temperatura diminui, as cadeias de acetil compactam-se eficientemente, formando a fase gel (Hazel, 1995). Em uma eventual elevação da temperatura alguns lipídeos assumem até mesmo uma fase hexagonal invertida, que é resultado da perda da integridade da bicamada lipídica (Hazel, 1995).

Alterações nas fases de conformação das membranas devido a perturbações térmicas podem acarretar um profundo impacto na estrutura e nas funções das membranas celulares (Hazel, 1995) e como consequência, uma alteração na temperatura pode comprometer a manutenção da homeostase de um organismo principalmente um animal ectotérmico, sendo então necessário que haja um mecanismo que minimize os impactos de uma possível alteração da temperatura ambiente, que é denominado de adaptação homeoviscosa. As respostas observadas nos surubins do Paraíba quanto a elevação da temperatura, estão relacionadas ao processo de adaptação homeoviscosa, que segundo McElhaney (1984), se refere a uma habilidade do organismo de manter suas membranas celulares em uma fase constante (fase líquida cristalina).

A manutenção da viscosidade da membrana foi observada pela primeira vez em *Escherichia coli* (Sinensky e Ikonem, 1974), todavia os peixes são muito utilizados para esse tipo de estudos, porque, esse grupo abrange uma grande faixa de gradientes termais (Crockett e Londraville, 2006). Para que a adaptação homeoviscosa ocorra, é necessária

uma reestruturação dos lipídeos da membrana celular, que é um meio de compensação das alterações induzidas pela temperatura nas propriedades físicas desta membrana. Esta reestruturação é o processo mais observado quando ocorrem alterações na temperatura corpórea do animal, sendo que a mudança mais comum ocorre nas quantidades relativas de PUFA e SFA (Crockett e Londraville, 2006).

No presente experimento, os ácidos graxos presentes na membrana celular (polares), do fígado e do músculo, assim como os livres no plasma do surubim do Paraíba, apresentaram uma resposta semelhante ao descrito na literatura quanto às suas classes (saturados e polinsaturados) ao longo do experimento (Tabela 7, 9 e 11), ou seja, após novembro de 2009, com o aumento da temperatura, a porcentagem de SFA se elevou significativamente em ambos os tecidos e no plasma, paralelamente a uma queda na porcentagem de PUFA neste mesmo período e tecidos.

É provável que as temperaturas registradas no presente experimento não sejam suficientes para que as membranas celulares passem da fase líquida cristalina para a fase hexagonal. Todavia a elevação da temperatura observada em ambos os grupos experimentais poderia ser suficiente para alterar a conformação física e consequentemente os processos fisiológicos das membranas celulares dos surubins do Paraíba, fazendo com que a resposta de adaptação homeoviscosa ocorresse. Porém, a maior diferença de 2°C em média em todo o experimento para grupo Estufa, não acarretou em uma resposta de adaptação homeoviscosa mais incisiva para este grupo, pelo menos nas porcentagens de SFA e PUFA.

A redução na temperatura leva invariavelmente a ajustes na composição dos lipídeos da membrana celular, elevando a proporção de ácidos graxos *cis*-insaturados, particularmente os de cadeia longa (PUFA) (Hazel, 1995). Em relação à elevação da temperatura, resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho foram observados em uma comparação com 17 espécies de peixes, nas quais a porcentagem de ácidos graxos insaturados (principalmente os PUFAs) decaía proporcionalmente com a elevação da temperatura (Logue *et al.*, 2000).

A elevação da porcentagem de SFA no plasma dos animais submetidos às temperaturas mais elevadas (grupo Estufa) sugere que estes SFA foram mobilizados principalmente do tecido adiposo, em direção ao músculo e fígado.

Até o mês de novembro de 2009 a adaptação homeoviscosa nos tecidos não foi observada, já que não houve elevação dos SFA e nem queda nos PUFA, sendo possível

que esta resposta seja em decorrência a um desafio (baixa alimentação) e, como foi dito anteriormente, neste período os estoques de lipídeos dos tecidos, assim como do tecido adiposo estavam sendo utilizados para a manutenção do animal, não sendo possível então que houvesse um acúmulo de ácidos graxos saturados na membrana celular.

5.5.2 Ácidos Graxos das Frações Neutras

A análise dos ácidos graxos da fração lipídica neutra dos tecidos demonstrou diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (Tabela 8). No fígado estas diferenças apresentaram-se nos SFA, já na coleta de novembro de 2009 e nos MUFA na coleta de março, com os animais submetidos às temperaturas mais elevadas apresentando maiores porcentagens destes ácidos graxos e por outro lado, os animais mantidos em temperaturas mais baixas (Sem Estufa) apresentaram porcentagens mais elevadas de PUFA na coleta de março de 2010.

No músculo está diferença ocorreu para na coleta de janeiro de 2010, com os animais do grupo Estufa apresentando maior porcentagem de SFA e PUFA da família n6 que os animais submetidos às temperaturas mais baixas (Tabela 10). Estes resultados demonstram que a diferença de temperatura entre os grupos experimentais influenciou também no perfil dos ácidos graxos da fração neutra dos lipídios.

Em experimentos nos quais foram analisados os efeitos da dieta no perfil dos ácidos graxos, foi observado que este fator tem uma influência mais forte na fração neutra do que na fração polar (Skalli e Robin, 2004). No presente trabalho, ambos os grupos apresentaram duas respostas iguais na fração polar, sendo uma antes e outra após a adequação da quantidade de ração, que pode indicar que a inadequada quantidade de ração pode ter influenciado para que a resposta à adaptação homeoviscosa do surubim do Paraíba não ocorresse já em novembro de 2009. Já na fração neutra do fígado as diferenças ocorreram nos dois momentos, porém as respostas foram distintas (menor porcentagem de SFA e MUFA em novembro de 2009 e março de 2010 respectivamente, nos animais do grupo Sem Estufa em relação aos animais mantidos na Estufa e elevação de PUFA em março também nos animais mantidos em temperaturas mais baixas), o que demonstra que assim como na fração polar, tanto a ração quanto a temperatura tiveram influência nos ácidos graxos de reserva deste tecido. Essa menor porcentagem de SFA na fração neutra hepática dos animais do grupo Sem Estufa, no mês de novembro de 2009, pode ser relacionada à utilização menos eficiente destes para obtenção de energia

devido à menor temperatura, fazendo com que mais moléculas fossem utilizadas para que os processos fisiológicos fossem realizados, quando comparado ao grupo Estufa. Já para os MUFA e PUFA está proporção inversa apresentada no final do experimento (março de 2010) entre os grupos experimentais (Tabela 8) indica que a temperatura influenciou na preferência de utilização dos diferentes tipos de ácidos graxos para obtenção de energia.

No músculo, os animais do grupo Estufa apresentaram maiores porcentagens de SFA e menores de PUFA n6 no mês de janeiro de 2010, demonstrando que neste momento houve uma maior utilização de PUFA n6 como fonte de energia pelos animais deste grupo, enquanto que os animais submetidos às temperaturas mais baixas utilizaram preferencialmente os SFA como principal fonte de energia, assim como ocorreu no fígado.

Em um estudo anterior com “sea bass” (*Dicentrarchus labrax*) foi observado que a temperatura teve uma maior influência nos ácidos graxos polares que nos neutros nos tecidos analisados (músculo, fígado, brânquias, olhos e cérebro) com exceção do fígado (Skalli *et al.*, 2006). No presente trabalho, assim como observado na dieta, a temperatura teve uma forte influência nas duas frações, já que na fração neutra foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais. Contudo, para entender de fato a real influência da temperatura no perfil dos ácidos graxos no surubim do Paraíba é necessário também observar a fonte de alimentos ingerida pelos animais.

Para muitos peixes, o óleo de peixe é a principal fonte lipídica da ração, sendo que os principais ácidos graxos presentes nas rações do hemisfério norte são o C16:0, C18:1n9, C20:1n9, C22:1n11 e os PUFA n3, C20:5n3 e C22:6n3 (Tocher, 2003). Diferente da ração acima descrita, a ração utilizada para os surubins apresentou uma maior quantidade de PUFA n6 (Tabela 1), o que consequentemente permitiu que as principais diferenças encontradas entre os grupos experimentais em relação aos PUFA ocorreram nesta família (Tabelas 7 e 9).

Tocher (2003) menciona que sem dúvidas o C16:0, C18:1n9, C20:1n9 e C22:1n11 são altamente catabolizados para prover energia em peixes, porque eles são consumidos em grandes quantidades durante o cultivo destes animais. Estes ácidos graxos foram de fato consumidos pelos surubins em grandes quantidades (com exceção do C22:1n11), principalmente no período em que a quantidade de ração oferecida não foi adequada,

mas após este período pode ter havido um acúmulo desses ácidos graxos providos da ração fazendo com que suas porcentagens se elevassem nos tecidos dos animais em ambos os grupos (Tabelas 8 e 10). Na fração neutra do tecido hepático, os animais submetidos às temperaturas mais baixas aumentaram significativamente a porcentagem de PUFA n3 em relação aos animais mantidos na estufa. Esse aumento foi refletido principalmente devido às alterações no C20:5n3 (EPA) e C22:6n3 (DHA). Alguns estudos que buscaram explicações sobre o papel hipolipidêmico do óleo de peixe (rico em EPA e DHA) demonstraram que o EPA é facilmente β -oxidado nas mitocôndrias e peroxissomos, mas a oxidação do DHA ocorre principalmente nos peroxissomos, e desta forma os autores concluem que o EPA é o principal agente hipolipidêmico do óleo de peixe (Madsen *et al.*, 1999). Com base nestas diferenças, esses mesmos autores sugerem que o EPA seja um PUFA mais ativo metabolicamente, enquanto que o DHA tenha mais funções estruturais. Tanto no fígado quanto no músculo de ambos os grupos experimentais, as porcentagens de PUFA foram semelhantes, mas quando a temperatura da água dos tanques experimentais atingiu o valor de 25°C para a máxima e 23°C para mínima no grupo Estufa, os animais apresentaram uma redução da porcentagem de PUFA n3 na fração neutra hepática, em relação aos animais submetidos às temperaturas mais baixas, sendo esta redução compensada pelo aumento de MUFA (Tabela 8). A via mencionada acima pode ter aumentado sua atividade para os animais mantidos no grupo Estufa devido à influência da temperatura, porém, catabolizando PUFA n3 e n6, sendo este último provavelmente devido à maior quantidade (principalmente C18:2n6) na ração. No entanto, no caso do PUFA n3, o mais consumido foi o DHA e não o EPA, como proposto por Madsen *et al.* (1999).

A temperatura pode ter influenciado em muitos outros fatores para que esta diferença observada ocorresse. Seria necessário analisar também o perfil dos ácidos graxos do tecido adiposo dos animais, a fim de avaliar se estes foram deslocados para a região mesentérica. Adicionalmente seria interessante medir a atividade enzimática das lipases, assim como a concentração plasmática dos hormônios que regulam esta atividade. Além disso, junto com estes estudos é necessário estabelecer os efeitos da temperatura nos peroxissomos do surubim do Paraíba, pois eles são outra via de β -oxidação em mamíferos. Possivelmente, eles são especificamente utilizados como uma cadeia de encurtamento inicial, anterior à β -oxidação convencional (mitocôndria) de ácidos graxos de cadeia muito longa e/ou PUFA (Tocher, 2003). Sendo assim, postula-

se que a elevação da temperatura pode ter elevado a atividade das enzimas dessa organela, envolvida nos processos mencionados acima, gerando esta resposta.

O catabolismo de ácidos graxos é a maior fonte de energia para muitas espécies de peixes (Tocher, 2003), e os dois grupos experimentais utilizaram-se desse substrato para a manutenção da homeostase e também para o crescimento. Contudo, a energia obtida a partir de um ácido graxo saturado de cadeia longa é maior que a de um PUFA de mesmo tamanho, devido às duplas ligações que esta última molécula possui, que armazena uma quantidade de energia potencial menor que uma molécula com apenas ligações simples, ou mesmo com apenas uma insaturação (Nelson e Cox, 2005).

Esta informação, relacionada com os valores de temperatura, fortalece a hipótese que a temperatura mais elevada aumentou a absorção dos alimentos e/ou a eficiência dos processos de catálise dos ácidos graxos para a obtenção de energia, já que mesmo os animais do grupo Estufa utilizaram um substrato com um potencial de energia menor (polinsaturados) no músculo e no fígado, que os animais do grupo Sem Estufa, nas fases finais do experimento. No entanto, os peixes de ambos os grupos experimentais apresentaram um crescimento satisfatório.

A análise conjunta da concentração de lipídio hepático e muscular e dos ácidos graxos destes tecidos mostra que independente da temperatura, os animais utilizaram os lipídios como substrato preferencial para a manutenção e crescimento, no entanto o tipo de ácido graxo utilizado foi influenciado pela temperatura.

5.6 Cortisol Plasmático

O resultado da análise do cortisol plasmático mostrou que os animais mantidos em temperaturas mais elevadas apresentaram uma elevação da concentração desse hormônio na coleta realizada em janeiro de 2010 em relação aos meses iniciais do experimento, já os animais do grupo Sem Estufa, ou seja, mantidos em temperaturas mais baixas, não apresentaram diferenças estatísticas ao longo do experimento. Entre os grupos experimentais, houve uma diferença justamente na coleta de janeiro de 2010, em que os animais do grupo Estufa apresentaram concentrações significativamente maiores (Figura 52). O cortisol é o hormônio corticosteróide mais ativo e abundante em peixes, tendo uma estrutura molecular bem conservada em todas as espécies de vertebrados já estudadas (van der Boon *et al.*, 1991). Esse importante hormônio age primariamente nas células das brânquias, intestinais e hepáticas, nas quais foram identificadas até o

momento duas principais funções adaptativas, relacionadas à osmorregulação e à manutenção do balanceamento do metabolismo energético (Wendelaar Bonga, 1997), que podem causar alterações no crescimento, sucesso reprodutivo e diminuição de resistência às doenças (Barton, 2002).

Quanto ao metabolismo energético, o cortisol desempenha um importante papel na mobilização de substratos tais como a glicose e ácidos graxos livres para a manutenção da homeostase, exercendo efeitos diretos e indiretos no metabolismo intermediário, que participam da resposta ao estresse (van der Boon *et al.*, 1991). Desta forma, é comum relacionar os processos envolvidos ao estresse, de algum modo, com a eficiência energética (Emlen *et al.*, 1998).

Seguindo o raciocínio de que o estresse pode estar envolvido na eficiência energética, e que o cortisol pode alterar a mobilização dos substratos energéticos e indiretamente o crescimento, a comparação entre os resultados obtidos com o cortisol, substratos energéticos e o crescimento, sugere que a elevação do cortisol em janeiro de 2010 nos animais do grupo Estufa, assim como um maior valor em relação aos animais do grupo Estufa, não expressa o fato de que os animais deste grupo estariam passando por alguma resposta ao estresse. Por outro lado, seria esperado que o valor de cortisol fosse mais elevado na coleta de novembro de 2009, em ambos os grupos, devido à baixa quantidade de ração oferecida, as alterações no metabolismo de lipídeos e a ausência de crescimento, contudo, essa alteração hormonal não ocorreu. Segundo Vijayan e Leatherland (1990), durante o estresse crônico pode haver uma queda para níveis basais do cortisol, mesmo se o peixe estiver respondendo ao estressor. Isto pode ter ocorrido no presente experimento, no período em que a alimentação não foi o suficiente, já que houve uma estagnação da massa corpórea e a mobilização dos lipídeos do mesentério para o fígado e músculo, além da manutenção dos valores de proteína e glicogênio.

Dois conceitos elaborados por McEwen e Wingfield (2003) podem auxiliar o entendimento dos resultados apresentados, sobretudo na queda significativa da massa corpórea dos animais do grupo Sem Estufa. O primeiro é o conceito de alostase, que é o processo corpóreo de tentativa de atingir a estabilidade (homeostase), variando as operações fisiológicas e comportamentais. O segundo é o status alostático, que refere-se às alterações sustentadas por mediadores primários que integram as respostas fisiológicas e comportamentais em decorrência de um desafio. McEwen and Wingfield (2003) citam ainda que o status alostático pode ser sustentado por períodos limitados

com a ingestão de alimento e/ou estoque de energia como a gordura, que pode ser um combustível para os mecanismos homeostáticos.

Aplicando-se estes conceitos no presente trabalho, juntamente com a observação de uma grande quantidade de tecido adiposo no mesentério que estes animais apresentaram na primeira coleta (setembro de 2009), e também que este estoque de energia foi utilizado até novembro de 2009, é possível sugerir que os animais tenham processado respostas fisiológicas frente ao desafio (inadequada quantidade de alimento) e conseguido manter seus mecanismos homeostáticos até a segunda coleta (novembro de 2009), fazendo com que não houvesse mortes neste período, alterações bruscas no comportamento ou como no caso dos animais da Estufa, a manutenção da massa corpórea. Já nos animais mantidos fora da Estufa esta manutenção da massa corpórea não ocorreu (Tabela 5), provavelmente porque a menor temperatura acarretou em uma atividade enzimática mais baixa, aliada a uma possível menor eficiência na absorção dos alimentos, como foi observado no final do experimento (Tabela 6). Esses fatos podem ter contribuído para que a mesma quantidade de substrato energético não fosse utilizada de uma maneira tão eficaz quanto o que foi observado para os animais do grupo Estufa, gerando uma queda da massa corpórea dos surubins mantidos em temperaturas mais baixas.

Mesmo com estes fatos, não foram observadas alterações no cortisol neste período, entretanto, o aumento deste hormônio foi observado na coleta seguinte, nos animais do grupo Estufa, que por sua vez, apresentaram um crescimento significativo em relação ao mês anterior (Tabela 5). Este aumento pode estar relacionado a alguma ação inadequada que ocorreu durante o manejo, ou mesmo em algum momento antes da coleta por algum trabalho realizada na piscicultura, ou seja, este resultado pode não ser relacionado diretamente com os valores de temperatura observadas neste período, já que esta elevação continuou (Tabela 3) e os animais apresentaram o mesmo padrão de mobilização energética além de um crescimento satisfatório.

A concentração de glicose plasmática também é relacionada a uma resposta ao estresse, já que em condições subótimas ou estressante as células cromafins liberam os hormônios catecolamina (adrenalina e noradrenalina), que atingem a circulação sanguínea (Reid *et al.*, 1998). Estes hormônios associados com o cortisol mobilizam e elevam a produção de glicose nos peixes por meio da glicogênese e glicogenólise (Iwama *et al.*, 1999). Em *Rhamdia quelen* foi observada a relação entre a glicose

plasmática e o cortisol, como um parâmetro para indicar uma resposta fisiológica ao estresse (Lermen *et al.*, 2004), todavia, no presente estudo não foi identificada essa relação ao longo do experimento.

Martínez-Porchas *et al.*, (2009) revisaram a viabilidade em utilizar as análises de glicose e cortisol como indicadores de estresse. Os autores concluem que o cortisol e a glicose não podem ser eliminados da lista de indicadores de estresse, mas por sua alta variabilidade, eles devem ser complementados com outras mediadas tais como outros hormônios, proteínas de choque térmico (hsp), contagem das células sanguíneas (principalmente em experimentos com estresse crônico), métodos não invasivos e/ou outros métodos que permitam compreender um perfil mais completo sobre o status de estresse do peixe. Os autores complementam que ao utilizar o cortisol e a glicose como indicador de estresse o pesquisador precisa ser cuidadoso para identificar possíveis situações ou fatores que podem influenciar as respostas ao estresse dos peixes, para que se tenha certeza de que eles não fazem parte do processo ou método experimental. Finalmente, os autores mencionam que a credibilidade dos resultados de um experimento é significativamente elevada se um número adequado e suficiente de testes for realizado. Estes cuidados mencionados foram tomados ao longo do presente trabalho, demonstrando que as análises zootécnicas, de crescimento e metabólicas foram essenciais para as interpretações dos resultados de cortisol e também a sua interação com a glicose plasmática.

5.7 Abordagem Teórica das Implicações da Temperatura nos Processos Fisiológicos do surubim

Como foi definida acima, a temperatura mede o grau médio de agitação caótica das moléculas. Desta forma, se houver uma elevação da temperatura em um ambiente no qual um animal está inserido, haverá o processo de transferência de energia do local com temperatura maior, para o de temperatura menor (calor), e pode gerar, por consequência, uma elevação da energia cinética das moléculas dos animais (Hochachka e Somero, 2002).

A interferência da temperatura no grau de energia cinética das moléculas, por sua vez atua diretamente na reatividade das moléculas de um organismo, por meio de diversos fatores como conformação tridimensional, elevação e também diminuindo da energia de ativação da molécula, que é a energia necessária para que ocorra uma reação

(Hochachka e Somero, 2002). Esta influência da temperatura sobre a reatividade das moléculas pode ser observada nas enzimas, pois a sua união com uma determinada molécula causa uma queda na energia de ativação, transformando então, o substrato em produto em um tempo muito reduzido (Nelson e Cox, 2005). Por isso a elevação da temperatura altera a reatividade de uma enzima, fazendo com que as reações ocorram com a velocidade e/ou a eficiência modificada. Se for transportado esse conhecimento teórico aos resultados do presente experimento pode ser sugerir que uma quantidade maior de moléculas seja transformada com maior velocidade e/ou maior eficiência, como por exemplo, no processo de β -oxidação, em que os ácidos graxos são transformados em energia química (ATP), que acarretou possivelmente em uma maior energia para a realização dos processos fisiológicos, inclusive o crescimento nos animais do grupo submetido à maior temperatura.

5.8 Correlações entre os Resultados de Crescimento, Análises Metabólicas e Ácidos Graxos em uma Extrapolação para o Ambiente Natural

Para os surubins que participaram do presente experimento, o acúmulo principalmente de proteína e a utilização dos lipídeos como o principal substrato energético, nos períodos em que os animais apresentaram um incremento de massa, foi pouco relacionado com a diferença de temperatura utilizada neste trabalho, já que os dois grupos experimentais apresentaram este mesmo padrão, mas a utilização dos substratos energéticos e o seu crescimento, assim como a eficiência alimentar foram mais eficazes nos animais submetidos a temperaturas mais altas. Todavia, a extrapolação deste resultado para o ambiente natural, que apresente uma elevação de 2°C de temperatura deve ser feita com cautela.

Como foi observado acima, com uma quantidade de ração inadequada houve uma maior utilização do substrato energético do mesentério, além da manutenção da proteína muscular e hepática naquele período, o que acarretou em um crescimento nulo. O aquecimento da água em ambiente natural pode acarretar em uma redução da solubilidade dos gases, principalmente o oxigênio (Schmidt-Nielsen, 2002) e, além disso, o aumento da temperatura ainda reduz a afinidade da hemoglobina ao oxigênio (Whiters, 1992). Em determinados períodos do ano, em que este aumento de temperatura poderá gerar uma diminuição do oxigênio dissolvido, a homeostase dos

peixes deste ambiente pode ser seriamente comprometida, diminuindo então tanto o crescimento, na oferta de alimentos e utilização de seu substrato energético.

Para os animais como os peixes, que vivem em um ambiente em que a oferta de oxigênio é limitada devido a sua baixa solubilidade na água, a oxidação de lipídeos pode ser desvantajosa, sendo então a proteína o substrato energético preferencialmente oxidado, para a manutenção da homeostase. A oxidação de proteína em peixes resulta em um maior coeficiente respiratório ($QR > 0,9$) que a oxidação de lipídeos ($QR < 0,7$), embora a equivalência calorimétrica (J/unidade de oxigênio) seja similar para proteínas e lipídeos (Mommensen, 2001). Uma casual queda de oxigênio dissolvido devido a uma elevação da temperatura (principalmente nos períodos mais quentes do ano) pode acarretar em respostas semelhantes às encontradas no primeiro período do experimento (setembro a novembro de 2009), ou seja, ausência de crescimento e utilização das reservas lipídicas, assim como a manutenção da concentração de proteína, mesmo com disponibilidade de alimento. Em um ambiente com uma baixa quantidade de oxigênio dissolvido, esta relação de consumo de substratos com disponibilidade de oxigênio pode fazer com que as proteínas e o glicogênio sejam os substratos preferências para a obtenção de energia (Tabela 12).

Estas alterações dos substratos energéticos, principalmente proteínas e lipídeos, podem futuramente alterar a composição da molécula de vitelogenina nas fêmeas adultas. Esta molécula é a principal precursora das proteínas do vitelo em vertebrados e invertebrados (Finn, 2007), possuindo um papel essencial para o sucesso do desenvolvimento embrionário e do crescimento larval. Sua composição é de 79% de proteínas e 19% de lipídios, quanto aos lipídeos, 70% do total desse substrato correspondem aos fosfolipídios (Jalabert, 2005). Estes fosfolipídios são compostos principalmente pelos ácidos graxos polinsaturados (PUFA), especialmente o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n3), o ácido araquidônico (AA, 20:4n6) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n3) e este último, ainda é muito importante na formação do tecido nervoso (Jalabert, 2005).

Com a elevação da temperatura, houve uma elevação de SFA nas membranas celulares dos animais em ambos os grupos e uma utilização de PUFA para a obtenção de energia na fração neutra. Estas alterações podem causar consequências na sobrevivência da prole, chegando até, dependendo da intensidade causar impactos na população da espécie no ambiente natural.

6. Considerações finais

Como foi observado, a baixa quantidade de ração oferecida fez com que os animais dos diferentes grupos experimentais apresentassem alterações no metabolismo de lipídeos, de proteínas e de glicogênio, porém o incremento de massa durante este período foi maior para os animais mantidos na estufa, grupo este que, desde o início do experimento, manteve a temperatura mais elevada em seus tanques experimentais. Após a adequação da ração, o crescimento dos animais do grupo Estufa continuou maior e foi constatado que tanto o crescimento específico, relativo quanto a eficiência alimentar neste grupo foram mais elevados, porém o padrão de utilização dos substratos energéticos foi semelhante entre os grupos experimentais durante este período (janeiro e março de 2010).

Assim como a resposta dos lipídeos totais, os ácidos graxos da membrana celular (fração polar) apresentaram um padrão semelhante, com aumento dos SFA após o período de novembro de 2009, paralelamente a uma diminuição dos PUFA, principalmente n6, dos animais do grupo Estufa, podendo ser sugerido que os animais desse grupo utilizaram esses ácidos graxos para a obtenção de energia.

Os dados das análises de cortisol mostraram que, mesmo sendo um hormônio importante na resposta ao estresse, o seu resultado por si só, não é suficiente para mencionar ou sugerir que os animais mantidos em temperaturas mais elevadas estariam estressados, pois como a resposta ao estresse está relacionada com diversos fatores já discutidos, direcionam a uma conclusão que a temperatura não foi um agente estressor ao longo do experimento, mas sim a baixa quantidade de ração pode ter sido. Contudo, a temperatura pode ter diferenciado as respostas fisiológicas frente a um mesmo estressor nos dois grupos experimentais, como por exemplo, na perda de massa corpórea que foi observada nos animais submetidos a temperaturas mais baixas.

Observando-se os resultados obtidos e correlacionando-os com os conhecimentos teóricos das implicações da temperatura no organismo, principalmente em animais ectotérmicos, é possível sugerir que a temperatura mais elevada fez com que a taxa metabólica do animal se alterasse e com isso alguns processos como o crescimento fosse diferente entre os grupos experimentais, mesmo nos momentos em que a alimentação não foi adequada. Isto pode ter ocorrido possivelmente em decorrência de

uma maior velocidade e/ou eficiência das enzimas envolvidas nestes processos, gerando então uma quantidade de substratos energéticos semelhantes nos dois grupos, porém com um incremento de massa maior. Além disso, esta influência da temperatura pode ter sido decisiva para a maior eficiência alimentar o que pode ter possibilitado também uma melhor absorção dos alimentos e, portanto uma maior utilização destes para diversos processos fisiológicos tal como o crescimento.

Conclui-se além do que foi dito acima, que o aumento da temperatura possivelmente influenciou na atividade das enzimas dos peroxissomos, favorecendo a utilização de PUFA como fonte de energia, o que, em fêmeas adultas, poderia causar alterações qualitativas na molécula de vitelogenina, colocando “em cheque” a hipótese de que a temperatura mais elevada aperfeiçoaria a criação e a dinâmica populacional do surubim do Paraíba.

Os resultados deste trabalho demonstram os “efeitos finais” da influência da temperatura sobre o metabolismo e também no crescimento, porém eles não analisam os processos bioquímicos envolvidos para que estes valores fossem obtidos, e por isso não é possível avaliar com precisão onde e quais foram os locais específicos em que a temperatura influenciou nos processos fisiológicos propostos neste trabalho, mas é possível reforçar que este fator abiótico é fundamental para a vida dos animais.

De uma forma geral, pode-se concluir que em uma possível elevação de 2°C da temperatura do ambiente devido às alterações climáticas, o que é previsto pelo IPCC (2007), o surubim do Paraíba pode apresentar um benefício quanto ao crescimento e utilização dos substratos energéticos, porém este trabalho não avalia as possíveis alterações que podem ocorrer no ambiente em que este animal vive. Possíveis alterações, como a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na água podem acarretar em modificações semelhantes às encontradas quanto à quantidade de alimento inadequada, já que pelas características das moléculas (lipídeos e proteínas) a utilização dos substratos energéticos pode ser alterada. O fato de que o consumo de PUFA ocorreu devido à elevação da temperatura não pode ser extrapolado diretamente para o ambiente natural, já que possíveis modificações na cadeia trófica e na qualidade da água podem modificar os resultados encontrados.

A sobrevivência dos surubins do Paraíba após uma prevista elevação de temperatura pode aparentemente ser benéfica, tanto em ambientes naturais quanto em cativeiro, porém são necessários mais estudos tanto na área fisiológica quanto ecológica

para que se possa entender melhor as respostas fisiológicas frente a esta alteração e assim, estabelecer um plano eficaz para a conservação destes animais no ambiente natural e também para a adequação da criação desta espécie em cativeiro.

7. Referências Bibliográficas

- Almeida, S.C.A., Nuñez, A.P.O. 2009. Crescimento de *Pimelodus maculatus* (Actinopterygii, Pimelodidae) estocados em diferentes densidades em tanques-rede. Biotemas. 22, 113-119.
- Anelli, L.C., Olle, C.D., Costa, M.J., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2004. Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from the neotropical teleost *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887-Teleostei, Serrasalminae). Journal of Thermal Biology 29, 103–113.
- Aragão, M. A.; Araújo, P. A. 2006. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: P. A. Zagatto; E. Bertoletti (Eds.). Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. São Carlos: Rima, pp. 117-152.
- Azaza, M.S., Dhraïef, M.N., Kraïem, M.M., 2008. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. Journal of Thermal Biology 33, 98–105.
- Baldisserotto, B. e Gomes L. C. 2005. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. (Eds.) UFSM. 1ª edição. Rio Grande do Sul. pp. 303 – 342.
- Baldisserotto, B., 2002. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Ed.UFSM. 1ª edição. Rio Grande do Sul. 7: 1149-162
- Baldisserotto, B., 2002. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Ed.UFSM. 1ª edição. Rio Grande do Sul. PP. 1149-162.
- Barcellos, L.G., Souza, S.M.G., Woehl, V.M. 2000. Estresse em peixes: Fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências. Boletim do Instituto de Pesca 26, 1.99-111.
- Barroso, R.M., Hisdorf, W.S., Mreira, H.L.M., Cabello, P.H., Traub-Cseko, Y.M., 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. Aquaculture. 247, 51-65.

- Barton, B.A., 2002. Stress in fish: a diversity of response with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Society Integrative Comparative Biology* 42, 517–525.
- Beitinger, T.L., Bennett, W.A., McCauley, R.W. 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes* 58, 237–275.
- Bolivar, R.B., Newkirk, G.F., 2002. Response to within family selection for body weight in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a single-trait animal model. *Aquaculture* 204, 371–381.
- Boyd, C. E. 1990. Water quality in ponds for aquaculture. Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Alabama, USA.
- Brasil. 2004. Instituição normativa Nº 05 de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente.
- Burgess, W.E. 1989. An atlas of freshwater and marine catfishes. A Preliminary survey of the Siluriformes. United States of America Pp. 784.
- Campinho, M.A., Moutou, K.A., Power, D.M., 2004. Temperature sensitivity of skeletal ontogeny in *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* 65, 1003–1010.
- Crockett, E.L., Londraville, R.L. 2006. Temperature. *In*: Evans, D. H. e Claiborne, J. B. *The Physiology of Fishes*. Ed. Taylor & Francis. 3^a edição. Flórida. 232- 258.
- Dufek, A.S., Ambrizzi, T. 2007. Precipitation variability in São Paulo State, Brazil. *Theoretical and Applied Climatology*. 93:167-178.
- Egginton, S., Sidell, B.D., 1989. Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 256, R1– R9.
- El-Sayed, A.F.M., El-Ghobashy, A., Al-Amoudi, M., 1996. Effects of pond depth and water temperature on the growth, mortality and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research* 27, 681–687.
- Emlen, J.M., Freeman, D.C., Mills, A., Graham, J.H., 1998. How organisms do the right thing : the attractor hypothesis. *Chaos* 8, 717–726.

- Emlen, J.M., Freeman, D.C., Mills, A., Graham, J.H., 1998. How organisms do the right thing : the attractor hypothesis. *Chaos* 8, 717–726.
- Evans, D. H. e Claiborne, J. B. 2006. *The Physiology of Fishes*. (Eds.) Taylor e Francis. 3^a edição. Florida. pp 7- 232.
- Fauconneau, B., 1985. Protein synthesis and protein deposition in fish. In: COWEY, C.B., MACKIE, A.M., Bell, J.B., *Nutrition and Feeding in Fish*. (Eds.) Academic Press, London, pp.17-45.
- Finn, R.N., 2007. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins. *Biology of Reproduction*. 76, 926-935.
- Folch, J., Less, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-503.
- Frings, C.S., Fendly, T.W., Dunn, R.T., Quenn, C.A., 1972. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clinical Chemistry*. 18, 673-674.
- Froyland, L., Madsen, L, Eckhoff, K.M., Lie, O., Berge, R.K. 1998. Carnitine palmitoyltransferase I, carnitine palmitoyltransferase II, and acyl-CoA oxidase activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Lipids* 33. 923–930.
- Gabillard J.,Weil C., Rescan,P.Y. Navarro I., Gutiérrez J., Le Bail, P.Y. 2003. Environmental temperature increases plasma GH levels independently of nutritional status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 133, 17–26.
- Gardeur, J.N., Lemarie, G., Coves, D., Boujard, T., 2001. Typology of individual growth in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources* 14, 223–231.
- Gjerde, B., Schaeffer, L.R., 1989. Body traits in rainbow trout II. Estimates of heritabilities and of phenotypic and genetic correlations. *Aquaculture* 80, 25–44.

- Gjerde, B., Schaeffer, L.R., 1989. Body traits in rainbow trout II. Estimates of heritabilities and of phenotypic and genetic correlations. *Aquaculture* 80, 25–44.
- Goldspink, G., Penney, R.K., 1982. Changes in fish muscle under various environmental temperature conditions. *Molecular Physiology* 2, 3-14.
- Hazel, J., R. 1984 Effects of Temperature on the Structure and Metabolism of Cell Membranes in Fish. *The American. Physiology. Society.* 246, R460-470.
- Hazel, J.R. 1995. Thermal Adaptation in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Annual Review Physiology* 57, 19-42.
- Hazel, J.R., Williams, E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipids Research* 29, 167 -227.
- Hilsdorf, A. W., Petrere, M. Jr., 2002. Peixes da bacia do rio Paraíba do Sul: Aspectos de sua diversidade e conservação. *Revista Ciência Hoje* 180, 62-65.
- Hochachka, P.W.; Somero, G.N. 2002. Temperature. *In: Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution.* Oxford, New York, pp. 26 – 29.
- Honji, R.M. ; Caneppele, D.; Hilsdorf, A.W. S. ; Moreira, R. G. 2009. Threatened fishes of the world: *Steindachneridion parahybae* (Steindachner, 1877) (Siluriformes: Pimelodidae). *Environmental Biology of Fishes*, 85, 207-208
- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, vM., Van Der Linden, P.J., Xiaosu, D. 2001. Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 944.
- Ibarz A., Beltrán M., Fernández-Borràs, J., Gallardo, M.A. Sánchez, J. Blasco, J. 2007. Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262, 470–480.
- Ibarz A., Beltrán M., Fernández-Borràs, J., Gallardo, M.A. Sánchez, J. Blasco, J. 2007. Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262, 470–480.

- Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC (2007). Climate Change 2001 – The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the IPCC. Cambridge University Press. Cambridge.
- Iwama, G. K., Vijayan, M. M., Forsyth, R. B. & Ackerman, P. A. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*, 39: 901-909.
- Jalabert, B. 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutritional Development*, 45, 261–279.
- Janssens, P.A., Lowrey, P. 1987. Hormonal regulation of hepatic glycogenolysis in the carp, *Cyprinus carpio*. *American Journal of Physiology* 252, 653–660.
- Jobling, M., 1997. Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature change. In: Wood, C.M., McDonald, D.G. (Eds.), *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish*. Cambridge University Press, pp. 223–254.
- Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., Wahlroos, H., Mäntysaari, E.A., 2005. Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout. *Aquaculture* 247, 177–187.
- Kause, A., Ritola, O., Paananen, T., Mäntysaari, E., Eskelinen, U., 2003. Selection against early maturity in large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the quantitative genetics of sexual dimorphism and genotype by environment interactions. *Aquaculture* 228, 53–68.
- Keppler, D. e Decker, K. 1984. Glycogen. In: Bergmeyer, H.U. (Eds.) *Methods of Enzymatic Analysis*. v.6. Weinheim, Verlag Chemie.
- Keppler, D., Decker, K. 1974. Glycogen. Determination with amyloglucosidase. In: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer, H.U. (Eds.)). Verlag Chemie. Weinheim/Bergstr. pp. 1127 – 1131.
- Kling L.J., Muscato Hansen, J., Jordaan A. 2007. Growth, survival and feed efficiency for post-metamorphosed Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared at different temperatures. *Aquaculture* 262, 281-288.
- Koolman, J., Roehm, K.H. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. Ed. Thieme Stuttgart, New York. 46-56 pp.

- Lambert, Y., Dutil, J., 2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. *Aquaculture* 192, 233–247.
- Larsen, D.A., Beckman, B.R., Dickhoff, W.W. 2001. The Effect of Low Temperature and Fasting during the Winter on Metabolic Stores and Endocrine Physiology (Insulin, Insulin-like Growth Factor-I, and Thyroxine) of Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* 123, 308–323.
- Larsson, S., Berglund, I., 2005. The effect of temperature on the growth energetic, growth efficiency of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) from four Swedish populations. *Journal of Thermal Biology* 30, 29–36.
- Le-Cren E.D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology* 20, 201–219.
- Lemarié, G.; Dosdat, A.; Covés, D.; Dutto, G.; Gasset, E.; Ruyet, P. 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 229: 479–491.
- Lermen, C.L., Lappe, R., Crestania, M., Vieira, V.P., Gioda, C.R., Schetinger, M.R.C. a, Baldisserotto, B., Moraes, G., Morsch, V.M. 2004. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 239, 497–507.
- Logue, J.A, DeVieres, A.L., Fodor, E., Cossins, A.R. 2000. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *Journal of Experimental Biology* 203, 2105–2115.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry* 193, 265–275.
- Lundberg, J.G., Littmann, M.W., 2003. Family Pimelodidae (Long-whiskered cat fishes). In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, Jr., C.J. (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, pp. 437–452.

- Machado, C.E., Abreu, H.C.F., 1952. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo- I. A pesca no Vale do Paraíba. Boletim de Industria Animal. 13, 145-160.
- Madsen, L., A. C. Rustan, H. Vaagenes, K. Berge, E. Dyroy, R. K. 1999. Berge. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. Lipids 34, 951–963.
- Marengo, J.A., 2008. Água e Mudanças Climáticas. Estudos Avançados pp. 22, 63.
- Martínez-Porchas M., Martínez-Córdova, L., Ramos-Enriquez, R. 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? Pan-American Journal of Aquatic Sciences 4, 158-178.
- Mateus, L. A. F., Petrere Jr., M. 2004. Age, growth and yield per recruit analysis of the pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) in the Cuiabá River basin, Pantanal Matogrossense, Brazil. Brazilian Journal of Biology 64, 257-264.
- Mazeaud, M., e M., Mazeaud, F. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. Pickering, Ad. D., Stress and fish. , London: Academic Press pp. 49-75.
- McElhaney, R.N. 1984. The structure and function of the *Acholeplasma laidlawii* plasma membrane. Biochimica et Biophysica Acta 779, 1-42.
- McEwen, B.S., Wingfield, J.C., 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. Hormones and Behavior 43, 2–15.
- Médale, F., Aguirre, P., Kaushik, S.J., 1991. Utilization of dietary carbohydrates by rainbow trout at two water temperatures. In: Wenk, C., Boessinger, M. (Eds.), Energy metabolism of Farm Animals. European Association for Animal Production, 58, pp. 392–395.
- Milligan, C.L., Girard, S.S., 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. Journal of Experimental Biology 180, 175-193.
- Mommsen, T. P. 2001. Paradigms of growth in fish. Comparative Biochemistry and Physiology 129B: 207-219.
- Montero, D., Izquierdo, M., S., Tort, L., Robaina , L., Vergara J., M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and

- biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 53–60.
- Moon, T.W., Foster, G.D., 1995. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. *In*: Hochachka, P.W., Mommsen, T.O. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fish, Metabolic Biochemistry*, vol. 4. Elsevier Sciences Publishers, New York, pp. 65– 100.
- Mora, C., Maya, M.F. 2006. Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. *Journal of Thermal Biology* 31, 337-341.
- Moreira, I.S., Peres, H., Couto, A., Enes, P., Oliva-Teles, A. 2008. Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilization of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 274, 153 – 160.
- Nate P. F., Moule M. L. and Schuh J. E. 1964. The normal blood sugar of the toadfish. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 42, 225-232.
- Neira, R., Lhorente, J.P., Araneda, C., Díaz, N., Bustos, E., Alert, A., 2004. Studies on carcass quality traits in two populations of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): phenotypic and genetic parameters. *Aquaculture* 241, 117–131.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2005. *Principles of Biochemistry*. 4^o Edition. Ed. W.H. Freeman and Company. New York. pp. 522-554.
- Olin, T., Decken V.D., 1989. Vitellogenin Synthesis in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) at Different Acclimation Temperatures. *Aquaculture*, 79, 397-402.
- Ottolenghi, C., Puviani, A.C., Baruffaldi, A., Brighenti, L., 1984. Effect of insulin on glycogen metabolism in isolated catfish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 78 A, 705–710.
- Person-Le Ruyet J., Mahe'K., Le Bayon N., Le Delliou H. 2004. Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 237, 269-280.
- Pickering, A.D., 1981. *Stress and Fish*. Academic Press, (Ed.), London.

- Prötner, H.O., 2002, Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A.* 132, 739–761.
- Randall A.D. Burggren, W. French, K. (2000) Usando a Energia: Enfrentando o Ambiente *In: Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações.* Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, pp. 619 – 622.
- Reid, S. G., Bernier, N. J., & Perry, S. F. 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology* 120C: 1-27.
- Ruyet, J. P. L.; Galland, R.; Roux, A. L.; Chartois, H. 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154: 155- 171p.
- Sampaio, G., Marengo, J., Nobre, C., 2008. Dimensão Atmosférica, *In: BUSCKERIDGE, M.S., Biologia e Mudanças Climáticas no Brasil.* (Eds.) Rima, São Carlos-SP, pp. 19-21.
- Sargent, J. R. 1989. Ether-linked glycerides in marine animals. *In: Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils,* (Ackman, R. G., Ed.). Bacon Raton, Florida: CRC Press. pp. 175–198.
- Schmidt-Nielsen, K. (2002.) *Metabolismo Energético In: Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente.* Santos. São Paulo. Pp. 160 -175.
- Schreck, C.B., 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish. *In: Moberg, G.P., Mench, J.A. (Eds.), The biology of animal stress.* CAB International, Wallingford, pp. 147–158.
- Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 549-556.
- Selye, H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 1, 1383-1392.
- SHERIDAN, M.A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates.

- Shikata, T., Iwanaga, S., Shimeno, S., 1995. Regulation of carbohydrate metabolism in fish .25. Metabolic response to acclimation temperature in carp. *Fish for Science*. 61, 512–516.
- Sinensky, K., e Ikonem, E. 1974. Homeoviscous adaptation-a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 71, 522-525.
- Skalli, A., Robin, J.H., 2004. Requirement of n–3 long chain polyunsaturated fatty acids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture* 240, 399–415.
- Skalli, A., Robin, J.H., Le Bayon, N., Le Delliou, H., Person-Le Ruyet, J. 2006. Impact of essential fatty acid deficiency and temperature on tissues fatty acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 255 223–232.
- Sun, L.T., Chen, G.R., Chang, C.F., 1995. Acute responses of blood parameters and comatose effects in salt acclimated tilapias exposed to low temperatures. *Journal of Thermal Biology* 20, 299– 306.
- Tobin, D., Kause, A., Mäntysaari, E.A., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Dobly, A., Kiessling, A., Rungruangsak-Torrissen, K., Ritola, O., Ruohonen, K., 2006. Fat or lean? The quantitative genetic basis for selection strategies of muscle and body composition traits in breeding schemes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261, 510–521.
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11108–162.
- Tolussi, C.E., Caneppele, D., Hilsdorf, A.S. Moreira. R.G. 2010. The effects of stocking density in physiological parameters and growth of the endangered teleost species piabanha *Brycon insignis* (Steindachner, 1877) *Aquaculture* doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.10.007.
- van der Boon J., G.E.E.J.M. van den Thillart, and A.D.F. Addink. 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100A:47–53.

- Van Ham, E.H., Berntssen, H.G., Imsland, A.K., Parpouna, A.C., Bonga, E.W., Stefansson, S.O., 2003. The influence of temperature and ration on growth, feed conversion, body composition and nutrient retention of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 217, 547–558.
- Vazzoler, A.E.A.M., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e Prática*. Ed. Nupelia, Maringá-PR, pp. 169.
- Vijayan, M.M., Ballantyne, J.S.; Leatherland, J.F. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 88: 371–381.
- Wang, N., Xu, X., Kestemont, P. 2009. Effect of temperature and feeding frequency on growth performances, feed efficiency and body composition of pikeperch juveniles (*Sander lucioperca*). *Aquaculture* 289, 70 -73.
- Wendelaar Bonga S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiology Review* 77, 591–625.
- Wikelski, M., Cooke, S.J. 2006. Conservation physiology. *Trends in ecology and evolution*. 21, 38-46.
- Withers, P.C., 1992. *Comparative Animal Physiology In: Temperature*. Saunders College Publishing, pp. 123.

7- Anexo I

1. Determinação de Nitrito pela Reação de Griess

1.1 Princípio do método:

A reação mais comumente utilizada para determinação de nitrito é a reação de Griess, baseada na reação de diazotização da sulfanilamida com nitrito, seguido do acoplamento do produto dessa reação com a N-1-naftiletilenodiamina em meio ácido. O composto formado, de coloração púrpura, é proporcional à quantidade de nitrito presente na amostra e apresenta máximo de absorção em 540nm. Espectro de absorção na região do visível do azocomposto produzido na reação de Griess.

1.2 Pré-tratamento das amostras para determinação de nitrito:

As amostras coletadas devem ser armazenadas em geladeira, sem aditivos. Devem ser analisadas no mesmo dia da coleta. Se estiverem muito turvas é necessário realizar a filtração em membrana de 0,45um.

1.3 Soluções necessárias:

No preparo das soluções usar preferencialmente água tipo 1 (Milli Q) ou água deionizada.

- Solução de reagente colorimétrico formado pela mistura de 4g de sulfanilamida com 0,100g de cloridrato de naftiletilenodiamina e 10ml de ácido fosfórico concentrado para 100ml de solução; Armazenar em frasco âmbar, imediatamente após o preparo. Pode ser armazenado em geladeira ($\pm$ uma semana) para ser usado posteriormente, contudo observar a solução deverá ser incolor. Se estiver rosa, descartar.

- Solução padrão estoque (E_1) de nitrito de sódio ou potássio, contendo o equivalente a 200mgN/L. Preparar solução 0,986g/L de NaNO_2 ou 1,214g/L de KNO_2 . Acrescentar 2ml de clorofórmio depois de pronta. É melhor armazenar em geladeira.

- Solução padrão estoque (E_2) de nitrito de sódio ou potássio contendo 20mgN/L preparada pela diluição de 10ml da solução estoque E_1 para o volume final de 100ml. Armazenar em geladeira.

- Padrões de nitrito na faixa de 0,02 a 0,5mgN/L preparados por diluição da solução estoque E₂. Estes padrões devem ser preparados no momento da análise e sobras devem ser descartadas.

1.4 Preparo dos padrões:

Preparar 100 ml dos padrões, diluídos conforme as proporções da tabela abaixo. Depois de completado o volume, homogeneizar e transferir para frascos âmbar devidamente identificados:

Conc. padrão mgN/L	Aliquota solução E2	Volume final (c/ água)
0 (água)	0	100ml
0,02	100ul	100ml
0,05	250ul	100ml
0,10	500ul	100ml
0,20	1000ul	100ml
0,40	2000ul	100ml
0,50	5000ul	100ml

1.5 Método de análise:

No momento da análise, as soluções do reagente, dos padrões e as amostras devem estar em temperatura ambiente.

E1) Para curva analítica:

Misturar e homogeneizar as proporções de padrão e reagente colorimétrico designados na tabela a seguir:

Identificação Padrão (mgN/L)	Volume de Padrão (ml)	Volume de Reagente colorimétrico (ml)
0 (água)	4	2
0,02	4	2
0,05	4	2
0,10	4	2
0,20	4	2
0,40	4	2
0,50	4	2

E2) Para análise das amostras

Misturar as seguintes proporções de amostra, reagente colorimétrico e água (é importante homogeneizar bem cada meio reacional).

Identificação	Volume de amostra (ml)	Volume de reagente	Volume de água deionizada (ml)	Parâmetro determinado
---------------	------------------------	--------------------	--------------------------------	-----------------------

		colorimétrico (ml)		
Amostra A	4	2	0	Replicata 1 A
Amostra A	4	2	0	Replicata 2 A
Branco amostra A	4	0	2	Branco amostra A
Amostra B	4	2	0	Replicata 1 B
Amostra B	4	2	0	Replicata 2 B
Branco amostra B	4	0	2	Branco amostra B

Obs.: Prepara um branco para cada amostra.

E3) Medida das absorvâncias:

Após 20 minutos, medir as absorvâncias em 540nm para todos os meios preparados (padrões, amostras e branco das amostras). Usar cubeta com caminho ótico de 1cm (acrílico, vidro ou quartzo, pois absorve na região visível do espectro).

- Se a amostra A for > padrão 0,5mgN/L, a amostra precisa ser diluída.
- Diluir com água Tipo 1 ou deionizada, de modo que o valor de absorvância da amostra diluída esteja no meio da curva analítica.
- Anotar o fator de diluição utilizado.
- O branco desta amostra será realizado com o mesmo fator de diluição.

1.6 Tratamento de dados

Dados obtidos para a curva analítica.

mgN/L	Abs. 540nm
0	0,0129
0,02	0,0492
0,05	0,1146
0,10	0,2318
0,20	0,4486
0,40	0,8923
0,50	1,1121

Curva analítica:

$Y = \text{coeficiente linear} + \text{coeficiente angular } X$

$(\text{Absorbância}) = (\text{branco curva analítica}) + (\text{sensibilidade}) * \text{Concentração}$

$$A = B + S * C$$

2. Determinação de Amônia pelo Método do Fenolato

2.1 Princípio do Método:

O mecanismo proposto para a reação de Berthelot consiste na reação da amônia com íon hipoclorito, formando um composto intermediário chamado de monocloroamina (reação I). Na sequência, a monocloroamina reage com o fenol formando o composto intermediário da reação II. O intermediário da reação II também reage com fenol, produzindo um composto de coloração azul chamado de indofenol (reação III), o qual absorve em 632 nm. O nitroprussiato de sódio é geralmente incorporado no meio reacional porque aumenta a velocidade da reação e a sensibilidade do método. O citrato de sódio em meio alcalino é utilizado como complexante para evitar a interferência de cálcio e magnésio.

2.2 Condicionamento das amostras

As amostras coletadas podem ser mantidas sem aditivos se conservadas em geladeira e analisadas no máximo em 24 horas. Caso seja necessário armazená-las por período maior, as amostras devem ser acidificadas ainda em campo com 1mL de H_2SO_4 concentrado para cada litro de amostra e preservadas em geladeira. Neste caso, pode-se analisar dentro de um prazo máximo de 28 dias.

Obs.: Usar luvas descartáveis no preparo de todas as soluções e durante a realização do experimento; manter todas as soluções na geladeira em frasco âmbar; retirar da geladeira antes da utilização e deixar atingir a temperatura ambiente.

2.3 Reagentes e Soluções

2.3.1 Análise de amostras naturais (conservadas apenas em geladeira)

- solução de nitroprussiato 0,5%
- solução alcalina de citrato de sódio 20% em NaOH 1%: Pesar 20 g de citrato de sódio di-hidratado e 1 g de NaOH. Misturar, dissolver e diluir em balão volumétrico para 100 mL.
- hipoclorito de sódio 2,5%
- solução oxidante: 100 mL da solução alcalina de citrato de sódio misturada com 50 mL de hipoclorito de sódio 2,5%
- solução de fenol 0,126 mol/L: 11,1 mL de fenol liquefeito diluído para 100mL com etanol absoluto. Densidade do fenol = 1,071g/mL; mw=94,11g/mol
- solução estoque E_1 contendo 3,819 g/L de NH_4Cl (1000mgN/L)
- solução estoque E_2 100mgN/L preparada por diluição de E_1
- padrões de NH_4Cl contendo 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1 mgN/L, preparados por diluição de E_2

Concentração (mgN/L)	Aliquota de $E_2 = 100 \text{ mg/L}$	Vol. final
0,05	50 μL	100 mL
0,1	100 μL	100 mL
0,2	200 μL	100 mL
0,5	500 μL	100 mL
1	1000 μL	100 mL

2.3.2 Análise de amostras acidificadas em campo com 1mL de H_2SO_4 concentrado por L de amostra :

Neste caso é importante para equiparar a acidez das amostras e padrões (tornar as matrizes similares)

- 1 L de solução de H_2SO_4 0,018 mol/L

Usar esta solução como solvente para o preparo de todas as soluções do padrão (estoques e diluições);

Se o teor de amônia nas amostras for superior à faixa analítica de trabalho, diluir as amostras e seus respectivos brancos também com esta solução.

- solução estoque E_1 contendo 3,819 g/L de NH_4Cl (1000mgN/L), preparada em H_2SO_4 0,018 mol/L

- solução estoque E_2 100mgN/L preparada por diluição de E_1 , preparada em H_2SO_4 0,018 mol/L

- padrões de NH_4Cl contendo 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 1 mgN/L, preparados por diluição de E_2 , em H_2SO_4 0,018 mol/L

•

Concentração (mgN/L)	Alíquota de $E_2 = 100 \text{ mg/L}$	Vol. Final diluído com H_2SO_4 0,018 mol/L
0,05	50 μL	100 mL
0,1	100 μL	100 mL
0,2	200 μL	100 mL
0,5	500 μL	100 mL
1	1000 μL	100 mL

- 100 mL de solução tampão de carbonato de sódio 0,25 mol/L, pH ajustado em 10,2 com HCl (para adequar o pH do meio reacional). Pesar 2,6497 g de Na_2CO_3 , dissolver em 50 mL de água. Ajustar o pH em 10,2 com solução de HCl 6 mol/L, transferir para balão volumétrico e completar o volume para 100 mL.

- solução alcalina de citrato de sódio 20% em NaOH 1%:

- hipoclorito de sódio 2,5%

- solução oxidante: 100 mL da solução alcalina de citrato de sódio misturada com 50 mL de hipoclorito de sódio 2,5%

- solução de fenol 0,126 mol/L: 11,1 mL de fenol liquefeito diluído para 100mL com etanol absoluto.

2.4 Procedimento

Ligar o espectrofotômetro e programá-lo para obtenção de espectros na região entre 400 –1100 nm, zerando o equipamento com água deionizada. Programar para serem listados os valores de absorbância em 632 nm. Usar cubeta de caminho ótico de 1 cm:

Para preparo dos meios reacionais de amostras e padrões, usar frascos âmbar de 10 mL para evitar a incidência de luz. É de extrema importância seguir a ordem de adição de reagentes recomendadas. Qualquer alteração no procedimento leva à formação de produtos diferentes do indofenol.

2.4.1 Análise de amostras e padrões não acidificados

a) Análise dos padrões:

Transferir alíquotas de 5 mL de cada um dos padrões na faixa de 0,05-0,1 mgN/L para frascos distintos, acrescentando-se em cada um deles 250 µL de solução do fenol, 250 µL de nitroprussiato de sódio 0,5% e 500 µL de solução oxidante. Homogeneizar o conteúdo dos frascos após a adição de cada reagente. Guardar os frascos tampados e no escuro por 1 hora. Após este período medir os espectros destas soluções.

b) Análise das amostras

Distribuir alíquotas homogêneas de 5 mL de amostras em 3 diferentes frascos com capacidade para 10 mL cada um. Nos dois primeiros frascos, acrescentar 250 µL de solução do fenol, 250 µL de nitroprussiato de sódio 0,5% e 500 µL de solução oxidante a determinação do teor de amônia em duplicata. No terceiro frasco preparar o branco da amostra, acrescentando 1000 µL de água Tipo 1. Homogeneizar o conteúdo dos frascos após a adição de cada reagente. Guardar os frascos tampados e no escuro por 1 hora. Após este período, medir os espectros das amostras em duplicata e do branco das amostras.

2.4.2 Amostras e padrões acidificados:

a) Análise dos padrões:

Transferir alíquotas de 5 mL de cada um dos padrões na faixa de 0,05-0,1 mgN/L para frascos distintos, acrescentando-se em cada um deles 250 µL de solução do fenol e 250 µL de nitroprussiato de sódio 0,5% Homogeneizar o conteúdo dos frascos após a adição de cada reagente. Na sequência, acrescentar 500 µL de solução oxidante,

homogeneizar e imediatamente acrescentar 1 mL de solução tampão carbonato. Guardar os frascos tampados e no escuro por 1 hora. Após este período medir os espectros destas soluções.

b) **Análise das amostras**

Distribuir alíquotas homogêneas de 5 mL de amostras em diferentes frascos com capacidade para 10 mL cada um. Acrescentar 250 µL de solução do fenol e 250 µL de nitroprussiato de sódio 0,5%. Homogeneizar o conteúdo dos frascos após a adição de cada reagente. Na sequência, acrescentar 500 µL de solução oxidante, homogeneizar e imediatamente acrescentar 1 mL de solução tampão carbonato. Fazer este procedimento em duplicata para cada amostra. Guardar os frascos tampados e no escuro por 1 hora. Após este período, medir os espectros das amostras preparadas.

Preparar um branco para cada amostra, com 5 mL de amostra, 1 mL de H₂SO₄ 0,018 mol/L e 1 mL de tampão. Homogeneizar o conteúdo dos frascos após a adição de cada reagente. Medir os espectros dos brancos das amostras (não é necessário esperar 1 hora neste caso).

3 Extração de proteínas totais

1. Pesar cerca de 100mg do tecido;
2. Adicionar 5 volumes da solução de PCA (ácido perclórico) a 6%;
3. Homogeneizar no microprocessador;
4. Centrifugar a 11.100 rpm em centrífuga *eppendorf* por 5 minutos;
5. Ressuspender o precipitado em 4 volumes de PCA e repetir o procedimento de centrifugação por mais 3 vezes;
6. Adicionar 14 volumes de KOH (hidróxido de potássio);
7. Manter por 24 horas em agitação constante em temperatura ambiente.

3.1 Quantificação das proteínas totais

1. Diluir o solubilizado restante em 50 ou 100 vezes (dependendo do tecido) com água destilada;

2. Preparar o padrão em duplicata seguindo o volume abaixo:

P1: 40uL de BSA + 160uL de água

P2: 80uL de BSA + 120uL de água

P3: 120uL de BSA + 80uL de água

P4: 160uL de BSA + 40uL de água

P5: 200uL de BSA + 0uL de água

B: 200uL de água

3. Pipetar 200uL do volume diluído em tubos *eppendorfs*;
4. Adicionar 1000 µL da mistura reativa (hidróxido de sódio + carbonato de sódio + tartarato de sódio e potássio + sulfato de cobre) em todos os *eppendorfs*;
5. Adicionar 100µL de reagente Folin-Ciocalteu (1:1);
6. Após 30 minutos ler as amostras em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 660 nm.

4 Extração dos lipídeos totais

1. Lavar os frascos com clorofórmio e metanol;
2. Pesar de 50 a 100 mg de tecido;
3. Adicionar uma solução contendo clorofórmio e metanol em uma proporção de 2:1;
4. Homogeneizar no microprocessador;
5. Transferir para os tubos de centrifugação;
6. Acrescentar água;
7. Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos;
8. Retirar a fase líquida inferior, contendo os lipídios, através da técnica de dupla pipeta;
9. Repetir o procedimento de centrifugação mais duas vezes adicionando-se clorofórmio para remoção dos lipídios remanescentes;
10. Evaporar o solvente na estufa à 60°C para as posteriores análises.

4.1 Quantificação dos lipídeos totais

1. Preparar a solução padrão: 4,95 mL de clorofórmio para 0,50 uL de óleo de fígado de bacalhau;
2. Pipetar o padrão nos tubos de ensaio em duplicata seguindo o volume abaixo:

P1: 5uL
 P2: 10uL
 P3: 15uL
 P4: 20uL
 P5: 25uL
 P6: 30uL

3. Ressuspender o extrato lipídico em 1 mL de clorofórmio;
4. Pipetar de 20 a 100uL (dependendo do tecido) da amostra nos tubos de ensaio (duplicata);
5. Evaporar na estufa a 60°C por 15 minutos (padrão+amostras);
6. Acrescentar 200uL de ácido sulfúrico em todos os tubos (padrão+amostras+branco);
7. Colocar em banho-maria a 100°C por 10 minutos;
8. Após o resfriamento, adicionar sulfofosfovanilina e colocar em banho-maria a 35°C por 15 minutos;
9. Ler em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm.

5 Separação dos ácidos graxos neutros e polares

- 5.1. Aquecer a sílica em estufa a 110°C por 1 hora.;
- 5.2. Ressuspender a amostra em 1 ml de clorofórmio;
- 5.3. Preparar coluna em uma pipeta Pasteur utilizando lã de vidro e sílica;
- 5.4. Adicionar 4 ml de metanol para lavar a sílica;
- 5.5. Adicionar 4 ml clorofórmio para lavar a sílica;
- 5.6. Adicionar 1 ml de amostra;
- 5.7. Adicionar 3 ml de mistura (9,9 ml de clorofórmio, 1 ml de metanol e 0,5 ml), para eluir os ácidos graxos de fração neutra;
- 5.8. Adicionar 6 ml de metanol para retirada da fração neutra dos ácidos graxos;
- 5.9. Secar as amostras em nitrogênio.

6 Metilação

- 6.1 Ressuspender as amostras em 2 ml de toluol e 3 ml de cloreto de acetila em uma proporção de 1ml cloreto de acetila para 10 ml de metanol;
- 6.2 Encubar as amostras em banho-maria com uma temperatura de 70°C;

- 6.3 Adicionar as amostras em tubos de ensaios com 1g de sulfato de sódio anidro;
- 6.4 Adicionar 5ml de carbonato de potássio 6% (100ml de água para 6 gramas carbonato de potássio);
- 6.5 Homogeneizar e retirar o sobrenadante, que contém os ácidos graxos metilados;
- 6.6 Secar as amostras em nitrogênio para a posterior leitura no cromatógrafo, diluídas em hexano;

7 Concentração de Glicogênio

Preparar o tecido

- Sacrificar o animal e retirar rapidamente o tecido desejado, mergulhando-o em N₂ líquido. Após o congelamento, armazenar a amostra em frascos próprios e congelar em freezer -85°C até o momento do uso.

- No dia dos experimentos para medida de glicogênio, pegar a amostra de tecido congelado e colocar em um almofariz (“mortar”) previamente congelado com N₂ líquido e sobre gelo. Proceder a trituração do tecido com o pistilo, sempre adicionando N₂ líquido para evitar o descongelamento, além de manter o almofariz sobre gelo. É importante não descongelar a amostra antes de adicionar o PCA.

- Adicionar ao tecido congelado PCA: para cada **1g de tecido** adicionar **4mL de PCA** (ácido perclórico acético) a **0,6M** para desproteínizar a amostra. A partir daqui anotar TODOS os volumes de soluções adicionadas na amostra para depois descontar a diluição no cálculo final.

- Se a medida for feita em amostras de plasma, adicionar 2mL de PCA-0,6M para cada 1mL de sangue(ou plasma). Se for recolhido sangue e não plasma, centrifugar 10min, 8000g, 4°C.

- Neste momento, usar uma amostra deste homogeneizado para a medida da concentração inicial de D-GLICOSE - este será o “*branco de glicose na amostra*”. Outra amostra do homogeneizado será incubada com amiloglicosidase para que todas as unidades de glicose sejam hidrolisadas do corpo de glicogênio. Então deverá ser feita uma dosagem da concentração de D-GLICOSE nesta segunda amostra também, a qual será a medida de UNIDADES GLICOSIL.

Reação

- Preparar todos os reagentes nas concentrações indicadas na primeira coluna

REAGENTES	Volume a pipetar	Concentração final
Concentração inicial da solução	(μL)	
Homogeneizado	100 *	
KHCO_3 – 1M	50	43mM
AG – 10 Unidades / mL	1000	8,7 Unid./ mL
(em tampão de acetato ácido acético 0,2M, pH 4,8)		(174mM)
AG: Amiloglicosidase (EC 3.2.1.3)		

* Preparar um **branco** para esta medida usando 100 μL de PCA-0,6M ao invés de amostra homogeneizada. Os demais reagentes são os mesmos (nas mesmas quantidades).

- Misturar bem os reagentes e colocar o frasco para incubação em 40°C, por 4 horas, com agitação.

- Após o período de incubação, parar a hidrólise com 26 μL de PCA-70%

- Neutralizar a solução (colocar em pH 7,0) com K_2CO_3 - 3M. Aqui é indicado o uso de fitas para medição de pH que sejam extremamente finas para não absorver muito a amostra.

- Centrifugar o extrato (3000 rpm ou 8000g por 15 minutos).

- Utilizar o sobrenadante para a medida de concentração de D-GLICOSE.

Medida da Concentração de D-GLICOSE

- Preparar todos os reagentes nas concentrações indicadas na primeira coluna:

REAGENTES	Volume a pipetar	Concentração final
Concentração inicial da solução	(μL)	
NaH_2PO_4 - 105mM - pH 7,7	676 (se L ou PG*)	100mM

MgSO ₄ - 38Mm	100	3,8mM
ATP - 15Mm	100	1,5mM
NAD ⁺ - 15Mm	100	1,5mM
Homogeneizado	20 (se L) PG*	
(até 0,238mM de glicose)	40 (se WM, H, Br, Pl)	
<i>Misturar e ler Absorbância a 340nm após 3-5min a 25°C → A₁</i>		
HK - 1080U/ml	2	2,0U/mL
G6PDH - 1000U / ml	2	2,0U/mL
<i>Misturar e ler Absorbância a 340nm até um valor constante (15-30min) → A₂</i>		
HK: hexoquinase; G6PDH: glicose 6 fosfato desidrogenase		
L: liver; WM: white muscle; H: heart; Br: Brain; Pl: Plasma.		
PG: Curva padrão de glicogênio (usar esse volume)		

- Usar como **branco** tampão ao invés de amostra (os demais reagentes são iguais)
- Calibrar o aparelho com tampão NaH₂PO₄ e ler o **branco**.

Cálculos

Concentração de D-GLICOSE na amostra

Peso molecular da Glicose: 180,16

$$\Delta A_{\text{glicose}} = (A_2 - A_1)_{\text{amostra}} - (A_2 - A_1)_{\text{branco}}$$

(esta é a medida de D-GLICOSE na amostra que NÃO foi encubada)

$$\mu\text{mol glicose} / \text{mL} = (\Delta A_{\text{glicose}} \times \text{diluição total da amostra}) / 6,22$$

$$\mu\text{g glicose} / \text{mL} = (\Delta A_{\text{glicose}} \times \text{diluição total da amostra} \times 180,16) / 6,22$$

Concentração de GLICOGENIO na amostra

Peso molecular da Unidade Glicosil: 162

$$\Delta A_{\text{unidades glicosil}} = (A_2 - A_1)_{\text{amostra}} - (A_2 - A_1)_{\text{branco}}$$

(esta é a medida de D-GLICOSE na amostra que foi encubada)

$$\mu\text{mol unidades glicosil} / \text{mL} = (\Delta A_{\text{un. glicosil}} - \Delta A_{\text{glicose}}) \times \text{diluição total da amostra} / 6,22$$

$$\mu\text{g unidades glicosil} / \text{g} = \mu\text{mol} / \text{mL} \times 162 = \mu\text{mol} / \text{g} \times 162$$

Observações importantes:

1. A diluição total da amostra deve ser a diluição feita na homogeneização do tecido com PCA, vezes a diluição feita na neutralização, vezes a diluição feita no ensaio. (anotar todos os volumes adicionados na amostra para depois descontar nos cálculos)

2. Empregando G6PDH de levedura, usar NADP.

(G6PDH de levedura é específica para NADP. Já a enzima de *Leuconostoc mesenteroides* reage com ambos, NAD^+ e NADP)

3. O valor de 6,22 representa o coeficiente de absorção milimolar do NAD^+ (normalmente é representado pela letra ϵ)

4. Todos os ensaios estão montados para um volume final de 1 mL. Guardadas as devidas concentrações finais de cada reagente, pode ser feito um ajuste no volume dos reagentes para qualquer volume final de ensaio (*por exemplo, ajustar tudo para 300 μL e usar espectrofotômetro de placa tipo ELISA*). Basta apenas testar antes e fazer nova curva padrão.

Curva Padrão de D-GLICOSE

- Para se verificar a precisão do método de medida da concentração de D-GLICOSE, é necessária a construção de uma curva padrão.

- Preparar uma solução de D-GLICOSE a 5mM mais todos os demais reagentes nas concentrações indicadas na primeira coluna.

REAGENTES	volume a pipetar (μL)	Concentração final
Concentração inicial da solução		
NaH_2PO_4 - 105mM - pH 7,7	646	100mM
MgSO_4 - 38Mm	100	3,8mM
ATP - 15Mm	100	1,5mM
NAD^+ - 15Mm	100	1,5mM
Água destilada	40	
	30	
D-GLICOSE - 5mM (em água)	10	100x
	20	50x
Misturar e ler Absorbância a 340nm após 3-5min a 25°C $\rightarrow A_1$		
HK - 1080U/ml	2	2,0U/mL
G6PDH - 1000U / ml	2	2,0U/mL
Misturar e ler Absorbância a 340nm até um valor constante (15-30min) $\rightarrow A_2$		

- Usar como **branco** tampão ao invés de amostra (os demais reagentes são iguais)

- Calibrar o aparelho com tampão NaH_2PO_4 e ler o **branco**.

- Calcular a concentração de D-GLICOSE como descrito anteriormente

(o valor aqui para os dois pontos da curva deve ser de 5mM)

(= concentração de glicose na solução inicial)

Curva Padrão de GLICOGÊNIO

- Para se verificar a precisão do método e da hidrólise, é necessária a construção de uma curva padrão de GLICOGÊNIO.

- Preparar uma solução de glicogênio 10mg/mL e utilizar os volumes indicados na tabela abaixo em um mistura com PCA-7%.

GLICOGÊNIO 10mg/mL (μ L)	PCA - 7% (μ L)	Diluição da incubação
24,5	25,5	24x
12,3	37,7	47,8x
6,13	43,87	95,92x
3,07	46,93	191,53x
0	50	--

- Adicionar 25 μ L de KHCO_3 – 1M

- Adicionar 500 μ L de AG - 10U/ml (em tampão de acetato-ácido acético-0,2M ,pH 4,8)

- Misturar bem os reagentes e colocar o frasco para incubação em 40°C, por 4 horas, com agitação.

- Após o período de incubação, parar a hidrólise com 13uL de PCA-70%

- Neutralizar a solução (colocar em pH 7,0) com K_2CO_3 - 3M. Aqui é indicado o uso de fitas para medição de pH que sejam extremamente finas para não absorver muito a amostra.

- Centrifugar o extrato (3000 rpm ou 8000g por 15min).

- Utilizar o sobrenadante para a medida de concentração de D-GLICOSE.

- Calcular a concentração:

$$\text{mg glicogênio / mL} = \frac{\Delta A \text{ unidades glicosil} \times \text{diluição total} \times 162}{6,22 \times 1000}$$

- esse valor, para todos os ensaios, deve ser **10 mg/mL**

(= concentração inicial da solução de glicogênio)

- a diluição total aqui é a diluição da incubação vezes a diluição do ensaio

8- Anexo II

Tabela 1 - Perfil de ácidos graxos (%) da ração oferecida aos surubins do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*) em ambos os grupos experimentais (Sem Estufa e Estufa), ao longo do experimento (Média ± EPM).

Ração	
C14:0	1,4±0,05
C15:0	0,2±0,009
C16:0	16,7±0,11
C17:0	0,4±0,005
C18:0	6,3±0,02
C20:0	0,5±0,008
C22:0	3,6±0,29
C23:0	0,1±0,006
C24:0	0,2±0,008
Σ SFAs	29,6±0,54
C24:1	0,3±0,02
C16:1	2,8±0,05
C18:1n11	2,1±0,001
C18:1n9	23,7±0,05
C20:1n9	3,0±0,01
Σ MUFA	31,9±0,17
C18:3n3	2,1±0,04
C18:4n3	0,4±0,02
C20:4n3	0,2±0,01
C20:5n3	3,01±0,08
C22:5n3	0,5±0,04
C22:6n3	4,7±0,33
Σ n3 PUFA	11,1±0,32

C18:2n6c	24,9±0,01
C18:3n6	0,1±0,003
C20:2n6	0,2±0,01
C20:4n6	0,9±0,04
C22:4n6	0,2±0,01
Σ n6 PUFA	26,5±0,29
Σ PUFA	37,7 ± 0,02
Σ n3/n6	0,4±0,02

Tabela 2 - Composição dos parâmetros químicos da água de ambos os grupos experimentais e da canaleta de abastecimento.

	Canaleta	Sem Estufa	Estufa
Dureza (mg/L)	8,0	7,0	8,5
Fosfatos (mg/L)	0,6	0,55	0,5
Nitrogênio Total (mg/L)	0,3	0,5	0,5
Alcalinidade Total (mg/L)	10	10,25	9,5
Matéria Orgânica (%)	25,6	19,9	25

Tabela 3 – Temperatura máxima, mínima às 9:00 horas da manhã (ambiente) da água nos tanques dos grupos A (Sem Estufa) e grupo B (Estufa) ao longo do experimento (Média ± EPM).

	Out/09		Nov/09		Dez/09		Jan/10		Fev/10	
	Estufa	S/ Estufa	Estufa	S/ Estufa	Estufa	S/ Estufa	Estufa	S/ Estufa	Estufa	S/ Estufa
Ambiente	22,7±0,17	20,4±0,11	23,5±0,21	21,9±0,11	23,2±0,11	20,8±0,09	23,7±0,15	22,0±0,08	24,5±0,16	22,6±0,12
Máxima	23,7±0,19	21,5±0,25	24,7±0,21	22,9±0,13	24,1±0,11	21,8±0,09	24,8±0,15	23,3±0,1	25,7±0,2	23,3±0,12
Mínima	21,8±0,37	20,0±0,13	22,6±0,19	21,3±0,11	22,2±0,13	20,3±0,08	23,1±0,16	21,7±0,1	23,7±0,16	21,8±0,37

Tabela 4 – Ração ingerida (g) pelos animais do grupo Sem Estufa e Estufa ao longo do experimento (Média ± EPM).

	Out/09	Nov/09	Dez/09	Jan/10	Fev/10
Sem Estufa	5±0,00	15±7,10	30,3±0,63	36,2±0,94	46,8±0,32
Estufa	5±0,00	15±1,00	30,3±0,63	36,2±0,94	46,8±0,32

Tabela 5 - Massa corpórea (g) e Comprimento total (cm) do Surubim do Paraíba (*Steindachneridion parahybae*) ao longo do experimento (Média ± EPM).

Massa	Out/09	Nov/09	Dez/09	Jan/10
Sem Estufa	38,9±0,28 ^b	35,7±0,48 ^c	44,3±0,76 ^a	44,7±0,90 ^a
Estufa	38,9±0,28 ^c	37,6±0,68 ^{c*}	51,9±0,93 ^{b*}	59,1±1,20 ^{a*}
Comprimento				
Sem Estufa	15,8±0,06 ^b	16,0±0,06 ^b	16,7±0,08 ^a	17,1±0,10 ^a
Estufa	15,8±0,06 ^d	16,5±0,06 ^c	17,8±0,09 ^{b*}	18,4±0,09 ^{a*}

As letras ^{a,b} representam diferença estatística maior entre as coletas no próprio grupo experimental.

*Representa as diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais dentro das respectivas coletas. ($P < 0,05$).

Tabela 6 – Parâmetros Zootécnicos entre os grupos experimentais Sem Estufa e Estufa (Média $\pm$ EPM)

	Sem Estufa	Estufa
CV Inicial	15,6 $\pm$ 1,75	13,7 $\pm$ 1,83
CV Final	26,0 $\pm$ 3,75	25,0 $\pm$ 0,57
K	0,09 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00
CR (%)	16,2 $\pm$ 1,65*	49,8 $\pm$ 7,12**
CE (%)	0,2 $\pm$ 0,03*	0,7 $\pm$ 0,01**
EA (%)	13,7 $\pm$ 0,66*	27,1 $\pm$ 7,62**
S (%)	98,0 $\pm$ 2,00	100 $\pm$ 0,00

Valores seguidos de asteriscos apresentam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). Coeficiente de variação (CV); Fator de condição (K); Crescimento relativo (CR); Crescimento específico (CE); Eficiência alimentar (EA); Sobrevivência (S);

Tabela 7 - Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar do tecido hepático dos animais do grupo Sem estufa e Estufa, ao longo do experimento (Média $\pm$ EPM).

	Sem Estufa				Estufa			
	Set/09	Nov/09	Jan/10	Mar/10	Set/09	Nov/09	Jan/10	Mar/10
C14:0	0,5 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,05	1 $\pm$ 0,14	1,1 $\pm$ 0,06	0,5 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,07	1,9 $\pm$ 0,46	1,3 $\pm$ 0,05
C15:0	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,03	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,04	0,2 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,01
C16:0	11,3 $\pm$ 0,66 ^b	12,5 $\pm$ 1,08 ^b	16,9 $\pm$ 1,13 ^{ab}	26 $\pm$ 1,28 ^a	11,3 $\pm$ 0,66 ^b	11,8 $\pm$ 0,96 ^b	18,0 $\pm$ 2,37 ^{ab}	25,3 $\pm$ 0,8 ^a
C17:0	0,4 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,04	1 $\pm$ 0,09	1,1 $\pm$ 0,09	0,4 $\pm$ 0,01	0,6 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,05	NE
C18:0	15,0 $\pm$ 0,76 ^c	21,1 $\pm$ 2,08 ^b	22,9 $\pm$ 1,01 ^b	29,4 $\pm$ 1,78 ^a	15,0 $\pm$ 0,76 ^c	17,5 $\pm$ 0,63 ^c	21,6 $\pm$ 1,20 ^b	29,7 $\pm$ 1,05 ^a
C20:0	0,5 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,07	0,8 $\pm$ 0,04	0,9 $\pm$ 0,07	0,5 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,07	0,5 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,04
C21:0	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,05	0,1 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,01
C22:0	0,3 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,06	0,8 $\pm$ 0,07	0,3 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,04	0,7 $\pm$ 0,06
C23:0	0,2 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,12	0,2 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,09	0,5 $\pm$ 0,08	0,5 $\pm$ 0,08
C24:0	0,5 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,02
Σ SFAs	29,1$\pm$ 0,92^{cd}	37,5$\pm$3,04^{bc}	44,6 $\pm$ 2,14^{ab}	60,5 $\pm$ 3,34^a	29,1$\pm$ 0,92^c	31,0$\pm$1,35^c	41,8$\pm$2,58^b	59,9 $\pm$ 1,79^a
C16:1	1,3 $\pm$ 0,08	0,1 $\pm$ 0,03	1,5 $\pm$ 0,17	1,1 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,08	1,5 $\pm$ 0,12	3,4 $\pm$ 0,73	1,2 $\pm$ 0,06
C18:1n11	3,0 $\pm$ 0,85 ^b	2,1 $\pm$ 0,20 ^b	2,5 $\pm$ 0,16	1,5 $\pm$ 0,13 ^b	3,0 $\pm$ 0,85	1,8 $\pm$ 0,20	2,4 $\pm$ 0,22	1,2 $\pm$ 0,08
C18:1n9	7,3 $\pm$ 1,13	9,4 $\pm$ 0,74	8,3 $\pm$ 0,67 ^a	6,7 $\pm$ 0,82	7,3 $\pm$ 1,13 ^b	10,6 $\pm$ 0,85 ^{ab}	16,3 $\pm$ 3,20 ^a	9,7 $\pm$ 0,59 ^{ab}
C20:1n9	0,7 $\pm$ 0,09	0,7 $\pm$ 0,10	0,5 $\pm$ 0,07	0,3 $\pm$ 0,05	0,7 $\pm$ 0,09	0,7 $\pm$ 0,12 ^b	1,3 $\pm$ 0,20	0,3 $\pm$ 0,05
C24:1	0,9 $\pm$ 0,10	1,2 $\pm$ 0,08	0,5 $\pm$ 0,06	0,3 $\pm$ 0,07	0,9 $\pm$ 0,10	1,0 $\pm$ 0,09	0,7 $\pm$ 0,11	0,3 $\pm$ 0,05
Σ MUFA	13,2$\pm$ 0,92	15,0$\pm$1,18	13,3 $\pm$ 1,06[*]	10,1 $\pm$ 1,05[*]	13,2$\pm$ 0,92^{ab}	15,6$\pm$1,12^{ab}	22,6$\pm$4,37^{a**}	12,9 $\pm$ 0,72^{b**}
C18:3n3	0,3 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,01	NE	0,3 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,01	NE
C20:3n3	0,1 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,02	NE	NE	0,1 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	NE
C20:5n3	3,3 $\pm$ 0,38	2,7 $\pm$ 0,30	1,4 $\pm$ 0,16	1,3 $\pm$ 0,24	3,3 $\pm$ 0,38	2,0 $\pm$ 0,30	0,9 $\pm$ 0,17	1,2 $\pm$ 0,65
C22:5n3	2,6 $\pm$ 0,19	2,0 $\pm$ 0,21	1,4 $\pm$ 0,17	1 $\pm$ 0,11	2,6 $\pm$ 0,19	1,8 $\pm$ 0,20	1,3 $\pm$ 0,16	0,6 $\pm$ 0,07
C22:6n3	26,7 $\pm$ 1,36 ^a	19,6 $\pm$ 3,00 ^{ab}	13,2 $\pm$ 1,53 ^b	11,5 $\pm$ 1,00 ^b	26,7 $\pm$ 1,36 ^a	22,5 $\pm$ 2,65 ^a	9,4 $\pm$ 2,57 ^b	9 $\pm$ 1,42 ^b
Σ n3 PUFA	33,0$\pm$1,75^a	23,0$\pm$3,57^{ab}	16,1 $\pm$ 1,8^b	13,8 $\pm$ 1,12^b	33,0$\pm$1,75^a	27,5$\pm$3,11^a	11,6$\pm$3,15^b	11,2 $\pm$ 1,55^b
C18:2n6	5,3 $\pm$ 0,24	4,5 $\pm$ 0,34	3,3 $\pm$ 0,17	3,1 $\pm$ 0,54	5,3 $\pm$ 0,24	4,4 $\pm$ 0,38	3,7 $\pm$ 0,29	2,8 $\pm$ 0,21

C18:3n6	0,6±0,03	0,51 ±0,05	0,6 ± 0,04	0,4 ± 0,03	0,6±0,03	0,6±0,10	0,5±0,07	0,4 ± 0,03
C20:2n6	0,9±0,09	1,0± 0,05	1,2 ± 0,07	0,8 ± 0,13	0,9±0,09	1,0±0,04	1,2±0,15	1,1 ± 0,05
C20:3n6	3,4±0,31	2,5±0,20	2,7 ± 0,16	2 ± 0,39	3,4±0,31	2,4±0,22	2,4±0,46	2,3 ± 0,27
C20:4n6	8,6±1,29	10,1± 1,01	10,6 ± 1,03	6,4 ± 0,58	8,6±1,29	9,7±0,91	6,9±1,61	5,8 ± 0,75
C22:4n6	1,0±0,12	0,7±0,08	2,7 ± 0,95	0,7 ± 0,22	1,0±0,12	0,7±0,11	1,0±0,35	1,1 ± 0,37
C22:5n6	3,5±0,41	2,7±0,30	5,3 ± 0,82	1,7 ± 0,4	3,5±0,41	2,9±0,42	3,2±0,65	1,7 ± 0,29
Σ n6 PUFA	23,4±1,70^{ab}	22,2±1,10^{ab}	25,8 ± 1,35^a	15,5 ± 1,48^b	23,4±1,70^a	21,6±1,37^{ab}	18,4± 3,18^{ab}	15,5 ± 0,87^b
Σ PUFA	56,5±1,88^a	45,1±4,18^{ab}	42 ± 2,97^{ab}	29,3 ± 2,42^b	56,5±1,88^a	49,1±4,32^{ab}	30,0±6,21^{ab}	26,7 ± 2,2^b
Σ n3/n6	1,5± 0,17^a	1,0±0,14^b	0,6 ± 0,06^b	0,9 ± 0,07^b	1,5± 0,17^a	1,2±0,13^a	0,5±0,10^b	0,7 ± 0,08^b

As letras ^{a,b} representam diferença estatística entre as coletas no próprio grupo experimental. *Representa as diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais dentro das respectivas coletas. ($P < 0,05$). Σ SFA (somatória dos ácidos graxos saturados); Σ MUFA (somatória dos ácidos graxos monoinsaturados); Σ PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados); Σ n3 PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 3); Σ n6 PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 6); Σ n3/n6 (relação entre a somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 3 e n6) e NE (ácido graxo não encontrado).

Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos (%) da fração neutra do tecido hepático dos animais dos grupos Sem estufa e Estufa, ao longo do experimento (Média ± EPM).

	Sem Estufa				Estufa			
	Set/09	Nov/09	Jan/10	Mar/10	Set/09	Nov/09	Jan/10	Mar/10
C14:0	1,5 ± 0,14	2,1 ± 0,22	2,4 ± 0,54	1,9 ± 0,29	1,5 ± 0,14	2,8 ± 0,27	2,4 ± 0,28	3,1 ± 0,16
C15:0	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02	NE	NE	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,03	NE
C16:0	14,3 ± 0,43 ^b	16,9 ± 0,93 ^{ab}	20,4 ± 1,38 ^a	20,6 ± 2,9 ^a	14,3 ± 0,43 ^b	20,2 ± 1,42 ^a	19,6 ± 2,07 ^a	22,4 ± 1,1 ^a
C17:0	0,4 ± 0,02	0,6 ± 0,06	2,3 ± 0,54	0,8 ± 0,13	0,4 ± 0,02	0,7 ± 0,14	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
C18:0	6,5 ± 0,64 ^b	6,1 ± 0,78 ^b	11,4 ± 1,67 ^a	12,9 ± 5,36 ^a	6,5 ± 0,64	6,5 ± 0,34	11,3 ± 3,23	8,2 ± 0,59
C20:0	0,3 ± 0,02	0,4 ± 0,03	0,8 ± 0,17	0,4 ± 0,18	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,03	0,4 ± 0,06	0,5 ± 0,14
C21:0	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,9 ± 0,13	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,05	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,04
C22:0	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,02	NE	0,8 ± 0,07	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,03	NE
C23:0	0,3 ± 0,07	NE	0,4 ± 0	NE	0,3 ± 0,07	NE	0,5 ± 0,08	NE
C24:0	0,4 ± 0,13	0,8 ± 0,39	2,5 ± 0,28	0,4 ± 0,06	0,4 ± 0,13	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,04	NE
Σ SFAs	23,3 ± 0,71^b	27,1 ± 0,84^{ab *}	39,9 ± 2,88^a	38 ± 7,77^a	23,3 ± 0,71^b	31,2 ± 1,7^{a **}	35,8 ± 3,69^a	36,7 ± 1,81^a
C16:1	4,6 ± 0,41	5,4 ± 0,41	4,8 ± 0,67	4 ± 1,2	4,6 ± 0,41	5,3 ± 0,24	4,5 ± 0,61	5,1 ± 0,31
C18:1n11	3 ± 0,22	3,2 ± 0,08	3,2 ± 0,41	2,4 ± 0,52	3 ± 0,22	2,6 ± 0,13	2,8 ± 0,27	3,2 ± 0,22
C18:1n9	27,7 ± 2,33 ^{ab}	33,0 ± 1,6 ^a	23,5 ± 3,04 ^b	18,3 ± 5,05 ^{b *}	27,7 ± 2,33 ^b	35,6 ± 1,77 ^{ab}	24,4 ± 2,96 ^{bc}	38,3 ± 2,13 ^{a **}
C20:1n9	1,4 ± 0,14	1,5 ± 0,07	1,5 ± 0,16	1,1 ± 0,17	1,4 ± 0,14	1,1 ± 0,07	1,7 ± 0,18	2 ± 0,08
C24:1	0,4 ± 0,19	0,2 ± 0,04	NE	0,5 ± 0,09	0,4 ± 0,19	0,2 ± 0,02	0,4 ± 0,09	NE
Σ MUFA	37 ± 2,97^{ab}	43,9 ± 1,9^a	32,9 ± 4,33^{ab}	26,2 ± 6,68^{b *}	37 ± 2,97^b	45,1 ± 1,93^{ab}	34,1 ± 3,81^b	48,4 ± 2,48^{a **}
C18:3n3	0,9 ± 0,12	0,6 ± 0,11	0,5 ± 0,04	0,7 ± 0,13	0,9 ± 0,12	0,6 ± 0,08	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,04
C20:3n3	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02	NE	NE	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,02	1,1 ± 0,45	NE
C20:5n3	1,8 ± 0,29 ^b	1,2 ± 0,16 ^b	1,7 ± 0,36 ^b	3,5 ± 2,24 ^a	1,8 ± 0,29	1 ± 0,26	2,4 ± 0,96	0,8 ± 0,08
C22:5n3	1,7 ± 0,28	1 ± 0,15	0,7 ± 0,07	0,8 ± 0,17	1,7 ± 0,28	0,8 ± 0,19	2,2 ± 0,98	0,7 ± 0,16
C22:6n3	7,5 ± 3,17 ^a	3,6 ± 0,84 ^{ab **}	2,0 ± 0,05 ^b	4,9 ± 1,93 ^{ab}	7,5 ± 3,17 ^a	2,3 ± 0,45 ^{ab *}	4,8 ± 2,6 ^{ab}	2,6 ± 0,98 ^b
Σ n3 PUFA	12,3 ± 3,4^a	7,3 ± 1,13^{ab}	4,7 ± 0,87^b	12,2 ± 1,93^{a **}	12,3 ± 3,4^a	5,6 ± 1,15^{ab}	9,7 ± 2,94^{ab}	4,0 ± 1,15^{b *}
C18:2n6	13,7 ± 1,24	10,9 ± 1,19	7,8 ± 0,92	9,7 ± 2,42 ^{**}	13,7 ± 1,24 ^a	9,3 ± 2,17	5,6 ± 1,17 ^b	5,6 ± 0,79 ^{b *}
C18:3n6	2,7 ± 0,29	3,3 ± 0,33	2,1 ± 0,41	2,6 ± 1,04	2,7 ± 0,29	2,5 ± 0,34	1,2 ± 0,36	0,6 ± 0,08
C20:2n6	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,11	1,5 ± 0,44	3,9 ± 2,72	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,06	1,3 ± 0,23	1,0 ± 0,1

C20:3n6	2,4 ± 0,14	1,7 ± 0,18	1,7 ± 0,26	1,3 ± 0,14	2,4 ± 0,14 ^a	1,1 ± 0,16 ^b	1,9 ± 0,49 ^{ab}	1,1 ± 0,14 ^b
C20:4n6	2,9 ± 0,48	1,9 ± 0,63	1,1 ± 0,11	2,4 ± 0,97	2,9 ± 0,48	1 ± 0,19	3 ± 1,24	0,6 ± 0,11
C22:4n6	0,5 ± 0,06	0,4 ± 0,06	2,7 ± 0,63	1,0 ± 0,62	0,5 ± 0,06	0,3 ± 0,03	1,8 ± 0,63	2,8 ± 1,09
C22:5n6	1,2 ± 0,26	0,7 ± 0,17	1,3 ± 0,56	0,7 ± 0,12	1,2 ± 0,26	0,6 ± 0,09	1,0 ± 0,19	0,8 ± 0,06
Σ n6 PUFA	25,3 ± 1,35	20,4 ± 1,41	20,1 ± 1,75	23,5±4,59**	25,3 ± 1,35^a	15,9 ± 2,35^b	17,1 ± 2,31^b	10,9 ± 1,3^{b*}
Σ PUFA	37,6 ± 2,86^a	27,7 ± 2,2^b	24,8 ± 2,58^b	35,7±7,19^{a**}	37,6 ± 2,86^a	21,5 ± 2,74^b	26,8 ± 5,02^{ab}	14,9±1,56^{b*}
Σ n3/n6	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,04	0,2 ± 0,03 *	0,6 ± 0,17	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,12	0,5 ± 0,11^{**}	0,4 ± 0,18

As letras ^{a,b} representam diferença estatística entre as coletas no próprio grupo experimental. *Representa as diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais dentro das respectivas coletas. ($P < 0,05$). Σ SFA (somatória dos ácidos graxos saturados); Σ MUFA (somatória dos ácidos graxos monoinsaturados); Σ PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados); Σ n3 PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 3); Σ n6 PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 6); Σ n3/n6 (relação da somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 3 e n6) e NE (ácido graxo não encontrado).

Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar do tecido muscular dos animais do grupo Sem estufa e Estufa, ao longo do experimento (Média $\pm$ EPM).

	Sem Estufa				Estufa			
	Set/09	Nov/09	Jan/10	Mar/10	Set/09	Nov/09	Jan/10	Mar/10
C14:0	0,4 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,04	0,7 $\pm$ 0,09	0,8 $\pm$ 0,07	0,4 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,04	0,7 $\pm$ 0,08
C16:0	10,7 $\pm$ 0,50 ^b	9,1 $\pm$ 0,41 ^b	14,6 $\pm$ 0,43 ^a	14,7 $\pm$ 1,3 ^a	10,7 $\pm$ 0,50 ^b	10,5 $\pm$ 0,36 ^b	14,9 $\pm$ 0,95 ^a	14,3 $\pm$ 1,44 ^a
C17:0	0,3 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,10	0,6 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,06	0,7 $\pm$ 0
C18:0	9,9 $\pm$ 0,37 ^b	13,0 $\pm$ 0,77 ^a	17,2 $\pm$ 1,17 ^a	14,9 $\pm$ 1,18 ^a	9,9 $\pm$ 0,37 ^b	12,5 $\pm$ 0,32 ^{ab}	18,7 $\pm$ 0,80 ^a	15,6 $\pm$ 1,89 ^a
C20:0	0,36 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,06	0,5 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,02	0,6 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 0,05
C21:0	0,1 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,03	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,02	0,2 $\pm$ 0,03
C22:0	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	0,6 $\pm$ 0,06	0,5 $\pm$ 0,05	0,1 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,02	0,7 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,05
C24:0	0,4 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,07	0,5 $\pm$ 0,06	0,4 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,06	0,4 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,04
Σ SFAs²	24,2$\pm$0,27^b	26,5$\pm$0,63^{ab}	36,4$\pm$0,63^a	32,9 $\pm$ 2,49^a	24,2$\pm$0,27^b	27,0 $\pm$ 0,33^{ab}	38,9$\pm$1,77^a	33 $\pm$ 3,28^a
C16:1	0,8 $\pm$ 0,09	0,5 $\pm$ 0,07	1,0 $\pm$ 0,26	1,2 $\pm$ 0,12	0,8 $\pm$ 0,09	0,6 $\pm$ 0,03	0,8 $\pm$ 0,14	1,1 $\pm$ 0,13
C18:1n9	9,5 $\pm$ 0,59 ^a	6,6 $\pm$ 0,32 ^b	10,0 $\pm$ 1,9 ^a	10,3 $\pm$ 0,58 ^a	9,5 $\pm$ 0,59 ^a	7,5 $\pm$ 0,32 ^b	8,9 $\pm$ 1,34 ^{ab}	10,1 $\pm$ 0,82 ^a
C18:1n11	1,7 $\pm$ 0,05	2,0 $\pm$ 0,11	2,1 $\pm$ 0,10	2,2 $\pm$ 0,11	1,7 $\pm$ 0,05	2,04 $\pm$ 0,07	2,2 $\pm$ 0,10	2,1 $\pm$ 0,14
C20:1n9	0,6 $\pm$ 0,02	1,1 $\pm$ 0,44	0,7 $\pm$ 0,08	0,6 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,02	0,6 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,07
C24:1	0,3 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,040	0,3 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,04	0,5 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,06	0,5 $\pm$ 0,06
Σ MUFA	13,1$\pm$0,67^{ab}	10,7$\pm$0,38^b	14,2$\pm$2,10^a	14,9 $\pm$ 0,65^a	13,1$\pm$0,67	11,5 $\pm$ 0,40	13,1 $\pm$ 0,92	14,5 $\pm$ 0,99
C18:3n3	0,2 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,21	0,3 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,03
C20:4n3	0,1 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,52	NE	NE	0,18 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,02	NE	0,2 $\pm$ 0
C20:5n3	2,4 $\pm$ 0,08	1,9 $\pm$ 0,11	2,2 $\pm$ 0,56	1,8 $\pm$ 0,37	2,4 $\pm$ 0,08	2,0 $\pm$ 0,07	1,7 $\pm$ 0,42	3,3 $\pm$ 1,45
C22:5n3	3,7 $\pm$ 0,06*	3,7 $\pm$ 0,12*	2,3 $\pm$ 0,14	2,6 $\pm$ 0,24	3,7 $\pm$ 0,06	3,3 $\pm$ 0,09	2,5 $\pm$ 0,09	2,6 $\pm$ 0,31
C22:6n3	33,3 $\pm$ 1,35 ^a	32,2 $\pm$ 0,93 ^a	20,9 $\pm$ 3,03 ^b	24,4 $\pm$ 1,88 ^{ab}	33,3 $\pm$ 1,35 ^a	32,6 $\pm$ 0,58 ^a	24,0 $\pm$ 1,00 ^b	23,2 $\pm$ 2,49 ^b
Σ n3P UFA	39,8$\pm$1,36^a	39,1$\pm$0,56^a	26,9$\pm$2,15^b	29,4 $\pm$ 2,36^b	39,8$\pm$1,36^a	39,7$\pm$1,01^a	28,9 $\pm$ 1,06^b	30,6 $\pm$ 2,36^b
C18:3n6	0,1 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,04	0,4 $\pm$ 0,05	6,7 $\pm$ 0,54	0,1 $\pm$ 0,01	0,3 $\pm$ 0,04	0,2 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,04
C18:2n6	5,7 $\pm$ 0,24b	6,3 $\pm$ 0,34b	5,3 $\pm$ 0,50b	0,4 $\pm$ 0,02	5,7 $\pm$ 0,24	5,9 $\pm$ 0,27	5,3 $\pm$ 0,36	5,8 $\pm$ 0,54
C20:2n6	1,1 $\pm$ 0,04	0,9 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,06	1,1 $\pm$ 0,08	1,1 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,04	0,7 $\pm$ 0,04	1 $\pm$ 0,06

C20:3n6	3,4±0,16	2,5±0,13	1,7±0,20	2,7 ± 0,06	3,4±0,16	2,7 ± 0,10	1,7 ± 0,01	2,3 ± 0,14
C20:4n6	6,9±0,22	7,3±0,30	5,6±0,78	6,0 ± 0,85	6,9±0,22 ^{ab}	7,4 ± 0,23 ^a	5,9 ± 0,21 ^b	5,7 ± 0,44 ^b
C22:4n6	1,1±0,034	0,9±0,06	0,7±0,42	1 ± 0,05	1,1±0,03	1,0 ± 0,03	0,7 ± 0,03	0,8 ± 0,06
C22:5n6	3,9±0,11	4,0±0,23	3,4±0,63	3,3 ± 0,21	3,9±0,11a	3,8 ± 0,11ab	2,4 ± 0,44c	3 ± 0,28
Σ n6 PUFA	22,5±0,51^{ab}	22,9±0,44^a	19,0±0,87^b	21,6 ± 1,47^{ab}	22,5±0,51^a	21,2 ± 0,9^{ab}	17,6 ± 1,02^b	21,9 ± 1,58^{ab}
Σ PUFA	62,4±0,89^a	62,1±0,74^a	45,9±2,32^b	51,0 ± 3,78^b	62,4±0,89^a	61,0± 0,49^a	46,5 ± 1,73^b	52,4 ± 3,51^b
Σ n3/n6	1,8±0,10^a	1,7±0,04^{ab}	1,4±0,87^b	1,4 ± 0,04^b	1,8±0,10^{ab}	1,9 ± 0,13^a	1,6 ± 0,09^{ab}	1,4 ± 0,1^b

As letras ^{a,b} representam diferença estatística entre as coletas no próprio grupo experimental. *Representa as diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais dentro das respectivas coletas. ($P<0,05$). Σ SFA (somatória dos ácidos graxos saturados); Σ MUFA (somatória dos ácidos graxos monoinsaturados); Σ PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados); Σ n3 PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 3); Σ n6 PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 6); Σ n3/n6 (relação da somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 3 e n6) e NE (ácido graxo não encontrado).

Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos (%) da fração neutra do tecido muscular dos animais do grupo Sem estufa e Estufa, ao longo do experimento (Média ± EPM).

	Sem Estufa				Estufa			
	Set/09	Nov/09	Jan/10	Mar/10	Set/09	Nov/09	Jan/10	Mar/10
C14:0	1,9 ± 0,09	1,8 ± 0,09	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,24	1,9 ± 0,09	1,9 ± 0,18	2,4 ± 0,19	1,7 ± 0,08
C15:0	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,05	0,1 ± 0,01	0,3 ± 0,16	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,01
C16:0	17,5 ± 0,6	14,2 ± 1,01	16,2 ± 1,28 *	16,9 ± 1,37	17,5 ± 0,6 ^{ab}	15,5 ± 0,42 ^b	19,6 ± 0,6 ^{a**}	19,2 ± 0,6 ^a
C17:0	0,3 ± 0,01	1 ± 0,18	0,7 ± 0,11	0,9 ± 0,18	0,3 ± 0,01	0,9 ± 0,21	1,5 ± 0,25	0,8 ± 0,14
C18:0	7,6 ± 0,23	9,1 ± 0,57	8,7 ± 1,31	10 ± 2,18	7,6 ± 0,23	8,6 ± 0,32	9,2 ± 0,65	9,5 ± 0,78
C20:0	0,4 ± 0,02	0,7 ± 0,06	0,6 ± 0,07	0,5 ± 0,07	0,4 ± 0,02	0,7 ± 0,03	0,7 ± 0,04	0,6 ± 0,02
C21:0	0,1 ± 0,02	0,4 ± 0,06	0,3 ± 0,08	0,4 ± 0,09	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,06	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
C22:0	0,2 ± 0,01	0,4 ± 0,04	0,5 ± 0,08	0,6 ± 0,22	0,2 ± 0,01	0,4 ± 0,05	0,5 ± 0,11	0,4 ± 0,06
C23:0	0,5 ± 0,06	NE	NE	NE	0,5 ± 0,06	NE	0,4 ± 0,02	NE
C24:0	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,19	0,3 ± 0,11	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,07	0,1 ± 0,01
Σ SFAs²	28,3 ± 0,52	28,1 ± 1,04	28,8 ± 2,26 *	31,3 ± 3,45	28,3 ± 0,52^{bc}	29,3 ± 1,01^c	35,2 ± 1,49^{a**}	33,3 ± 1,36^{ab}
C16:1	4,2 ± 0,21	2,6 ± 0,26	3,4 ± 0,55	3,3 ± 0,5	4,2 ± 0,21	3,1 ± 0,15	4,2 ± 0,25	3,8 ± 0,26
C18:1n11	2,4 ± 0,02	2,1 ± 0,11	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,15	2,4 ± 0,02	2,3 ± 0,07	3,9 ± 1,42	2,5 ± 0,11
C18:1n9	29,6 ± 0,45	25,0 ± 2,2	23,4 ± 3,12	22,6 ± 3,04	29,6 ± 0,45	27,8 ± 0,93	22,5 ± 2,79	28,1 ± 1,94
C20:1n9	1,5 ± 0,05	1,7 ± 0,16	1,5 ± 0,16	1,3 ± 0,17	1,5 ± 0,05	2 ± 0,09	1,5 ± 0,14	1,8 ± 0,06
C24:1	0,2 ± 0,01	0,4 ± 0,07	0,2 ± 0,05	0,8 ± 0,43	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,05	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02
Σ MUFA	37,6 ± 0,6	32,2 ± 2,54	30,6 ± 3,95	30,3 ± 3,86	37,6 ± 0,6	35,9 ± 1,1	32,3 ± 1,8	36,6 ± 1,76
C18:3n3	1,2 ± 0,04	0,9 ± 0,09	0,7 ± 0,12	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,04	1 ± 0,08	0,8 ± 0,06	0,9 ± 0,05
C20:4n3	0,1 ± 0,01	0,5 ± 0,15	NE	NE	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,02	NE	NE
C20:5n3	2 ± 0,1	3,1 ± 1	2,5 ± 0,58	3,5 ± 0,78	2 ± 0,1	1,9 ± 0,4	2,3 ± 0,48	1,6 ± 0,16
C22:5n3	1,8 ± 0,08	1,7 ± 0,12	1,2 ± 0,27	1,4 ± 0,28	1,8 ± 0,08	1,6 ± 0,11	1,3 ± 0,08	1,4 ± 0,05
C22:6n3	6,8 ± 0,66 ^a	5,3 ± 0,74 ^{ab}	5,1 ± 2,82 ^b	7,1 ± 2,93 ^{ab}	6,8 ± 0,66 ^a	4,6 ± 0,31 ^b	3,7 ± 0,46 ^b	4,5 ± 0,51 ^b
Σ n3P UFA	12,8 ± 0,7	12,7 ± 1,21	10,6 ± 2,79	13,8 ± 2,66	12,8 ± 0,7^a	10,9 ± 0,46^b	10 ± 0,66^b	9,3 ± 0,59^b

C18:3n6	13,7 ± 0,41	11,9 ± 1,14	11,1 ± 1,34	9,2 ± 1,24	13,7 ± 0,41	13,6 ± 0,7	11,6 ± 0,68	12,6 ± 0,57
C18:2n6	0,7 ± 0,02	0,6 ± 0,09	0,8 ± 0,11	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,02	0,7 ± 0,07	0,7 ± 0,06	0,8 ± 0,06
C20:2n6	1 ± 0,02	0,9 ± 0,07	1,7 ± 0,67	0,9 ± 0,15	1 ± 0,02	1 ± 0,05	0,8 ± 0,09	1,1 ± 0,15
C20:3n6	1,5 ± 0,06	1,6 ± 0,14	1,4 ± 0,23	1,3 ± 0,22	1,5 ± 0,06	1,7 ± 0,06	1,1 ± 0,09	1,1 ± 0,15
C20:4n6	1,4 ± 0,17	1 ± 0,12	8,8 ± 6,77	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,17	1 ± 0,06	1,1 ± 0,21	1,2 ± 0,15
C22:2n6	0,4 ± 0,11	1,2 ± 0,45	1,7 ± 0,55	2,3 ± 0,78	0,4 ± 0,11	1,1 ± 0,54	1,6 ± 0,47	0,6 ± 0,16
C22:4n6	0,9 ± 0,08	0,6 ± 0,05	0,5 ± 0,09	0,5 ± 0,09	0,9 ± 0,08	0,8 ± 0,32	0,4 ± 0,07	0,4 ± 0,03
C22:5n6	0,4 ± 0,11	1,5 ± 0,48	1,3 ± 0,43	0,8 ± 0,36	0,4 ± 0,11	1,4 ± 0,26	1,1 ± 0,27	0,6 ± 0,08
Σ n6 PUFA	19,9 ± 0,4	20,6 ± 0,52	27 ± 5,01**	18,2 ± 1,38	19,9 ± 0,4^{ab}	21,5 ± 0,68^a	19 ± 0,44^{b*}	18,8 ± 0,69^b
Σ PUFA	32,8 ± 0,95	33,3 ± 0,95	37,6 ± 4,94	32,1 ± 2,98	32,8 ± 0,95^a	32,4 ± 0,73^a	29,0 ± 0,76^b	28,1 ± 1,05^b
Σ n3/n6	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,07	0,5 ± 0,14	0,8 ± 0,17	0,6 ± 0,03	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,04	0,5 ± 0,03

As letras ^{a,b} representam diferença estatística entre as coletas no próprio grupo experimental. *Representa as diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais dentro das respectivas coletas. ($P < 0,05$). Σ SFA (somatória dos ácidos graxos saturados); Σ MUFA (somatória dos ácidos graxos monoinsaturados); Σ PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados); Σ n3 PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 3); Σ n6 PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 6); Σ n3/n6 (relação da somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 3 e n6) e NE (ácido graxo não encontrado).

Tabela 11 - Perfil de ácidos graxos (%) plasmático dos animais do grupo Sem estufa e Estufa, ao longo do experimento (Média ± EPM).

	Sem Estufa				Estufa			
	Set/09	Nov/09	Jan/10	Mar/10	Set/09	Nov/09	Jan/10	Mar/10
C14:0	0,8±0,04	1,7±0,59	1,2±0,10	1,5±0,20	0,8±0,04	2,9±1,54	1,2±0,21	1,6±0,22
C15:0	0,2±0,03	0,6±0,43	0,1±0,01	0,1±0,01	0,2±0,03	1,5±1,11	0,2±0,01	NE
C16:0	15,6±0,93 ^a	9,8±2,25 ^b	16,2±0,53 ^a	15,3±1,82 ^a	15,6±0,93 ^b	6,8±2,69 ^{bc}	16,8±0,52 ^{abc}	18,8±0,64 ^a
C17:0	0,6±0,10	0,7±0,32	1,1±0,07	0,9±0,18	0,6±0,10	1,2±0,62	1,3±0,39	1,4±0,35
C18:0	10,0±0,55 ^a	8,9±2,27 ^{ab}	8,6±0,26 ^{ab}	7,3±0,86 ^{b*}	10,0±0,55	6,1±1,46	10,1±1,19	9,4±0,24 ^{**}
C20:0	0,6±0,04	0,3±0,07	0,47±0,04	0,3±0,03	0,6±0,04	0,6±0,07	0,5±0,03	0,4±0,03
C21:0	0,3±0,03	0,2±0,05	0,4±0,03	0,3±0,04	0,3±0,03	0,5±0,31	0,3±0,02	0,4±0,09
C22:0	0,3±0,03	2,04±1,27	0,3±0,04	2,2±1,48	0,3±0,03	1,5±0,78	0,4±0,03	0,3±0,02
C23:0	0,2±0,01	0,4±0,09	NE	0,4±0,14	0,2±0,01	0,3±0,11	0,5±0,19	0,8±0,04
C24:0	0,4±0,03	0,4±0,01	0,3±0,03	0,3±0,03	0,4±0,03	0,5±0,07	0,3±0,02	3,0±2,54
Σ SFAs	29,0±1,65	25,0±2,91	29,0±0,90	27,2±3,19	29,0±1,65^b	22,9±3,11^b	31,6±2,28^{ab}	35,1±2,13^a
C16:1	2,2±0,12	1,5±0,28	2,9±0,11	2,7±0,38	2,2±0,12	1,4±0,25	2,6±0,07	2,8±0,23
C17:1	0,2±0,03	2,6±1,30	NE	NE	0,2±0,03	1,1±0,39	0,2±0,04	NE
C18:1n9	17,1±0,55 ^a	8,4±2,51 ^b	19,2±0,73 ^a	16,3±2,28 ^a	17,1±0,55 ^a	8,1±3,18 ^b	18,4±1,23 ^a	20,2±1,5 ^a
C18:1n11	1,8±0,06	1,2±0,31	2,2±0,08 ^a	1,7±0,20	1,8±0,06	0,8±0,33	2,0±0,08	1,8±0,06
C20:1n9	0,8±0,06	0,5±0,01	1,4±0,07	0,8±0,09	0,8±0,06	0,6±0,10	1,5±0,04	1,0±0,17
C22:1n9	0,2±0,01	0,2±0,07	0,2±0,06	0,4±0,12	0,2±0,01	0,5±0,19	0,2±0,02	0,1±0,03
C24:1	1,0±0,07	0,9±0,09	0,9±0,04	0,8±0,05	1,0±0,07	0,8±0,13	0,7±0,03	0,7±0,09
Σ MUFA	23,4±0,73^a	14,9±2,17^b	26,8±0,91^a	22,5±2,78^{ab}	23,4±0,73^a	12,2±3,47^b	25,4±1,58^a	26,6±1,76^a
C18:3n3	0,5±0,04	0,3±0,05	0,5±0,04	0,8±0,10	0,5±0,04	0,4±0,10	0,6±0,07	0,5±0,04
C18:4n3	0,3±0,02	0,6±0,10	0,1±0,003	0,5±0,06	0,3±0,02	0,8±0,17	0,1±0,01	NE
C20:3n3	0,2±0,02	0,2±0,03	NE	0,3±0,10	0,2±0,02	0,4±0,15	1,5±0,66	NE

C20:4n3	0,2±0,02	0,4±2,65	3,4±1,50	0,4±0,10	0,2±0,02	0,3±0,08	1,2±0,77	NE
C20:5n3	2,8±0,19	4,4±0,64	3,1±0,45	2,9±0,78	2,8±0,19b	7,1±2,10a	3,2±0,38b	1,8±0,18c
C22:4n3	0,3±0,07	2,0±1,38	1,6±0,85	3,4±1,68	0,3±0,07	1,7±1,25	0,9±0,21	1,1±0,38
C22:5n3	2,2±0,17	2,2±0,64	1,7±0,07	1,6±0,20	2,2±0,17ab	3,8±0,08a	1,8±0,10b	1,6±0,33bc
C22:6n3	16,0±1,22 ^{ab}	18,3±3,51 ^a	11,2±0,52 ^b	14,1±0,85 ^{ab}	16,0±1,22	15,9±3,23	11,4±0,64	12,5±2,46
Σ n3PUFA	22,7±1,49	27,1±3,05	18,9±1,34	21,3±1,90	22,7±1,49	26,1±3,00	18,1±1,56	16,8±2,66
C18:2n6c	9,1±0,44	7,3±2,16	9,4±0,38	7,3±1,03	9,1±0,44	6,2±2,17	9,0±0,62	7,4±0,48
C18:2n6	0,5±0,06	0,8±0,47	0,5±0,08	1,8±0,94	9,1±0,44	8,6±1,25	9,0±0,37	7,4±0,48
C18:3n6	1,0±0,06	3,9±1,23	1,1±0,09	0,7±0,13	1,0±0,06	0,7±0,21	0,8±0,14	0,5±0,13
C20:2n6	0,9±0,03	2,6±1,48	0,9±0,05	2,9± 1,69	0,9±0,03	5,2±2,63	1,4±0,31	1,4±0,10
C20:3n6	3,1±0,22	2,0±0,5	2,0±0,10	2,4±0,31	3,1±0,22	1,8±0,58	2,3±0,17	2,7±0,29
C20:4n6	5,5±0,42	5,6±1,88 *	5,8±0,33	4,9±0,62	5,5±0,42 ^b	7,3±1,11 ^{a**}	4,2±0,48 ^b	4,7±0,42 ^b
C22:2n6	0,4±0,06	3,2±1,68	2,1±0,82	7,2±2,51	0,4±0,06	0,4±1,11	1,3±0,40	0,3±0,10
C22:4n6	0,8±0,06	1,9±0,68	0,8±0,04	0,9±0,15	0,8±0,06	1,4±0,40	0,8±0,18	1,4±0,38
C22:5n6	2,2±0,22	3,7±0,49	2,1±0,11	2,3±0,24	2,2±0,22	3,6±1,00	1,6±0,24	1,8±0,42
Σ n6PUFA	23,4±1,19	24,7±1,90	23,6±0,83**	25,2±2,33**	23,4±1,19^a	28,7±4,07^a	21,3±0,93^{ab*}	20,0±1,03^{b*}
Σ PUFA	46,1±2,35^{ab}	51,8±1,67^a	42,4±1,10^b	46,5±4,12^{ab}	46,1±2,35^{ab}	52,7±2,31^a	39,5±1,25^b	36,8±2,90^b
Σ n3/n6	1,0±0,50	1,2±0,20	0,8±0,10	0,8±0,04	1,0±0,50	0,9±0,22	0,8±0,11	0,8±0,13

As letras ^{a,b} representam diferença estatística entre as coletas no próprio grupo experimental. *Representa as diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais dentro das respectivas coletas. ($P<0,05$). Σ SFA (somatória dos ácidos graxos saturados); Σ MUFA (somatória dos ácidos graxos monoinsaturados); Σ PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados); Σ n3 PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados n3); Σ n6 PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados n 6); Σ n3/n6 (relação entre a somatória dos ácidos graxos polinsaturados n3 e n6) e NE (ácido graxo não encontrado).

Tabela 12 Calor produzido e oxigênio consumido no metabolismo de alimentos.

Alimento	Kcal/g	KJ/g	Litro O₂/g	Kcal/ O₂	KJ /litro	QR
Carboidrato	4,20	17,6	0,84	5,0	20,9	1,00
Gordura	9,40	39,3	2,00	4,7	19,7	0,71
Proteína (uréia)	4,30	18,0	0,96	4,5	18,8	0,81
Proteína (ácido úrico)	4,25	17,8	0,97	4,4	18,4	0,74

*Os valores para as proteínas dependem do produto metabólico final. QR (coeficiente respiratório) = CO₂ formado/O₂ consumido