



Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato

Lilian Carolina Rosa da Silva¹, Wilson Massamitu Furuya², Maria Raquel Marçal Natali³, Christiano Rodrigues Schamber¹, Lilian Dena dos Santos¹, Luiz Vitor Oliveira Vidal¹

¹ Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá - UEM, Av. Colombo, 5790, Maringá - PR.

² Departamento de Zootecnia - UEM, Maringá - PR.

³ Departamento de Ciências Morfofisiológicas - UEM, Maringá - PR.

RESUMO - Este estudo foi realizado para avaliar níveis de L-glutamina e L-glutamato em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo ($0,60 \pm 0,1$ g). Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com quatro dietas e três repetições e 90 peixes por unidade experimental. Foi utilizada dieta controle, com 29% de proteína digestível e 2.940 kcal/kg de energia digestível, suplementada mistura de L-glutamina e L-glutamato na proporção de 0, 1, 2 e 3% da dieta, durante 85 dias. Não foi observado efeito da L-glutamina e L-glutamato sobre o consumo, a conversão alimentar, a taxa de eficiência protéica, a eficiência de retenção de nitrogênio, o índice hepatossomático, a composição química corporal, a amônia e ureia sanguíneas. O aumento nos níveis de L-glutamina e L-glutamato nas dietas teve aumento linear sobre o ganho de peso e efeito quadrático na altura dos vilos. A adição de L-glutamina e L-glutamato melhora o ganho de peso e a altura das vilosidades intestinais de tilápia-do-nilo.

Palavras-chave: aminoácido, histologia, mucosa intestinal, peixe

Productive performance and intestinal morphology of Nile tilapia juvenile fed diets with L-glutamine and L-glutamate

ABSTRACT - This work was carried out to evaluate levels of L-glutamine and L-glutamate in diets for Nile tilapia juveniles (0.60 ± 0.1 g). A complete randomized experimental design with four diets and three replicates and 90 fish per experimental unit was used. It was used a control diet with 29% of digestible protein and 2,940 kcal/kg of digestible energy supplemented with L-glutamine and L-glutamate at the proportion of 0, 1, 2 and 3% of diet, during 85 days. It was not observed effect of dietary L-glutamine and L-glutamate on feed intake, food conversion, protein efficiency rate, nitrogen retention efficiency, hepatic somatic index, chemical body composition, blood ammonia and urea. It was observed a linear increase on gain weight and a quadratic effect on villus height when levels of L-glutamine and L-glutamate increased. The addition of L-glutamine and L-glutamate increases the weight gain and intestinal villus height of Nile tilapia.

Key Words: amino acid, fish, histology, intestinal mucous

Introdução

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies mais indicadas para criação intensiva, pela elevada taxa de crescimento, adaptabilidade a mudanças no ambiente e habilidade no crescimento e reprodução. Além disso, apresenta facilidade de obtenção de larvas, rusticidade, possui carne com boas características organolépticas e seu filé não tem espinhas intramusculares em “Y”. As exigências nutricionais de peixes variam conforme a capacidade em aproveitar o alimento fornecido e além disso, os peixes não possuem exigência verdadeira em proteína e sim de adequado

balanceamento entre aminoácidos essenciais e não essenciais (Sampaio et al., 2009).

A glutamina e o glutamato são aminoácidos abundantes na circulação e no espaço intracelular e são precursores da síntese de aminoácidos, nucleotídeos, proteínas e outras moléculas biologicamente importantes (Smith, 1990). O glutamato e a glutamina possuem via metabólica comum no enterócito, pois a glutamina é metabolizada em glutamato mais amônia pela glutaminase e o glutamato também pode se transformar em glutamina pela ação da glutamina sintetase (Maiorka et al., 2000). Dessa forma, o glutamato pode substituir a glutamina em diversos de seus papéis metabólicos,

como geração de energia e síntese de aminoácidos (Wu et al., 1995).

A suplementação de L-glutamina na dieta de suínos e aves tem sido utilizada com resultados positivos em seu desempenho, prevenindo a atrofia das vilosidades do jejuno de leitões que receberam dietas com 1% de L-glutamina (Wu et al., 1996), melhorando a eficiência alimentar (Kitt et al., 2001), o ganho de peso, o desenvolvimento da mucosa intestinal de frangos de corte (Murakami et al., 2007) e a taxa de eficiência proteica e aumentando a altura das vilosidades intestinais da carpa-comum (*Cyprinus carpio*) (Yan & Qiu-Zhou, 2006).

O conhecimento da mucosa intestinal dos peixes é importante para fornecer informações para os estudos de nutrição, de forma a atender às exigências nutricionais para adequado desempenho e saúde dos peixes. A mucosa intestinal de peixes teleósteos tem inúmeras projeções denominadas vilos, sem criptas na base e que possuem células indiferenciadas, que sofrem sucessivas mitoses para formação das células epiteliais do vilão (Jobling, 1995).

Avaliou-se neste trabalho a utilização de L-glutamina e L-glutamato em dietas para juvenis de tilápia-do-nylo por meio do desempenho produtivo, da composição química corporal, da morfometria da mucosa intestinal e amônia e ureia sanguíneas.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura do Núcleo de Pesquisa em Limnologia e Aquicultura (NUPELIA) da Universidade Estadual de Maringá durante 85 dias, período de janeiro a abril de 2007.

Foram utilizadas 1.080 tilápias-do-nylo da linhagem tailandesa, revertidas durante a fase larval, com peso inicial de $0,60 \pm 0,01$ g, originadas da Piscicultura Araucária Belmonte, Rolândia, Paraná. Os peixes foram distribuídos em 12 tanques de cimento amianto com volume útil unitário de $0,8 \text{ m}^3$ cada, totalizando 90 peixes em cada tanque, em um delineamento inteiramente casualizado com quatro dietas e três repetições.

Foi utilizado sistema de recirculação com renovação contínua de água (7 litros/minuto/tanque) e com biofiltro central. Em cada tanque foi instalado um sistema de aeração com difusores de ar acoplados a um soprador central, mantendo o oxigênio entre 4 e 6 mg/L. A temperatura variou de 27 a 30°C. Cada tanque foi recoberto com lona preta para reduzir a produção primária.

As dietas (Tabela 1) foram formuladas com base nos valores de aminoácidos digestíveis determinados para tilápia-do-nylo (Furuya et al., 2001). Uma mistura de L-glutamina

e L-glutamato (mínimo de 10% de L-glutamina) foi adicionada à dieta controle na proporção de 0, 1, 2 e 3% em substituição ao milho. Todos os alimentos foram moídos em moinho tipo faca e peneira de 0,5 mm de diâmetro. Em seguida foi pulverizada água (55°C) na proporção de 12% de seu peso total. As dietas foram aglomeradas em moedor de carne e desidratadas em estufa de ventilação forçada (55°C) durante 18 horas. Posteriormente, foram desintegradas, selecionando os grânulos com diâmetro de 0,8 mm (1^o ao 14^o dia), 1,18 mm (15^o ao 32^o dia), 2 mm (33^o ao 41^o dia) e 3 mm até o final do experimento.

Cada dieta foi fornecida diariamente quatro vezes/dia, às 8, 12, 16 e 18 h. O arraçamento foi manual e até saciedade aparente, quando não foi observada regurgitação dos grânulos.

Tabela 1 - Composição da dieta controle

Ingrediente	(%)
Quirera de arroz	16,70
Farelo de soja	35,00
Milho	5,00
Farelo de trigo	10,00
Glúten de milho	6,00
Farinha de peixe	15,00
Fosfato bicálcico	1,00
Óleo de soja	5,00
Levedura desidratada	3,00
Hidrolisado protéico	2,00
DL-metionina	0,18
L-lisina HCl	0,10
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,50
Vitamina C ²	0,10
Sal comum	0,30
Antifúngico ³	0,10
BHT ⁴	0,02
Nutricional	
Matéria seca (%) ⁵	92,00
Energia digestível (kcal/kg) ⁷	2937,16
Proteína bruta (%) ⁵	32,70
Proteína digestível (%) ⁵	29,43
Fibra bruta (%) ⁵	3,37
Extrato etéreo (%) ⁵	6,17
Cinzas ⁵ (%)	7,56
Cálcio (%) ⁵	0,93
Fósforo total ⁵ (%)	0,93
Fósforo disponível (%) ⁶	0,43
Lisina ⁸ (%)	1,80
Treonina ⁸ (%)	1,38
Metionina + cistina ⁸ (%)	1,37
Metionina ⁸ (%)	0,87

¹ Suplemento mineral e vitamínico (Supre Mais): composição por kg: Vit. A = 1200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000 mg; vit. K3 = 2.400 mg; vit. B1 = 4.800 mg; vit. B2 = 4.800 mg; vit. B6 = 4.000 mg; vit. B12 = 4.800 mg; ác. fólico = 1.200 mg; pantotenato de cálcio = 12.000 mg; vitamina C = 48.000 mg; biotina = 48 mg; colina = 65.000 mg; niacina = 24.000 mg; Fe = 10.000 mg; Cu = 600 mg; Mg = 4.000 mg; Zn = 6.000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg e Se = 20 mg.

² Vitamina C: (42% de ácido ascórbico).

³ Propionato de Cálcio.

⁴ Butil Hidroxi Tolueno.

⁵ Valores determinados no Lana – Universidade Estadual de Maringá.

⁶ De acordo com Miranda et al. (2000).

⁷ Valores calculados segundo o NRC (1993).

⁸ Valores determinados no Laboratório da Ajinomoto Biolatina.

As análises químicas das dietas foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (LANA), segundo metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002). As análises de aminoácidos foram realizadas no Laboratório da Ajinomoto Biolatina pelo método de Cromatógrafo a Líquido de Alto Desempenho (HPLC), modelo Shimadzu.

Após a pesagem e distribuição dos animais em cada unidade experimental, foram coletados 30 peixes originados do mesmo lote utilizado para a montagem do experimento para determinação da composição química da carcaça inicial. Ao final do experimento, foi realizada a pesagem de todos os peixes em balança digital (0,01 g). Trinta peixes por repetição foram utilizados para determinação da composição química da carcaça e do índice hepatossomático, e nove peixes por dieta para a análise histológica. Os peixes foram eutanizados com superdosagem de Eugenol (300 mg/L de água).

Foram determinados o ganho de peso, o consumo da dieta e a conversão alimentar, utilizando-se para determinação do índice hepatossomático, taxa de eficiência proteica e da eficiência de retenção de nitrogênio as expressões descritas por Jauncey & Ross (1982): $IHS = (PF/PV) \times 100$ em que IHS = índice hepatossomático; PF = peso do fígado (g); e PV = peso vivo (g); $TEP = GP/PC$, em que TEP = taxa de eficiência protéica; GP = ganho de peso (g); e PC = proteína consumida (g); e $ERN = (Nf \times Pf - Ni \times Pi) \times Nc$, em que ERN = eficiência de retenção de nitrogênio; Nf = nitrogênio final (%); Pf = peso final (g); Ni = nitrogênio inicial (%); Pi = peso inicial (g); e Nc = nitrogênio consumido (g).

As amostras para a composição corporal dos peixes (peixe inteiro) foram moídas em moedor de carne, até obter-se uma polpa homogênea, a qual foi seca em estufa de ventilação forçada a 55° C por 48 horas e moídas em moinho bola. As análises químicas da carcaça foram realizadas no LANA, seguindo-se metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002).

A cada semana foram tomadas as medidas de temperatura (8 e 16 horas) e oxigênio dissolvido (mg/L) da água de cada tanque. Os dados foram obtidos por meio de oxímetro digital portátil.

Para as análises hematológicas, foram utilizados nove peixes por tratamento. Os peixes foram anestesiados com Eugenol (60 mg/mL), o sangue foi retirado com seringa sem EDTA e colocado em tubo de ensaio com EDTA (10%). Esses tubos foram agitados manualmente e armazenados em geladeira (4°C) até posterior análise. As análises de amônia e ureia plasmática foram realizadas no Laboratório Veterinário de Análise Clínicas, Citologia e Anatomia Patológica Santo Antônio[®], Maringá, Paraná, utilizando-se

plasma centrifugado a 2.500 rpm por oito minutos. A análise de uréia foi realizada com o teste UV enzimático uréase-GLDH e para amônia foi utilizado o plasma com EDTA, que foi analisado pelo analisador automático Selectra XL – series – da Vital Scientific.

Para a morfometria da mucosa intestinal, que foi realizada no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá foram recolhidas porções de aproximadamente 5 cm de comprimento do intestino médio (45 cm abaixo da junção do estômago com o intestino) de 12 peixes por tratamento. As amostras foram colocadas em placa de isopor, abertas longitudinalmente, lavadas com solução salina, fixadas em solução de “Bouin” por 6 horas, desidratadas em série ascendente de álcool, diafanizadas em xilo, e incluídas em parafina, para obtenção de cortes histológicos semiseriados. Foram realizados cortes de 7 µm de espessura que foram corados pelo método de hematoxilina-eosina. A fotodocumentação (captura de imagens) foi realizada no Laboratório de Captura de Imagens DCM/UEM em fotomicroscópio Olympus BX50 em objetiva de 4X, utilizando-se sistema de imagens computadorizado (Image Pro Plus – Versão 5.2-Media Cibernética). A morfometria da mucosa intestinal foi realizada em 25 vilos por animal perfazendo um total de 225 medidas por dieta, mensurando a altura dos vilos.

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância e regressão polinomial por meio do programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (UFV, 1982).

Resultados e Discussão

Não foi observada mortalidade decorrente da suplementação de L-glutamina e L-glutamato durante o período experimental. Os níveis crescentes de L-glutamina e L-glutamato nas dietas não influenciaram ($P > 0,05$) o consumo de dieta, a conversão alimentar, a taxa de eficiência proteica, a eficiência de retenção de nitrogênio, o índice hepatossomático e o rendimento de carcaça (Tabela 2).

Com o aumento da suplementação de L-glutamina e L-glutamato foi observado aumento linear ($P < 0,05$) do ganho de peso (Tabela 2). Melhora no ganho de peso foi observada também em trabalhos com carpa-comum sob suplementação com 1,2% de L-glutamina (Yan & Qiu-Zhou, 2006) e leitões suplementados com 0,8% de L-glutamina na dieta (Lackeyram, 2001). O aumento no ganho de peso pode estar relacionado ao fato de a L-glutamina e o L-glutamato promoverem a síntese de aminoácidos não-essenciais para a deposição de proteína corporal. Além disso, a glutamina

Tabela 2 - Desempenho de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo L-glutamina e L-glutamato

Item	L-glutamina e L-glutamato (%)				CV (%)
	0	1	2	3	
Ganho de peso ² (g)	61,22	62,19	61,58	66,01	3,21
Consumo de dieta (g/peixe)	63,95	64,36	64,76	65,57	5,20
Conversão alimentar	1,05	1,04	1,05	0,99	6,66
Taxa de eficiência protéica	2,95	2,97	2,94	3,10	6,64
Eficiência de retenção de nitrogênio	30,67	32,40	30,10	34,46	6,22
Índice hepato-somático	2,29	2,22	1,98	2,18	8,03

CV = coeficiente de variação

² Efeito linear (P<0,05): Ganho de peso (Y = 60,6902 + 1,3743X; R²=0,75).

também pode resultar em maior ganho de peso, pelas melhorias na altura da mucosa intestinal dos animais, favorecendo a digestão e absorção de nutrientes da dieta.

Não foram observadas diferenças (P>0,05) na composição química corporal (Tabela 3) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com rações contendo L-glutamina e L-glutamato. A glutamina é importante na composição do músculo esquelético, pois atua no transporte de nitrogênio entre os tecidos para a formação de aminoácidos para a síntese de proteína muscular (Forte et al., 2003). A ausência de diferenças na composição corporal dos animais pode ter ocorrido pelo fato de a glutamina exógena ter maiores efeitos em situações de estresse como infecções e queimaduras (Ribeiro et al., 2004).

A utilização de dietas com níveis crescentes de L-glutamina e L-glutamato não influenciou (P>0,05) os parâmetros sanguíneos de amônia e ureia (Tabela 4). Por outro lado, Flynn & Wu (1997) suplementaram glutamina à dieta de leitões lactentes e notaram aumento da amônia sanguínea dos animais. Assim, a adição de até 3% de L-glutamina e L-glutamato em dietas não acarreta prejuízos metabólicos em termos de formação e excreção dos resíduos nitrogenados.

As análises morfométricas das vilosidades evidenciaram efeito quadrático (P>0,05) da suplementação de L-glutamina e L-glutamato na altura dos vilos (Figura 1), cujo valor máximo foi de 407 µm no nível de 1,67% de L-glutamina e L-glutamato. Yan & Qiu-Zhou (2006)

Tabela 3 - Composição química corporal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo L-glutamina e L-glutamato

Item	L-glutamina e L-glutamato (%)				CV (%)
	0	1	2	3	
Umidade	72,11	71,61	72,61	71,45	1,22
Proteína bruta	15,15	15,04	15,01	16,11	4,03
Extrato etéreo	8,25	8,61	8,28	8,38	3,83
Cinzas	3,68	3,68	3,10	3,51	8,65

CV = coeficiente de variação.

Tabela 4 - Parâmetros sanguíneos de juvenis de tilápias-do-nilo alimentados com dietas contendo L-glutamina e L-glutamato

Item	L-glutamina e L-glutamato (%)				CV (%)
	0	1	2	3	
Amônia sanguínea	1,23	1,13	1,32	1,18	12,87
Ureia sanguínea	5,00	4,67	4,67	5,00	8,37

CV = coeficiente de variação.

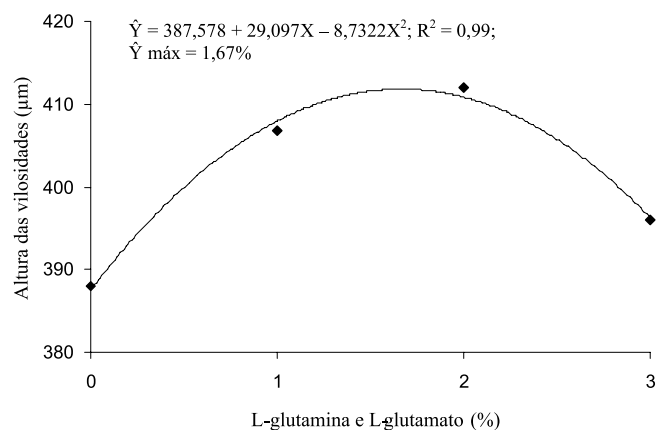


Figura 1 - Altura dos vilos intestinais de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo L-glutamina e L-glutamato.

também observaram aumento dos vilos intestinais com a suplementação de L-glutamina em dietas para a carpa-comum.

O aumento da altura dos vilos intestinais ocorreu provavelmente porque a glutamina é uma importante fonte de energia para os enterócitos, fornecendo nitrogênio para a biossíntese de nucleotídeos necessários para a replicação celular das células da mucosa do intestino (Yan & Qiu-Zhou, 2006). Esse efeito trófico relaciona-se à renovação celular do epitélio da mucosa intestinal, pois a glutamina e o glutamato estimulam o aumento das mitoses na base do vilão, que acarreta maior proliferação

das células do epitélio da mucosa intestinal e, dessa forma, aumentando a altura dos vilos, melhorando a digestão e absorção intestinal e o desempenho dos animais (Boleli et al., 2002).

Conclusões

A adição de L-glutamina e L-glutamato melhora o ganho de peso de juvenis de tilápia-do-nylo e, no nível de 1,67%, é adequada para promover o desenvolvimento da mucosa intestinal.

Referências

- BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZÁLES, E.P. (Eds.) **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. p.75-96.
- FLYNN, N.E.; WU, G. glucocorticoids play an important role in mediating the enhanced metabolism of arginine and glutamine in enterocytes of post weaning pigs, **The Journal of Nutrition**, p.732-737, 1997.
- FORTI, F.; CANCELLIERO, K.M.; SILVA, C.A. et al. O efeito da glutamina no músculo esquelético desnervado. **Saúde Revista**, v.5, n.9, p.59-65, 2003.
- FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C. et al. Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) (Linhagem Tailandesa). **Acta Scientiarum**, v.23, p.465-469, 2001.
- GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M. et al. Relação lisina digestível:proteína digestível em rações para tilápias-do-nylo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2299-2305, 2009.
- JAUNCEY, K.; ROSS, B. **A guide to tilapia feed and feeding**. Scotland: University of Stirling, 1982. 111p.
- JOBLING, M. **Environmental biology of fishes. Fish and Fisheries Series 16**. London: Chapman & Hall. 1995. 455p.
- KITT, S.J.; MILLER, P.S.; LEWIS, A.J. et al. Effects is diet and crystalline glutamina supplementation of growth performance and small intestine morphology of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v.79, p.10, p.230-238, 2001.
- LACKEYRAM, D.; YUE, X.; FAN, M.Z. Effects dietary supplementation of crystalline L-glutamine on the gastrointestinal tract and whole body growth in early-weaned piglets fed corn and soybean meal – based diets. **Journal Animal Science**, v.79, p.11, 2001.
- MAIORKA, A., SILVA, A.V.F., SANTIN, E. et al. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.5, p.487-490, 2000.
- MIRANDA, E.C.; PEZZATO, A.C.; PEZZATO, L.E. et al. Disponibilidade aparente de fósforo em ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, v.22, n.3, p.669-675, 2000.
- MURAKAMI, A.E.; SAKAMOTO, M.I.; NATALI, M.R.M. et al. Supplementation f glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens. **Poultry Science**, v.86, p.488-495, 2007.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutritional requirements of fishes**. Washington, D.C.: Academic Press, 1993. 114p.
- RIBEIRO, S.R.; PINTO JR., P.E.; MIRANDA, A.C. et al. Weight loss and morphometric study of intestinal mucosa in rats after massive intestinal resection. influence of a glutamine-enriched diet. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v.59, n.6, p.349-356, 2004.
- SILVA, S.S.; QUEIROZ, S. **Análises de alimentos** (métodos químicos e biológicos). 2.ed. Viçosa, MG: Imprensa Universitária, 2002. 235p.
- SMITH, R.J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **Journal Parenteral and Enteral Nutrition**, v.14, p.40S-44S, 1990.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas – SAEG**. Versão 6.0. Viçosa, MG, 1982. 52p.
- WU, G. Effects of concanavalin A and phorbol myristate acetate on glutamine metabolism and proliferation of porcine intraepithelial lymphocytes. **Biochemistry Physiology**, v.114A, p.363-368, 1996.
- WU, G.; KNABE, D.A.; YAN, W. et al. Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. **American Journal Physiology**, v.137, p.R334-R342, 1995.
- YAN, L.; QIU-ZHOU, X. Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture**, v.256, p.389-394, 2006.