



MARIANA MARTINS DRUMOND

**RACTOPAMINA PARA PACUS (*Piaractus
mesopotamicus*) EM FASE DE TERMINAÇÃO**

LAVRAS – MG

2012

MARIANA MARTINS DRUMOND

**E RACTOPAMINA PARA PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) EM FASE
DE TERMINAÇÃO**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de não ruminantes, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora:

Dra. Priscila Vieira e Rosa

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Drumond, Mariana Martins.

Ractopamina para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) em fase de
terminação / Mariana Martins Drumond. – Lavras: UFLA, 2013.
75 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.
Orientador: Priscila Vieira e Rosa.
Bibliografia.

1. Beta adrenérgico. 2. Metabolismo. 3. Peixes de água doce. 4.
Aditivos modificadores do metabolismo. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 639.3752 04133

MARIANA MARTINS DRUMOND

**UTILIZAÇÃO DE RACTOPAMINA PARA PACUS (*Piaractus
mesopotamicus*) EM FASE DE TERMINAÇÃO**

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de não ruminantes, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 26 de outubro de 2012.

Dr. Vinícius de Souza Cantarelli	UFLA
Dr. Daniel Okamura	UFLA
Dra. Paula Adriane Perez Ribeiro	UFMG
Dr. Rodrigo Fortes da Silva	UFRB

Dra. Priscila Vieira e Rosa
Orientadora

**LAVRAS – MG
2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
Coordenadoria de Pós-Graduação *Stricto Sensu*

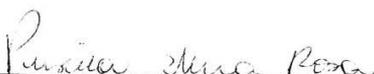
ATA DE DEFESA DE TESE

Aos 26 dias do mês de outubro do ano de 2012, às 14:00 horas, sob a presidência de Priscila Vieira e Rosa e com a participação de Rodrigo Fortes da Silva, Paula Adriane Perez Ribeiro, Vinicius de Souza Cantarelli e Daniel Okamura, reuniu-se a banca da defesa de Tese de **Mariana Martins Drumond**, Matrícula **200917013**, aluna do Curso de Doutorado em Zootecnia. A tese "**Ractopamina para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) em fase de terminação**", foi **aprovada**. Para constar, foi lavrada a presente ata que depois de lida e aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora.

Observações:

- 1- O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências dos 70 e 78 do Regulamento Geral de Pós-Graduação *Stricto sensu*.
- 2- O presidente da banca examinadora, através do Departamento de vinculação do curso, deverá enviar o original da presente ata à Pró-Reitoria de Pós-Graduação, até 48 horas após a realização da defesa.

Lavras, 26 de outubro de 2012.


Priscila Vieira e Rosa
Presidente


Paula Adriane Perez Ribeiro
Membro


Rodrigo Fortes da Silva
Membro


Vinicius de Souza Cantarelli
Membro


Daniel Okamura
Membro

À minha família, que me apoiou desde o início de tudo, e a Deus, por permitir que conseguisse chegar até aqui,

DEDICO

À minha filha, Maria Fernanda, por me ensinar o que realmente é importante na vida e me permitir vivenciar o verdadeiro amor incondicional,

OFEREÇO

*O homem erudito é um desobridor de fatos que já existem; mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir.
(Albert Einstein)*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela bolsa concedida.

Em especial à Professora Priscila Vieira e Rosa, pelos ensinamentos, paciência e compreensão.

Ao professor Rilke Tadeu Fonseca de Freitas e ao Dr. Daniel Okamura, por todo auxílio nas análises estatísticas.

Ao professor Vinícius Cantarelli, pelo apoio logístico durante a execução dos experimentos.

À professora Paula Adriane Perez Ribeiro, pela amizade e incentivo, em todos os momentos.

Às grandes e eternas amigas Marinez Moraes de Oliveira e Luciana de Paula Naves, por estarem ao meu lado durante todos os momentos e auxiliarem em todas as análises compartilhando valiosos conhecimentos.

À Raquel Tatiane Pereira, “geninha”, e Anaíse Emanuele Resende, pelo auxílio em todo o estudo de crescimento muscular.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da UFLA, Eleci Pereira e José Roberto, pela colaboração em campo e por todas as boas risadas que demos juntos.

Ao amigo Galileu Crovato Veras, pela presença constante em todas as coletas e à Luisa Oliveira, Renato Leal e Sarah Kelly por todo o auxílio na condução do experimento em campo.

Aos colegas e professores da pós-graduação que, mesmo na correria e atribulação, estavam sempre dispostos a esclarecer dúvidas e ajudar no que fosse preciso.

Às amigas Gilmara, Camilitx, Luiza que, mesmo distantes, sempre estavam presentes em meu pensamento e coração.

A toda a minha família (todos, sem exceção), por apoiarem minhas decisões, sempre!

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste sonho!

Muito Obrigada!

RESUMO

A utilização de partidores de nutrientes tem sido frequentemente relatada na produção animal. Sua utilização em peixes ainda é relativamente pequena e seus efeitos sobre o metabolismo desses animais ainda são pouco conhecidos. O pacu é um peixe de grande interesse comercial, porém tem tendência a acumular gordura em sua cavidade celomática o que reduz seu valor de mercado. Para avaliar os efeitos da ractopamina sobre o metabolismo de pacus em terminação um experimento foi conduzido, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (ração com 32% PB e inclusão de 0, 11,25, 22,5, 33,75 e 45,00 ppm de ractopamina) e oito repetições por tratamento, no laboratório de metabolismo de peixes da Estação de Piscicultura da Universidade Federal da Lavras. O período experimental foi de 60 dias durante os quais os animais foram alimentados com as dietas experimentais, duas vezes ao dia, *ad libitum*. Ao final do experimento foram avaliados parâmetros de desempenho (consumo de ração e taxa de rendimento dos filés), sanguíneos (triglicérides e proteínas totais circulantes), enzimológicos (G6PD e EM). Fragmentos de filés foram submetidos à análise de composição centesimal e análises de crescimento muscular através da mensuração do diâmetro das fibras e do percentual de deposição de tecido adiposo entre as fibras musculares. Os resultados obtidos para os parâmetros de desempenho, sanguíneos e da composição centesimal dos filés foram submetidos à análise de variância e posterior teste de Student-Newman-Keuls (SNK) a 5% de probabilidade. As análises de crescimento muscular e percentual de deposição de tecido adiposo entre as fibras foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e posterior teste de comparações múltiplas de Nemenyi, a 5% de probabilidade. A inclusão de 11,25 ppm de ractopamina nas dietas de pacus levou a uma redução ($P < 0,05$) no extrato etéreo dos filés corroborada pelo resultado significativo ($P < 0,05$) na mensuração do percentual de distribuição do tecido adiposo entre as fibras musculares. Entretanto, não houve qualquer alteração nos parâmetros de desempenho, sanguíneos ou enzimológicos dos animais. Os resultados encontrados sugerem que inclusões superiores a 11,25 ppm de ractopamina levam a um desequilíbrio metabólico, ocasionando elevação nas concentrações ($P < 0,05$) de triglicérides e proteínas totais circulantes e redução das atividades específicas das enzimas G6PD e EM sem que estas alterações fossem refletidas

sobre os parâmetros de desempenho e na análise de composição centesimal dos filés. A suplementação de 11,25 ppm de ractopamina nas dietas, por 60 dias, traz resultados satisfatórios do ponto de vista comercial uma vez que reduz o extrato etéreo dos filés e a quantidade de tecido adiposo entre das fibras musculares dos pacus em terminação.

Palavras-chave: Beta adrenérgico. Glicose-6-fostato-desidrogenase. Enzima málica. Metabolismo. Crescimento muscular. Deposição lipídica. *Piaractus mesopotamicus*.

ABSTRACT

The use of nutrient partitioning has often been reported in animal production. Its use in fish is still relatively rare and its effects on the metabolism of these animals are still poorly understood. Pacu is a fish of great commercial interest, but has a tendency to accumulate fat in the coelomic cavity, which reduces their market value. To evaluate the effects of ractopamine on the metabolism of pacu in the finishing phase, an experiment was conducted in a completely randomized design with five treatments (diet with 32% Crude Protein and ractopamine supplementation of 0, 11.25, 22.5, 33.75 and 45.00 ppm) and eight replicates per treatment in the fish metabolism laboratory of the Fish Culture Station of the Federal University of Lavras. The experimental period was 60 days, during which the animals were fed with the experimental diets twice daily, *ad libitum*. At the end of the experiment, performance parameters (feed intake and rate of return of the fillets), blood (triglycerides and total circulating proteins) and enzymology (Glucose-6-phosphate-dehydrogenase and Malic Enzyme) were assessed. Fragments of steaks were subjected to chemical composition analysis and analysis of muscle growth by measuring the diameter of the fibers and the percentage of fat deposition between muscle fibers. The results for the performance parameters, blood and chemical composition of the fillets were submitted to variance tests and subsequent Student-Newman-Keuls (SNK) tests at the 5% probability level. Analyses of muscle growth and the percentage of fat deposition between fibers were subjected to non-parametric Kruskal-Wallis tests and subsequent Nemenyi multiple comparisons at the 5% probability level. The inclusion of 11.25 ppm ractopamine in the pacu diet led to a reduction ($P < 0.05$) in the ether extract of steaks, corroborated by the significant result ($P < 0.05$) in the measurement of the percentage of fat distribution between muscle fibers. However, there was no change in performance parameters, blood or enzymological results. The results suggest that inclusions greater than 11.25 ppm ractopamine lead to metabolic imbalance, causing an increase in the concentrations ($P < 0.05$) of circulating triglycerides and total protein and a reduction in the specific activities of the enzymes G6PD and ME. These results were reflected in the performance parameters and the analysis of the chemical composition of the fillets. Supplementation with 11.25 ppm ractopamine in the

diet, for a period of 60 days, led to satisfactory results from the commercial point of view because it reduced the ether extract of the fillets and the amount of adipose tissue between the muscle fibers of pacus in the finishing phase.

Keywords: Beta-adrenergic. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase. Malic enzyme. Metabolism. Muscle growth. Fat deposition. *Piaractus mesopotamicus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da ractopamina.....	22
Figura 2	Mecanismo de ação dos agonistas β -adrenérgicos.....	24
Figura 3	Produção de Acetil-CoA no citoplasma a partir do citrato intramitocondrial.....	25
Figura 4	Síntese do malonil CoA a partir do acetil-CoA pela ação da enzima acetil-CoA carboxilase.....	26
Figura 5	Fase oxidativa da via das pentose fosfato onde há formação de NADPH	28
Figura 6	Ciclo do Malato/Piruvato. Malato originando piruvato através da ação da enzima málica	28
Figura 7	População de mioblastos indiferenciados (mioblastos adultos ou células mio-satélites) que contribui para o crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura estriada esquelética nos peixes. A proliferação e diferenciação dos mioblastos ocorrem sob o controle da expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs) e de fatores de crescimento	33
Figura 8	Resumo esquemático dos efeitos dos agonistas β -adrenérgicos, como a ractopamina sobre o metabolismo protéico	36
Figura 9	Desenho esquemático da ação de agonistas β -adrenérgicos, como a ractopamina sobre o metabolismo lipídico	38
Figura 10	Seção transversal de músculo esquelético branco de pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i>), em fase de terminação alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de ractopamina	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição percentual e nutricional da dieta-base experimental	40
Tabela 2	Concentrações séricas de triglicerídeos e proteína total de pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) em terminação alimentados com dietas contendo níveis crescentes de ractopamina	45
Tabela 3	Atividade específica da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e enzima málica determinada no extrato hepático de pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) em terminação alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de ractopamina	47
Tabela 4	Consumo de ração (g) ao final dos 60 dias de experimento e taxa de rendimento dos filés (%), de pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) em terminação alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de ractopamina.....	48
Tabela 5	Teores de umidade e extrato etéreo, em g/100g de matéria seca, determinados nos filés de pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) em terminação alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de ractopamina.....	51
Tabela 6	Frequência percentual de distribuição de fibras, em classes de diâmetros (μm), do músculo branco de pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) em terminação alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de ractopamina.....	51
Tabela 7	P-valores do teste de comparação múltipla de Nemenyi, para avaliação de diferença de deposição de tecido adiposo entre as fibras musculares de pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) em terminação alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de ractopamina.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6PHD.....	6-fosfogluconato desidrogenase
ABA	Agonista beta adrenérgico
ACa	Adenilato ciclase ativa
ACC	Acetilcoa carboxilase
ACP.....	Aroteína transportadora de acila
AGS.....	Ácido graxo sintase
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
beta-ARK.....	Beta-adreno-receptor quinase
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
EM	Enzima Málica
FOG.....	Oxidativo/glicolítico (do inglês <i>fast glycolityc oxidative</i>)
G6PD.....	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GH.....	Hormônio do crescimento (do inglês <i>growth hormone</i>)
GPDH.....	Glicerolfosfato desidrogenase
GTP	Guanina trifosfato
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à isnulina – 1 (do inglês <i>insulin-like growth factor 1</i>)
MRFs.....	Fatores de Regulação Miogênica
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro

Myf5.....	Fator miogênico 5 (do inglês <i>myogenic factor 5</i>)
MyoD	Gene de diferenciação miogênica (do inglês <i>myogenic determination gene</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato hidreto
PG	Proteína G
PKa.....	Proteína quinase ativada
PKA.....	Proteína quinase A
RBA	Receptor beta adrenérgico
RNAm	Ácido Ribonucleico mensageiro
rRNA.....	Ácido Ribonucléico ribossômico
SO	Metabolismo oxidativo (do inglês <i>slow oxidative</i>)
TAG	Triacilglicerol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	20
2.2	Aditivos modificadores do metabolismo animal	21
2.2.1	Ractopamina.....	21
2.3	Lipogênese em peixes.....	25
2.4	Tecido muscular em peixes	29
2.4.1	Crescimento do tecido muscular em peixes	33
2.4.1.1	Efeito da ractopamina sobre o metabolismo protéico.....	35
2.4.1.2	Efeito da ractopamina sobre o metabolismo lipídico.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Local e duração do experimento.....	39
3.2	Animais e instalações	39
3.3	Dietas	40
3.4	Procedimentos	41
3.4.1	Arraçoamento.....	41
3.4.2	Parâmetros limnológicos.....	41
3.4.3	Coleta de sangue e análises sanguíneas	41
3.4.4	Abate e análises.....	42
3.4.5	Delineamento e análises estatísticas	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

5	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICE A	Obtenção do extrato hepático, segundo Ribeiro (2007), com modificações.....	67
APÊNDICE B	Determinação da atividade específica da enzima glicose- 6-fosfato desidrogenase (G6PD)	68
APÊNDICE C	Determinação da atividade da enzima málica (EM).....	70
ANEXO A	Análises de variância	72

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a aquicultura é o setor de produção de alimentos de maior crescimento no mundo. No Brasil, nos últimos dez anos, a intensificação do cultivo de peixes em cativeiro tem sido crescente, principalmente de espécies nativas tropicais, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*). Essas espécies apresentam grande potencial para a piscicultura intensiva uma vez que possuem carne de excelente qualidade, facilidade de adaptação ao cultivo em tanques-rede ou viveiros e grande procura na pesca esportiva.

Entretanto, o pacu apresenta tendência a depositar grande quantidade de gordura corporal, sobretudo na cavidade abdominal, o que altera a palatabilidade da carne, reduzindo seu valor de mercado. Pesquisas recentes vêm enfatizando o uso de aditivos como forma de alterar a partição de nutrientes, buscando a diminuição da deposição de gordura e o aumento do crescimento muscular. Além da manipulação de nutrientes da dieta, várias substâncias têm sido pesquisadas, como a ractopamina.

Os primeiros estudos realizados em peixes para avaliar os efeitos da suplementação de ractopamina foram conduzidos por Vandenberg e Moccia (1998) com truta arco-íris e por Mustin e Lovell (1993) com bagre do canal. Esses estudos demonstraram que a ractopamina apresenta menores efeitos que os encontrados para outros vertebrados.

A ractopamina, agonista β -adrenérgico do grupo das fenetanolaminas, é uma substância exógena que altera a partição dos nutrientes para a deposição de músculo e gordura. Trata-se de um análogo sintético das catecolaminas, hormônios que regulam processos fisiológicos através da ativação de receptores adrenérgicos específicos (RAMOS; SILVEIRA, 2001). Em nível celular, a ractopamina pode inibir a lipogênese e estimular a lipólise (MILLS, 2002)

contribuindo, conseqüentemente, para a redução do teor de gordura na carcaça do animal, o que é desejável pelo produtor devido à maior aceitação deste produto pelo consumidor (AGOSTINI *et al.*, 2008).

Neste sentido, faz-se necessário entender, no contexto metabólico, de forma geral, de que maneira o organismo do peixe responde à suplementação de ractopamina na dieta. Nos peixes, como na grande maioria dos animais, o fígado desempenha papel importante no metabolismo lipídico, uma vez que apresenta acentuada atividade lipogênica (NANKERVIS *et al.*, 2000) sendo que as principais enzimas atuantes na síntese lipídica são a enzima málica (EM) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD).

A G6PD é a principal enzima responsável pelo fornecimento de NADPH para a biossíntese de ácidos graxos (ALVAREZ *et al.*, 1999). Esta enzima também é necessária para sustentar a síntese de nucleotídeos envolvidos na produção de DNA, durante a fase de alto crescimento celular, por se tratar de uma enzima chave na via das pentoses (WINZER *et al.*, 2002). Já a contribuição do NADPH proveniente do ciclo do piruvato/malato, realizado pela EM, apresenta grande variação entre as diversas espécies de peixes (DIAS *et al.*, 1998).

Paralelamente, há relatos de que a ractopamina também está relacionada com o aumento da deposição protéica no tecido muscular. De acordo com Dunshea *et al.* (2005), a primeira resposta da ractopamina sobre o tecido muscular é o aumento do tamanho das fibras musculares. Como consequência, seu maior efeito está relacionado ao aumento de deposição protéica e aumento no crescimento, sendo observado apenas um pequeno efeito relacionado à deposição de tecido adiposo (WEATHERUP *et al.*, 1998; DUNSHEA *et al.*, 2005; MOORE *et al.*, 2009).

Diante da escassez de estudos sobre a ação da ractopamina para peixes, o objetivo do presente trabalho é avaliar a ação da ractopamina sobre o metabolismo lipídico e crescimento muscular em pacus em fase de terminação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu (HOLMBERG, 1887) é uma espécie pertencente à superordem Ostariophysi - na qual, segundo Urbinati e Gonçalves (2005), incluem-se os peixes de maior valor comercial na pesca e piscicultura brasileiras - família *Characidae* e subfamília *Myleinae*. Comumente conhecida como pacu, ocorre desde a bacia do rio Orinoco, na Venezuela, até o rio da Prata, no Uruguai.

No Brasil, a criação de peixes em cativeiro tem aumentado e, entre as espécies que vêm sendo utilizadas, destaca-se o pacu que apresenta grande potencial para a piscicultura intensiva devido à adaptabilidade ao cultivo, menor exigência de proteína e possibilidade de menor inclusão de farinha de peixe na ração (FERNANDES *et al.*, 2000).

De acordo com vários autores, o pacu é uma das espécies mais promissoras para a piscicultura brasileira por apresentar fácil adaptação alimentar, crescimento rápido, facilidade de reprodução artificial e adequação para pesca esportiva (CANTELMO, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2005). A espécie é tolerante à baixa qualidade da água e apresenta crescimento compensatório quando há restrição de alimento. Além disto, resiste a manejos estressantes (URBINATI; GONÇALVES, 2005). Entretanto, por ser classificado como pescado gordo, pois sua composição corporal apresenta alto teor de lipídio, (cerca de 8-10% de lipídios na carcaça) ainda apresenta certa resistência no consumo por parte do mercado consumidor (ALVES, 1999; STECH, 1999).

2.2 Aditivos modificadores do metabolismo animal

Aditivos são substâncias com propriedades funcionais digestivas ou equilibradoras da microbiota do trato digestório que são adicionadas aos produtos ou água de bebida dos animais ou administrados diretamente ao animal por via oral (BRASIL, 2003). Os aditivos podem ainda ser referenciados como substâncias ou microrganismos adicionados intencionalmente aos alimentos com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades. Dentre os aditivos, os modificadores metabólicos têm utilidade na produção animal, uma vez que possuem a capacidade de alterar o crescimento animal (GUYTON; HALL, 2006).

Os aditivos modificadores do metabolismo animal podem alterar as taxas de síntese protéica, modificar a proporção da proteína em relação à gordura, alterar o perfil de ácidos graxos na carne ou alterar o metabolismo *post mortem*. Alguns modificadores metabólicos são compostos por vitaminas, metabólitos vitamínicos (LAWRENCE; COPPACK, 2000) e compostos semelhantes à vitamina, que fornecem benefícios adicionais à carcaça quando adicionados além da exigência dos animais (HEO *et al.*, 2000). Além disso, têm sido utilizados como modificadores do metabolismo animal, os agonistas beta-adrenérgicos, com destaque para a ractopamina. Este aditivo redireciona os nutrientes para o anabolismo protéico em detrimento ao lipídico, contribuindo para melhorar as características da carcaça (SCHINCKEL *et al.*, 2003).

2.2.1 Ractopamina

A ractopamina é um agonista beta-adrenérgico pertencente à família das fenetanolaminas, constituída em sua estrutura por um anel aromático substituível, uma cadeia lateral com o grupo etanolamina e um nitrogênio

alifático (Figura 1) (MILLS *et al.*, 2003; SMITH, 1998). É um agente repartidor que redireciona nutrientes do tecido adiposo para deposição em tecido magro (MOODY *et al.*, 2000). Pela definição, fenetanolaminas beta-adrenérgicos agonistas são combinações quirais, isto é, existe assimetria molecular ao carbono β hidroxilateral a um nitrogênio alifático e α para um grupo benzil substituído comum a todas as fenetanolaminas (RICKE *et al.*, 1999).

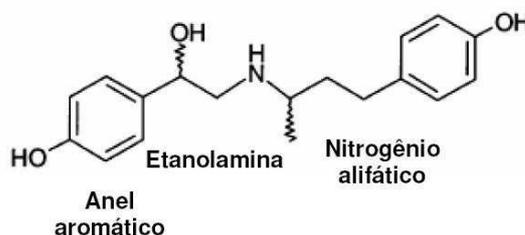


Figura 1 Estrutura química da ractopamina

Fonte: Smith (1998) adaptado por Cantarelli (2007).

A ractopamina HCl é uma fenetanolamina beta-adrenérgico agonista que contém dois carbonos quirais que permitem a existência de quatro estereoisômeros. Assim, para um beta-agonista ter atividade biológica deve haver um anel aromático com seis membros substituíveis, grupo hidroxil ligado ao carbono β na configuração R e nitrogênio positivamente carregado na cadeia etilamina, e plenamente substituível no nitrogênio alifático para conferir especificidade para o beta-receptor. A ractopamina, por ser constituída por dois centros quirais, pode apresentar-se como quatro estereoisômeros: RR, RS, SR e SS (RICKE *et al.*, 1999). Dessa forma, a preparação comercial da ractopamina é uma mistura racêmica dos quatro estereoisômeros possíveis (MILLS *et al.*, 2003).

As fenetanolaminas, e consequentemente a ractopamina, são substâncias com capacidade de ligação aos receptores α e/ou β adrenérgicos (SMITH, 1998).

Entre os quatro estereoisômeros da ractopamina, o RR é provavelmente o ligante funcional, uma vez que possui alta afinidade e grande habilidade para gerar resposta celular após seu acoplamento com o receptor (MILLS *et al.*, 2003).

As ações mediadas pelos beta-adrenérgicos são intracelulares sequenciais a estimulação do receptor beta agonista (GONZALEZ; DA SILVA, 2006). O complexo agonista/receptor se fixa a uma proteína heterotrimérica G_s , a qual consiste de subunidades alfa_s, beta e gama e, quando na forma inativa, a subunidade alfa_s encontra-se acoplada à guanina difosfato (GDP) (LEHNINGER *et al.*, 2007). Após a ação da ractopamina, que atua como primeiro mensageiro, sobre o receptor beta₂, a subunidade alfa_s substitui o GDP por guanina trifosfato (GTP), dissocia-se das subunidades beta e gama e, conseqüentemente, o complexo alfa_s-GTP induz uma modificação na fluidez da membrana, permitindo seu deslocamento lateral e estimulando a ação catalítica da adenilato ciclase (AC) (BARROS *et al.*, 1999). Esta participa da formação do AMPc a partir do ATP, passando a atuar como segundo mensageiro (McGRAW; LIGGETT, 2005). O AMPc ativa a enzima proteína quinase A (PKA) (LINHART *et al.*, 2001), a qual encontra-se na forma inativa e organizada na forma de tetrâmeros com duas subunidades regulatórias (R) e duas subunidades catalíticas (C) (MERSMANN, 1998). Assim, o AMPc interage com a PKA inativa, liga-se às subunidades R e libera as subunidades C, tornando-a ativa, a qual conduz a fosforilação de enzimas responsáveis pela resposta final da célula (Figura 2) (McGRAW; LIGGETT, 2005).

No entanto, sob ação contínua da ractopamina, o AMPc ativa uma proteína quinase, a beta-adreno-receptor quinase (beta-ARK) que, ao fosforilar o receptor, o torna inativo e desacopla o complexo receptor- G_s -adenilato ciclase (LEEB-LUNDBERG *et al.*, 1987). O efector desacoplado passa para o espaço intracitoplasmático, o que diminui o número de receptores disponíveis na membrana. Essa diminuição no número de receptores é chamada

dessensibilização e causa diminuição na resposta a estimulação beta-adrenérgica da ractopamina (MILLS, 2002; SPURLOCK *et al.*, 1998). Além disso, no espaço intracitoplasmático, o receptor beta-adrenérgico pode ser consumido, fenômeno denominado sequestro, o que acarreta a diminuição do número de receptores celulares (BENOVIC *et al.*, 1988). Esta variação no número de receptores por unidade de sarcolema é denominada “*down regulation*”. Tanto os receptores beta₁ quanto os beta₂-adrenérgicos podem sofrer processos de dessensibilização e *down-regulation*, porém estes fenômenos são mais expressivos com receptores do tipo beta₂ (MILLS, 2002).

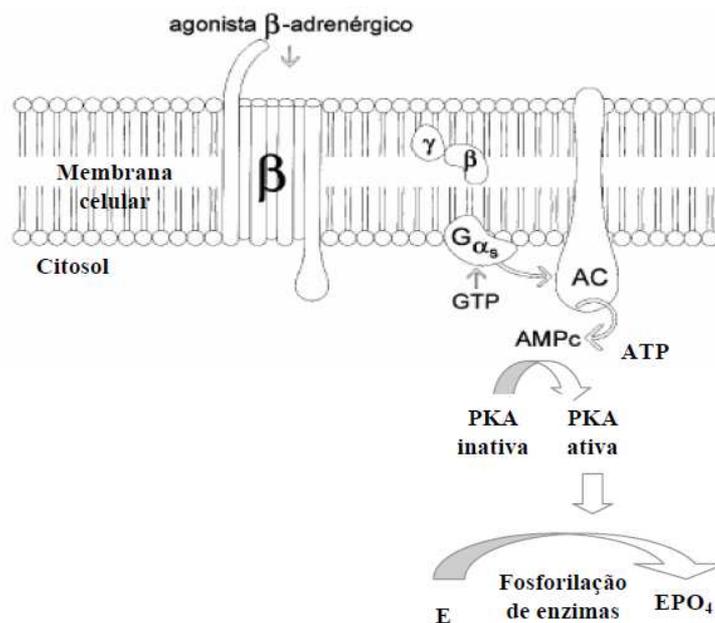


Figura 2 Mecanismo de ação dos agonistas beta-adrenérgicos. beta – receptor beta-adrenérgicos; Gs – proteína ativa; AC - enzima adelinato ciclase; ATP – trifosfato de adenosina; AMPc – monofosfato cíclico de adenosina; PKA – proteína quinase A; E – enzima; EPO₄ – enzima fosforilada.

Fonte Adaptado de Barros *et al.* (1999)

2.3 Lipogênese em peixes

A lipogênese se inicia com a produção de uma molécula de acetil-CoA no citoplasma, a partir da formação de citrato no interior da mitocôndria (Figura 3). O transporte do citrato intramitocondrial para o citossol só ocorre quando sua concentração está elevada no interior da mitocôndria. Essa elevação é causada pela inibição da atividade da enzima isocitrato desidrogenase, no ciclo de Krebs, pelo acúmulo de ATP. Portanto, o aumento de ATP e de citrato favorece a ocorrência dessa rota metabólica (CHAMPE; HARVEY, 1997).

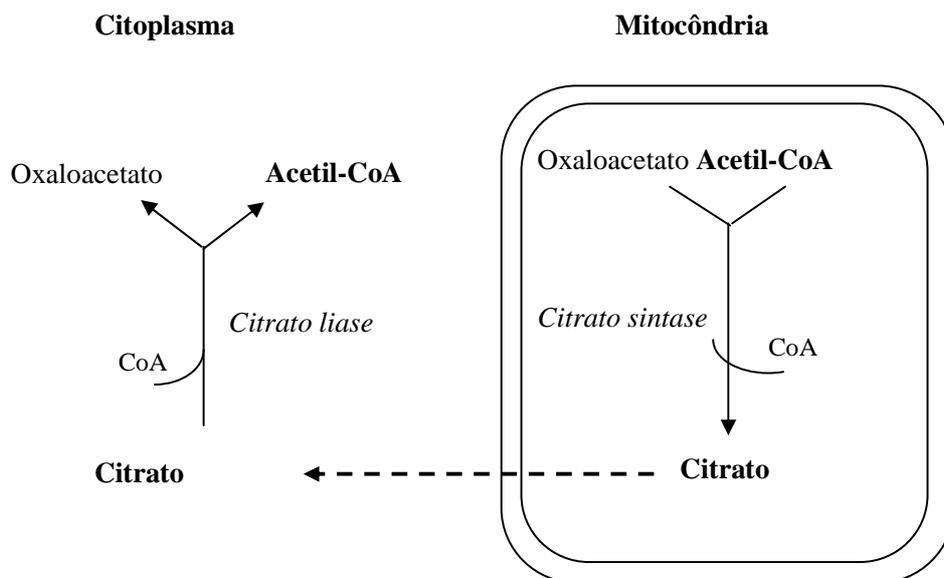


Figura 3 Produção de Acetil-CoA no citoplasma a partir do citrato intramitocondrial (adaptado de Champe e Harvei, 1997).

Em seguida, ocorre a carboxilação da acetil-CoA, para a formação de malonil-CoA, através de um processo mediado pela enzima acetil-CoA carboxilase (Figura 4).

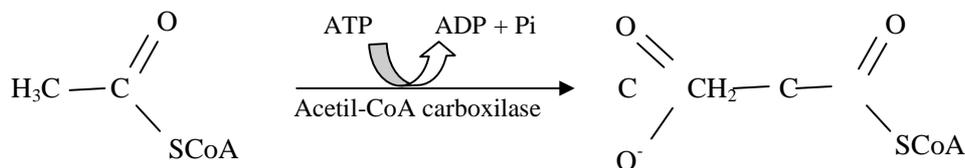


Figura 4 Síntese do malonil CoA a partir do acetil-CoA pela ação da enzima acetil-CoA carboxilase

A partir da molécula de malonil-CoA formam-se diferentes ácidos graxos, pela ação da enzima “ácido graxo sintetase”, um dímero multicatalítico capaz de catalisar até sete diferentes reações químicas, sendo que cada monômero contém um domínio que se liga covalentemente a uma molécula de 4'-fosfopanteteína que carrega unidades acetila e acila em seu grupo terminal tiol contendo sete enzimas e uma proteína transportadora de acila (ACP) (CHAMPE; HARVEY, 1997).

Para que as vias lipogênicas atuem de forma eficaz, é necessária a participação de NADPH como doador de equivalentes redutores sendo a via das pentoses-fosfato a principal fonte de hidrogênio necessário à síntese redutiva dos ácidos graxos.

A via das pentoses-fosfato é uma rota alternativa à via glicolítica para a oxidação da glicose. Ao contrário do que ocorre na via glicolítica, a via das pentoses-fosfato não produz ATP. Ao invés disto, ela gera NADPH, utilizado em processos de redução, como a biossíntese de ácidos graxos e a pentose ribose, para a produção de nucleotídeos e ácido nucléico (ARNESEN *et al.*, 1995).

A via das pentoses-fosfato apresenta duas fases (MAYES, 1988): (1) a fase oxidativa irreversível na qual a glicose-6-fosfato, o substrato comum para

todas as vias biológicas da glicose, sofre desidratações e descarboxilação dando origem a uma pentose. Essa reação é catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PHD). Ambas as enzimas necessitam de NADP^+ como aceptor de elétrons. As reações de desidratações e descarboxilação sofridas pela glicose-6-fosfato dão origem a NADPH e CO_2 e (2) fase não oxidativa reversível na qual a ribulose-5-fosfato é convertida a xilulose-5-fosfato e, após um rearranjo dos esqueletos carbônicos dos açúcares e a conversão de seis moléculas de glicose fosfato em cinco moléculas de glicose fosfato, completando o ciclo e permitindo a oxidação contínua da glicose-6-fosfato.

A conversão de malato a piruvato, catalisada pela enzima málica, e a conversão de citrato a acetil-CoA, catalizada pela enzima isocitrato desidrogenase são duas outras reações que dão origem a NADPH . As Figuras 5 e 6 ilustram a via das pentoses (fase oxidativa) e o ciclo do piruvato/malato, exemplificando a ação das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e málica, respectivamente, na formação de NADPH .

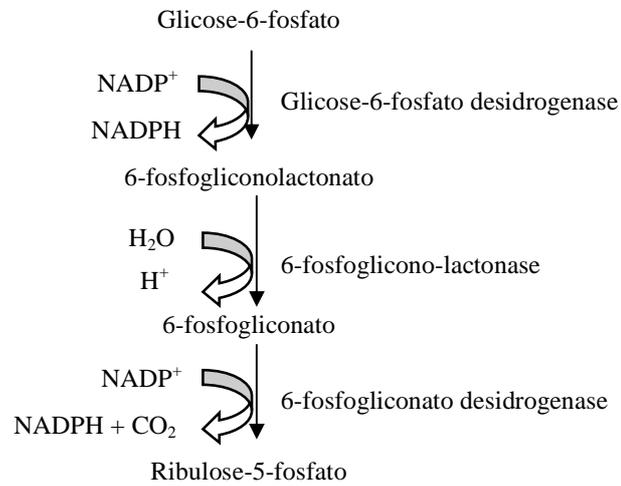


Figura 5 Fase oxidativa da via das pentose fosfato onde há formação de NADPH
 Fonte: Motta (2003)

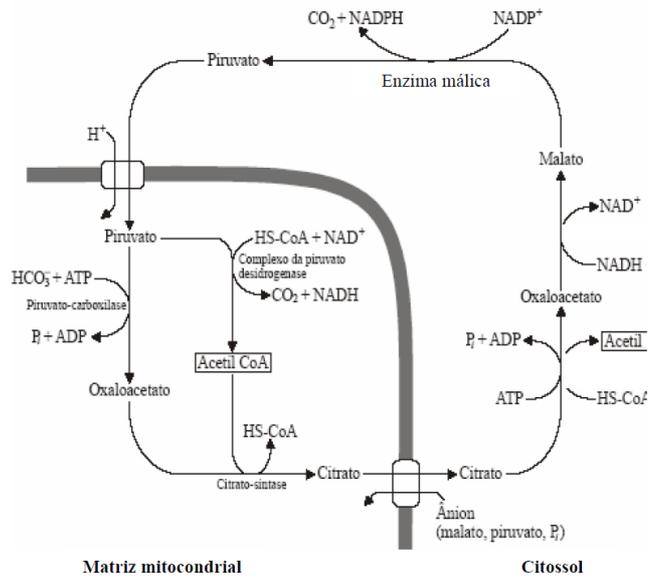


Figura 6 Ciclo do Malato/Piruvato. Malato originando piruvato através da ação da enzima málica
 Fonte: Motta (2003)

É importante ressaltar que tecidos que apresentam lipogênese ativa, como, por exemplo, o fígado e tecido adiposo, também apresentam a via oxidativa das pentoses ativa. Parece que o fígado é o local de maior importância para a síntese de ácidos graxos em peixes em comparação ao tecido adiposo (LIN *et al.*, 1977, LIKIMANI; WILSON, 1982).

2.4 Tecido muscular em peixes

O tecido muscular estriado esquelético é um tecido complexo, dinâmico e possui características peculiares de adaptação morfológica, metabólica e funcional frente aos mais variados estímulos (PETTE; STARON, 2000).

Nos peixes, a maior parte da massa corporal é representada pelo tecido muscular estriado esquelético que constitui de 40 a 75% do peso total do animal. Essa abundante massa muscular não representa somente um mecanismo específico para a adaptação desses animais no meio aquático, mas também uma importante fonte de proteínas utilizadas na alimentação humana (WEATHERLEY; GILL, 1985).

Na maioria das espécies de peixes, a musculatura estriada esquelética (musculatura miotomal) é organizada em miômeros, unidades morfofuncionais, que se repetem ao longo do corpo do animal e são separados entre si pelos miosseptos, constituídos por bainhas de tecido conjuntivo (ALEXANDER, 1969)

Existem três tipos básicos de fibras musculares, constituindo o tecido muscular estriado esquelético: fibras vermelhas, intermediárias e brancas (JOHNSTON, 1981). Enquanto nos mamíferos, a maioria dos músculos é formada por diferentes tipos de fibras, formando um mosaico ou em pequenos grupos de um mesmo tipo de fibra (ARMSTRONG *et al.*, 1982; ARMSTRONG; PHELPS, 1984), na maioria das espécies de peixes elas estão distribuídas em

compartimentos: vermelho, intermediário e branco. Embora as fibras brancas correspondam a mais de 90% do tecido muscular (WEATHERLEY; GILL, 1989; KILARSKI, 1990), a distribuição das fibras musculares nos compartimentos é variável tanto entre as espécies como nos diferentes estágios de desenvolvimento dos animais.

A cor do músculo é indicativa do grau de vascularização de cada tipo de fibra. O músculo vermelho aparece escuro devido ao alto teor de mioglobina, elevada densidade mitocondrial e alto grau de capilarização, em contraste com os baixos valores desses parâmetros no músculo branco. O músculo rosa possui características intermediárias. A nomenclatura, oxidação lenta (aeróbica lenta), oxidativa glicolítica rápida (aeróbica rápida) e glicolítica rápida, combina informação de propriedades contráteis e metabólicas. O uso de outros métodos quantitativos e analíticos (histoquímico, imunocitoquímico, microscopia eletrônica, morfometria, hibridização *in situ*) pode auxiliar na caracterização e identificação dos tipos de fibras mencionados e distingui-las em tipos adicionais (SÂNGER; STOIBER, 2001).

A musculatura estriada esquelética dos peixes é composta predominantemente de músculo branco. As fibras brancas representam mais de 70% da massa do músculo miotomal e são as fibras de maiores diâmetros, atingindo entre 50 e 100 μm ou mais. A proporção da área da secção transversal do músculo miotomal correspondente ao músculo branco varia ao longo do comprimento do peixe: é maior na parte anterior do animal, diminuindo em direção à cauda (SÂNGER; STOIBER, 2001).

As fibras musculares lentas, ou vermelhas, estão comumente restritas a uma faixa estreita superficial ao longo da linha lateral, com uma inserção na região do septo horizontal e geralmente apresentam um alinhamento paralelo ao eixo do corpo, apropriado para lenta velocidade de movimento do corpo (BONE, 1978).

As fibras musculares vermelhas, de pequeno diâmetro (25-45 μm), usualmente constituem menos de 10% e nunca mais de 30% da musculatura miotomal, estando presentes em maior proporção na região caudal (ZHANG *et al.*, 1996). A proporção de músculo vermelho na região posterior reflete um determinado estilo de vida. Predadores possuem menos de 5% de músculo vermelho na região caudal (LUTHER *et al.*, 1995). Segundo Katz (2002), uma razão potencial para se ter maior quantidade de músculos vermelhos é simplesmente a necessidade de manter velocidade aeróbica superior àquela de presas potenciais ou predadores competitivos, definindo assim, uma estratégia efetiva.

Entre os compartimentos vermelho e branco, encontra-se o compartimento intermediário (musculatura intermediária), com fibras que apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias entre as das fibras musculares brancas e vermelhas (ROMANELLO *et al.*, 1987; MASCARELLO *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1996; SANGER; STOIBER, 2001), como contração rápida e metabolismo oxidativo/glicolítico (FOG, do inglês *fast glycolytic oxidative*) (JOHNSTON *et al.*, 1977). Essas fibras compreendem em torno de 10% da massa miotomal e apresentam diâmetro médio entre as fibras brancas e vermelhas (GILL *et al.*, 1989).

A locomoção e a manutenção dos processos vitais do organismo, como alimentação e respiração, são dependentes da constituição morfofisiológica dos músculos e dos tipos de fibras musculares envolvidas, incluindo o tipo de miosina existente nas fibras (GOLDSPINK *et al.*, 2001). A especialização muscular nos peixes envolve a adaptação associada aos fatores físicos do ambiente e às mudanças do comportamento dos mesmos (JOHNSTON, 1999). Estudos de Johnston *et al.* (1977) mostraram que natação prolongada leva a um aumento na proporção das fibras musculares do músculo vermelho e a um

aumento sutil na proporção das fibras musculares do músculo branco, embora estas sejam passivas nesse tipo de movimento muscular.

Da mesma forma que em outros grupos animais, como os mamíferos, em algumas espécies de peixes, o tecido conjuntivo ao redor de cada fibra muscular recebe o nome de endomísio e o tecido conjuntivo mais desenvolvido, que separa as fibras musculares em grupos, é classificado como perimísio (ALMEIDA *et al.*, 2008; CARANI *et al.*, 2008; MICHELIN, 2007).

A distribuição da matriz extracelular entre as fibras da musculatura estriada dos peixes é específica para cada espécie, na dependência dos movimentos realizados durante a locomoção, porém, é menos desenvolvida que nos mamíferos, não ultrapassando 3% (SATO *et al.*, 1986; 1989).

O músculo esquelético consiste predominantemente de elementos contráteis, mas a íntima associação entre as fibras musculares e o tecido conjuntivo é importante para manter a integridade e a função do músculo inteiro (COHN; CAMPBELL, 2000; TAKALA; VIRTANEN, 2000).

2.4.1 Crescimento do tecido muscular em peixes

O crescimento pós-natal do tecido muscular esquelético nos peixes envolve os mecanismos de hipertrofia e hiperplasia das fibras, a partir da proliferação dos mioblastos indiferenciados ou células mio-satélites (ALFEI *et al.*, 1994; JOHNSTON, 1999; JOHNSTON *et al.*, 2000; DAL PAI-SILVA *et al.*, 2003a, b). Na hipertrofia, as células mio-satélites se fundem a fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas, enquanto que, na hiperplasia, ocorre a formação de novas fibras musculares (KOUMANS *et al.*, 1993; JOHNSTON *et al.*, 2000). Quando a hiperplasia está ocorrendo, observa-se um mosaico de fibras com diferentes diâmetros (fibras grandes e pequenas associadas) e predominam fibras com diâmetro menor que

25 μm . Esse padrão de organização das fibras é melhor observado na musculatura branca (VEGGETTI et al., 1990; JOHNSTON, 1999) (Figura 7).

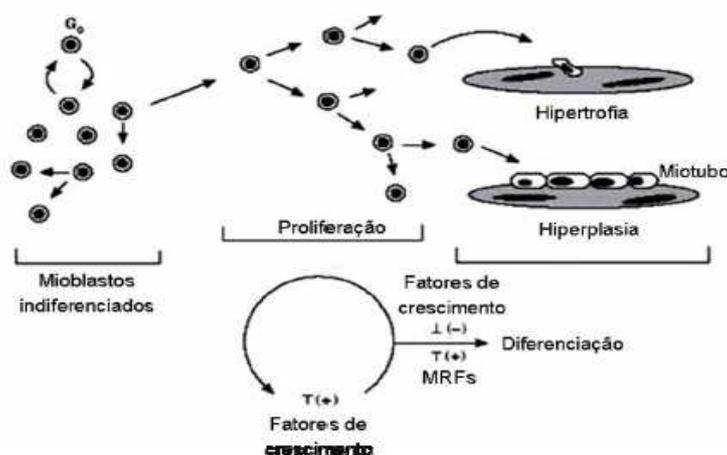


Figura 7 - População de mioblastos indiferenciados (mioblastos adultos ou células mio-satélites). A proliferação e diferenciação dos mioblastos ocorrem sob o controle da expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs) e de fatores de crescimento.

Fonte: Johnston (1999)

A hiperplasia pode ocorrer de forma estratificada ou em mosaico. A hiperplasia estratificada ocorre em todas as espécies de peixes, a partir das zonas germinais de proliferação de mioblastos, localizadas nas regiões dorsal e ventral dos miótomos e entre os compartimentos vermelho e branco. Esse tipo de hiperplasia é responsável pelo espessamento das camadas musculares nas fases iniciais do desenvolvimento. A hiperplasia em mosaico resulta em um grande aumento no número de fibras musculares, principalmente na fase juvenil, sendo observada na musculatura das espécies de grande valor comercial que atingem um tamanho maior (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001). A contribuição da hipertrofia e da hiperplasia, no crescimento do tecido muscular, pode variar de

acordo com a espécie e a fase de crescimento estudadas (BROOKS; JOHNSTON, 1993; JOHNSTON, 1993).

Entre todos os vertebrados, os peixes apresentam uma característica peculiar, principalmente quando os padrões de crescimento muscular são considerados. Com poucas exceções, os peixes tendem a apresentar crescimento indeterminado (MOMMSEN, 2001). Nos mamíferos, a hiperplasia cessa em um determinado período após o desenvolvimento embrionário (GOLDSPINK *et al.*, 2001). Nos peixes, a hiperplasia e a hipertrofia contribuem por todo o período de crescimento da musculatura estriada esquelética. Nas espécies que atingem tamanho de poucos centímetros, o crescimento muscular envolve principalmente a hipertrofia de fibras formadas nas fases iniciais da embriogênese, e o período de crescimento hiperplásico é mais curto. Nas espécies que atingem um tamanho maior, novas fibras musculares são continuamente recrutadas em todas as fases do crescimento (ALAMI-DURANTE *et al.*, 1997; ROWLERSON; VEGGETTI, 2001; WEATHERLEY *et al.*, 1988).

A retomada de eventos ocorridos durante a miogênese é observada durante o crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura (WATABE, 1999).

Nas fases iniciais de crescimento, a proliferação dos mioblastos e a hiperplasia celular podem ser inferidos pela maior expressão dos MRFs MyoD e Myf5 (JOHANSEN; OVERTURF, 2005). Já na fase adulta, a expressão de miogenina e MRF4 está relacionada com os processos de diferenciação dos mioblastos e hipertrofia das fibras musculares (JOHANSEN; OVERTURF, 2005). O balanço entre os mecanismos de crescimento muscular hipertrófico e hiperplásico pode determinar a taxa de crescimento e o tamanho da espécie, sendo dependente de vários fatores como, temperatura, fotoperíodo, regime alimentar e composição da dieta (ASSIS *et al.*, 2004; BRODEUR *et al.*, 2002; JOHNSTON *et al.*, 2000)

2.4.1.1 Efeito da ractopamina sobre o metabolismo protéico

O músculo estriado esquelético é o primeiro tecido no qual ocorre síntese protéica em animais alimentados com β -adrenérgicos como a ractopamina, mas a hipertrofia depende da adequada ingestão protéica advinda da dieta (BERGEN *et al.*, 1989; SAINZ; WOLF, 1990; YANG; McELLIGOTT, 1989). A deposição protéica em células musculares, *in vitro*, pode ser aumentada pela ação de β -adrenérgicos e esse efeito pode ser bloqueado por β -antagonistas (ANDERSON *et al.*, 1990). Isso demonstra que o aumento na hipertrofia muscular devido ao uso de β agonistas é mediado por uma via de sinalização de receptores do tipo β ; entretanto, outros tipos de estimulação do músculo esquelético também são propostos (BERGEN *et al.*, 1989).

O mecanismo pelo qual a ractopamina leva ao aumento da síntese muscular é controverso. Alguns estudos demonstram que a ractopamina reduz a degradação protéica e não estimula sua síntese (BUTTERY; DAWSON, 1990; YANG; McELLIGOTT, 1989; GOLL *et al.*, 1989). Todavia, quando a síntese protéica muscular foi avaliada utilizando-se aminoácidos marcados (BERGEN *et al.*, 1987), quase todos os estudos que utilizaram esta técnica concluíram que os agonistas β -adrenérgicos aumentam a síntese de proteínas (BERGEN *et al.*, 1989; CLAEYS *et al.*, 1989, MacLENNAN; EDWARDS, 1989).

Após a alimentação com um β -agonista, a excreção urinária de nitrogênio é rapidamente diminuída, portanto, é provável que haja uma redução na degradação protéica no músculo esquelético (EADARA *et al.*, 1989). Após alimentação continuada com este tipo de aditivo a capacidade de síntese protéica do músculo (rRNA) e a abundância de mRNA miofibrilar são aumentadas (HELFERICH *et al.*, 1990). Portanto, essas respostas metabólicas aos β -agonistas indicam que a síntese protéica é a via principal de síntese protéica durante a hipertrofia do músculo estriado esquelético. De forma geral, os efeitos

somatogênicos, endócrinos e metabólicos da ação dos β -agonistas no metabolismo protéico estão resumidos na figura 8.

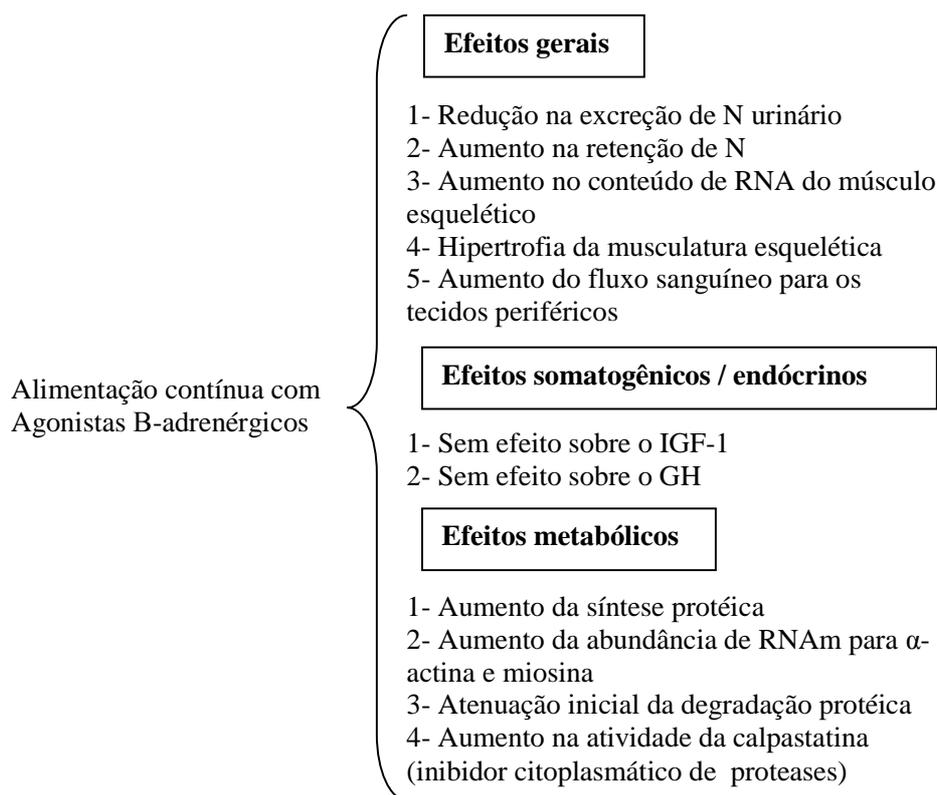


Figura 8 Resumo esquemático dos efeitos dos agonistas β -adrenérgicos, como a ractopamina sobre o metabolismo protéico
 Fonte Adaptado de Bergen e Merkel (1991)

2.4.1.2 Efeito da ractopamina sobre o metabolismo lipídico

A redução na gordura corporal é a maior consequência metabólica ao se alimentar animais com ractopamina. A redução da gordura corporal associada ao tratamento com β -agonistas pode ser uma consequência do aumento do gasto

energético, por aumento do metabolismo, ou devido a alterações na síntese e deposição dos lipídeos.

Os agonistas β -adrenérgicos, como a ractopamina, reduzem a deposição lipídica estimulando a lipólise e inibindo a lipogênese (YANG; McELLIGOT, 1989). O aumento da lipólise é dependente do aumento da atividade da enzima triacilglicerol lipase.

Já a redução da lipogênese no tecido adiposo se deve à diminuição na atividade das enzimas lipogênicas, que pode ser atribuída, em parte, à regulação alostérica via fosforilação por cAMP dependente da atividade da proteína quinase e em parte por uma redução na expressão dos genes das enzimas lipogênicas (DICKERSON, 1990).

Em suínos alimentados com ractopamina, há aumento na mobilização lipídica e redução na atividade das enzimas málicas e do complexo ácido graxo sintetase (MERKEL *et al.*, 1987a). Os efeitos da ractopamina sobre a deposição lipídica, lipólise, atividade de enzimas lipogênicas e expressão lipídica foram estudados em células adipogênicas do tipo TA1. A exposição de células TA1, diferenciadas e repletas de lipídeos, à ractopamina induziu uma redução imediata na síntese de ácidos graxos. A exposição crônica das células TA1 à ractopamina foi acompanhada por uma diminuição na abundância do mRNA para acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintetase e glicerol fosfato desidrogenase (BABII; BOOTH, 1988). O efeito da ractopamina sobre as células TA1 pode ser mimetizado pela adição de cAMP exógeno ao meio de cultura celular, na ausência de ractopamina e pode ser revertido pelo β -antagonista propranolol. Um resumo sobre a ação dos β -agonistas sobre o metabolismo lipídico está descrito na figura 9.

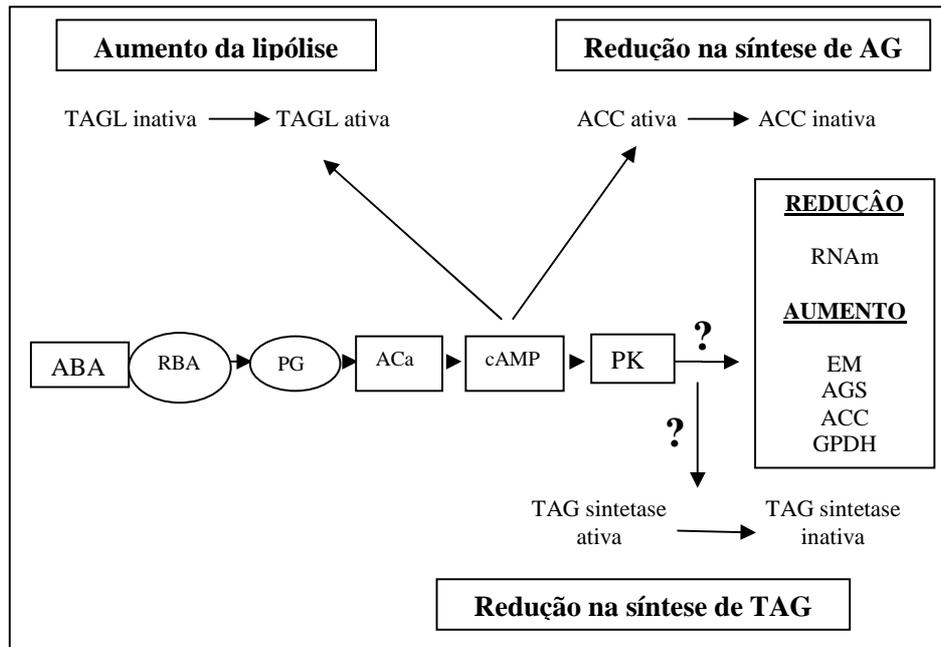


Figura 9 Desenho esquemático da ação de agonistas β -adrenérgicos, como a ractopamina sobre o metabolismo lipídico

ABA = Agonista beta adrenérgico, RBA = Receptor beta adrenérgico, PG = Proteína G, ACa = Adenilato ciclase ativa, cAMP = Monofosfato de adenosina cíclico, PK = Proteína quinase, TAG = Triacilglicerol, EM = Enzima málica, AGS = Ácido graxo sintase, ACC = Acetil CoA carboxilase, GPDH = glicerol fosfato desidrogenase, TAGL = Triacilglicerol lipase, AG = ácidos graxos.

Fonte Adaptado de Bergen e Merkel (1991)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e duração do experimento

O experimento foi conduzido na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) durante o período de agosto a outubro de 2011. As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia. O período experimental foi de 60 dias precedido de 10 dias de período pré-experimental para adaptação dos animais.

Para realização do experimento foram utilizadas as instalações do laboratório de metabolismo de peixes que dispunha de 40 caixas de fibra de vidro com volume útil de 75 L, dispostas em sistema de recirculação de água equipado com filtros de areia, ultravioleta e biológico além de um termostato para controle da temperatura.

3.2 Animais e instalações

Foram adquiridos de piscicultura comercial no município de Cana Verde, MG, 40 exemplares de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), com aproximadamente um ano de idade e peso inicial médio de 864 ± 75 gr.

Os animais foram transportados até o Laboratório de Metabolismo de Peixes da UFLA, onde foram alojados em caixas de fibra de vidro (um animal por caixa), com capacidade útil de 75 L cada, ligadas a um sistema de recirculação com filtros de areia, ultravioleta e biológico e com controle de temperatura por termostato.

3.3 Dietas

A ração fornecida aos animais foi formulada e preparada no Departamento de Zootecnia da UFLA, de acordo com as exigências da espécie e sem a inclusão de ractopamina. A esta ração basal foram suplementadas as quatro concentrações de ractopamina avaliadas (11,25, 22,5, 33,75 e 45 ppm).

Após a mistura dos ingredientes, a ração foi peletizada (peletizadora Marca CPM 2000) e, em seguida, foi seca a 40°C em estufa com ventilação forçada por aproximadamente 24 horas e armazenada em freezer a -18°C. A composição da dieta base encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 Composição percentual e nutricional da dieta-base experimental

Ingredientes (kg)	Ração basal ²
Farelo de soja	40,50
Fubá de milho	34,88
Farinha de peixe ³	8,00
Farelo de trigo	8,00
Óleo de soja	3,52
Fosfato bicálcico	3,80
Vitamina C	0,06
Suplemento vitamínico/mineral ⁴	0,50
BHT	0,02
Sal comum	0,20
L-Lisina (78%)	0,19
DL-Metionina	0,28
L-Treonina	0,05
Ractopamina	0,00
Proteína bruta (%)	31,28
Energia bruta (kcal/kg)	4099,10
Extrato etéreo (%)	7,08
Ractopamina (ppm)	0,00

² Ração basal sem ractopamina. ³ Farinha produzida a partir de resíduos da indústria de filetagem do salmão. ⁴ Fornecimento de vitaminas e minerais/kg de ração: Vitamina A: 1500 UI, Vitamina B1: 20 mg, Vitamina B2: 15 mg, Vitamina B3: 1000 UI, Vitamina B12: 10 µg, Vitamina E: 25 mg, Vitamina PP: 120 mg, Colina: 2000 mg, Pantetonato de Cálcio: 80 mg, Ácido Fólico: 2 mg, Manganês: 80 mg, Ferro: 24 mg, Zinco: 50 mg, Cobre: 8 mg, Iodo: 3 mg, Selênio: 0,10 mg, BHT: 170 mg.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Arraçoamento

O arraçoamento foi realizado duas vezes por dia, às 08:00 e 16:00 h, sendo que a quantidade diária foi fornecida até a saciedade dos animais. Diariamente, 30 minutos após o término da primeira alimentação, as caixas eram sifonadas.

Diariamente, mensurou-se o consumo de ração de cada animal por meio da subtração dos pesos dos potes de ração antes e após a alimentação, para determinação do consumo total aparente ao final do experimento.

3.4.2 Parâmetros limnológicos

Durante todo o período experimental os parâmetros limnológicos foram monitorados e registrados diariamente. O pH, temperatura e teores de oxigênio na água foram determinados por meio de equipamentos digitais (pHmetro, termômetros e oxímetro, respectivamente) enquanto os teores de nitrito e amônia tóxica foram quantificados utilizando-se kits comerciais (Labcon[®]).

Todos os parâmetros limnológicos avaliados encontraram-se dentro dos intervalos aceitáveis para pacus, sendo: temperatura = $27,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$, oxigênio dissolvido = $5,73 \pm 0,49$ mg/L, pH = $6,92 \pm 0,18$, nitrito = $0,089 \pm 0,007$ ppm e amônia tóxica = $0,0007 \pm 0,0002$ ppm.

3.4.3 Coleta de sangue e análises sanguíneas

Antes da manipulação e abate, no último dia do experimento, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas e, procedeu-se à coleta de sangue através

de punção da veia caudal utilizando tubos vacutainer[®]. Posteriormente, o sangue coletado foi centrifugado (Centrífuga Excelsa baby II, Modelo 206-R e 15 minutos, 3.500 rpm) e o soro foi coletado para a determinação das concentrações de triglicérides e proteínas totais utilizando-se para isso kits colorimétricos comerciais (Labtest[®], Triglicérides Liquiform, cat. 87 e Proteínas totais, cat. 99).

3.4.4 Abate e análises

No último dia do experimento, os 40 animais foram sedados (em caixa de transporte de 45L com benzocaína na concentração de 150 mg/L), abatidos e eviscerados descartando-se também a pele com escamas e a cabeça.

Os filés foram recolhidos, pesados (para cálculo da taxa de rendimento dos filés = [peso filé/peso do animal] x 100), acondicionados em embalagens plásticas e congelados a -20°C até a realização das análises bromatológicas. Os teores de proteína bruta, extrato etéreo, cinzas e umidade no filé foram determinados segundo metodologias da AOAC (1990), sendo o teor de proteína bruta determinada pelo método Microkjeldhal; o percentual de extrato etéreo foi obtido utilizando-se o método de Soxhlet e éter etílico como solvente; o teor de cinzas pelo método gravimétrico com aquecimento em mufla a 550°C e a umidade estabelecida pela secagem da amostra em estufa a 105°C até atingir peso constante.

Fragmentos de 8x4x4 mm do músculo branco da região dorsal de cada um dos animais foram coletados e imediatamente fixados em solução de Karnovsky modificada (2,5% glutaraldeído, 2% formaldeído em tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,4). Após a fixação, as amostras foram submetidas às técnicas histológicas de rotina com inclusão em resina plástica e coloração com hematoxilina-eosina, para realização das análises microscópicas de crescimento muscular (hiperplasia e/ou hipertrofia) e deposição de tecido adiposo entre as

fibras musculares. As lâminas foram observadas em lente de aumento de 10x em um microscópio Olympus CX31 (Olympus, Japão) acoplado a uma câmera digital Altra SC30 (Olympus, Japão). Para a avaliação do crescimento muscular, utilizou-se o programa de análises morfométricas SIS Cell B (Olympus, Japão), mensurando-se em cada lâmina, os diâmetros de 200 fibras musculares (DUBOWITZ; BROOKE, 1973). Os valores dos diâmetros obtidos foram distribuídos em classes de frequências (adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2008) com o objetivo de avaliar o grau de ocorrência de crescimento hipertrófico e hiperplásico do tecido muscular (VEGGETTI *et al.*, 1990). Para determinação da deposição do tecido adiposo entre as fibras musculares, um quadriculado contendo 1.564 intersecções para cada imagem foi utilizado, com o auxílio do programa Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD), contou-se o número de intersecções nestes tecidos, além de se efetuar a mesma contagem nos campos sem tecido algum atribuindo a este item, o nome artefato. Após a mensuração de todas as imagens de um mesmo animal (mesma lâmina) determinou-se o percentual de distribuição de cada um dos tecidos, excluindo-se previamente, a contagem dos artefatos.

Fragmentos de fígado de todos os animais foram retirados, congelados em nitrogênio líquido e posteriormente submetidos ao processo de extração hepática segundo Ribeiro (2007), com modificações para determinação da atividade específica das enzimas Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) seguindo o proposto por Graeve *et al.* (1994) e enzima málica (EM) conforme protocolo de Spina *et al.* (1966). Todos os protocolos estão descritos nos APÊNDICES A, B e C, respectivamente.

3.4.5 Delineamento e análises estatísticas

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente causalizado com cinco tratamentos (0, 11.25, 22.5, 33.75 e 45 ppm de ractopamina) e oito repetições por tratamento.

Os resultados referentes ao consumo de ração e taxa de rendimento dos filés, bem como composição química dos filés e atividade específica das enzimas G6PD e EM, foram submetidos à análise de variância e posterior teste de Student-Newman-Keuls (SNK) a 5% de probabilidade, com o auxílio do pacote estatístico SAEG.

Os resultados do crescimento muscular e a deposição de tecido adiposo entre as fibras musculares dos filés de pacu foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade e, quando significativo, os dados foram submetidos ao teste de comparações múltiplas de Nemenyi, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros sanguíneos avaliados no presente estudo foram influenciados ($P < 0,05$) pelo nível de inclusão da ractopamina na dieta (Tabela 2). Os peixes alimentados com as dietas contendo 33,75 e 45,00 ppm de ractopamina apresentaram maior concentração sérica de triglicerídeos comparados aos peixes dos demais tratamentos. Essa elevação dos triglicerídeos circulantes poderia estar relacionada a diversos fatores, dentre eles, a lipólise. Segundo Peters et al. (1980) e Vijayan et al. (1991), as catecolaminas, e as substâncias semelhantes à ela, como a ractopamina, facilitam a utilização de triglicerídeos, aumentando a concentração de ácidos graxos livres, sendo uma possível fonte energética em condições de aumento de demanda fisiológica em peixes submetidos ao estresse.

Tabela 2 Concentrações séricas de triglicerídeos e proteína total de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) em terminação alimentados com dietas contendo níveis crescentes de ractopamina

Nível de ractopamina na dieta (ppm)	Triglicerídeos (mg/dL)	Proteína total (g/dL)
0	307,41B	4,78B
11,25	262,96B	5,05B
22,50	329,01B	5,23B
33,75	622,22A	5,01B
45,00	606,17A	6,52A
Coefficiente de variação (%)	20,96	10,00

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), a 5% de probabilidade.

De modo semelhante, Haji-Abadi *et al.* (2010) também observaram aumento do teor de triglicérideo sanguíneo em juvenis de truta arco-íris alimentadas com ração contendo ractopamina, comparado aos animais do tratamento controle sem ractopamina. Por outro lado, Hoshi *et al.* (2005) não observaram correlação entre a ractopamina da dieta e o teor deste parâmetro para suínos, demonstrando que distintas espécies podem responder de modo diferente a este β -adrenérgico.

Por outro lado, apenas a inclusão de 45,00 ppm de ractopamina acarretou aumento no teor de proteínas totais no plasma. Em relação aos peixes alimentados com a dieta basal sem ractopamina, o uso de 45,00 ppm de ractopamina aumentou a concentração de proteínas circulantes em aproximadamente 36%.

Essa elevação dos triglicérides circulantes juntamente com a elevação da proteína total seriam resultados esperados da ação da ractopamina, o estímulo à lipólise. Entretanto, essa afirmação não pode ser confirmada unicamente com os resultados de parâmetros sanguíneos uma vez que o efeito do estresse sobre estes parâmetros são amplamente divulgados.

Como o kit utilizado para a determinação de triglicérides no presente estudo não é seletivo, ou seja, dosa todo e qualquer tipo de triglicérideo circulante, não se pode afirmar que a diferença estatística encontrada seja devido à ação lipolítica da ractopamina o que sugere que o aumento observado esteja relacionado ao estresse sofrido pelos animais (arraçoamento, manejo, etc.).

O que aparenta ter acontecido é que a partir de 22,5 ppm de inclusão de ractopamina, o estresse causado por ela acarretou num aumento gradativo nas concentrações dos parâmetros avaliados sugerindo que a ractopamina agiu como agente estressor e levou a um desequilíbrio metabólico dos animais, como resposta secundária a este estresse.

O nível máximo de suplementação da ractopamina avaliado neste trabalho (45,00 ppm) reduziu ($P < 0,05$) a atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e málica em até 36,45% e 61,90%, respectivamente (Tabela 3). De modo semelhante, Mills *et al.* (1990) e Merkel *et al.* (1987b) também constataram redução da atividade de enzimas lipogênicas no tecido adiposo de suínos alimentados com dietas suplementadas com ractopamina.

Tabela 3 Atividade específica da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e enzima málica determinada no extrato hepático de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) em terminação alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de ractopamina

Nível de ractopamina na dieta (ppm)	G6PD (U/mg de proteína)	Enzima málica (U/mg de proteína)
0	1,7375A	0,2625A
11,25	1,8175A	0,2400A
22,50	1,7100A	0,2125A
33,75	2,0025A	0,2550A
45,00	1,2725B	0,1000B
Coefficiente de variação (%)	14,08	11,82

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), a 5% de probabilidade.

A via das pentoses-fosfatos é a principal rota metabólica responsável pelo fornecimento de NADPH para o organismo, sendo esta molécula um importante redutor bioquímico. A enzima G6PD catalisa a reação de oxidação irreversível da glicose-6-fosfato + NADP a 6-fosfogliconolactona + NADPH e representa um importante ponto de regulação da via das pentoses-fosfato (CHAMPE *et al.*, 2009). No fígado, a maior parte do NADPH produzido é

utilizada para a biossíntese de ácidos graxos e por isso a G6PD é reconhecida como uma enzima lipogênica (ALVAREZ *et al.*, 1999). Outra importante enzima lipogênica é a malato-desidrogenase dependente de NADP (também conhecida como enzima málica) que também produz NADPH através da oxidação do malato à piruvato. Portanto, a diminuição da atividade das enzimas hepáticas G6PD e málica verificada nos pacus em terminação alimentados com o uso de 45,00 ppm de ractopamina na dieta, permite inferir que houve inibição da lipogênese culminando na menor produção de NADPH no hepatócito e consequente redução da biossíntese de ácidos graxos nesses animais.

Os resultados encontrados na avaliação das enzimas hepáticas demonstraram a inibição da lipogênese ao nível celular, entretanto, esta inibição não foi observada nos parâmetros de desempenho avaliados ($P > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 Consumo de ração (g) ao final dos 60 dias de experimento e taxa de rendimento dos filés (%), de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) em terminação alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de ractopamina

Nível de ractopamina na dieta (ppm)	Consumo de ração (g)	Taxa de rendimento dos filés (%)
0	648,63 A	44,84 A
11,25	626,88 A	44,98 A
22,50	615,25 A	45,98 A
33,75	639,50 A	46,32 A
45,00	630,13 A	46,24 A
Coefficiente de variação (%)	8,74	3,90

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), a 5% de probabilidade.

Em parte dos estudos conduzidos com diferentes grupos animais como suínos e ovinos, o efeito maior e mais marcante da suplementação de ractopamina na dieta é a melhora no desempenho (CROME *et al.*, 1996; BRUMM *et al.*, 2004; MIMBS *et al.*, 2005). O fato de não terem sido

encontrados efeitos significativos sobre o desempenho neste estudo pode estar relacionado a duas diferentes hipóteses. A primeira, é que a redução nas atividades enzimáticas tenha ocorrido na fase final do experimento e, o tempo entre esta redução e o término do experimento foi insuficiente para que se pudesse visualizar diferenças significativas no desempenho dos animais. A outra hipótese segue a linha proposta para os resultados encontrados para os parâmetros sanguíneos. Os níveis mais altos de inclusão de ractopamina levaram ao estresse do animal, culminando na redução das atividades enzimáticas, no nível mais alto de inclusão testado, como resposta ao desequilíbrio metabólico causado pelo beta-adrenérgico no organismo dos animais.

Um fato que corrobora os resultados encontrados para os parâmetros de desempenho é a fase em que os animais se encontravam quando submetidos ao estudo. É sabido que o crescimento dos peixes ocorre de forma diferente dos outros grupos animais já estudados. Enquanto suínos apresentam grande ganho de peso na fase de terminação, a maioria dos peixes, neste mesmo período, apresenta baixas taxas de crescimento e, em algumas espécies, na terminação, o crescimento já está praticamente completo (JOHNSTON, 1999). Por isto, alterações no desempenho não são esperadas para animais nesta fase.

Diversos estudos conduzidos com peixes também não encontraram resultados significativos da suplementação da ractopamina sobre os parâmetros de desempenho (VANDENBERG; MOCCIA, 1998; VANDENBERG *et al.*, 1998; WEBSTER *et al.*, 1995). Contradizendo os resultados referentes ao consumo encontrados no presente estudo, alguns autores relatam que o uso da ractopamina na dieta reduz o consumo de alimento (APPLE *et al.*, 2007), mas não influencia o ganho de peso (MIMBS *et al.*, 2005).

Não houve diferenças ($P > 0,05$) significativas nos níveis de proteína bruta e cinza dos filés de pacu. Devens *et al.* (2012), estudando a inclusão de ractopamina para juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*), também não verificaram

influência da suplementação do beta adrenérgico sobre esses mesmos parâmetros e Bicudo *et al.* (2012) não verificaram qualquer diferença na composição corporal de pacus alimentados, por 60 dias, com diferentes níveis de inclusão de ractopamina (0-40 mg/kg de dieta). O fato de não ter sido encontrada diferença estatística para o teor de proteína bruta é corroborado pelo resultado encontrado para análise de crescimento através da mensuração do diâmetro das fibras musculares (Tabela 5). Desta forma, pode-se concluir que, nas condições do presente estudo, a inclusão de ractopamina não teve influência sobre o crescimento muscular de pacus na fase de terminação.

No presente estudo, reduções significativas ($P < 0,05$) no extrato etéreo foram encontradas nos animais que receberam a dieta contendo 11,25 ppm de ractopamina (Tabela 5). De forma semelhante, Boscolo *et al.* (2009) relataram uma diminuição da gordura corporal de pacus alimentados, por 30 dias, com rações contendo de 2,5 a 10 mg de ractopamina por quilo de dieta.

Diferenças significativas ($P < 0,05$) também foram observadas para o teor de umidade dos filés (Tabela 5). A relação inversa entre extrato etéreo e umidade é amplamente conhecida. Por isso, era de se esperar, uma vez que os outros parâmetros não apresentaram diferenças estatísticas, que tal resultado fosse encontrado. Resultados semelhantes ao do presente estudo, demonstrando a relação inversa entre EE e U foram encontrados por Souza *et al.* (2002), que verificaram hidratação dos tecidos e diminuição nos teores de extrato etéreo em pacus quando submetidos a períodos de restrição alimentar.

Tabela 5 Frequência percentual de distribuição de fibras, em classes de diâmetros (μm), do músculo branco de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) em terminação alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de ractopamina

Nível de ractopamina na dieta	% de fibras segundo as classes de diâmetros		
	< 30 μm	30 a 50 μm	>50 μm
0 ppm	9,2 A	24,3 A	66,5 A
11,25 ppm	6,9 A	27,0 A	66,1 A
22,50 ppm	11,9 A	27,9 A	60,2 A
33,75 ppm	10,7 A	25,3 A	64,0 A
45,00 ppm	9,1 A	24,5 A	66,4 A
p>Qui-quadrado*	0,4296	0,5495	0,4602

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Walis, a 5% de probabilidade.

Tabela 6 Teores de umidade e extrato etéreo, em g/100g de matéria seca, determinados nos filés de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) em terminação alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de ractopamina

Nível de ractopamina na dieta (ppm)	Proteína Bruta (%)	Extrato etéreo (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
0	25,37 A	6,51 A	1,29 A	66,83 B
11,25	21,92 A	3,40 B	1,35 A	73,33 A
22,50	22,96 A	5,52 A	1,32 A	70,20 AB
33,75	23,25 A	5,25 A	1,40 A	70,10 AB
45,00	21,87 A	6,19 A	1,31 A	70,63AB
Coefficiente de variação (%)	19,53	19,67	17,30	2,87

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem-se entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), a 5% de probabilidade.

Corroborando com os resultados obtidos na avaliação do extrato etéreo dos filés, a análise realizada para avaliar a deposição do tecido adiposo entre as fibras de tecido muscular demonstrou que apenas o tratamento com inclusão de 11,25 ppm de ractopamina diferiu entre os demais ($P < 0,05$) (Tabela 7), apresentando uma menor deposição de tecido adiposo entre as fibras. A figura 10 mostra as fotomicrografias dos tratamentos evidenciando a menor deposição de tecido adiposo no tratamento de 11,25 ppm de ractopamina.

Tabela 7 P-valores do teste de comparação múltipla de Nemenyi, para avaliação de diferença de deposição de tecido adiposo entre as fibras musculares de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) em terminação alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de ractopamina

P-valores do teste de Nemenyi		Tratamento B			
		11	22	33	45
Tratamento A	0	0,0117*	0,9981	0,4424	0,9716
	11	-	0,0261*	0,0466*	0,0497*
	22	-	-	0,5954	0,9970
	33	-	-	-	0,7982

P-valor do Teste de Kruskal-Wallis significativo a 5% de significância: 0,0089*

* Diferenças significativas ($P < 0,05$) ao teste Nemenyi, de comparações múltiplas.

Os resultados encontrados nos presente estudo podem estar relacionados ao período prolongado, 60 dias, de utilização da ractopamina. Assim como no presente estudo, Boscolo *et al.* (2009) relataram redução no percentual de gordura de peixes tratados com ractopamina, por 30 dias, mas não encontraram diferenças quando os parâmetros foram avaliados após 60 dias de tratamento.

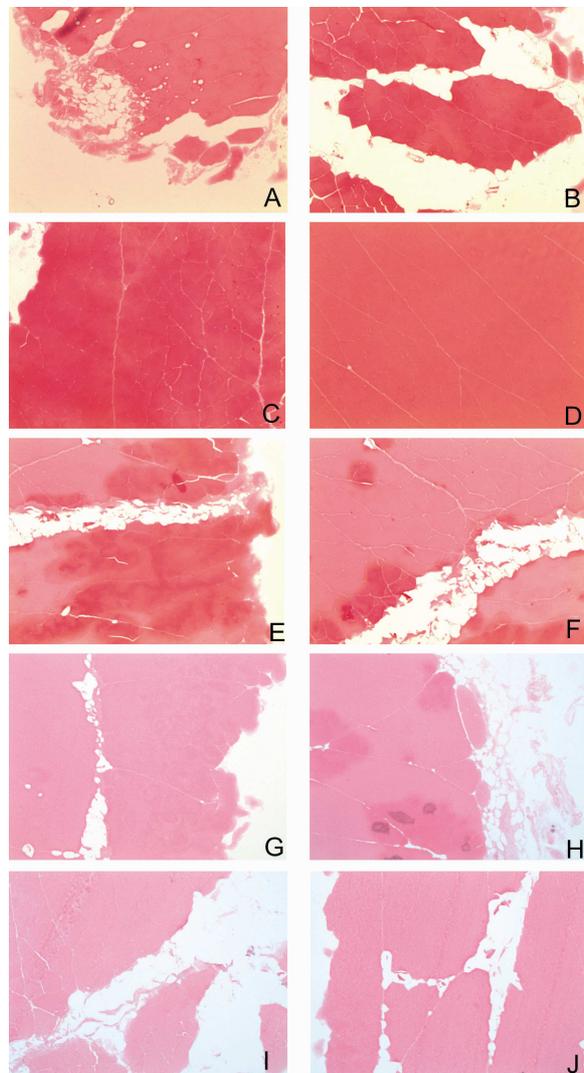


Figura 10 Seção transversal de músculo esquelético branco de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), em fase de terminação alimentados com rações contendo níveis crescentes de inclusão de ractopamina

(A, B) = Tratamento 1 – 0ppm, (C, D) = Tratamento 2 – 11,25 ppm, (E, F) = tratamento 3 – 22,50 ppm, (G, H) = tratamento 4 – 33,75 ppm, (I, J) = tratamento 5 – 45 ppm. Aumento 10X (todas), coloração HE (hematoxilina-eosina).

Como a ação da ractopamina, assim como os demais beta-adrenérgicos, é dose e tempo dependente, é possível que os níveis mais altos de inclusão tenham levado ao processo de dessensibilização ou *down regulation*. Outra hipótese levantada é que os níveis mais elevados de inclusão levam a um desequilíbrio metabólico evidenciado pelo aumento na concentração dos parâmetros sanguíneos e redução na atividade das enzimas lipogênicas avaliadas. Embora muitas hipóteses sejam levantadas, apenas com estudos mais aprofundados e que levem em conta diferentes níveis de inclusão e tempo de administração da ractopamina é que se pode chegar a uma conclusão.

5 CONCLUSÕES

A inclusão de 11,25 ppm de ractopamina reduziu os níveis de extrato etéreo dos filés de pacu. Inclusões superiores levam possivelmente a um desequilíbrio metabólico com aumento nas concentrações de triglicerídeos e proteínas totais circulantes, redução da atividade das enzimas lipogênicas sem causar qualquer alteração nos parâmetros de desempenho.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, O. S. et al. **Níveis de ractopamina para suínos: efeitos no desempenho e características de carcaça associado ao diâmetro das fibras musculares.** In: FÓRUM INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 4, 2008, Curitiba. Anais... Curitiba: Animal World, 2008, p.104-105.

ALAMI-DURANTE, H. et al. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to somatic growth rate. **J. Fish Biol.**, v.50, n.6, p.1285-1302, 1997.

ALEXANDER, R. The orientation of muscles fibres in the myomers of fish. **J. Mar. Biol. Assoc.**, v.49, p.263-290, 1969.

ALMEIDA, F. L. A. et al. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Micron**, v.39, p.1306–1311, 2008.

ALVAREZ, M. J. et al. The partial substitution of digestible protein with gelatinized starch as na energy source reduces susceptibility to lipid oxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle. **J. Anim. Sci.**, v.77, p. 3322-3329,1999.

ALVES, J. M. C. **Níveis de lipídeos em dietas para o crescimento inicial do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).** 1999. 57f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ANDERSON, P. T. et al. Ractopamine increases total and myofibrillar protein synthesis in cultured rat myotubes. **J. Nutr.**, v.120, p.1677-1683, 1990.

APPLE , J. K. et al. Review: meta-analysis of the ractopamine response in finishing swine. **Prof. Anim. Sci.**, v.23, n.3, p.179-196, 2007.

ARMSTRONG, R. B.; PHELPS, R. O. Muscle fiber type composition on the rat hindlimb. **Am. J. Anat.**, v.171, p.259-272, 1984.

ARMSTRONG, R. B. et al.. Distribution of fiber types in locomotory muscles. **Am. J. Anat.**, v.163, p.87-98, 1982.

ARNESEN, P.; KROGDAH, L. A.; SUNDBY, A. Nutrient digestibilities, weight gain and plasma and liver levels of carbohydrate in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) fed diets containing oats and maize. **Aquaculture Nutrition**, v.1, n.3, p.151-158 Sept. 1995.

ASSIS, J. M. F. et al. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, v.237, p.251-67, 2004.

BABIJ, P.; BOOTH, F. W. Clenbuterol prevents or inhibits loss of specific mRNAs in a trophying rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p.C657-C660, 1988.

BARROS, R. D. A. et al. Via beta-adrenérgica em corações normais e hipertrofiados. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.72, p.641-648, 1999.

BENOVIC, J. L. et al. Regulation of adenylyl cyclase-coupled & adrenergic receptors. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v.4, p.405-428, 1988

BERGEN, W. G. et al. Muscle protein metabolism in finishing pigs fed ractopamine. **J. Anim. Sci.**, v.67, n.9, p.2255-2262, 1989.

BERGEN, W. G., MERKEL, R. A. Body composition of animals treated with portioning agents: implications for human health. **The FASEB Journal**, v.5, p.2951-2957, 1991.

BERGEN, W. G.; et al. Muscle protein metabolism in finishing pigs fed ractopamine. **J. Anim. Sci.**, v.67, n.9), p.2255-2262, Sept. 1989.

BONE, Q. Locomotor muscle. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (ed.) **Fish physiology**. vol. VII. New York: Academic Press, 1978. p.361-424.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.7, n.72, p.248-254, May 1976.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62**, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2003.

BRODEUR, J. C.; PECK, L. S.; JOHNSTON, I. A. Feeding increases MyoD and PCNA expression in myogenic progenitor cells of *Nototheniacoriiceps*. **J. Fish Biol.**, v.60, p.1475-1485, 2002.

BRUMM, M. C.; MILLER, P. S.; THALER, R. C. Response of barrows to space allocation and ractopamine. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.3373-3379, 2004.

BUTTERY, P. J.; DAWSON, J. M. Growth promotion in farm animals. **Proc. Nutr. Soc.**, v.49, p.459-466, 1990.

CANTARELLI, V. S. **Ractopamina em rações para suínos em terminação com alimentação à vontade ou restrita**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2007. 108p.

CANTELMO, O. A. **Níveis de proteína e energia em dietas para o crescimento do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmbey, 1887)**. 1993. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARANI, F. R. et al. Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (*Teleostei, arapaimidae*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.30, n.2, p.205-211, 2008.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 446p.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Biochemistry: lippincott's illustrated reviews**. 4th ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 528p.

CLAEYS, M. C. et al. Skeletal muscle protein synthesis and growth hormone secretion in young lambs treated with clenbuterol. **J. Anim. Sci.**, v.67, n.9, p.2245-2254, 1989.

COHN, R. D.; CAMPBELL, K. P. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve**, v.23, n.10, p.1456-1471, 2000.

CROME, P. K. et al. Effect of ractopamine on growth performance, carcass composition and cutting yields of pigs slaughtered at 107 and 125 kilograms. **J. Anim. Sci.**, v.74, n.4, p.709-716, Apr. 1996.

DAL PAI-SILVA, M.; DAL PAI, V.; MOTA, D. L. Características morfológicas e histoquímicas do tecido muscular do *Synbranchus marmoratus*, com fenótipo I e II. **Rev. Bras. Biol.**, v.55, p.685-691, 1995.

DAL PAI-SILVA, M. et al. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histochemical, ultrastructural and morphometric study. **Tissue Cell**, v.35, p.179–187, 2003a.

DAL PAI-SILVA, M. et al. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. **Arch. Fish Mar. Res.** v.50, p.149–160, 2003b.

DIAS, J. et al. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v.161, p.169–186, 1998.

DICKERSON, P. S. **The effect of the phenethanolamine ractopamine on lipid metabolism of the adipogenic cell line TA1**. PhD Dissertation. Michigan State University, East Lansing. 1990.

DRIEDZIC, W. R.; HOCHACHKA, P. W. Control of energy metabolism in fish white muscle. **Am. J. Physiol.**, v.230, n.3, p.579-582, 1976.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. H. **Muscle biopsy: a modern approach**. London: Saunders, 1973. 220p.

DUNSHEA, F. R. et al. Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. **Meat Sci.**, v.71, n.1, p.8-38, Sept. 2005.

EADARA, J. K. et al. Effects of cimaterol, a adrenergic agonist, on protein metabolism in rats. **Metabolism**, v.38, n.9, p.883-890, 1989.

FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N. K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.3, p.646-653, 2000.

GILL, H. S. et al. Histochemical characterization of myotomal muscle of five teleost species. **J. Fish Biol.**, v.34, n.3, p.375-386, 1989.

GOLDSPINK, G.; WILKES, D.; ENNION, S. Myosin expression during ontogeny, post-hatching growth, and adaptation. In: JOHNSTON, I. A. (ed.) **Muscle development and growth**. San Diego: Academic Press, 2001. Cap.3: p.43-72.

GOLL, D. E.; KLEESE, W. C.; SZPACENKO, A. Skeletal muscle proteases and protein turnover. In: CAMPION, D. R.; HAUSMAN, G. J.; MARTIN, P. J.

(eds.) **Animal growth regulation**. New York: Plenum Publishing, 1989. p.141-182.

GONZALEZ, F. H. D.; DA SILVA, S. C. **Introdução a bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2006. 360p.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 11.ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2006.

HAJI-ABADI, S. M. A. J. et al. Effects of supplemental dietary l-carnitine and ractopamine on the performance of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquac. Res.**, v.41, p.1582-1591, 2010.

HELPERICH, W. G. et al. G. Skeletal muscle alpha-actin synthesis is increased pretranslationally in pigs fed the phenethanolamine ractopamine. **Endocrinology**, v.126, n.6, p.3096-3100, 1990.

HEO, K. et al. Dietary L-carnitine improves nitrogen utilization in growing pigs fed low energy, fat-containing diets. **J. Nutr.**, v.130, n.7, p.1809–1814, 2000.

HOSHI, E. H. et al. Muscle fibre number and growth performance of pigs from sows treated with ractopamine. Asian-australas. **J. Anim. Sci.**, n.18, p.1492–1497, 2005.

JOHANSEN, K. A.; OVERTURF, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Marine Biotechnology**, v.7, n.6, p.576-87, 2005.

JOHNSTON, I. A. et al. Muscle fibre density in relation to colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo solar L*). **Aquaculture**, v.189, n.3-4, p.335-349, 2000.

JOHNSTON, I. A. Structure and function offish muscles. In: DAY, M.H. (Ed.) **Vertebrate locomotion**. Symposia of the Zoological Society of London, No. 48, London: Academic Press, 1981. p.71-113.

JOHNSTON, I. A. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. **Aquaculture**, v.177, p.99-115, 1999.

JOHNSTON, I. A.; DAVISON, W.; GOLDSPINK, G. Energy metabolism of carp swimming muscles. **J. Comparison Physiol.**, v.114, p.203-216, 1977.

KILARSKI, W. Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach *Rutilus rutilus* (L). **J. Fish Biol.**, v.36, n.3, p.353-62, 1990.

KOUMANS, J. T. M. et al. Growth of carp (*Cyprinus carpio*) white axial muscle; hyperplasia and hypertrophy in relation to the myonucleus/sarcoplasm ratio and the occurrence of different subclasses of myogenic cells. **J. Fish Biol.**, v.43, p.69-80, 1993.

KOUMANS, J. T. M.; AKSTER, H. A. Myogenic cells in development and growth of fish. **Comparative Biochem. Physiol.**, v.110, n.1, p.3-20, 1995.

LAWRENCE, V. J.; COPPACK, S. W. The endocrine function of the fat cell-regulation by the sympathetic nervous system. **Horm. Metab. Res.**, v.32, n.11-12, p.453-467, 2000.

LEEB-LUNDBERG, L. M. et al. Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. I. Agonist-promoted desensitization and phosphorylation of alpha 1-adrenergic receptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v.262, n.7, p.3098-3105, 1987.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 1232p.

LIKIMANI, T. A.; WILSON, R. P. Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue. **J. Nutr.**, v.112, n.1, 112-117, 1982.

LIN, H. et al. Influence of diet on in vitro and in vivo rates of fatty acid synthesis in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). **J. Nutr.**, v.107, n.9 p.1677-1682, 1977.

LINHART, H. G. et al. C/EBP α is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, n.22, p.12532-12537, 2001.

MAcLENNAN, P. A.; EDWARDS, R. H. T. Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass. Evidence that clenbuterol stimulates muscle β_2 -adrenoceptors to induce hypertrophy. **Biochem.J.**, v.264, n.2, p.573-579, 1989.

MASCARELLO, F. et al. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L): I. Myosin expression and organization of fibre types in lateral

muscle from hatching to adult. **J. Muscle Res. Cell Motil.**, v.16, n.3, p.213-222, 1995.

MAYES, P. A. Gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway. In: GRANNER, D. K. et al. (eds.) **Harper's Biochemistry**. Michigan: Appelton & Lange, 1988. p.172-179.

McGRAW, D. W.; LIGGETT, S. B. Molecular mechanisms of beta2-adrenergic receptor function and regulation. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v.2, n.4, p.292-296, 2005.

MERKEL, R. A. et al. The effect of ractopamine on subcutaneous adipose tissue metabolism in pigs. **Research Report**, v.487, p.143, 1987a.

MERKEL, R. A. P. S. et al. The effect of ractopamine on lipid metabolism. **FASEB J.**, v.1, p.1177A, 1987b.

MERSMANN, H. J. Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. **J. Anim. Sci.** v.76, n.1, p.160-172, 1998.

MICHELIN, A. C. **Músculo estriado esquelético em peixes: Aspectos estruturais e bioquímicos das fibras e da matriz extracelular durante o crescimento**. 2007. 72f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho - UNESP, Botucatu.

MILLS, S. E. Biological basis of the ractopamine response. **J. Anim. Sci.**, v.80, n.2, p.28-32. 2002.

MILLS, S. E. et al. Effects of ractopamine on adipose tissue metabolism and insulin binding in finishing pigs. Interaction with genotype and slaughter weight. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.6, p.51, 1990.

MILLS, S. E.; SPURLOCK, M. E.; SMITH, D. J. β -Adrenergic receptor subtypes that mediate Ractopamine stimulation of lipolysis. **J. Anim. Sci.**, v.81, n.3, p.662-668, 2003.

MIMBS, K. J. et al. Effects of ractopamine on performance and composition of pigs phenotypically sorted into fat and lean groups. **J. Anim. Sci.**, v.83, n.6, p.1361-1369, 2005.

MOMMSEN, T. P. Paradigms of growth in fish. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v.129, n.2-3, p.207-219, 2001.

MOODY, D. E.; HANCOK, D. L.; ANDERSON, D. B. Phenethanolamine repartitioning agents. In: D'MELLO, J. P. F. D. (ed.). **Farm animal metabolism and nutrition**. New York: CAB, 2000. Cap. 4: p.65-95.

MOORE, K. L. et al. Ractopamine supplementation increases lean deposition in entire and immunocastrated male pigs. **Anim. Prod. Sci.**, v.49, n.12, p.1113-1119, 2009.

MOTTA, T. V. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 4. ed. Porto Alegre: Médica Missau, 2003.

MUSTIN, W. T.; LOVELL, R. T. Feeding the repartitioning agent ractopamine to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) increases weight gain and reduces fat deposition. **Aquaculture**, v.109, p.145-152, 1993.

NANKERVIS, L.; MATTHEWS, S. J.; APPLEFORD, P. Effect of dietary non-protein energy source on growth, nutrient retention and circulating insulin-like growth factor I and triiodothyronine levels in juvenile barramundi, *latipes calcarifer*. **Aquaculture**, v.191, p.323-335, 2000.

OLIVEIRA, A. M. B. M. S.; CONTE, L.; POSSEBON, J. E. Produção de characiformes autóctones. In: CYRINO, J. E. P. et al. (Eds.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt. Cap. 8: p.217-238, 2004.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc. Res. Tech**, v.50, n.6, p.500-509, 2000.

QUEIROZ, J. F. et al. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture**, v.36, p.45-50, 2005.

RAMOS, F.; SILVEIRA, M. I. N. D. Agonistas adrenérgicos β_2 e produção animal: II - Relação estrutura-atividade e farmacocinética. **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, v.96, p.167-175, 2001

RIBEIRO, P. A. P. **Efeito de fontes de ácidos graxos na dieta e da redução da temperatura sobre o metabolismo lipídico de tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) e trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)**. 162f. 2007. Tese (Doutorado em zootecnia, área de concentração nutrição de monogástricos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

RICKE, E. A. et al. Effects of ractopamine Hcl stereoisomers on growth, nitrogen retention, and carcass composition in rats. **J. Anim. Sci.**, v.77, n.3, p.701-707, 1999.

ROMANELLO, M. G. et al. Post-larval growth in the lateral white muscle of the eel *Anguilla Anguilla*. **J. Fish Biol.**, v.30, n.2, p.161-72, 1987.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: JOHNSTON, I. A. (ed.) **Muscle development and growth**. San Diego: Academic Press, 2001. Cap. 5: p.103-140.

SAINZ, R. D.; WOLFF, J. E. Development of a dynamic, mechanistic model of lamb metabolism and growth. **Animal Production**, v.51, n. 3, p.535-549, 1990.

SÄNGER, A. M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: JOHNSTON, I. A. (ed.) **Muscle development and growth**. San Diego: Academic Press, 2001. Cap. 7: p.187-250.

SATO, K. et al. Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissue of fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.92, n.1, p.87-91, 1989.

SATO, K. et al. Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. **Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.**, v.52, n.9, p.1595-1600, 1986.

SCHINCKEL, A. P. et al. Development of a model to describe the compositional growth and dietary lysine requirements of pigs fed ractopamine. **J. Anim. Sci.**, v.81, n.5, p.1106-1119, 2003.

SMITH, D. J. The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of beta-adrenergic agonists in livestock. **J. Anim. Sci.**, v.76, n.1, p.173-194, 1998.

SPURLOCK, M. E. et al. Obese gene expression in porcine adipose tissue is reduced by food deprivation but not by maintenance or submaintenance intake. **J. Nutr.**, v.128, n.4, p.677-682, 1998.

STECH, M. R. **Utilização de soja integral processada em dietas para o crescimento de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 1999. 90f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

TAKALA, T. E.; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v.10, n.6, p.321-325, 2000.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005, p.225-226.

VANDENBERG, G. W.; LEATHERLAND, J.F.; MOCCIA, R. D. The effects of the b-agonist ractopamine on growth hormone and intermediary metabolite concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Res.**, v. 29, p. 79-87, 1998.

VANDENBERG, G. W.; MOCCIA, R. D. Growth performance and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed the b-agonist ractopamine. **Aquaculture Res.**, v. 29, p. 469-479, 1998.

VEGETTI, A. et al. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.): an ultrastructural and morfometric study. **Anat. Embryol.**, v.182, n.1, p.1-10, 1990.

WATABE, S. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. **J. Fish Biol.**, v.55, Suppl A, p.1-18, 1999.

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S. Protein, lipid and caloric contents. In: _____ . **The biology of fish growth**. London: Academic Press, 1989. p.101-146.

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S.; LOBO, A. F. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibre in teleost and their relationship to somatic growth and ultimate size. **J. Fish Biol.**, v.33, n.6, p.851-859, 1988.

WEATHERLEY, A. H.; H. S. GILL. Dynamics of increase in muscle fibers in fishes in relation to size and growth. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.41, n.3, p.353-354, 1985.

WEATHERUP, R. N. et al. The effect of increasing slaughter weight on the production performance and meat quality of finishing pigs. **J. Anim. Sci.**, v.67, p.591-600, 1998.

WEBSTER, C. D. et al. Effects of feeding the repartitioning agent L644,969 on growth and body composition of bluecatfish, *Ictalurus furcatus*, fed diets

containing two protein levels reared incages. **Aquaculture**, v.134, p.247-256, 1995.

WINZER, K.; Van NOORDEN, C. J. F.; KOEHLER, A. Sex-specific biotransformation and detoxification after xenobiotic exposure of primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.) **Aquat. Toxicol.**, v.59, p. 17-33, 2002.

YANG, Y. T.; MCELLIGOTT, M. A. Multiple actions of, B-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. **Biochem. J.**, v.261, n.1, p.1-10, 1989.

ZHANG, G.; SWANK, D. M.; ROME, L. C. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenotomus chrysops*. **J. Morphol.**, v.229, n.1, p.71-81, 1996.

APÊNDICE A - Obtenção do extrato hepático, segundo Ribeiro (2007), com modificações

Pesou-se 0,1g do fígado de cada animal. Esse material foi macerado, em gral de porcelana mantido sobre banho de gelo, na presença de 0,4 mL de tampão HEPES-KOH 25 mM e pH 7,2. Após completa homogeneização do tecido, o extrato foi submetido a banho ultrassônico por 10 minutos (Ultrasonic Cleaner Unique) e foi centrifugado a 10.000 xg por 30 minutos a 4°C (Centrifuga refrigerada a ar Sigma modelo 2K15) sendo o sobrenadante recolhido e armazenado em tubo eppendorf.

Em seguida, o *pellet* foi re-suspendido em 0,4 mL do tampão, homogeneizado em vortex e levado ao banho ultrassônico seguido de centrifugação com posterior recolhimento do sobrenadante o qual foi reunido ao sobrenadante resultante da primeira centrifugação.

O procedimento de resuspensão do *pellet* foi realizado três vezes, de modo que o extrato hepático final obtido correspondeu à proporção de 0,1g de fígado para 1,2 mL de tampão.

Os extratos hepáticos foram congelados à -20°C até a realização dos ensaios cinéticos para a determinação da atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e málica.

APÊNDICE B - Determinação da atividade específica da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

A determinação da atividade da G6PD (E.C. 1.1.1.49) hepática foi realizada segundo protocolo de Graeve (1994) que se baseia na ação da G6PD presente na amostra sobre o substrato D-glicose-6-fosfato com a formação de 6-fosfo-D-gluconato, na presença de β -NADP.

O ensaio cinético foi feito em microplacas de 96 poços sendo adicionados em cada poço: 210 μ L de água deionizada + 50 μ L de tampão HEPES-KOH 25 mM (pH 7,2) + 10 μ L de NADP 20 mM (SIGMA N0505) + 10 μ L de $MgCl_2$ 300 mM + 10 μ L de D-glicose-6-fosfato 60 mM (SIGMA G7879) + 10 μ L do sobrenadante do extrato hepático. Para cada amostra, realizou-se também o branco amostra (ou branco enzima) substituindo-se a D-glicose-6-fosfato pelo tampão.

A placa foi incubada a 25°C em um leitor de microplacas automático (Bio-Tek Instruments, PowerWaveTM XS Microplate Scanning Spectrophotometer) previamente programado para realizar leituras de absorbância em $\lambda=340$ nm a cada 15 segundos de reação durante um período máximo de 240 segundos.

Posteriormente, os dados do ensaio enzimático foram utilizados para gerar uma curva linear crescente, sendo os valores da absorbância plotados no eixo y do gráfico e o tempo de reação no eixo x. O cálculo da atividade da enzima G6PD foi feito pelo uso da seguinte equação:

$$\text{Atividade volumétrica (U/L)} = \frac{(\text{IRA} - \text{IRBA}) \times \text{VT} \times 1000}{\epsilon \times V}$$

IRA = inclinação da reta resultante do ensaio cinético com a amostra (absorbância/segundo)

IRBA = inclinação da reta do branco amostra (absorbância/segundo)

VT = volume total da reação em μL ($300\mu\text{L}$)

ε = coeficiente de extinção molar do NADPH, a 340nm ($6,22 \text{ L/mmol}$)

V = volume do extrato hepático em μL ($10\mu\text{L}$)

O teor de proteína nas amostras (mg de proteína/mL de extrato hepático) foi dosado segundo Bradford (1976) usando a albumina sérica bovina como padrão a fim de permitir o cálculo da atividade específica da G6PD conforme descrito a seguir:

Atividade específica (U/mg de proteína) = atividade volumétrica \div teor de proteína na amostra.

Portanto, a atividade G6PD foi expressa em U, sendo que U é a quantidade de enzima que gera $1\mu\text{mol}$ de 6-fosfo-D-gluconato, na presença de β -NADP, por 1 segundo de reação em $\text{pH} = 7,2$ e 25°C .

APÊNDICE C - Determinação da atividade da enzima málica (EM)

A determinação da atividade da enzima málica (E.C.1.1.1.40) hepática foi realizada segundo protocolo de Spina *et al.* (1966) que se baseia na ação da enzima málica presente na amostra sobre o substrato L-malato com a formação de piruvato, na presença de β -NADP.

O ensaio cinético foi feito em microplacas de 96 poços sendo adicionados em cada poço: 109 μ L de água deionizada + 92 μ L de tampão HEPES-KOH 25 mM (pH 7,2) + 15 μ L de NADP 20 mM (SIGMA N0505) + 6 μ L de $MnCl_2$ 50 mM + 8 μ L de NH_4Cl 40mM + 31 μ L de KCl 1M + 31 μ L de malato 100 mM (SIGMA M1125) + 15 μ L do sobrenadante do extrato hepático. Para cada amostra, realizou-se também o branco amostra (ou branco enzima) substituindo-se o malato pelo tampão.

A placa foi incubada a 25°C em um leitor de microplacas automático (Bio-Tek Instruments, PowerWave™ XS Spectrophotometer) previamente programado para realizar leituras de absorvância em $\lambda=340$ nm a cada 15 segundos de reação durante um período máximo de 105 segundos. Posteriormente, os dados do ensaio enzimático foram utilizados para gerar uma curva linear crescente sendo os valores da absorvância plotados no eixo y do gráfico e o tempo de reação (em segundos) no eixo x. O cálculo da atividade da enzima málica foi feito pelo uso da seguinte equação:

$$\text{Atividade volumétrica (U/L)} = \frac{(\text{IRA} - \text{IRBA}) \times \text{VT} \times 1000}{\epsilon \times V}$$

IRA = inclinação da reta resultante do ensaio cinético com a amostra (absorvância/segundo)

IRBA = inclinação da reta do branco amostra (absorvância/segundo)

VT = volume total da reação em μL (307 μL)

ε = coeficiente de extinção molar do NADPH, a 340nm (6,22 mmol/L)

V = volume do extrato hepático em μL (15 μL)

Assim como para a enzima G6PD, O teor de proteína nas amostras foi dosado segundo Bradford (1976), sendo a atividade específica (U/mg de proteína) obtida pela razão matemática entre a atividade volumétrica e teor de proteína na amostra. A atividade da enzima málica foi expressa em U, sendo que U é a quantidade de enzima que gera 1 μmol de piruvato, na presença de β -NADP, por 1 segundo de reação à pH = 7,2 e 25°C.

ANEXO A - Análises de variância

Tabela 1 - Análise de variância da concentração de triglicérides circulantes após 60 dias de experimento

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ractopamina	4	484065,2	121016,3	15,199	0,00004
Resíduo	15	119431,5	7962,099		
CV* (%) = 20,96					

*Coeficiente de Variação

Tabela 2 - Análise de variância da concentração de proteínas totais circulantes após 60 dias de experimento

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ractopamina	4	7,615087	1,903772	6,719	0,00263
Resíduo	15	4,249953	0,2833302		
CV* (%) = 10,00					

*Coeficiente de Variação

Tabela 3 - Análise de variância da atividade específica enzimática, hepática, da G6PD, após 60 dias de experimento

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ractopamina	4	1,157020	0,2892550	4,998	0,00920
Resíduo	15	0,868100	0,578733e ⁻⁰¹		
CV* (%) = 14,08					

*Coeficiente de Variação

Tabela 4 - Análise de variância da atividade específica enzimática, hepática, da EM, após 60 dias de experimento

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ractopamina	4	0,7011842e ⁻⁰¹	0,1752961 e ⁻⁰¹	27,73	0,00000
Resíduo	15	0,885000 e ⁻⁰²	0,6321429e ⁻⁰³		
CV* (%) = 11,82					

*Coeficiente de Variação

Tabela 5 - Análise de variância do teor de umidade dos filés após 60 dias de experimento

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ractopamina	4	63,77145	15,94286	3,903	0,02476
P inicial	1	2,787892	2,787892	0,683	-
Resíduo	14	57,18191	4,084422		
CV* (%) = 2,87					

*Coeficiente de Variação

Tabela 6 - Análise de variância do teor de extrato etéreo dos filés após 60 dias de experimento

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ractopamina	4	16,05177	4,012943	3,590	0,03246
P inicial	1	6,169049	6,169049	5,519	-
Resíduo	14	15,64857	1,117755		
CV* (%) = 19,67					

*Coeficiente de Variação

Tabela 7 - Análise de variância do teor de matéria mineral dos filés após 60 dias de experimento

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ractopamina	4	0,3467802	0,869505e ⁻⁰¹	1,803	0,18438
P inicial	1	0,8625275e ⁻⁰²	0,862527e ⁻⁰²	0,179	-
Resíduo	14	0,6731430	0,4808165e ⁻⁰¹		
CV* (%) = 17,30					

*Coeficiente de Variação

Tabela 8 - Análise de variância do teor de proteína bruta dos filés após 60 dias de experimento

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Ractopamina	4	28,71007	7,177517	0,624	-
P inicial	1	0,9254939	0,9254939	0,080	-
Resíduo	14	161,1091	11,50779		

CV* (%) = 19,53

*Coeficiente de Variação