

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Câmpus de Botucatu

CÁLCIO E FÓSFORO PARA JUVENIS DA TILÁPIA-DO-NILO

MARIUCHA KARINA HONÓRIO RIBEIRO ROCHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos requisitos para obtenção
de título de Doutor(a).

B O T U C A T U - S P
J A N E I R O / 2 0 1 6

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Câmpus de Botucatu

CÁLCIO E FÓSFORO PARA JUVENIS DA TILÁPIA-DO-NILO

MARIUCHA KARINA HONÓRIO RIBEIRO ROCHA
Zootecnista

Orientador: Dr. Luiz Edivaldo Pezzato

Co-orientador: Dr. Pedro de Magalhães Padilha

B O T U C A T U - S P
JANEIRO/ 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R672c Rocha, Mariucha Karina Honório Ribeiro, 1983-
Cálcio e fósforo para juvenis da tilápia-do-nilo / Mariucha Karina Honório Ribeiro Rocha. - Botucatu : [s.n.], 2016

vii, 141 f. : fots. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2016

Orientador: Luiz Edivaldo Pezzato

Coorientador: Pedro de Magalhães Padilha

Inclui bibliografia

1. Peixe - Alimentação e rações. 2. Cálcio na nutrição animal. 3. Fósforo na nutrição animal. 4. Minerais na nutrição animal. I. Pezzato, Luiz Edivaldo. II. Padilha, Pedro de Magalhães. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

*“Você se torna responsável
por aquilo que cativas”*

Antoine De Saint-Expéry

Dedicatória

Dedico meu trabalho a Deus e a minha família, Mozar, Fátima e Katiucha

Agradecimentos

Agradeço ao orientador Luis Edivaldo Pezzato pela presteza e paciência a mim dedicados. Meus agradecimentos se estendem a professora Margarida Maria Barros pelo apoio a minha formação e a todos os colegas do AquaNutri. Agradecimento especial aos meus amigos Rafael L. da Silva, Eric P. de Araújo, Lara W. Genovez e Alis C. Bitarello.

Não poderia esquecer é claro, de agradecer a Gisele Setznagel do laboratório de Bromatologia, ao José do Laboratório de solos, Silene Padilha do laboratório de química, aos funcionários dedicados da pós-graduação e aos professores Dirlei A. Berto, Pedro M. Padilha, Wilian F. Zambuzzi, Luiz F. Barbisan e Katiucha Rocha pelos auxílios prestados.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e tecnológico – CNPq.

A todos dedico meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
CAPITULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	2
Considerações iniciais.....	2
<i>Relação cálcio fósforo.....</i>	<i>3</i>
<i>Cálcio.....</i>	<i>5</i>
<i>Absorção de cálcio.....</i>	<i>8</i>
<i>Necessidade de cálcio.....</i>	<i>9</i>
<i>Fósforo.....</i>	<i>9</i>
<i>Exigência de fósforo para peixes.....</i>	<i>11</i>
<i>Absorção de fósforo.....</i>	<i>15</i>
<i>Fosfatase alcalina.....</i>	<i>16</i>
<i>Aspartato aminotransferase.....</i>	<i>16</i>
<i>Adenosina Trifósforo Sintetase (ATPase).....</i>	<i>16</i>
Referências bibliográficas.....	18
Capitulo II	30
RELAÇÃO CÁLCIO E FÓSFORO PARA TILÁPIA-DO-NILO:	
DESEMPENHO PRODUTIVO E MINERALIZAÇÃO ÓSSEA.....	31
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e métodos.....	34
<i>Dietas experimentais.....</i>	<i>34</i>
<i>Ensaio experimental.....</i>	<i>34</i>
<i>Coleta de amostras.....</i>	<i>35</i>
<i>Análises químicas.....</i>	<i>36</i>
<i>Análise histológica.....</i>	<i>36</i>
Análise estatística.....	36
Comitê de ética.....	36
Resultados.....	37

<i>Desempenho</i>	37
<i>Mineralização</i>	37
Discussão.....	38
Referências bibliográficas.....	40
Tabela 1.....	43
<i>Composition of basal and experimental diets (dry matter 100%)</i>	43
Tabela 2.....	44
<i>Initial body weight (IBW), Final body weight (FBW), Body weight gain (BWG), Morphometric vertebral length (MVL) Feed conversion (FC) and Survival of juvenile Nile-tilapia fed diets containing various levels of calcium and phosphorus</i>	44
Tabela 3.....	45
<i>Calcium (Ca) and phosphorus (P) levels and Ca/P ratio in scale, vertebrae and carcass of juvenile Nile-tilapia fed diets containing various levels of calcium and phosphorus</i>	45
Figura 1.....	46
<i>Vertebrae histological section of juvenile Nile tilapia fed diets containing 0 (1A); 0,34:0,51 (1B); 0,51:0,51 (1C); 0,67:1,0 (1D) and 1,0:1,0 (1E) of calcium and phosphorus, respectively. Locations represented for * are bone matrix. They represent locations that were performed Morphometric cuts</i>	46
CAPÍTULO III	47
RELAÇÃO CÁLCIO E FÓSFORO PARA TILÁPIA-DO-NILO: UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	48
Resumo.....	48
Abstract.....	49
Introdução.....	50
Material e métodos.....	51
<i>Dietas experimentais</i>	51
<i>Determinação dos coeficientes de absorção aparente</i>	51
<i>Análises bioquímicas</i>	52
<i>Análise estatística</i>	54
Resultados.....	54
<i>Utilização protéica e energética</i>	54
<i>Bioquímica</i>	55

Discussão.....	55
Referências bibliográficas.....	58
Tabela 1.....	61
<i>Composition of basal and experimental diets (dry matter 100%).....</i>	<i>61</i>
Tabela 2.....	62
<i>Analyzed values of Total calcium (Ca_{total}), Phosphorus available ($P_{available}$), Total phosphorus (P_{total}) and Digestibility coefficient (CDA) of Nile tilapia juvenile.....</i>	<i>62</i>
Tabela 3.....	63
<i>Values of protein efficiency rate (PER) protein retention coefficient (PRC), energy retention coefficient (ERC), specific growth rate (SGR), Phosphorus retention (PR) and Ortho-Phosphate of Nile tilapia juvenile.....</i>	<i>63</i>
Tabela 4.....	64
<i>Cholesterol, Triglycerides, Calcium, Protein Alkaline phosphatase enzymatic activity (AF), aspartate aminotransferase (AST) in serum and adenosine triphosphate synthetase (ATPase) in liver of juveline Nile-tilapia fed diets containing various levels of calcium and phosphorus.....</i>	<i>64</i>
CAPÍTULO IV.....	65
IMPLICAÇÕES.....	66

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Considerações iniciais

A produção de pescado mundial no ano de 2012 foi de 138 milhões de toneladas, destas, 136,2 milhões de toneladas foram utilizadas para consumo humano. Estima-se que até 2030 a aquicultura será responsável por mais de 60% da produção mundial de pescado para consumo humano (FAO, 2014 e MAPA, 2015). Breve panorama da aquicultura mundial mostra dados da produção aquícola total em 2012 de 66,6 milhões de toneladas, com 41,9 milhões de toneladas provenientes da aquicultura de água doce e 24,7 da aquicultura marinha (FAO, 2014 e MAPA, 2015).. Em relação a organismos aquáticos cultivados, 44,1 milhões de toneladas oriundas da produção total de peixes, constituindo 36,8 milhões de toneladas de peixes de água doce (FAO, 2014 e MAPA, 2015).

O Brasil apareceu no ano de 2012 em décimo segundo lugar no ranking dos países com maior produção aquícola mundial, com 707.461 toneladas e a China em primeiro lugar produção de 41.108.306 toneladas (FAO, 2014 e MAPA, 2015).

A aquicultura continental no Brasil é representada pela piscicultura com produção de 476.512 toneladas de peixes e entre os peixes cultivados, a tilápia tem grande regionalização, cujo cultivo estende-se da região nordeste, sudeste e parte da região sul (MAPA, 2015).

Devido à baixa produção nacional e ao grande potencial do país para o desenvolvimento da atividade aquícola, medidas estão sendo tomadas para aumentar a produção. Segundo MAPA (2015) entrou em vigor o “Plano de desenvolvimento da aquicultura” cujo objetivo é aumentar a produção aquícola para dois milhões de toneladas até 2020.

O maior desafio da aquicultura hoje é melhorar a qualidade dos efluentes mantendo altos índices de produção. Diversos fatores podem influenciar na qualidade dos efluentes oriundos de atividades aquícolas, dentre eles, relação energia/proteína, manejo alimentar, digestibilidade dos alimentos e excesso de nutrientes (CYRINO et al., 2010).

O fósforo e o nitrogênio são alguns dos resíduos provenientes da aquícola que podem causar eutrofização nas coleções de água (GREEN et al., 2002). Sendo estes, os

nutrientes mais limitantes para produção primária de algas e os mais impactantes em águas doces e ambientes marinhos (BOYD, 1979; 1990). O fósforo não digerido ou o excesso do mineral lixiviado pode estimular o crescimento de algas, resultando em diminuição da qualidade da água no ambiente (JAHAN *et al.*, 2002)

O excesso de cálcio na dieta prejudica a absorção do fósforo, assim como o excesso de fósforo também prejudica a absorção do cálcio (FRACALOSSO E CYRINO, 2013). O mineral cálcio é considerado importante elemento para a utilização do fósforo devido à proteína ligada ao cálcio que atua transportando o cálcio e o fósforo para o intestino (BRODY, 1999; HOUSAIN e YOSHIMATSU, 2014).

O cálcio e o fósforo estão associados tanto no metabolismo quanto na fisiologia animal, além disso, constituem o fósforo de cálcio, principal componente estrutural dos tecidos mineralizados. Ambos minerais também são responsáveis por atuar diretamente no equilíbrio ácido base dos fluidos corporais (NRC, 2011).

O crescimento e a composição química dos peixes são influenciados pela manipulação de diferentes nutrientes nas dietas. Visto que a deficiência de fósforo tem como consequência o aumento da gliconeogênese do fígado e, com isso, incremento na síntese de ácidos graxos a partir dos aminoácidos (TAKEUCHI e NAKAZOE, 1981), tais fatores podem elevar a quantidade de gordura em peixes (TAKEUCHI e NAKAZOE, 1981; ONISH *et al.*, 1987) e alterar as características de carcaça, bem como a deposição lipídica.

A maioria dos peixes mantém a relação cálcio e fósforo constante no corpo (NRC, 2011). Contudo, para manter a proporção destes minerais na vértebra, esta relação deve ser mantida na formulação da dieta dos animais; caso contrário, o excesso de nutrientes será lixiviado e poderá alterar a composição química da água no ambiente (JAHAN *et al.*, 2002). Porém, pesquisas realizadas sobre a mal formação óssea e a prevalência desta condição em peixes são definidas pobremente (LALL e McCREA, 2007).

Relação cálcio e fósforo

A exigência nutricional de cálcio em peixes pode ser atendida pela absorção de cálcio presente na água. Estudos realizados com peixes sugerem que deve ser considerada a proporção de cálcio em relação ao fósforo e a outros minerais, além dos

níveis individuais destes minerais nas dietas (PORN-NGAM et al., 1993, LI et al., 1996). Entretanto, observou-se que juvenis de tilápia-híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) alimentados com dietas não suplementadas de cálcio obtiveram menor ganho de peso e baixo teor do mineral nas escamas, este fato ocorreu devido aos animais estarem circunstancialmente em águas cujo teor do cálcio era de 30mg L^{-1} (SHIAU e TSENG, 2007). ROBINSON et al. (1987) observaram que a exigência de cálcio para tilápia-áurea (*Oreochromis aureus*) criados em água livre de cálcio é de $7,0\text{g kg}^{-1}$ de cálcio na dieta. O aproveitamento de cálcio da água varia de acordo com a capacidade da espécie de peixe e a suplementação na dieta pode ser necessária, principalmente em águas com baixos teores de cálcio dissolvido (FRACALOSSI E CYRINO, 2013).

Estudo com carpa-comum apresentou como resultado relação negativa entre a quantidade de fósforo absorvida e os teores de cálcio na dieta (NAKAMURA et al., 1982). O excesso de cálcio na dieta em relação ao fósforo afetou negativamente o crescimento e a sobrevivência da garoupa (YE et al., 2006). A absorção de fósforo em carpa comum e truta-arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*) foi reduzida com o aumento dos níveis de cálcio da dieta (PORN-NGAM et al., 1993).

Estudo com “red sea bream” (*Pagrus major*) apresentou a relação cálcio e fósforo satisfatória quando as proporções dos minerais foram de 1:2 e 1:1, respectivamente (SAKAMOTO e YONE, 1973), embora o estudo realizado por LOVELL (1978) não tenha encontrado nenhuma diferença nas relações. As taxas de crescimento do bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com dietas contendo diferentes proporções de cálcio e de fósforo, não apresentaram diferenças quando as dietas continham níveis acima de 3g kg^{-1} de cálcio e 4g kg^{-1} fósforo (LOVELL, 1978).

A exigência de fósforo e a ótima relação cálcio e fósforo no crescimento e composição tecidual da carcaça de “mrigal” (*Cirrhinus mrigala*) foi encontrada nos animais alimentados com dieta contendo a relação 1:4 na dieta. No mesmo experimento, teores de proteína da carcaça, lipídios e fósforo aumentaram com a inclusão de fósforo na dieta. Os níveis de cálcio e fósforo encontrados nesta investigação foi de 0,19: 0,75 (PAUL et al., 2004). Miranda et al. (2000) encontraram nível de $2,5\text{g kg}^{-1}$ de fósforo disponível na dieta para ocorrer a mínima mineralização óssea destes peixes. Segundo estes autores, alevinos da tilápia-do-nilo obtiveram ótimo desempenho com dietas contendo as relações 1:1 e 1:1,5 de cálcio e fósforo.

Cálcio

O cálcio possui papel importante na contração muscular, coagulação sanguínea, transmissão de impulsos nervosos por meio da produção de acetilcolina, na integridade da membrana, na divisão celular, manutenção do equilíbrio ácido-base e na ativação enzimática (PATERSON, 1978; FRACALOSSO E CYRINO, 2013). Além de participar dos diversos processos fisiológicos dos peixes, o cálcio está diretamente envolvido no desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético, sendo encontrado em maior teor nos ossos e escamas (FLIK et al., 1986).

Diversos hormônios interagem para regular o balanço extracelular de cálcio e fósforo. Os mais importantes são o paratormônio (PTH) e o calcitriol (1,25 diidroxivitamina D). O paratormônio é um hormônio polipeptídico que ajuda a regular o cálcio plasmático ao afetar a reabsorção e ou a formação óssea, a excreção e ou reabsorção do Ca^{2+} renal e a síntese do calcitriol, afetando consequentemente a absorção gastrointestinal do Ca^{2+} . Parece não haver nenhuma relação entre as concentrações fisiológicas do fósforo extracelular e a secreção de PTH e a excreção de PTH, exceto quando alterações nas concentrações de fósforo modificam os níveis circulantes de Ca^{2+} (GOODMAN e GILMAN, 2012).

A vitamina D participa da mineralização óssea atuando na deposição do cálcio e do fósforo, ela regula a absorção de cálcio induzindo o transporte do mineral para o lúmen intestinal por meio dos canais de cálcio (BRONNER, 2009). A absorção de cálcio pode ser realizada por meio de transporte ativo e passivo.

Diferença essencial entre vertebrados terrestres e peixes consiste na absorção de cálcio diretamente da água pelo segundo grupo, os quais podem cumprir toda a sua exigência de cálcio ou em parte durante a privação alimentar do mineral (ICHII e MUGIYA, 1983). A absorção de cálcio ocorre, principalmente, por meio das brânquias, sendo estas consideradas mais importantes para a regulação do cálcio fisiológico (HANSSEN et al., 1991; FLIK et al., 1995). Peixes mantêm o nível de cálcio no sangue pela mobilização de cálcio no osso (FLIK et al., 1986).

A capacidade de absorção de cálcio da água varia entre espécies de peixes, sendo a nutrição de cálcio importante devido a falta de cálcio disponível para o crescimento e mineralização óssea em peixes de viveiro. No entanto, a falta de

conhecimento sobre a disponibilidade de cálcio proveniente da dieta e pelo ambiente torna-se difícil determinar a exigência de cálcio para peixes (FRACALOSSI E CYRINO, 2013). A absorção de cálcio da água, a interação do cálcio da dieta e da absorvida por meio da água, da biodisponibilidade a partir de diferentes fontes alimentares, a relação ideal com o fósforo, interação com outros minerais da dieta são áreas importantes a serem estudadas para melhorar a compreensão do mineral na nutrição em peixes (SHIAU e TSENG, 2007).

A suplementação de cálcio na dieta não é necessária para o crescimento de alguns peixes de água doce quando criados em ambiente contendo níveis adequados de cálcio (OGINO e TAKEDA, 1976, 1978; WATANABE et al., 1980; ICHII e MUGIYA, 1983; SHIM e HO, 1989). Este fato também ocorre em algumas espécies de água salgada, não sendo necessária a suplementação de cálcio na dieta de “Black sea bream” (*Acanthopagrus schlegelii*) e “red sea bream” (HOSSAIN e FURUICHI, 1999a,b). Porém, foi observado para “filefish” (*Monacanthus cirrhifer*) o aumento da absorção, na ausência de suplementação de cálcio na dieta (HOSSAIN e FURUICHI, 2008a). A absorção foi baixa em comparação com “redlip-mullet” (*Lisa fraematocheila*), indicando que esta espécie precisa de suplementação de cálcio na dieta, além do cálcio absorvido a partir de água do mar. A suplementação de cálcio na dieta é essencial para “redlip-mullet” (HOSSAIN e FURUICHI, 2000a). Em, “japanese flounder” (*Paralichthys olivaceus*) não ocorreu aumento na absorção de cálcio da água do mar quando o mineral não estava disponível na dieta (HOSSAIN e FURUICHI, 2000b, 2008b). A absorção de cálcio da água do mar e do mineral na dieta é diferente entre os peixes marinhos, o que deve ser considerado antes da suplementação de cálcio nas dietas (HOSSAIN e FURUICHI, 2009). A capacidade de aproveitamento do cálcio na água varia com a espécie de peixe, fazendo com que a suplementação de cálcio na dieta possa ser necessária. Peixes podem absorver o cálcio a partir da água, sendo preocupação importante aos nutricionistas de peixes devido ao fato da necessidade ou não de suplementação (HOSSAIN e YOSHIMATSU, 2014).

Peixes de água doce podem crescer normalmente quando houver cálcio suficiente no ambiente, mesmo alimentados com dieta deficiente do mineral (FLIK e VERBOST, 1993; HWANG et al., 1996). Porém, baixos teores de cálcio na água dos peixes podem limitar o crescimento (RODGERS, 1984).

A suplementação de cálcio na dieta não foi necessária em algumas espécies de peixes de água doce (OGINO e TAKEDA, 1976, 1978; WATANABE et al., 1980; SHIM e HO, 1989). No entanto, para outras espécies existe a necessidade de suplementação de cálcio na dieta, como para carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*), ciclídeo-americano, jundiá (*Rhamdia quelen*), Robalo (*Morone saxatilis*) e tilápia-aurea (ROBINSON et al., 1984;. DOUGALL et al., 1996; CHAVEZ-SANCHEZ et al., 2000; COPATTI et al., 2005; SHIAU e TSENG, 2007; LIANG et al., 2012). A exigência nutricional de cálcio em peixes é atendida preferencialmente por meio da absorção direta deste elemento presente na água, de forma total ou parcial (LOVE, 1980; FRACALOSSI E CYRINO, 2013).

Absorção de cálcio

Os peixes possuem sistema endócrino com funções semelhantes às de mamíferos (LALL e MCCREA, 2007), e apresentam os metabólitos da vitamina D idênticos aos de mamíferos terrestres (NAHM et al., 1979; YANDA e GHAZARIAN, 1981; HAYES et al., 1985; SUNDELL et al., 1992; GRAFF et al., 1999). A vitamina D₃ e 1,25- (OH)₂D₃ estimulam a captação de cálcio intestinal em peixes (FENWICK et al., 1984).

O intestino delgado é órgão importante para a absorção de cálcio e fósforo e, por conseguinte, alvo principal para o sistema endócrino da vitamina D. Estudo em carpa-comum (*Cyprinus carpio*) revelou que enterócitos isoladas expostos a 1,25 (OH)₂D₃ aumentaram a atividade da proteína C quinase não apresentando alteração no teor de cálcio intracelular (NEMERE et al., 2000). O fluxo de cálcio a partir do lúmen para o plasma em enguia-européia (*Anguilla Anguilla L.*) foi estimulada pela 1,25 (OH)₂D₃ dependente da dose (CHARTIER et al., 1979). As concentrações fisiológicas da vitamina D estimulam a captação intestinal de cálcio pelos peixes (FENWICK, 1984).

O bacalhau-do-atlântico (*Gadus morhua*) apresentou aumento da absorção intestinal de cálcio quando suplementado com 25 (OH) D₃ (SUNDELL e BJORNSSON, 1990). Os locais de síntese de 1,25 (OH) D₃ poderiam ser responsáveis pelos efeitos observados a partir do metabólito 25 (OH) D₃; 1,25 (OH)₂D₃ e 24,25 (OH)₂D₃ afetando a absorção de cálcio no intestino desta espécie de peixe (LARSSON et al., 1995).

O teor de cálcio nas escamas da *Tilapia esculentia* é 19 a 24 % do peso seco, sendo as escamas importantes locais de armazenamento e metabolismo do cálcio (GARROD e NEWELL, 1958). A quantidade de cálcio nas escamas dos peixes diminui durante a época reprodutiva e na inanição (YAMADA, 1956; GARROD e NEWELL, 1958)

Necessidade de cálcio

A necessidade de cálcio na dieta é afetada pela composição química da água e pelas diferenças entre espécies (LALL e MCCREA, 2007). Estudos sobre o nível de exigência de cálcio na dieta foram realizados apenas para um número limitado de peixes (HOSSAIN e YOSHIMATSU, 2014). Peixes de água doce podem absorver eficientemente o cálcio disponível da água, porém, algumas espécies necessitam da suplementação do mineral na dieta. Peixes cultivados em águas contendo 20mg L^{-1} de cálcio não necessitavam de suplementação (OGINO e TAKEDA, 1976). A necessidade de cálcio determinada para bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) em águas livres de cálcio foi de $4,5\text{g kg}^{-1}$ (ROBINSON et al., 1986). Em águas livres de cálcio, foi necessário suplementar 7g kg^{-1} de cálcio na dieta para tilápia-do-nilo (ROBINSON et al., 1987).

Tilápia-híbrida criadas em águas contendo cerca de 30mg L^{-1} de cálcio foi encontrada a exigência de $0,4\text{g kg}^{-1}$ do mineral na dieta (SHIAU e TSENG, 2007). A exigência de cálcio na dieta encontrada para carpa capim foi de 1g kg^{-1} (LIANG et al., 2012) e truta-arco-íris apresentaram crescimento máximo com 15g kg^{-1} do mineral suplementado na dieta, sendo que suplementações superiores reduziram o crescimento desta espécie (ANDREWS et al., 1973).

Exigência de cálcio em peixes marinhos como: “Tiger-puffer”, “japanese-flounder” e corvina-gigante (*Nibea japonica*) variam entre 1 e $2,5\text{g kg}^{-1}$ da dieta (HOSSAIN e FURUICHI, 1999c, d, e). A absorção de cálcio da água do mar por “Black sea bream” foi adequada para atender as suas necessidades (SAKAMOTO e YONE, 1976; HOSSAIN e FURUICHI, 1999a, b). Em salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) a suplementação por meio da dieta foi desnecessária devido ao fato de que peixes desta espécie utilizam o cálcio proveniente da água do mar (LALL e BISHOP, 1977). A suplementação de cálcio em dietas para tilápia-azul aumentou os teores de cálcio nos

ossos destes animais em águas com baixos teores do mineral (O'CONNELL e GATLIN, 1994).

Fósforo

O fósforo é um macromineral fundamental para o crescimento e a reprodução dos peixes (ROY e LALL, 2003). Este mineral encontra-se distribuído em todas as células do organismo (LOVELL, 1988) participando de processos metabólicos essenciais, presente nos ácidos nucleicos, fosfolipídios, enzimas, compostos glicolíticos e de alta energia. Atua como moderador covalente na fosforilação oxidativa, ou seja, participa da regulação de inúmeros processos metabólicos, sendo um dos principais ânions da estrutura cristalina dos ossos (BERNE, 1980).

Sinais da deficiência do fósforo podem ser indicados pela falta de apetite, redução na eficiência alimentar, maior acúmulo de gordura na carcaça e menor mineralização dos ossos (NRC, 1993), interferindo diretamente no crescimento do animal. A sua deficiência influencia o metabolismo intermediário exercendo papel importante na transferência de energia química no organismo por meio do trifosfato de adenosina (NELSON E COX et al., 2011) prejudicando a digestibilidade de lipídeos, carboidratos e, conseqüentemente, de energia (RODEHUTSCORD et al., 2000), afetando o crescimento.

A quantidade de fósforo necessária para prevenção da deficiência em peixes varia com o tamanho do animal, taxa de crescimento, estágio de desenvolvimento e fatores externos (SUGIURA et al., 2004). Os primeiros estudos sobre este mineral e sua relação com a estrutura óssea mostraram que vertebrados terrestres podem continuar crescendo com dietas contendo baixos níveis de fósforo, utilizando o nutriente armazenado no sistema esquelético até sua exaustão (SUGIURA et al., 2004).

O alimento possui maior importância que a água para suprir a necessidade em fósforo dos peixes, sendo que aproximadamente 90% do fósforo proveniente desta fonte é destinado a constituição dos tecidos de sustentação (STEFFENS, 1987). Contudo, o fósforo presente nos alimentos convencionais encontra-se parcialmente indisponível na forma de fitato, devido ao fato da mucosa intestinal dos peixes não secretar a enzima fitase (VIELMA et al., 1998.)

Os peixes utilizam suas reservas de fósforo armazenadas no esqueleto e em outros tecidos para suprir suas necessidades de crescimento (LALL, 2002), variando a exigência de acordo com a espécie. As exigências em fósforo dependem da fonte desses minerais e das características do sistema digestório. Esse mineral é absorvido com mais facilidade pelos peixes que possuem estômagos, em relação aos que não o possuem, sendo melhor absorvido em pH ácido (STEFFENS, 1987).

Informações sobre exigências, valor biológico dos alimentos e fontes inorgânicas são dados importantes para formulação de dietas para peixes, sendo essenciais na formulação de rações de baixo custo e que reduzam a excreção de nutrientes como o fósforo para o meio (MUKHOPADHYAY e RAY 1997; PEÑAFLORES, 1999).

O fósforo não absorvido pelo animal será excretado e perdido na água, que após decomposição irá eutrofizar o meio (WEISMANN et al., 1988). Tal impacto ambiental está diretamente relacionado com a quantidade e qualidade do fósforo presente na ração (ROY et al., 2002). A principal inclusão de fósforo no ambiente aquático pela piscicultura é por meio de rações e, conseqüentemente, da excreção dos animais (ODUM e BARRETT, 2007).

A suplementação do mineral é essencial, sobretudo, quando a fonte utilizada é de origem vegetal (SUGIURA et al., 1998) este elemento se apresenta na forma de fósforo fítico ou fitato, indisponível aos peixes (VIELMA e LALL, 1998). A substituição da farinha de peixe por proteína vegetal afeta a digestibilidade e a biodisponibilidade do fósforo na dieta.

As exigências de fósforo para peixes são praticamente satisfeitas pela dieta (WILSON et al., 1982). A absorção do fósforo proveniente da dieta é dependente do grau de moagem do alimento, podendo influenciar na utilização do mineral e na solubilidade do nutriente no ponto de contato com a membrana absorptiva (MC DOWELL, 1992; LI et al., 1996). Além da fonte do mineral na dieta, as exigências do peixe também dependem das características anatômicas das espécies. Em peixes cujo estômago compõe o aparelho digestório, a absorção de fósforos de baixa solubilidade é superior, devido ao pH mais ácido, quando comparada a espécies que não o possuem (STEFFENS, 1987). As taxas de absorção e de assimilação também variam entre as espécies e, conseqüentemente, suas exigências (HEPHER, 1990). Solúveis em ácido, os

fósforos da alimentação são absorvidos em considerável quantidade mediante trocas de formas não iônicas no trato digestório e, por transporte na forma iônica do estômago até músculos e tecidos estruturais (STEFFENS, 1987).

Exigência do fósforo para peixes

Animais alimentados com baixos teores de fósforo disponível apresentaram piora na conversão alimentar, bem como redução do consumo e menor ganho de peso o que pode estar relacionado com a pior relação cálcio e fósforo (FRACALOSSI e CYRINO, 2013). As relações de cálcio e fósforo disponível adequadas para alevinos de tilápia-do-nylo foram de 1,5 e 1,0; fundamentais para o crescimento e a retenção de minerais pela tilápia-do-nylo (FURUYA, 2010).

Existe variabilidade nas exigências de fósforo devido às diferenças da disponibilidade do mineral das dietas, espécies e fase de crescimento. (NRC, 2011). A exigência dietética de fósforo para juvenis de salmão-do-atlhântico, alimentados com dietas contendo 4, 8, 10, 15 e 25 g kg⁻¹ de fósforo e uma ração comercial contendo 17 g kg⁻¹, durante nove semanas, não diferiram em ganho de peso. Porém, os resultados foram menores quando comparado a peixes alimentados com a ração comercial. A eficiência alimentar e teor de fósforo corporal normais indicaram que a exigência para esta fase foi de aproximadamente 10g kg⁻¹(ASGARD e SHEARER, 1997).

Juvenis de salmão-do-atlhântico apresentaram crescimento reduzido consumindo dieta deficiente em fósforo após nove semanas (BAEVERFJORD et al., 1998). Os efeitos de alto e baixo teor de fósforo na dieta para salmão-do-atlhântico foram investigados e, após 30 dias de experimento não foram observados efeitos sobre o peso corporal dos peixes, enquanto que as dietas com baixo teor de fósforo resultaram em aumento do teor lipídico e redução no teor de cinzas, P, Ca, Mg e Zn, comparado aos peixes alimentados com dietas contendo elevados níveis de fósforo (HELLAND et al., 2005).

O nível de fósforo recomendado para máxima mineralização óssea de juvenis de carpa comum foi de 15g kg⁻¹ (Ogino e Takeda, 1976). Em experimento para determinação da exigência de fósforo para alevinos de carpa comum, mostrou que o teor de fósforo corporal aumentou com o aumento dos níveis de fósforo nas dietas. As exigências mínimas de fósforo, baseadas no ganho de peso, teor de fósforo corporal e

excreção de fósforo foram de 6,4; 7,1 e 6,0g kg⁻¹, respectivamente (SUKUMARAM et al., 2009).

Em bagre-do-canal, o fósforo sérico, cinzas e fósforo no osso aumentaram linearmente com o aumento dos níveis do fósforo na dieta (EYA e LOVELL, 1997). Para alevinos de bagre-do-canal alimentados com dietas contendo níveis e relações de cálcio (5,0 a 20g kg⁻¹) e fósforo (5,0 a 12,0g kg⁻¹), a exigência de fósforo disponível foi de aproximadamente 8,0 g kg⁻¹ da dieta. Nestes experimentos os ganhos de peso foram máximos em peixes alimentados com dieta contendo 15,0g kg⁻¹ de cálcio, porém, os valores de cinza nos ossos do crânio e nas vértebras indicaram que a exigência máxima de cálcio para mineralização óssea pode ser maior que para o crescimento ótimo (ANDREWS et al., 1973).

Salmões (*Oncorhynchus nerka*) alimentados com dieta suplementada com fósforo e ferro apresentaram teor elevado de cinzas, cálcio, fósforo, ferro e magnésio no corpo quando comparados aos alimentados com dieta basal, enquanto que os teores de proteína e gordura não diferiram (SEKINE e SATO, 1933).

Juvenis de “milk-fish” (*Chanos chanos*) apresentaram ganho de peso, teores de cinza nos ossos, cálcio e fósforo nas escamas aumentados até o nível de fósforo de 8,9g kg⁻¹ da dieta, sendo o nível de fósforo necessário para o crescimento ótimo e a mineralização de juvenil de “milk-fish” 8,5g kg⁻¹ da dieta (BORLONGAN e SATOH, 2001).

Os valores referentes ao ganho de peso e eficiência alimentar indicaram que as exigências mínimas de fósforo disponível para juvenis de “sunshine bass” (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) foram de 4,1 e 4,6g kg⁻¹ na dieta. Análises de cálcio nos ossos, fósforo dos ossos e escamas indicaram a necessidade mínima de fósforo disponível na dieta de 5,4g kg⁻¹ para a máxima mineralização óssea (BROWN et al., 1993).

O ganho de peso, a conversão alimentar e a eficiência proteica da tilápia-do-nilo foram melhorados com a inclusão de fósforo na dieta (DATO-CAJEGAS e YAKUPITIYAGE, 1996). Os efeitos do aumento do teor de fósforo na ração foram estudados para juvenis de “tiger barb” (*Barbus tetrazona*), sendo o ganho de peso, eficiência alimentar e composição mineral do corpo e ossos afetados pelos níveis fósforo presentes nas dietas. Os peixes alimentados com a dieta contendo baixos níveis

de fósforo apresentaram elevado teor de gordura corporal (ELANGOVAN e SHIM, 1998).

Experimento realizado com juvenis de bacalhau-do-atlântico demonstrou aumento significativo do comprimento do peixe, melhor eficiência alimentar e mineralização óssea adequada com o aumento da suplementação de fósforo (KOUSOULAKI, 2010).

Truta-arco-íris alimentadas com dietas isentas de suplementação de cálcio e fósforo apresentaram redução no apetite, retardo no crescimento, anemia hipocrômica microcítica e, em certa porcentagem dos peixes, convulsão e morte após duas semanas de experimento. Os peixes sobreviventes apresentaram escoliose, lordose e descamação de ossos craniais (OGINO e KAMIZONO, 1975).

Estudo com juvenis de truta-arco-íris relataram valores de cinzas, níveis de fósforo e cálcio corporal e pele com escamas, responsivos para níveis entre 2,3 e 11,6 g kg⁻¹ de fósforo na dieta, enquanto o crescimento dos peixes e a eficiência alimentar não responderam aos níveis de fósforo (SKONBERG et al., 1997).

Estimou-se a exigência de fósforo para “large yellow croaker” (*Pseudosciaena crocea*) cuja taxa de crescimento específico que aumentou com a inclusão de fósforo disponível entre 3,0 a 6,9 g kg⁻¹ na dieta. A composição corporal demonstrou que o teor de fósforo corporal, vértebras e escamas responderam ao nível de fósforo disponível na dieta. A exigência de fósforo disponível mínima para o ótimo crescimento foi de 7,0g kg⁻¹ e para órgãos ou vértebras, de 8,9 e 9,1g kg⁻¹ da dieta, respectivamente (MAI et al., 2006).

A exigência de fósforo foi avaliada para juvenis de robalo-japonês (*Lateolabrax japonicus*), apresentando os teores de cinza, lipídios, proteína, fósforo corporal, vértebras e escamas, responsivos aos níveis de fósforo disponível nas dietas que continham entre 6,8 e 9,0 g kg⁻¹ do mineral (ZHANG et al., 2006).

A exigência de fósforo para o “Black sea bream” cujo nível estimado para o melhor ganho de peso foi de 5,5 g kg⁻¹ de fósforo disponível. O teor de fósforo presente no corpo, vértebras e escamas dos peixes indicou que as necessidades para esta espécie foram atendidas com os níveis de 8,1; 8,7 e 8,8g kg⁻¹, respectivamente. (SHAO et al., 2008).

A necessidade de fósforo para “whitefish” (*Coregonus lavaretus*) mostrou que os peixes alimentados sem suplementação de fósforo apresentaram hipofosfatemia, baixos teores de fósforo corporal e baixos teores de fósforo plasmático. Para obter 95% do teor máxima de cinzas nas vértebras e crescimento máximo, as necessidades de fósforo disponível foram de 6,5 e 6,2g kg⁻¹, respectivamente (VIELMA et al., 2002).

Em juvenis de perca prateada (*Bidyana bidyanus*) a porcentagem de ganho de peso aumentou com a adição de 2,4 a 7,2 g kg⁻¹ de fósforo nas dietas. Os resultados indicaram que o crescimento máximo foi obtido de animais alimentados com dieta contendo 7,1 g kg⁻¹ de fósforo. Os teores de fósforo no plasma aumentaram com os níveis de fósforo de 7,2 e 10,8 g kg⁻¹, porém sem efeitos no teor de cálcio plasmático, magnésio, zinco e atividade da fosfatase alcalina no plasma foram menores em peixes alimentados com dietas com baixos níveis de fósforo. Sinais de deficiência de fósforo foram caracterizados por crescimento deficiente, perda de apetite, coloração escura, menor atividade física, mineralização óssea pobre e aumento no teor de lipídeos no corpo e fígado dos peixes (YANG et al., 2006).

A exigência de fósforo na dieta para juvenis de “chinese sucker” (*Myxocyprinus asiaticus*) alimentados com rações contendo 3,1; 5,3; 7,5; 9,6 e 11,8 g kg⁻¹ de fósforo disponível. Contudo, a exigência mínima de fósforo em dietas para juvenis de “chinese sucker” foi de 7,4 g kg⁻¹, sendo que as exigências estabelecidas pelos teores de fósforo do corpo, vértebras e escamas foram de 8,3, 8,8 e 8,6 g kg⁻¹ de fósforo disponível, respectivamente (YUAN et al., 2011).

Absorção de fósforo

O fósforo é absorvido no duodeno por mecanismo de transporte ativo com co-transporte do íon sódio. A taxa de transporte ativo aumenta com a presença do hormônio calcitrol, considerado a forma ativa da vitamina D3(1,25 (OH)₂D3). O transporte do fósforo no jejuno e íleo ocorre por mecanismo passivo, sendo a taxa de transporte do fósforo dependente principalmente da suo teor no lúmen intestinal (GOODMAN e GILMAN, 2012).

A absorção do fósforo é feita no intestino delgado por meio das fosfatases intestinais que hidrolisam a forma orgânica, assim, a maior parte da absorção do fósforo

ocorre na forma inorgânica (McDOWELL, 1992; MARTINI 2006; DA SILVA e COZZOLINO, 2007).

O íon fósforo representa importante papel no metabolismo de carboidratos, lipídeos, e aminoácidos; no metabolismo dos tecidos musculares e nervosos; nos processos metabólicos que envolvem função tampão em fluidos de corpo (LALL, 2002). A deficiência de fósforo tem como consequência aumento da gliconeogênese no fígado e, com isso, incremento na síntese de ácidos graxos a partir dos aminoácidos (TAKEUCHI e NAKAZOE, 1981).

Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima polifuncional, que funciona como transfosforilase catalisando a transferência de grupos de um composto para o outro, em pH alcalino e desempenhando papel central na mineralização do esqueleto de animais aquáticos (LAN et al., 1995; ZIKIC et al., 2001). A fosfatase alcalina no osso ou no plasma vem sendo usada como indicador de desenvolvimento ósseo. Altos níveis de fosfatase alcalina indicaram peixes hipofosfatêmicos em “red sea bream” (SAKAMOTO e YONE, 1980). A atividade da enzima em juvenis de tilápia híbrida foi menor em peixes alimentados com dietas sem suplementação de cálcio (SHIAU e TSENG, 2007). Alterações nos níveis plasmáticos de fosfatase alcalina podem levar ao aumento da deposição de lipídeos na carcaça (BAEVERFJORD et al., 1998; ZANG et al., 2006., YANG et al., 2006; FURUYA et al., 2008).

Enzimas séricas como a fosfatase alcalina e a aspartato aminotransferase são consideradas marcadores séricos importantes na análise da função hepática de animais.

Aspartato aminotransferase (AST)

A aspartato aminotransferase é uma enzima envolvida no metabolismo de proteínas e aminoácidos (FOLMAR, 1993; ZIKIC et al., 2001). A AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o α -cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato, sendo o oxalato reduzido pela ação da malato desidrogenase, ao mesmo tempo em que a coenzima NADH é oxidada a NAD (STRYER, 1990).

Adenosina trifosfato sintetase (ATPase)

A ATPase desempenha papel importante no transporte de íons através das células e desta forma contribui para o equilíbrio osmótico dos peixes (STAGG et al., 1992; ATLI e CANLI, 2011). A enzima se liga a diferentes cofatores apresentando funções específicas. A Na^+/K^+ -ATPase está envolvida no transporte ativo de eletrólitos através das brânquias. A Ca^{2+} -ATPase possui a função de remover os íons Ca^{2+} do citoplasma para impedir a redução dos níveis de Ca^{2+} séricos. A Mg^{2+} -ATPase é responsável pela regulação trans-epitelial do íon Mg^{2+} , desempenhando papel importante na fosforilação oxidativa e transporte iônico (ATLI e CANLI, 2011). Por meio da fosforilação oxidativa a célula obtém a maior parte da energia a partir da degradação de matéria orgânica. A formação dos complexos de Mg^{2+} isola parcialmente as cargas negativas influenciando a conformação dos grupos fósforo em nucleotídeos tais como ATP e ADP (NELSON E COX, 2011).

A ATPsintetase ou ATPase, é um complexo enzimático localizado na membrana mitocondrial interna que a partir de ADP e fósforo inorgânico, catalisa a formação e hidrólise do ATP, acompanhado por fluxo de prótons (NELSON E COX, 2011). O ATP hidrolisado libera energia que é direcionada para os processos anabólicos onde moléculas simples são ligadas formando moléculas complexas como lipídios, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos.

A ATPase é considerada como biomarcador sensível utilizado para avaliar a fragilidade da membrana das brânquias (STAGG et al., 1992). O fígado é o órgão que desempenha papel vital em diversas vias metabólicas dos peixes (MOON et al., 1985), sendo o principal órgão onde ocorre acumulação, biotransformação e excreção de produtos do metabolismo de xenobióticos (TRIEBSKORN et al., 1994). O fígado possui funções de assimilar e armazenar nutrientes, produzir bile, manter a mineralização corporal com o processamento de carboidratos, proteínas, lipídeos e vitaminas (FRACALOSSI E CYRINO, 2013).

Esta tese foi dividida em dois estudos:

Estudo I: tem como objetivo avaliar a influência do cálcio e fósforo no desempenho produtivo e mineralização óssea de juvenis da tilápia-do-nilo.

Estudo II: tem como objetivo avaliar a influência do cálcio e fósforo na utilização de nutrientes e bioquímica de juvenis da tilápia-do-nilo.

Ambos os artigos foram normatizados de acordo com a revista *Aquaculture Nutrition*.

Referências Bibliográficas

- ANDREWS, J.W., DAVIS, J.W.; CAMPBELL, C. (1973) Effects of dietary calcium and phosphorus on growth, food conversion, bone ash and hematocrit levels of catfish. **Journal Nutr. Philad.**, v. **103**, p. 766-771, 1973.
- ASGARD, T.; SHEARER, K.D. Dietary phosphorus requirement of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar L.* **Aquaculture Nutrition**, v.3, p. 17-23, 1997.
- ATLI, G.; CANLI, M. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology**, v. 20(8), p. 1861-1869, 2011.
- BAEVERFJORD, G.; ASGARD, T.; SHEARER, K.D. Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, parr and postmolts. **Aquaculture Nutrition**, v. 4, p. 1-11, 1998.
- BERNE, R.M. Fisiologia. 2ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1980, 829p.
- BJORNSSON, B.T.; PERSSON, P.; LARSSON, D.; JOHANNSSON, S.H.; SUNDELL, K. Calcium balance in teleost fish: transport and endocrine control mechanism. In: Calcium Metabolism: Comparative Endocrinology. **Bioscientifica Ltd, Bristol, UK**, p. 29-38, 1999.
- BORLOGAN, I.G; SATOH, S. Dietary phosphorus requirement of juvenile milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal). **Aquaculture Research**, v. 32 (suppl 1), p. 26-32, 2001.
- BOYD, C.E. Phosphorous dynamics in ponds. **Proc. Ann. Conference Game Fish Communications**, v. 25, p. 418-442, 1971.
- BOYD, C.E. Water quality in warmwater fish ponds. Auburn:Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 1979.
- BOYD, C.E. Water quality in ponds for aquaculture. Auburn: International Center for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 1990.
- BRODY, T. Calcium and phosphate. In: Nutritional Biochemistry, 2nd. **Academic Press Boston**, p. 761-794, 1999.
- BRONNER, F. Recent development in intestinal calcium absorption. **Nutrition Rev.**, v. 67, p. 109-113, 2009.
- BROWN, M.L.; JARAMILLO, F.; GATLIN, D.M. III. Dietary phosphorus requirement of juvenile sunshine bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. **Aquacult.**, v. 113, p. 355-363, 1993.

- CHARTIER, M.M.; MILLET, C.; MARTELLY, E.; LOPEZ, E.; WARROT, S. Stimulation par la vitamine D₃ et le 1, 25-dihydroxyvitamine D₃ l'absorption intestinale du calcium chez l'anguille (*Anguilla anguilla* L.). **J Physiol (Paris)**, v. 75, p. 275–282, 1979.
- CHAVEZ-SANCHEZ, C.; MARTINEZ-PALACIOUS, C.A.; MARTINEZ-PEREZ, G.; ROSS, L.G. Phosphorus and calcium requirements in the diet of the American cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). **Aquaculture Nutrition**, v.6, p. 1-9, 2000.
- COPATTI, C.E. et al. Effect of dietary calcium on growth and survival of silver catfish fingerlings, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae), exposed to different water pH. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 345-350, 2005.
- COWEY, C.B.; SARGENT, J.R. Nutrition IN: Fish Physiology. **Academic Press, New York**, v. 8, p. 1-69, 1979.
- DA SILVA, A.Y.H.; COZZOLINO, S.M.F. Fósforo. In: Biodisponibilidade de nutrientes. 2ª Ed., Barueri, SP, 2007, p.447-458.
- DATO-CAJEGAS, C.R.S.; YAKUPITIYAGE, A. The need for dietary mineral supplementation for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, culture in a semi-intensive system. **Aquaculture**, v. 14, p. 227-237, 1996.
- DOUGALL, D.S. et al. Dietary phosphorus requirement of juvenile striped bass, *Morone saxatilis*. **J. World Aquaculture Soc.**, v. 27, p. 82-91, 1996.
- ELAGOVAN, A.; SHIM, F. Dietary phosphorus requirement of *juvenile tiger barb*, *Barb tetrazona* (Bleeker,1855). **Aquarium Sciences and Conservation**, v. 2, p. 9-19, 1998.
- ENGLISH, W.R.; SCHWEDLER, T.E.; DYCK, L.A. Aphanizomenon flos-aquae, a toxic blue green alga in commercial channel catfish, *Ictalurus punctatus*, ponds: a case history. **Journal of Appl. Aquacul.**, v. 3, p. 195-209, 1993.
- EYA, J.C.; LOVELL, R.T. Net absorption of dietary phosphorus from various inorganic sources and effect of fungal phytase on net absorption of plant phosphorus by channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 28, p. 386-391, 1997.
- FAO. 2014 The state of world fisheries and aquaculture - world review of fisheries and aquaculture - Part 1 (SOFIA), Rome. [on line] URL: Acesso em: 10 nov. 2015

- FENWICK, J.C. et al. Effect of various vitamin D analogs on plasma calcium and phosphorus and intestinal calcium absorption in fed and unfed American eels, *Aguilla rostrata*. **Gen. Comp. Endocrinology**, v. 55, p. 398-404, 1984.
- FLIK, G. et al. Effects of low ambient calcium levels on wholebody Ca²⁺ flux rates and internal calcium pools in the freshwater cichlid teleost, *Oreochromis mossambicus*. **J. Exp. Biol.**, v. 120, p. 249–264, 1986.
- FLIK, G.; PERRY, S.F. Cortisol stimulates whole body calcium uptake and the branchial calcium pump in freshwater rainbow trout. **J. Endocrinology**, v. 120, p. 75-82, 1989.
- FLIK, G.; VERBOST, P.M. Calcium transport in fish gills and intestine. **J. Exp. Biol.**, v. 184, p. 17-29, 1993.
- FLIK, G. et al. Ca²⁺ and Mg²⁺ transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: a review. **J. Exp. Zool.**, v. 265, p. 356-365, 1993.
- FLIK, G.; RENTIER-DELRUE, F.; WENDELAAR BONGA, S.E. Calcitropic effects of recombinant prolactins in *Oreochromis mossambicus*. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. R1302-1308, 1994.
- FLIK, G.; VERBOST, P.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. Calcium transport processes in fishes. In: Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation (Wood, C.M. and worth, T.J. eds). **Academic Press, San Diego, CA.**, p. 317-342, 1995
- FOLMAR, L.C. 1993. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: A bibliography and synopsis of selected effects. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 12, p. 337–375, 1993.
- FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis, Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013, 375p.
- FURUYA, W. M. et al. 2008). Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alguns ingredientes pela tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) (linhagem tailandesa). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 23, p. 465-469, 2008.
- GARROD, D.J.; NEWELL, B.S. Ring formation in Tilapia esculentia. **Nature, Lond. V.**, v. 181, p.1411-1412, 1958.
- GRAFF, I.E.; AKSNES, L.; L.I.E. O. In vitro hydroxylation of vitamin D3 in tissues of Atlantic salmon *Salmo salar*, Atlantic mackerel *Scomber scombrus*, Atlantic halibut

- Hippoglossus hippoglossus and Atlantic cod *Gadus morhua*. **Aquaculture Nutr.**, v.5, p. 23-32, 1999.
- GREEN, J.A.; BRANDON, E.L.; HARDY, R.H. Effects of dietary phosphorus and lipid levels on utilization and excretion of phosphorus and nitrogen by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2. Production-scale study. *Aquaculture Nutrition*, v.8, p.291-298, 2002.
- GUERREIRO, P.M.; FUENTES, J.; POWER, D.M.; INGLETON, P.M.; FLIK, G.; CANARIO, A.V.M. Parathyroid hormone-related protein: a calcium regulatory factor in sea bream (*Sparus aurata L.*) larvae. **Am. J. Physiol.**, v.281, p. R855-R860, 2001.
- HANSEN, R.G.J.M.; AARDEN, E.M.; VENNE W.P.H.G.; PANG, P.K.T.; WENDELAAR BONGA, S.E. Regulation of secretion of the teleost fish hormone stanniocalcin: effects of extracellular calcium. *Gn. Comp. Endocrinol.*, v. 84, p. 155-163, 1991.
- HAYNES, M.E.; GUILLAND-CUMMING, D.F.; RUSSELL, R.G.G.; HENDERSON, I.W. Metabolism of ^3H -25OHD₃ and its relationship to calcium in the rainbow trout *Salmo gairdneri* In: Vitamin D. **A. chemical, Biochemical and Clinical Update, Walter de Gruyter and Co**, p.725-726, 1985.
- HELLAND, S. et al. Mineral balance and bone formation in fast-growing Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) in response to dissolved metabolic carbon dioxide and restricted dietary phosphorus supply. **Aquaculture**, v. 250, p. 364-376, 2005.
- HEPHER, B. Nutrition of pond fishes. New York, Cambridge University, 1990, 407p.
- HOSSAIN, M.A.; FURUICHI, M. Necessity of dietary calcium supplement in black sea bream. **Fisheries Sci.**, v. 65, 893-897, 1999a.
- HOSSAIN, M.A.; FURUICHI, M. Effect of deletion of calcium supplement from purified diet on growth and bone mineralization in red sea bream. **J. Fac. Agr. Kyushu Univ.**, v.44, p. 91-97, 1999b.
- HOSSAIN, M.A.; FURUICHI, M. Calcium requirement of tiger puffer fed a semi-purified diet. **Aquaculture Int.**, v. 7, p. 287-293, 1999c.
- HOSSAIN, M.A.; FURUICHI, M. Dietary calcium requirement of giant croaker *Nibea japonica*. **J. Fac. Agr., Kyushu Univ.**, v. 44, p. 99-104, 1999d.
- HOSSAIN, M.A.; FURUICHI, M. Requirement of Japanese flounder for dietary calcium. **Aquaculture Sci.**, v. 47, p. 567-571, 1999e.

- HOSSAIN, M.A.; FURUICHI, M. Essentiality of dietary calcium supplement in redlip mullet *Liza haematocheila*. **Aquacult. Nutr.**, v. 6, p. 33-38, 2000a.
- HOSSAIN, M.A.; FURUICHI, M. Necessity of dietary calcium supplement to the diet of Japanese flounder. **Fisheries Sci.**, v. 66, p. 660-664, 2000b.
- HOSSAIN, M.A.; FURUICHI, M. Necessity of dietary calcium supplement in filefish (*Monacanthus cirrhifer*). **Bangladesh J. Fish. Res.**, v. 12, p. 157-162, 2008a.
- HOSSAIN, M.A.; FURUICHI, M. Effect of dietary calcium on the absorption of radiocalcium from seawater in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Ann. Bangladesh Agric.**, v. 12, p. 63-69, 2008b.
- HOSSAIN, M.A.; FURUICHI, M. Absorption of ⁴⁵calcium from seawater by marine fishes in relation to dietary calcium. **J. Asiatic. Soc. Bangladesh Sci.**, v. 35, p. 9-18, 2009.
- HOSSAIN, M.A.; YOSHIMATSU, T. Dietary calcium requirement in fishes. **Aquaculture Nutr.**, v. 20(1), p. 1-11, 2014.
- HWANG, P.P.; TUNG, Y.C.; CHANG, M.H. Effect of environmental calcium levels on calcium uptake in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 15, p. 363-370, 1996.
- ICHII, T.; MUGIYA, Y. Effects of a dietary deficiency in calcium on growth and calcium uptake from the aquatic environment in the goldfish, *Carassius auratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 74(2), p. 259-262, 1983.
- JAHAN, P. et al. A laboratory-based assessment of phosphorus and nitrogen loading from currently available commercial carp feeds. **Fisheries Sci.**, v. 68, p. 579-586, 2002.
- KANEKO, T.; HIRANO, T. Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. **J. Exp. Biol.**, v. 184, p. 31-45, 1993.
- KOUSAULAKI, K. et al. Growth and tissue mineralization of Atlantic cod (*Gadus Morhua*) fed soluble P and Ca salts in the diet. **Aquaculture**, v. 309, p. 181-192, 2010.
- LAFEBER, F. P., et al. Hypocalcin from Stannius corpuscles inhibits gill calcium uptake in trout. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 254(6), p. R891-R896, 1988.

- LALL, S.P. The minerals, Fish Nutrition, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2002, p. 259-308.
- LALL, S.P.; BISHOP, F.J. Studies on mineral and protein utilization by Atlantic salmon (*Salmo salar*) grown in sea water. **Fish. Mar. Serv. Tech. Rep.**, v. 688, p. 1-16, 1977.
- LALL, S.P. & LEWIS-McCREA, L.M. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. **Aquaculture Nutr.**, V. 267, P. 3–19, 2007.
- LAN, W.G. Effect of combined copper, zinc, chromium, and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysophrys major*. **Aquaculture**, v. 131, p. 219–230, 1995.
- LARSSON, D.; BJORNSSON, B.T.; SUNDELL, K. Physiological concentrations of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ rapidly decrease the in vitro intestinal calcium uptake in the Atlantic cod *Gadus morhua*. **Gen.Comp. Endocrinol.**, v.100,211-217, 1995.
- NELSON E COX, A.L.; NELSON, D.L., COX, M.M. Princípios de bioquímica. São Paulo, Sarvier, 2011, 839p.
- LI, M.H., ROBINSON, E.H. Phosphorus availability of common feedstuffs to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) as measured by weight gain and bone mineralization. **Journal of the World Aquaculture Soc.**, v. 27(3), p. 297-302, 1996.
- LIANG, J.J. et al. Dietary magnesium requirement and effects on growth and tissue magnesium content of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquacult. Nutr.**, v. 18, p. 56-64, 2012.
- LOCK, E.J. et al. The significance of vitamin D for fish: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 16 (1), p. 100-116, 2010.
- LOVE, R. M. The Chemical Biology of Fishes, v.2. New York, NY, Academic Press, 1980, 943p.
- LOVELL, R.T. Dietary phosphorus requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 107, p. 617-621, 1978.
- LOVELL, T. Nutrition and feeding of fish. New York, Van Nostrand Reinhold, 1988, 260p.
- MAI, K. et al. Dietary phosphorus requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. **Aquaculture**, v. 251(2), p. 346-353, 2006.

- MANCERA, J.M. et al. Influence of environmental salinity on prolactin and corticotropic cells in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Gen.Comp. Endocrinol.**, v. 90, p. 220-231, 1993.
- MARTINI, L.A. **Cálcio e fósforo**. Nutrição Humana. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara koogan, 2006, v.1. p.219-236.
- McDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego, California, Academic Press Limited, 1992. 524p.
- Miranda, E. C., Pezzato, A. C., Pezzato, L. E., Graner, C. F., Rosa, G. J., & Pinto, L. G. Q. Relação cálcio/fósforo disponível em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Rev. bras. zootec**, 29(6), 2162-2171, 2000.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191(4784), p.144-148, 1961.
- MOON, T. W.; WALSH, P. J.; MOMMSEN, T. P. Fish hepatocytes: a model metabolic system. **Canadian journal of fisheries and aquatic sciences**, v.42(11), p.1772-1782, 1985.
- MUKHOPADHYAY, N.; RAY, A. K. (1997). The apparent total and nutrient digestibility of sal seed (*Shorea robusta*) meal in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. **Aquaculture Research**, v.28(9), p.683-689, 1997.
- NAHN, T.H. et al. 25OHD, a circulating vitamin D metabolite in fish. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 89, p. 396-402, 1979.
- NAKAMURA, Y. Effects of dietary phosphorus and calcium contents on the absorption of phosphorus in the digestive tract of carp. *Fisheries Sci.*, v. 51, p. 605-608, 1982.
- NAKAMURA, Y.; YAMADA, J. Effects of dietary calcium absorption rate in carp. *Bull.Fac. Fish Hokkaido Univ.*, v. 31, p. 277-282, 1980.
- NEMERE, I.; CAMPBELL, K. Immunochemical studies on the putative plasmalemmal receptor for 1, 25-dihydroxyvitamin D 3. III. **Vitamin D status.Steroids**, v. 65(8), p. 451-457, 2000.
- NOSE, T.; ARAI, S. Recent advances in studies on mineral nutrition in Japan. In: *Advances in Aquaculture*, Fishing News Books, Faraham, UK, 1979, p. 584-590.
- NCR –National Research Council - Nutrient Requirements of Fish National. Washington, DC, Academy Press, 1993, 124p.

- NCR –National Research Council - Nutrient Requirements of Fish National. Washington DC, Academy Press, 2011, 376p.
- O`CONNELL, J.P.; GATLIN, D.M. III. Effect of calcium and vitamin D₃ on weight gain and mineral composition of the blue tilapia (*Oreochromis aureus*) in low- calcium water. **Aquaculture**, v. 125, p. 107-117, 1994.
- ODUM, E.P.; BARRETT, G.W. Fundamentos da Ecologia. Thompson Pioneira, ed.5, 2007. 612p.
- OGINO, C.; KAMIZONO, M. Mineral requirements in Fish. I- Effects of dietary salt mixture levels on growth, mortality and body composition in rainbow trout and carp. **Bull. Jap. Soc. Sci Fish**, v. 41, p. 429-434, 1975.
- OGINO, C.; TAKEDA, H. Mineral requirements in Fish. III – Calcium and phosphorus requirements in carp. **Bull. Jap. Soc. Sci Fish**, v. 42 (7), p. 793-799, 1976
- OGINO, C.; TAKEDA, H. Requirements of rainbow trout for dietary calcium and phosphorus. **Fisheries Sci.**, v. 44, p. 1019-1022, 1978.
- ONISHI, T.; SUZUKI, M.; TAKEUCHI, M. Change in carp hepatopancreatic activities whith dietary phosphorus levels. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.47, p.353- 357, 1987.
- PATERSON, C.R. Calcium requirements in man: a critical review. **Postgrad. Med. J.**, v. 54, p. 244-248, 1978.
- PAUL, B.N. et al. Phosphorus requirements and optimum calcium/phosphorus ratio in the diet of *mrigal Cirrhinus mrigala* (Harm.) fingerlings. **J. Appl. Ichthyol.**, v. 20, p. 306-309, 2004.
- PEÑAFLOIDA, A.D. Interaction between dietary levels of calcium and phosphorus on growth of juvenile shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v. 1272 (n.3-4), p. 281-289, 1999.
- PHILLIPS Jr, A.M. The known and possible role of minerals in trout nutrition and physiology. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 88, p. 133-135, 1959.
- POPMA, T. J.; GREEN, B. W. Sex reversal of tilapia in earthen ponds. International Center for aquaculture. **Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University**, p. 93, 1990.

- PORN – NGAM, N. et al. Effect of the ratio of phosphorus to calcium on zinc availability to rainbow trout in high phosphorus diet. **Nippon. Suisan Gakkaishi**, v. 59, p. 2065-2070, 1993.
- ROBINSON, E.H. et al. An stimulation of the calcium requirement of fingerling *Tilapia aurea* reared in calcium-free water. **Aquaculture**, v. 41, p. 389-393, 1984.
- ROBINSON, E.H. et al. Calcium requirement of channel catfish reared in calcium-free water. **Aquaculture**, v. 53, p. 263-270, 1986.
- ROBINSON, E.H. et al. Dietary calcium and phosphorus requirements of *Oreochromis aureus* reared in calcium-free water. **Aquacult.**, v. 64, p. 267–276, 1987.
- RODGERS, D.W. Ambient pH and calcium concentration as modifiers of growth and calcium dynamics of brook trout, *Salvelinus fontinalis*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.41, p. 1774-1780, 1984.
- RODEHUSTSCORD, M.; GREGUS, Z.; PFEFFER, E. Effect of phosphorus intake on faecal and non-faecal phosphorus excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the consequences for comparative phosphorus availability studies. **Aquaculture**, v. 188, p. 383-398, 2000.
- ROY, P.K.; LALL, S.P. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus L.*). **Aquaculture**, v. 221, p. 451-468, 2003.
- ROY, P.K. et al. Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralization of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus L.*). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 27, p.35-48, 2002.
- SAKAMOTO, S.; YONE, Y. Effect of dietary calcium/phosphorus ration upon growth, feed efficiency and blood serum Ca and P level in red sea bream. **Fisheries Sci.**, v.39, p. 343-348, 1973.
- SAKAMOTO, S.; YONE, Y. Requirement of red sea bream for dietary Ca. **Rep. Fish. Res. Lab. Kyushu Univ.**, v. 3, p. 59-64, 1976.
- SAKAMOTO, S.; YONE, Y. A principal source of deposit lipid in phosphorus deficient red sea bream. **Bull. Jnp. Soc. Sci. Fish.**, v. 46, p. 1227-1230, 1980.
- SATOH, S.; TAKEUCHI, T; WATANABE, T. Availability of manganese and magnesium contained in white fish meal to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Sci.**, v. 57, p. 99-104, 1991.

- SEKINE, H.; SATO, S. On a synthetic diet for use in fish culture III. The effect of calcium-phosphate and iron-citrate as stimulants on growth in the post-larvae of red-salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Journal of the Imperial Fisheries Experimental Station (Suisan Shikenjou Houkoku)**, v. 3, p. 259-263, 1933.
- SHAO, Q. et al. Dietary phosphorus requirement of juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*. **Aquaculture**, v. 277, p. 92-100, 2008.
- SHIAU, S.Y.; TSENG, H.C. Dietary calcium requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, reared in fresh water. **Aquaculture Nutrit.**, v. 13 (4), p. 298-303, 2007.
- SHIM, K.F.; HO, C.S. Calcium and phosphorus requirements of guppy *Poecilia reticulata*. **Fisheries Sci.**, v. 55, p. 1947-1953, 1989.
- SKONBERG, D.I. et al. Metabolic response to dietary phosphorus intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 157, p. 11-24, 1997.
- STAGG, R. M.; RUSIN, J.; BROWN, F. (1992). Na⁺, K⁺-ATPase activity in the gills of the flounder (*Platichthys flesus*) in relation to mercury contamination in the Firth of Forth. **Marine environmental research**, v. 33(4), p. 255-266, 1992.
- STEFFENS, W. Principios fundamentales de la alimentación de los peces. Editora Acribia. Zaragoza, 1987, 272p.
- STOREBAKKEN, T. et al. The apparent digestibility of diets containing fish meal, soybean meal or bacterial meal fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*): evaluation of different faecal collection methods. **Aquaculture**, v. 169(3), p. 195-210, 1998.
- STRYER, L. Biochemie. Heidelberg, Spektrum der Wissenschaft, 1990, 1127p.
- SUGIURA, S.H. et al. Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonids. **Aquaculture**, v. 159, p. 177-200, 1998.
- SUGIURA, S.H. et al. Utilization of fish and animal by-product meals in low-pollution feeds for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 31 (7), p. 585-593, 2000.
- SUGIURA, S.H.; HARDY, R.W.; ROBERTS, R.J. The pathology of phosphorus deficiency in fish. A review. **J. Fish Dis.**, v. 27, p. 255-265, 2004.
- SUKUMARAN, K. et al. Phosphorus requirement of Catla (*Catla catla Hamilton*) fingerlings based on growth, whole-body phosphorus concentration and non-faecal phosphorus excretion. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 139-147, 2009.

- SUNDELL, K; BJORNSSON, B.T. Effects of vitamin D₃, 25(OH) vitamin D₃, 24, 25(OH)₂ vitamin D₃, and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ on the in vitro intestinal calcium absorption in the marine teleost, Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 78, p. 74-79, 1990.
- SUNDELL, K; BJORNSSON, B.T.; NORMAN, A.W. 1,25 Dihydroxyvitamin-D₃ in the Atlantic cod – plasma levels, a plasma binding component, and organ distribution of a high-affinity receptor. **Endocrinology**, v. 131, p. 2279-2286, 1992.
- TAKEUCHI, M.; NAKAZOE, J. Effect of dietary phosphorus on lipid content and its composition in carp. **Bull. Jpn. J. Sci. Fish.**, v. 47(3), p. 347-352, 1981.
- TRIEBSKORN, R. et al. Evaluation of bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II. Ultrastructural diagnosis and tin localization by energy filtering transmission electron microscopy (EFTEM). **Aquatic toxicology**, v. 30(3), p.199-213, 1994.
- Van Der PLOEG, M.; BOYD, C.E. Geosmin production by cyanobacteria (*blue green algae*) in fish ponds at Auburn, Alabama. **Journal World Aquaculture Society**, v. 22, p. 207-216, 1991.
- VIELMA, J; LALL, S.P. Phosphorus utilization by Atlantic salmon (*Salmo Salar*) reared in freshwater is not influence by higher dietary calcium intake. **Aquaculture**, v. 160, p. 117-128, 1998.
- VIELMA, J., KOSKELA, J.; RUOHONEN, K. Growth, bone mineralisation, and heat and low oxygen tolerance in European whitefish (*Coregonus lavaretus L.*) fed with graded levels of phosphorus. **Aquacul.**, v. 212, 321–333, 2002.
- WAGNER, G.F.; JAWORSKI, E.M.; RADMAN, D.P. Salmon calcitonin inhibits whole body Ca²⁺ uptake, in young rainbow trout. **J. Endocrinol.**, v. 155, p. 459-465, 1997.
- WAGNER, G.F.; JAWORSKI, E.M.; HADDAD, M. Stanniocalcin in the seawater salmon: structure, function, and regulation. **Am. J. Physiol.**, v. 274, R1177-R1185, 1998.
- WATANABE, T. et al. Requirement of Chum salmon held in freshwater for dietary phosphorus. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, v. 46, p. 361–367, 1980.

- WEISSMANN, D.; SCHEID, H; PFEFFER E. Water pollution with phosphorus of dietary origin by intensively fed rainbow trout (*Salmo gairderi*). **Aquaculture**, v. 69, p. 263-270, 1988.
- WENDELLAR BONGA, S.E.; PANG, P.K.T. Control of calcium regulating hormones in the vertebrates: parathyroid hormone, calcitonin, prolactin and stanniocalcin. **Int. Rev. Cytol.**, v. 128, p. 139-213, 1991.
- WILSON, R.P. et al. Dietary phosphorus requirement of Channel Catfish. **J. Nutr.**, v. 17, p. 159-169, 1982
- ZIKIC, R.V. 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocyte and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. **Physiol Res.**, v. 50, p. 105–111, 2001.
- ZHANG, C. et al. Dietary phosphorus requirement of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicas*. **Aquaculture**, v. 255, p. 201-209, 2006.
- YAMADA, J. On the mechanism of the appearance of the scale structure: VI. Some observations associating with the absorption of scale in the goldfish. **Bulletin of Faculty of Fisheries Hokkaido University**, v.7, p.202-207, 1956.
- YANDA, D.M.; GHAZARIAN, J.G. Vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): cytochrome P-450 and biotransformations of the vitamins. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 69B, p. 183-188, 1981.
- YANG, D. et al. Influence of dietary phosphorus levels on growth, metabolic response and body composition of juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 253, p. 592-601, 2006.
- YE, C. et al. Effect of dietary calcium and phosphorus on growth, feed efficiency, mineral content and body composition of juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. **Aquaculture**, v. 255, p. 263-271, 2006.
- YUAN, Y.C. et al. Dietary phosphorus requirement of juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p. 159-169, 2011.

CAPÍTULO II

Cálcio e fósforo para tilápia-do-nilo: desempenho produtivo e mineralização óssea

Resumo

Neste estudo foram utilizados 330 juvenis da tilápia-do-nilo (peso inicial $15,26 \pm 0,3g$) alimentados com dieta ausente de suplementação e suplementadas com 3,4:5,1; 5,1:5,1; 6,7:10,0 e 10,0:10,0g kg^{-1} de cálcio e fósforo, durante 96 dias. Peixes alimentados com 5,1: 5,1g kg^{-1} apresentaram peso final e ganho de peso menor ($P < 0,05$) comparados aos com 6,7:10,0 e 10,0:10,0g kg^{-1} . A conversão alimentar de peixes alimentados com dieta suplementada foi melhor ($P < 0,05$) comparada aos alimentados com dieta não suplementada. A análise morfométrica da vértebra dos peixes mostrou aumento ($P < 0,05$) em animais alimentados com 6,7:10,0g kg^{-1} . O teor de cálcio e fósforo corporal de peixes alimentados com 6,7:10,0g kg^{-1} foi maior comparado aos alimentados com 5,1:5,1g kg^{-1} . O teor de cinzas nas vértebras de peixes alimentados com dietas suplementadas foi maior ($P > 0,05$) comparada aos sem suplementação. O teor de cálcio na vértebra dos peixes alimentados com dieta contendo 10,0:10,0g kg^{-1} foi maior ($P < 0,05$) comparado às demais. O teor de cálcio na vértebra dos peixes alimentados com dietas contendo 6,7:10,0 e 5,1:5,1g kg^{-1} foi maior ($P < 0,05$) comparado aos alimentados com 3,4:5,1g kg^{-1} . Os teores de fósforo na vértebra de peixes alimentados com dietas de 3,4: 5,1g kg^{-1} e 6,7:10,0g kg^{-1} foram menores ($P < 0,05$) comparados aos peixes alimentados com as demais dietas. As dietas 6,7:10,0 e 10,0:10,0g kg^{-1} de cálcio e fósforo atenderam as necessidades dos Juvenís da tilápia-do-nilo em desempenho e mineralização óssea.

Palavras chave: mineral, nutrição, peixes, vértebra, relação

Calcium and phosphorus for Nile tilapia: growth performance and bone mineralization

Abstract

This study used 330 juveniles of Nile tilapia (initial weight $15.26 \pm 0.3\text{g}$) fed unsupplemented diet and supplemented with 3.4: 5.1; 5.1: 5.1; 6.7:10.0 and 10.0:10.0g kg^{-1} of calcium and phosphorus for 96 days. Fish fed with 5.1: 5.1g kg^{-1} final weight and had lower weight gain ($P < 0.05$) compared to those with 6.7: 10.0 and 10.0:10.0g kg^{-1} . The feed of fish fed with diet supplemented was better ($P < 0.05$) compared to the unsupplemented diet fed. The morphometric analysis of the vertebra showed fish increase ($P < 0.05$) in animals fed with 6.7: 10.0 g kg^{-1} . The body calcium and phosphorus fish fed with 6.7:10.0 g kg^{-1} was higher compared to fed 5.1: 5.1g kg^{-1} . The ash content in fish fed diets supplemented vertebrae was higher ($P > 0.05$) compared to no supplementation. The calcium content in fish vertebrae fed a diet containing 10.0: 10.0 g kg^{-1} was higher ($P < 0.05$) compared to too much trouble calcium content in the vertebrae of fish fed diets containing 6,7 : 10.0 and 5.1: 5.1g kg^{-1} was higher ($P < 0.05$) compared to fed 3.4: 5.1g kg^{-1} . The phosphorus content in the vertebra fish fed diets with 3.4: 5,1g kg^{-1} and 6.7: 10.0 g kg^{-1} were lower ($P < 0.05$) compared to fish fed with the other diets. Diets 6.7:10.0;10.0:10.0g kg^{-1} of calcium and phosphorus met the needs of juveniles of Nile tilapia in performance and bone mineralization.

Keywords: mineral, nutrition, fish, vertebra, relationship

Introdução

O cálcio e o fósforo atuam em conjunto no desenvolvimento, manutenção do sistema esquelético e estabilidade das vértebras e são exigidos em grandes quantidades pelos peixes (Robinson et al. 1987), sendo o fósforo absorvido preferencialmente do alimento e o cálcio da água (Nose e Arai 1979). A deficiência destes minerais pode causar deformidades esqueléticas, mortalidade, redução do crescimento e baixa utilização dos nutrientes pelos animais causando perdas econômicas (Aunsmo et al. 2008).

A maioria dos peixes mantém a relação cálcio e fósforo constante no corpo (NRC 2011), sendo esta relação importante na mineralização de tecidos corporais. Peixes que receberam ração deficiente em fósforo, mas com cálcio suficiente na água e ração, apresentaram baixo teor de cálcio nos tecidos independente da quantidade de fósforo presente na dieta (Sakamoto e Yone 1979; Ogino et al. 1979; Watanabe et al. 1980).

O excesso de cálcio interfere na absorção de fósforo, sendo o contrário verdadeiro (NRC 2011). Quando existe excesso de cálcio, o fósforo não é absorvido pelo intestino porque este elemento se combina com o cálcio formando composto biologicamente indisponível aos peixes (Andrews et al. 1973; Porn-Ngan et al. 1993; Li et al. 1996).

As necessidades de fósforo para peixes foram estimadas entre 0,3 e 8,0% (NRC 2011), sendo encontrados valores de 8,6 g kg⁻¹ para alevinos da tilápia-do-nilo (Yao et al. 2014). A necessidade de cálcio depende da disponibilidade do mineral na água, sendo de 0,7% para tilápia-do-nilo em águas livres de cálcio e de 0,37 em águas contendo 2% de cálcio (Hossain e Yoshimatsu 2014). A adição de fósforo em dietas melhorou o ganho de peso, crescimento, teor de fósforo corporal e teor de fósforo na vértebra de juvenis da tilápia-do-nilo (Yao et al. 2014) e, a adição de cálcio melhorou o ganho de peso, teor de cálcio e fósforo em ossos e escamas para a mesma espécie (Shiau e Tseng 2007).

Dentro do contexto apresentado, estudar a influência do cálcio e fósforo para juvenis da tilápia-do-nilo sobre desempenho e mineralização óssea.

Material e Métodos

Dietas Experimentais

Foram avaliadas quatro dietas suplementadas com cálcio e fósforo visando obter relações entre o cálcio e o fósforo de 1,0:1,0 e 1,0:1,5 e uma dieta ausente de suplementação destes minerais para ser utilizada como controle negativo. As fontes utilizadas nas dietas suplementadas foram fósforo monopotássico e fósforo bicálcico (Furuya et al. 2010).

As dietas foram constituídas de um tratamento ausente de suplementação, contendo apenas o cálcio e fósforo presente nos alimentos, as demais dietas foram formuladas para conter 3,4:5,1 g kg⁻¹ (relação 1,0:1,5); 5,1:5,1 g kg⁻¹ (relação 1,0:1,0); 6,7:10,0 g kg⁻¹ (relação 1,0:1,5) e 10,0:10,0 g kg⁻¹ (relação 1,0:1,0), de cálcio e fósforo, respectivamente. As dietas foram balanceadas de acordo com Furuya et al. (2010). O suplemento vitamínico-mineral presente nas dietas não continha cálcio e fósforo em sua composição (Tabela1).

Após a formulação das dietas, os ingredientes foram moídos a 0,42 mm e homogeneizados em misturador automático (AÇÃO CIENTIFICA[®], Piracicaba-SP, Brasil). A mistura foi processada em extrusora de rosca simples (EXTEEC[®], Ribeirão Preto, Brasil), desidratada em estufa de circulação forçada a 55 °C por 12 h e armazenados a -20 °C para posterior utilização.

Os peixes foram adaptados as dietas por sete dias e durante todo o período experimental os animais foram alimentados quatro vezes ao dia até a saciedade aparente. As alimentações foram realizadas às 8h30min, 11h30min, 14h30min e 17h30min.

Ensaio experimental

Foram utilizados 330 juvenis de tilápia-do-nilo com peso médio inicial de 15,26 ± 0,3 g distribuídos em 15 aquários de 500L. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições. Foi utilizado sistema de recirculação e filtragem de água por meio de filtro mecânico e biológico, o aquecimento foi controlado por meio de termostato digital (26°C) mantendo a temperatura constante, fotoperíodo de 12 h E: 12 h L e uso de lâmpada UV.

Foram avaliados cálcio da água ($3,14 \text{ mg L}^{-1}$) e parâmetros de qualidade utilizando-se sonda multiparâmetro YSI 556® (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA), medidos o pH (6,8) e por meio de kit, amônia tóxica ($0,004 \text{ ppm}$ - Labcon®), dureza ($17,41 \text{ ppm}$ de CaCO_3 -Labcon®). Após o período de 96 dias, os peixes foram eutanasiados (Benzocaína $0,1 \text{ g L}^{-1}$) e pesados para avaliar os índices de desempenho produtivo: ganho de peso (GP) = (peso final – peso inicial) (g); peso final (g); taxa de crescimento específico = $(\ln(\text{média final do peso}) - \ln(\text{média inicial do peso})) / \text{tempo} * 100 (\% \text{ dia}^{-1})$; conversão alimentar = (consumo de ração / ganho em peso) (g g^{-1}); taxa de sobrevivência = $(\text{n}^\circ \text{ de peixes vivos} / \text{n}^\circ \text{ de peixes mortos}) * 100 (\%)$.

Coleta de amostras

Foram coletados aleatoriamente três peixes por tanque para as análises de composição corporal. Os peixes foram pesados, moídos e secos em estufa de circulação de ar por 24h a 55°C , esta mistura foi armazenada para posterior análise.

Para a retirada das vértebras, seis peixes foram cozidos em aparelho de microondas por 5min. A vértebra de cada peixe foi coletada e seca em estufa de circulação de ar por 12 h a 105°C e para remoção de gordura, em seguida, as vértebras foram colocadas em aparelho Soxhlet (Foss Tecator Soxtec Sistema HT2 1045, Hoeganaes, Suécia) por 12 h para remoção da matéria graxa e foram novamente secas em estufa por 12 h. Estas vértebras foram moídas e armazenadas para posterior análise.

As escamas de seis peixes por aquário foram coletadas e secas em estufa de circulação de ar por 12 h a 105°C e para remoção de gordura, as escamas foram colocadas em aparelho de (Soxhlet Foss Tecator Soxtec Sistema HT2 1045, Hoeganaes, Suécia) por 12 h para remoção da matéria graxa e foram secas novamente em estufa por 12 h, moídas em moinho criogênico e armazenadas para posterior análise. Foram coletadas amostras de água para determinação de cálcio. Para histologia foram retiradas as vértebras de nove peixes por tratamento e imediatamente submetidas à fixação em formol 5%. As amostras foram descalcificadas e submetidas a corte de $4\mu\text{m}$ na quarta vértebra, por meio de micrótomo automático (Leica®2145). Em seguida procedeu-se a coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), conforme protocolo histotécnico padrão.

Análises químicas

Para determinação do teor de cinzas, as amostras processadas do corpo, das vértebras e das escamas, foram determinadas segundo AOAC (2000).

Para determinação de cálcio e fósforo, as amostras processadas foram digeridas em mistura contendo 2 mL de ácido nítrico e 3 mL de ácido perclórico em bloco digestor até a obtenção de extrato ácido transparente (AOAC 2000).

A determinação do cálcio das amostras mineralizadas e da água, foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica em chama. Solução de 5% de óxido de lantânio foi adicionada ao extrato ácido para prevenir interferência do fósforo presente nas amostras.

A determinação do fósforo das amostras mineralizadas foi realizada por espectrofotometria no visual, utilizando o método vanadomolibdico.

Análise histológica

Foram realizadas análises morfométricas da vértebra de juvenis da tilápia-do-nylo para obter medidas de comprimento de osso depositado. A leitura das lâminas histológicas foi realizada com auxílio de microscópio ótico (Leica[®] DM750) acoplado ao sistema analisador de imagens Leica[®](Image-Pro Plus versão 4.5.0.27) no Laboratório de imagens da zootecnia, FMVZ - Unesp, Botucatu.

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm DP. Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os tratamentos foram analisadas pelo teste de Duncan ao nível de significância $P < 0,05$. Programa estatístico utilizado foi o SAS.

Comitê de ética

Os experimentos produzidos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (protocolo 09/2013 – CEUA).

Resultados

Desempenho

Peixes alimentados com dieta contendo 5,1: 5,1g kg⁻¹ de cálcio e fósforo apresentaram peso final e o ganho de peso menor (P<0,05) quando comparados aos animais que consumiram as dietas contendo 6,7:10,0 e 10,0:10,0g Kg⁻¹ de cálcio e fósforo (Tabela 2).

A conversão alimentar de peixes ausentes de peixes alimentados com as dietas suplementadas de cálcio e fósforo foi melhor (P<0,05) comparada a peixes alimentados com a dieta não suplementada. Não houve diferença (P >0,05) na taxa de sobrevivência (Tabela 2).

Mineralização

A análise morfométrica da vértebra (Figura 1) dos peixes mostrou aumento (P<0,05) do comprimento a partir dos animais alimentados com dietas contendo 6,7:10,0g Kg⁻¹ de cálcio e fósforo, respectivamente (Tabela 2).

O teor de cálcio e fósforo corporal de peixes alimentados com dietas contendo 6,7:10,0g kg⁻¹ de cálcio e fósforo foi maior comparado aos peixes alimentados com 5,1:5,1g kg⁻¹ de cálcio e fósforo (Tabela 3). Não houve diferenças (P>0,05) no teor corporal de cinzas dos peixes alimentados com as dietas experimentais (Tabela 3).

O teor de cinzas avaliado nas vértebras de peixes alimentados com as dietas suplementadas de cálcio e fósforo foi maior (P>0,05) comparada as cinzas dos peixes alimentados com a dieta sem suplementação (Tabela 3).

O teor de cálcio na vértebra dos peixes alimentados com a dieta contendo 10,0:10,0g kg⁻¹ de cálcio e fósforo foi maior (P<0,05) comparado às demais dietas (Tabela 3). O teor de cálcio na vértebra dos peixes alimentados com dietas contendo 6,7:10,0 e 5,1:5,1g kg⁻¹ de cálcio e fósforo foi maior (P<0,05) comparado aos alimentados com dieta contendo 3,4:5,1g kg⁻¹.

Os teores de fósforo na vértebra de peixes alimentados com as dietas de 3,4: 5,1g kg⁻¹ de cálcio e fósforo e de 6,7g kg⁻¹ de cálcio e 10,0g kg⁻¹ de fósforo foram menores (P<0,05) comparados aos peixes alimentados com as demais dietas (Tabela 3).

O teor de cinzas, cálcio e fósforo das escamas dos peixes alimentados com as dietas experimentais não apresentaram diferenças ($P>0,05$) quando comparados os tratamentos (Tabela 3).

Discussão

A suplementação de cálcio e fósforo nas dietas dos peixes proporcionou redução na conversão alimentar quando comparada aos animais alimentados com a dieta sem inclusão. Este fato pode ser associado ao aumento do peso final e ganho de peso em todos os tratamentos (Tabela 2), embora os peixes alimentados com 6,7:10,0 e 10,0:10,0g kg⁻¹ tenham apresentado valores de peso final e ganho de peso superiores aos demais tratamentos. Em todos os tratamentos, os peixes apresentaram teores de cinza da vértebra maiores comparados aos alimentados sem inclusão. O teor de cálcio da vértebra destes animais mostrou aumento exceto em peixes alimentados com 3,4g kg⁻¹. Embora tenha ocorrido aumento de cálcio na vértebra dos peixes alimentados com 5,1:5,1; 6,7:10,0; 10,0:10,0 apenas os tratamentos 6,7:10,0 e 10,0:10,0 apresentaram maior comprimento da morfometria da vértebra.

O cálcio e o fósforo são os principais constituintes do osso, sendo este considerado metabolicamente ativo, podendo sofrer contínua remodelação óssea (Lall e Lewis-MCcrea 2007). Os processos de formação, mineralização e reabsorção óssea são influenciados pelo nível de fósforo nas dietas (Roy et al. 2003). A concentração extracelular destes minerais é controlada por hormônios que afetam a entrada no intestino e saída pelos rins; quando necessário, estes hormônios regulam a retirada de mineral do reservatório esquelético. O paratormônio (PTH) pode exercer efeitos catabólicos e anabólicos sobre o osso. A elevação crônica do PTH pode aumentar a reabsorção óssea e conseqüentemente a liberação de cálcio no líquido extracelular. A principal célula alvo do PTH no osso é o osteoblasto (células formadoras de osso), além de recrutar células precursoras dos osteoclastos para formar novas unidades de remodelagem óssea. (Goodman e Gilman, 2012).

O aumento no ganho de peso e peso final em animais alimentados com dietas contendo 3,4:5,1 e 5,1:5,1g kg⁻¹ de cálcio e fósforo ocorreu em detrimento a redução do

fósforo na vértebra. A deficiência de fósforo na dieta de peixes teleósteos diminui com o teor mineral do osso, significando atraso na mineralização (Vielma et al. 2002) .

Os teores de cálcio e fósforo corporal dos peixes apresentaram aumento quando comparados aos animais alimentados com dietas contendo 5:1,5,1g kg⁻¹ de cálcio e fósforo. A adequação das concentrações absolutas de cálcio e fósforo nas dietas pode interferir na absorção destes minerais, pois o excesso de cálcio limita a absorção intestinal do fósforo, porque o fósforo se combina com o cálcio formando composto biologicamente indisponíveis aos peixes (Andrews et al. 1973). A utilização de fósforo é dependente de cálcio, sendo a calmodulina, a proteína responsável por transportar o cálcio e o fósforo para o intestino dos animais (Brody 1999).

As dietas 6,7:10,0 e 10,0:10,0g kg⁻¹ de cálcio e fósforo atenderam as necessidades dos Juvenís da tilápia-do-nilo em desempenho e mineralização óssea.

Referências bibliográficas

- Andrews, J.W., Davis, J.W. & Campbell, C. (1973) Effects of dietary calcium and phosphorus on growth, food conversion, bone ash and hematocrit levels of catfish. *Journal Nutr. Philad.*, **103**, 766-771.
- AOAC (2000) *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists (Arlington), pp. 1141.
- Boyd, C.E. (1998) *Water quality in ponds for aquaculture* (Birmingham, Auburn), pp. 448.
- Brody, T. (1999) "Calcium and phosphate." *Nutritional Biochemistry*, Academic (Boston, MA), 2nd edn., pp. 761-794.
- Brown, M.L., Jaramillo, F. & Gatlin, D.M. III. (1993) Dietary phosphorus requirement of juvenile sunshine bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. *Aquacult.*, 113, 355-363.
- English, W.R., Schwedler, T.E. & DYCK, L.A. (1993) *Aphanizomenon flos-aquae*, a toxic blue green alga in commercial channel catfish, *Ictalurus punctatus*, ponds: a case history. *Journal of Appl. Aquacul.*, 3, 195-209.
- Flik, G., Fenwick, J.C., Kolar, Z., Mayer-Gostan, N. & Wendelaabonga, S.E. (1986) Effects of low ambient calcium levels on whole body Ca^{2+} flux rates and internal calcium pools in the freshwater cichlid teleost, *Oreochromis mossambicus*. *J. Exp. Biol.*, 120, 249-264.
- Fontagné, S., Silva, N., Bazin, D., Ramos, A., Aguirre, P., Surget, A., Abrantes, A., Kaushik, S.J. & Power, D.M. (2009). Effects of a dietary phosphorus and calcium level on growth and skeletal development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquacult.*, 297, 141-150.
- Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Boscolo, W.R., Cyrino, J.E.P., Furuya, V.R.V. & Feiden, A. (2010) *Tabelas brasileiras para nutrição de Tilápias*. Toledo G.F.M., pp. 100.
- Hossain, M.A. & Yoshimatsu, T. (2014) Dietary calcium requirement in fishes. *Aquaculture Nutr.*, 20(1), 1-11.

- Hua, K., & D. P. Bureau. 2010. Quantification of differences in digestibility of phosphorus among cyprinids, cichlids, and salmonids through a mathematical modeling approach. *Aquaculture* 308: 152-158
- Jahan, P., Watanabe, T., Satoh, S. & Kiron, V. (2002) A laboratory-based assessment of phosphorus and nitrogen loading from currently available commercial carp feeds. *Fisheries Sci.*, 68, 579–586.
- Lall, S.P. & Lewis-McCrea, L.M. (2007) Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. *Aquaculture Nutr.*, 267, 3–19.
- Li, M.H., Robinson, E.H. (1996) Phosphorus availability of common feedstuffs to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) as measured by weight gain and bone mineralization. *Journal of the World Aquaculture Soc.*, 27(3), 297-302.
- Mai, K., Zhang, C., Ai, Q., Duan, Q., Xu, W., Zhang, L., Liufu, Z. & Tan, B. (2006) Dietary phosphorus requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. 2006. *Aquacult.*, 251(Issues 2–4), 346–353.
- Nose, T. & Arai, S. (1979) Recent advances in studies on mineral nutrition of fish in Japan. In: T.V.R. Pillay and W.A. Dill (Editors), *Advances in Aquaculture*. Fishing News Books, Farnham, Surrey, pp. 584-590.
- NRC -National Research Council (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academy Press (Washington, D.C), pp. 376.
- Ogino, C., Takeuchi, L., Takeda, H. & Watanabe, T. (1979) Availability of dietary phosphorus in carp and rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 45, 1527–1532.
- Porn –Ngam, N., Satoh, S., Takeuchi, T. & Watanabe, T. (1993) Effect of the ratio of phosphorus to calcium on zinc availability to rainbow trout in high phosphorus diet. *Nippon. Suisan Gakkaishi.*, 59, 2065-2070.
- Robinson, E.H., Labomascus, D., Brown, P.B. & Linton, T.L. (1987) Dietary calcium and phosphorus requirements of *Oreochromis aureus* reared in calcium-free water. *Aquacult.*, 64, 267–276.
- Robinson, E.H., Jackson, L.S. & Li, M.H. (1996) Supplemental Phosphorus in Practical Channel Catfish Diets. 1996. *Journal of the World Aquacult. Soc.*, 27 (3), 303-308.
- Roy, P.K., & Lall, S.P. (2003) Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L). *Aquacult.*, 221, 451-468.

- Sakamoto, S. & Yone, Y. (1978) Effects of dietary phosphorus level on chemical composition of red sea bream. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1227-1230.
- Shiau, S.Y. & Tseng, H.C. (2007) Dietary calcium requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, reared in fresh water. *Aquaculture Nutrit.*, 13 (4), 298-303.
- Vielma, J., Koskela, J. & Ruohonen, K. (2002) Growth, bone mineralisation, and heat and low oxygen tolerance in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) fed with graded levels of phosphorus. *Aquacul.*, 212, 321–333.
- Vonck, A.P.M.A., Bonga, S.E.W. & Flik, G. (1998) Sodium and Calcium Balance in Mozambique Tilapia, *Oreochromis mossambicus*, Raised at Different Salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiol.*, 119, 441-449.
- Yao, Y.F., Jiang, M., Wen, H., Wu, F., Liu, W., Tian, J. & Yang, C.G. (2014) Dietary phosphorus requirement of gift strain of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared in freshwater. *Aquaculture Nutrit.*, 20, 273-280.
- Watanabe, T., Murakami, A., Takeuchi, L., Nose, T. & Ogino, C. (1980) Requirement of Chum salmon held in freshwater for dietary phosphorus. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46, 361–367.

Table 1. Composition of basal and experimental diets (dry matter 100%)

Ingredients (g kg ⁻¹)	0:0	3.4:5.1	5.1:5.1	6.7:10.0	10.0:10.0
Soybean meal	458.70	465.14	465.92	468.19	468.90
Corn, gluten-60	58.60	56.03	55.82	60.00	60.00
Wheat middling	100.00	100.00	97.98	90.00	90.00
Corn, grain	367.70	349.13	349.40	316.24	311.97
Soybean oil	-	-	-	11.81	13.09
HCL- Lysine	2.58	2.49	2.48	2.49	2.48
Methionine	2.41	2.45	2.45	2.46	2.46
Threonine	3.37	3.37	3.37	3.39	3.39
Tryptophan	0.01	-	-	0.01	0.01
Dicalcium phosphate	-	7.37	14.22	20.67	33.95
Monopotassium phosphates	-	7.42	1.78	18.14	7.14
Butylated hydroxytoluene	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Salt	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin C	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Vitamin and mineral premix ¹	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Estimated composition					
Digestible energy (kcal kg ⁻¹)	3086	3039	3036	3036	3036
Digestible protein (%)	26.81	26.81	26.81	26.81	26.81
Crude fiber (%)	4.40	4.41	4.40	4.29	4.29
Crude lipid (%)	0.90	0.88	0.87	2.03	2.16
Calcium (%)	0.16	0.34	0.51	0.67	1.00
Available phosphorus (%)	0.20	0.51	0.51	1.00	1.00
Lysin (%)	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53
Methionine (%)	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
Methionine+Cystine (%)	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
Threonine (%)	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18
Tryptophan (%)	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30

¹Vitamin and mineral premix: Vitamin A = 1.000.000 IU kg⁻¹; Vitamin D3 = 500.000 IU kg⁻¹; Vitamin E = 20.000 IU kg⁻¹; Vitamin K3 = 500 mg kg⁻¹; Vitamin B1 = 1.900 mg kg⁻¹; Vitamin B2 = 2.000 mg kg⁻¹; Vitamin B6 = 2.400 mg kg⁻¹; Vitamin B12 = 3.500 mg kg⁻¹; Vitamin C = 25 g kg⁻¹; Niacin = 5.000 mg kg⁻¹; calcium pantothenate = 4.800 mg kg⁻¹; Folic acid = 200 mg kg⁻¹; Biotin = 40 mg kg⁻¹; Manganese = 7.500 mg kg⁻¹; Zinc = 210 g kg⁻¹; Iron = 12,50 g kg⁻¹; Copper = 2.000 mg kg⁻¹; Iodine = 200 mg kg⁻¹; Selenium = 70 mg kg⁻¹; Butylated hydroxyl toluene = 300 mg kg⁻¹.

Table 2. Initial body weight (IBW), Final body weight (FBW), Body weight gain (BWG), Morphometric vertebral length (MVL) Feed conversion (FC) and Survival of juvenile Nile-tilapia fed diets containing different levels of calcium and phosphorus

	0:0	3.4:5.1	5.1:5.1	6.7:10.0	10.0:10.0
IBW (g)	15.37 ± 0.1	15.44 ± 0.2	15.04 ± 0.6	15.06 ± 0.4	14.80 ± 0.5
FBW (g)	39.53 ± 2.0 ^c	118.63 ± 35.4 ^{ab}	108.60 ± 3.2 ^b	157.57 ± 31.82 ^a	153.9 ± 14.5 ^a
BWG (g)	24.14 ± 1.9 ^c	103.16 ± 35.3 ^{ab}	93.56 ± 3.7 ^b	142.48 ± 31.9 ^a	139.04 ± 3.2 ^a
FC (g g ⁻¹)	2.14 ± 0.4 ^a	1.47 ± 0.5 ^b	1.47 ± 0.05 ^b	1.28 ± 0.35 ^b	1.19 ± 0.06 ^b
Survival (%)	90.91 ± 4.5	86.36 ± 7.9	89.39 ± 5.2	93.34 ± 5.2	96.98 ± 2.6
MVL (µm)	130,52 ± 14,35 ^c	140,31 ± 12,88 ^c	141,73 ± 2,87 ^c	166,38 ± 9,58 ^b	198,11 ± 1,46 ^a

Values are as means ± standard deviation of three replicates. Means followed by the same letter in the column do not differ among themselves by Duncan test ($p < 0.05$). BWG: [final body weight (g) – initial body weight (g)]; FC: [feed intake (g)/ body weight gain (g)]; Survival: [(number of final fish/number of initial fish)]*100

Table 3. Calcium (Ca) and phosphorus (P) levels and Ca/P ratio in scale, vertebrae and carcass of juvenile Nile-tilapia fed diets containing various levels of calcium and phosphorus

	0:0	3.4:5.1	5.1:5.1	6.7:10.0	10.0:10.0
Body composition (g kg ⁻¹)					
Ash	9.61 ± 1.1	8.94 ± 0.3	8.98 ± 0.3	7.58 ± 2.4	8.81 ± 0.5
Calcium	5.64 ± 0.4 ^{ab}	6.71 ± 0.8 ^{ab}	5.25 ± 0.2 ^b	12.82 ± 6.8 ^a	10.40 ± 6.0 ^{ab}
Phosphorus	4.11 ± 0.4 ^{ab}	4.62 ± 1.2 ^{ab}	3.77 ± 0.1 ^b	10.31 ± 6.5 ^a	9.46 ± 6.1 ^{ab}
Ca/P	1.35 ± 0.1	1.51 ± 0.4	1.39 ± 0.1	1.41 ± 0.4	1.13 ± 0.1
Vertebrae (g kg ⁻¹)					
Ash	50.31 ± 0.8 ^b	54.69 ± 2.2 ^a	95.26 ± 0.9 ^a	56.88 ± 3.7 ^a	58.54 ± 1.1 ^a
Calcium	171.67 ± 7.1 ^c	176.83 ± 7.1 ^c	187.43 ± 3.3 ^b	189.68 ± 4.9 ^b	199.78 ± 6.2 ^a
Phosphorus	56.48 ± 2.6 ^a	51.31 ± 0.4 ^b	54.61 ± 1.4 ^a	51.38 ± 1.9 ^b	54.94 ± 0.6 ^a
Ca/P	3.04 ± 0.1	3.45 ± 0.05	3.44 ± 0.1	3.69 ± 0.2	3.64 ± 0.1
Scales (g kg ⁻¹)					
Ash	27.65 ± 4.1	25.65 ± 7.5	23.85 ± 1.6	26.49 ± 3.2	28.63 ± 3.8
Calcium	124.34 ± 10.4	128.55 ± 20.4	121.74 ± 7.9	131.71 ± 14.8	140.66 ± 10.1
Phosphorus	114.02 ± 20.6	118.71 ± 36.5	102.25 ± 12.5	119.28 ± 21.6	130.90 ± 15.8
Ca/P	1.10 ± 0.1	1.12 ± 0.2	1.20 ± 0.1	1.11 ± 0.1	1.07 ± 0.05

Values are as means ± standard deviation of three replicates. Means followed by the same letter in the column do not differ among themselves by Duncan test (p<0.05).

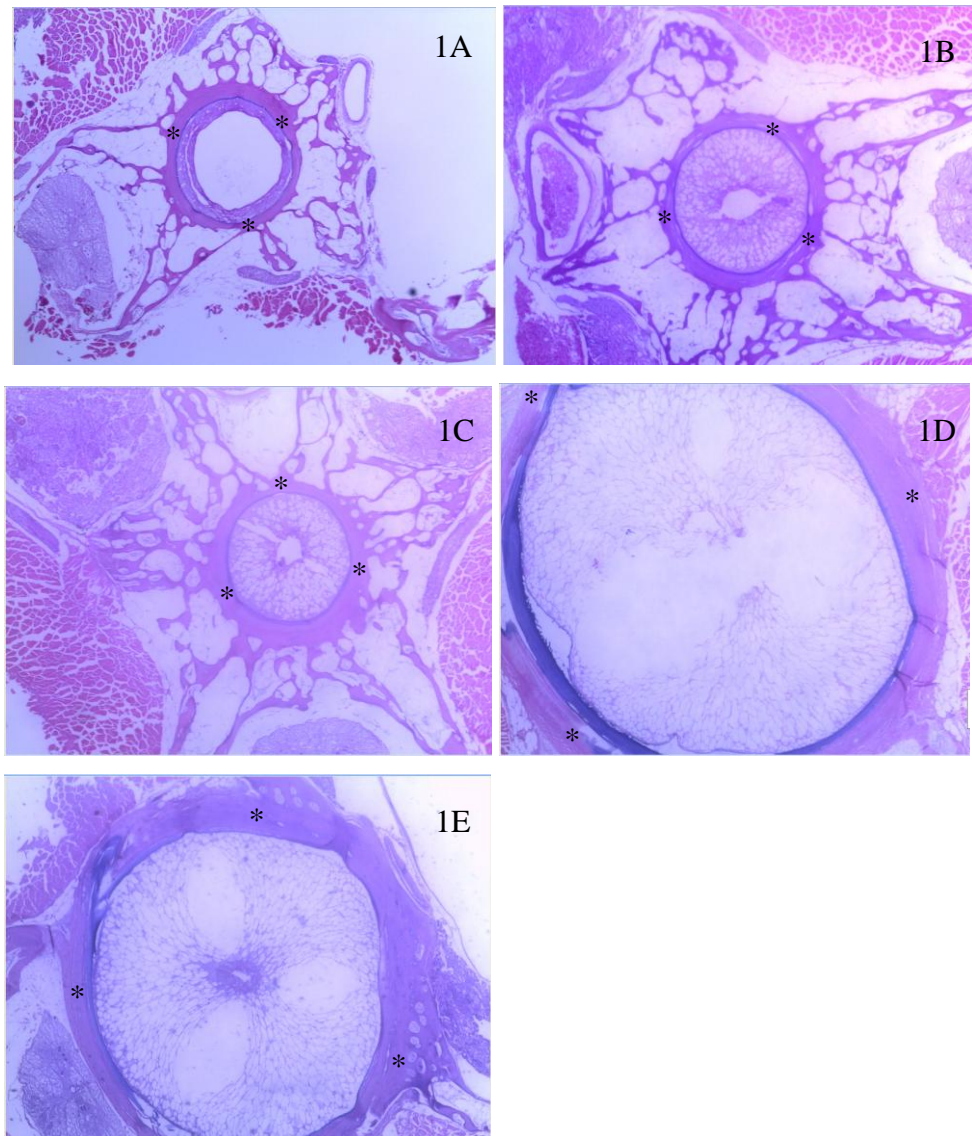


Figure1. Vertebrae histological section of juvenile Nile tilapia fed diets containing 0 (1A); 0,34: 0,51 (1B); 0,51:0,51 (1C); 0,67:1,0 (1D) and 1,0:1,0 (1E) of calcium and phosphorus, respectively. Locations represented for * are bone matrix. They represent locations that were performed Morphometric cuts.

CAPÍTULO III

Cálcio e fósforo para tilápia-do-nilo na utilização de nutrientes e parâmetros bioquímicos

Resumo

Para investigar influência do cálcio e fósforo sobre juvenis da tilápia-do-nilo, foram utilizados 60 peixes (peso médio, $80,3 \pm 1,0$ g) alimentados com dieta ausente de suplementação e suplementadas com 3,4:5,1; 5,1:5,1; 6,7:10,0 e 10,0:10,0g kg^{-1} de cálcio e fósforo, durante 96 dias. Todas as dietas foram acrescidas de óxido de cromo III. Peixes suplementados apresentaram maior ($P < 0,05$) taxa de crescimento específico. A concentração de orto fosfato na água dos aquários de peixes alimentados com 5,1:5,1 e 10,0:10,0g Kg^{-1} foi maior ($P < 0,05$). A retenção de fósforo foi maior ($P < 0,05$) com a inclusão deste mineral na dieta. Maiores ($P < 0,05$) valores de colesterol total foram apresentados no soro de peixes alimentados com 3,4: 5,1g kg^{-1} e 5,1:5, 1g kg^{-1} . Peixes alimentados com a dieta contendo 6,7:10,0g kg^{-1} de cálcio e fósforo apresentaram valores de colesterol séricos menores ($P < 0,05$) comparados aos demais tratamentos. A atividade da ATPase no fígado e concentração de triglicerídeos no soro aumentaram em peixes ($P < 0,05$) com a inclusão dos minerais na dieta em relação aos peixes alimentados com dieta sem inclusão. Juvenis da tilápia-do-nilo apresentaram melhor resultado quando alimentados com 6,7:10,0g kg^{-1} de cálcio e fósforo na dieta.

Palavras chave: Orto fosfato, ATPsintetase, Lipídeo, Peixes, Nutrientes

Calcium and phosphorous to the Nile tilapia in the use of nutrients and biochemical parameters

Abstract

To investigate the influence of calcium and phosphorus on juvenile of Nile tilapia, 60 fish were used (mean weight 80.3 ± 1.0 g) fed unsupplemented and diet supplemented with 3.4: 5.1; 5.1: 5.1; 6.7: 10.0 and 10.0: 10.0 g kg⁻¹ of calcium and phosphorus for 96 days. All diets were added to chromium III oxide. Supplemented fish had higher ($P < 0.05$) specific growth rate. The concentration of ortho-phosphate in water for fish tanks fed with 5.1: 10.0 and 5.1: 10.0 g kg⁻¹ was higher ($P < 0.05$). The phosphorus retention was higher ($P < 0.05$) with the inclusion of this mineral in the diet. Higher ($P < 0.05$) Total cholesterol values were found in the serum of fish fed with 3.4: 5.1 g kg⁻¹ and 5.1: 5.1 g kg⁻¹. Fish fed diets containing 6.7: 10.0 g kg⁻¹ of calcium and phosphorus had lower serum cholesterol levels ($P < 0.05$) compared to other treatments. The ATPase activity in the liver, serum triglyceride concentration in fish increased ($P < 0.05$) with the inclusion in the diet compared to fish fed with diet without inclusion. Juvenile of Nile tilapia showed better results when fed with 6.7: 10.0 g kg⁻¹ of calcium and phosphorus in the diet.

Keywords: Ortho-phosphate, ATP synthase, Lipid, Fish, Nutrients

Introdução

A aquicultura tem como desafio melhorar a qualidade dos efluentes mantendo os níveis de produção elevados. Os efluentes provenientes dos sistemas de produção contêm fósforo e nitrogênio, fato que pode contribuir para o crescimento excessivo de algas e macrófitas no meio aquático (Pillay 1992). Contudo, um modo eficaz para reduzir a carga de efluentes da aquicultura seria modificar a formulação de dietas para o crescimento de peixes objetivando a diminuição da excreção de fósforo e nitrogênio para o meio (Cowey e Cho 1991; Talbot e Furo 1994). No país, a eliminação permitida de fósforo corresponde á 0,035mg/L, segundo resolução do CONAMA.

O fósforo ingerido possui três destinos, ser retido para o crescimento, estar presente em resíduos sólidos e ser excretado (Lall 1991; Sugiura *et al.* 2000a). No entanto, alguns fatores podem influenciar os destinos do fósforo ingerido, dentre eles, incluem a forma do fósforo ingerido e sua disponibilidade, o nível de fósforo na dieta, a regulação fisiológica da absorção intestinal e a excreção urinária de fósforo (Lall 1991; Vielma e Lall 1998; Rodehutschord *et al.* 2000. ; Sugiura *et al.* 2000b).

A forma predominante de fósforo em alimentos de origem vegetal é o fósforo fítico, total ou parcialmente indisponível aos peixes (NRC 2011). No entanto, a substituição por fontes protéicas de origem vegetal em dietas podem reduzir os resíduos de fósforo mesmo sem a adição de fitase (Jahan *et al.* 2000; Vielma *et al.* 2000), melhorando a absorção do mineral pelos animais.

A relação de cálcio e fósforo adequada pode melhorar o aproveitamento de fósforo pelos peixes (Lall e LewisMcCrea 2007). O fósforo é um componente importante dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e dos compostos de transporte de energia como fosfolipídios das membranas celulares, bem como, da adenosina-trifosfato (ATP) (Lall 1991).

As funções metabólicas nos peixes dependem da energia oriunda do ATP. Esta energia é proveniente das fontes lipídicas, entre elas, os ácidos graxos que associados á proteínas representam os principais nutrientes essenciais para estes animais. Desta forma, a principal função dos lipídeos consiste em produzir energia metabólica para crescimento, nutrição, natação e armazenamento em peixes (Tocher 2003). Poucos estudos descrevem a composição dos ganhos e depósitos energéticos dos peixes alimentados com diferentes rações. Além disso, são escassas as informações sobre a

utilização de distintas fontes de nutrientes na composição energética em diversos tecidos de peixes (Dabrowski et al. 2010), incluindo pesquisas relacionadas a minerais.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência de dietas contendo níveis de cálcio e fósforo sobre a retenção de nutrientes e parâmetros bioquímicos.

Material e Métodos

Dietas Experimentais

Foram avaliadas quatro dietas suplementadas com cálcio e fósforo visando obter relações entre o cálcio e o fósforo de 1,0:1,0 e 1,0:1,5 e uma dieta ausente de suplementação destes minerais para ser utilizada como controle negativo. As fontes utilizadas nas dietas suplementadas foram fósforo monopotássico e fósforo bicálcico.

As dietas foram constituídas de um tratamento ausente de suplementação, contendo apenas o cálcio e fósforo presente nos alimentos, as demais dietas foram formuladas para conter 3,4: 5,1g kg⁻¹ (relação 1,0:1,5); 5,1:5,1 g kg⁻¹ (relação 1,0:1,0); 6,7:10,0g kg⁻¹ (relação 1,0:1,5) e 10,0:10,0g kg⁻¹ (relação 1,0:1,0) de cálcio e fósforo, respectivamente. As dietas foram balanceadas de acordo com Furuya et al. (2010). O suplemento vitamínico-mineral presente nas dietas não continha cálcio e fósforo em sua composição e todas as dietas foram acrescidas de óxido de cromo III (Tabela 1).

Após a formulação das dietas, os ingredientes foram moídos a 0,42mm e homogeneizados em misturador automático. A mistura foi processada em extrusora e desidratada em estufa de circulação forçada a 55°C por 12h e armazenados a -20°C para posterior utilização.

Os peixes foram adaptados as dietas por sete dias e durante todo o período experimental os animais foram alimentados quatro vezes ao dia até a saciedade aparente. As alimentações foram realizadas às 8h30min, 11h30min, 14h30min e 17h30min.

Determinação dos coeficientes de disponibilidade

Foram utilizados 60 peixes com peso médio de 80,3 ± 1,0 g distribuídos em cinco tratamentos para determinação dos coeficientes de disponibilidade aparente do

cálcio, do fósforo e para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia.

Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia até a saciedade aparente e nos dias da coleta de fezes as alimentações do período vespertino foram realizadas com maior frequência. As coletas de fezes foram realizadas em dias alternados, em tanques cônicos de 300 L para sedimentação das fezes (Cho et al. 1982). Os tanques foram conectados a um filtro biológico e a temperatura da água foi mantida a 26 °C por termostato eletrônico.

As fezes foram coletadas e armazenadas a -20 °C até a obtenção de volume representativo da amostra. As amostras foram secas em estufa de circulação forçada a 55 °C por 24h, maceradas e removidas as escamas. As amostras de fezes foram submetidas a digestão ácida (níttrica e perclórica) e a análise do oxido de cromio III foi realizada por espectrofotometria visível (Spectrofotometer Femto® model 6000s).

Os coeficientes de absorção aparente foram calculados de acordo com a equação descrita por Cho e Kaushik, (1990): $CDA (\%) = 100 - [100 * (\%Cr_2O_3 \text{ dieta} / \% Cr_2O_3 \text{ fezes}) * (\% \text{nutriente fezes} / \% \text{nutriente dieta})]$; taxa de crescimento específico descrito por Cho (1992): $TCE: [((\text{peso final (g)} - \text{peso inicial(g)}) / (\text{dias de experimento})) * 100]$;

Análises Bioquímicas

Foi retirado sangue de seis peixes por tanque por meio de punção da veia caudal para determinação de proteínas totais, cálcio, triglicérides, colesterol, atividade da fosfatase alcalina e atividade da aspartato aminotransferase. O sangue foi centrifugado a 5000 rpm por 15min para a retirada do soro e armazenado a -20°C até o dia seguinte para a realização das análises, sendo estas realizadas por meio do Kits da Labtest® (Minas Gerais, Brasil). Para a determinação da atividade da adenosina trifosfato sintetase foi retirado o fígado de seis peixes por tanque e armazenados em nitrogênio líquido para posterior análise.

A determinação das proteínas totais no soro dos peixes foi realizada pelo método do Biureto. Este método consiste na reação dos íons cobre (em meio alcalino) com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura com absorvância máxima em 545nm. Esta absorvância é proporcional o teor das proteínas nas amostras (Labtest®, Proteínas Totais, Minas Gerais, Brasil).

As análises de cálcio foram realizadas por meio da reação do Ca^{2+} com arsenazo III formando complexo de cor azul. A determinação da absorbância deste produto medida nos comprimentos de onda de 600 nm é proporcional o teor de cálcio nas amostras (Labtest[®], Ca arsenazo Liquiform, Minas Gerais, Brasil).

As avaliações de triglicérides foram realizadas pela sua hidrolização por meio da lipoproteína lípase liberando glicerol. O glicerol é convertido em glicerol-3-fósforo que é oxidado a dihidroxiacetona e a peróxido de hidrogênio pela presença de glicerolfósforo oxidase. O acoplamento do peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e do 4-clorofenol produziu reação que catalisada pela peroxidase produz uma quimoneimina que tem maior absorbância em 505 nm que é diretamente proporcional aos triglicerídeos das amostras (Labtest[®], Triglicérides Liquiform, Minas Gerais, Brasil).

Nas amostras de soro dos peixes, os ésteres do colesterol foram hidrolisados a colesterol livre e ácido graxo. O colesterol livre foi oxidado por meio da colesterol oxidase formando 4 colesteno e peróxido de hidrogênio. Na presença de oxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que possui absorção máxima a 500nm. Sendo a intensidade de radiação absorvida diretamente proporcional á teor de colesterol na amostra (Labtest[®], Colesterol Liquiform, Minas Gerais, Brasil).

A atividade da enzima fosfatase alcalina foi determinada em modo cinético. Em pH alcalino, esta enzima hidrolisou o p-nitrofenilfósforo liberando fósforo inorgânico e p-nitrofenol. O p-nitrofenol possui elevada absorbância a 405nm, sendo sua quantidade produzida diretamente proporcional a atividade da fosfatase alcalina na amostra (Labtest[®], Fosfatase Alcalina Liquiform, Minas Gerais, Brasil).

A análise da enzima aspartato aminotransferase realizada por meio da enzima malato desidrogenase, sendo o oxalato reduzido a malato e a coenzima NADH é oxidada. A oxidação desta coenzima é monitorada por meio de espectrofotômetro em 340nm sendo a redução da absorbância diretamente proporcional a atividade da enzima na amostra (Labtest[®], AST/GOT Liquiform, Minas Gerais, Brasil).

Para determinar a atividade da adenosina trifosfato sintetase (ATP-ase, E.C. 2.7.1.20) e da proteína, foram homogeneizados 200mg do tecido em 5mL de solução tampão fósforo gelada a 0,1 mol/L com pH de 7,4. Os tecidos foram homogeneizados

em aparelho Potter-Elverhjem de vidro com homogeneizador em teflon. O homogenato foi centrifugado a 10000rpm por 15min. O precipitado resultante foi ressuspensionado em 1mL de tampão fósforo a 0,1mol/L com pH 7,4 contendo 250mmol/L de manitol, 70mmol/L de sacarose e 1mmol/L de EDTA. A atividade da ATPase foi realizada por meio de um leitor de placas para fluorescência, fluorescência polarizada, absorvância e luminescência (Dcom[®] Micro-injeção Automática, Flex Station 3, Molecular Devices Microplaca, California, USA) em 340nm e controlado por meio do software SoftMax Pro[®] (Molecular Devices, California EUA). A temperatura utilizada para realização da análise foi de 25°C. Os reagentes utilizados para analisar o precipitado do tecido hepático são provenientes da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO) (Novelli et al. 2010). A redução da absorvância é diretamente proporcional a atividade da enzima na amostra.

A análise da proteína do precipitado ressuspensionado foi realizada pelo método do Biureto (Labtest[®], Proteínas Totais, Minas Gerais, Brasil).

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm DP. Todos os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). As diferenças pelos tratamentos foram determinadas pelo teste de Duncan ao nível de significância $P < 0,05$.

Resultados

Utilização Protéica e Energética

Valores de fósforo total e fósforo disponível foram apresentados na Tabela 2.

Todos os peixes suplementados com dietas de cálcio e fósforo apresentaram a taxa de crescimento específico maior ($P < 0,05$) comparados aos animais sem suplementação. Os peixes alimentados com as dietas contendo 5,1: 5,1 g Kg⁻¹ de cálcio e fósforo apresentaram redução do crescimento específico quando comparados aos demais tratamentos (Tabela 3).

A concentração de orto fosfato na água dos aquários foi maior ($P < 0,05$) em peixes alimentados com as dietas contendo 5,1:5,1 e 10,0:10,0g Kg⁻¹ de cálcio e fósforo.

A retenção de fósforo foi maior ($P < 0,05$) de acordo com a inclusão deste mineral na dieta (Tabela 3).

Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de eficiência protéica nos peixes deste estudo.

Bioquímica

Os valores de colesterol total no soro de peixes alimentados com dietas contendo 3,4: 5,1 e 5,1:5,1g kg^{-1} de cálcio e fósforo foram maiores ($P<0,05$) comparados aos animais alimentados com dieta sem inclusão. Peixes alimentados com a dieta contendo 6,7:10,0g kg^{-1} de cálcio e fósforo apresentaram valores de colesterol séricos menores ($P<0,05$) quando comparado ao soro de peixes alimentados com os demais tratamentos, enquanto os peixes alimentados com dieta 10,0:10,0g kg^{-1} não apresentaram alteração na concentração deste parâmetro em relação aos animais alimentados com dieta sem inclusão (Tabela 4). A atividade da ATPase no fígado dos peixes aumentou ($P<0,05$) com a inclusão de cálcio e fósforo na dieta (Tabela 4). Os valores de proteína total, cálcio total, fosfatase alcalina e AST encontradas no soro dos peixes não apresentaram diferenças ($P<0,05$) entre os tratamentos (Tabela 4).

A concentração de triglicerídeos séricos nos peixes alimentados com dietas suplementadas com cálcio e fósforo foram maiores ($P<0,05$) com relação aos peixes alimentados com dieta sem inclusão de cálcio e fósforo (Tabela 4).

Discussão

A relação cálcio e fósforo pode influenciar na utilização da energia e da proteína pelos peixes. Esta relação, quando adequada, pode melhorar o aproveitamento de fósforo pelos animais (Lall e McCrea 2007), sendo este mineral importante no metabolismo energético e de aminoácidos (Lall 2002). Embora, as inclusões de cálcio e fósforo nas dietas não tenham alterado a concentração de proteína sérica destes animais.

A piora na retenção de fósforo em peixes alimentados com 5,1:5,1g kg^{-1} de fósforo pode ser atribuída aos menores níveis do mineral na dieta. Aumento da inclusão do mineral aumenta sua deposição no corpo dos peixes (Lall, 2002).

Peixes que consumiram dieta contendo 5,1:5,1g kg^{-1} de cálcio e fósforo, respectivamente apresentaram baixa taxa de crescimento específico. A adequação das concentrações absolutas de cálcio e fósforo nas dietas pode interferir na absorção destes minerais, pois o excesso de cálcio limita a absorção intestinal do fósforo, porque o

fósforo se combina com o cálcio formando composto biologicamente indisponível aos peixes (Andrews et al. 1973).

A inclusão de cálcio e fósforo foi responsável pelo aumento da taxa de crescimento específico em detrimento à concentração de colesterol sérico em peixes alimentados com 6,7:10,10g kg⁻¹ de cálcio e fósforo.

O colesterol é precursor da vitamina D, de ácidos biliares e de hormônios esteróides (Nelson e Cox 2011). Mecanismos regulatórios de transporte e biossíntese de colesterol podem manter o suprimento deste esteróide no organismo (Nelson e Cox 2011). A redução do colesterol no soro de peixes que apresentaram maior taxa de crescimento específico (6,7:10,10g kg⁻¹) pode ter ocorrido devido à maior utilização do colesterol como precursor dos hormônios de crescimento e da vitamina D (Nelson e Cox 2011).

A inclusão de fósforo na dieta melhorou a atividade da enzima ATPase nos peixes, promovendo aumento da atividade da ATPase em todos os tratamentos. A ATPase é um complexo enzimático que a partir de ADP e fósforo inorgânico catalisa a formação e hidrólise do ATP acompanhado por fluxo de prótons (Nelson e Cox 2011). O ATP hidrolisado pode ter liberado energia que foi direcionada para os processos anabólicos (Nelson e Cox 2011), refletindo no crescimento dos peixes.

O fósforo atua no metabolismo intermediário participando dos processos metabólicos de transformação da energia química por meio do ATP (Nelson e Cox 2011). As proteínas quinases são enzimas que catalizam a fosforilação de proteínas por meio do ATP, estas proteínas estão envolvidas em diversas respostas celulares como incremento da musculatura esquelética por meio da hipertrofia das fibras musculares, estimulação da lipólise, aumento na gliconeogênese, glicólise, insulina e glucagon, (Moody et al.2000).

O aumento da produção de energia via ATP, pode induzir a síntese de ácidos graxos no fígado elevando sua concentração no tecido hepático. Os ácidos graxos são esterificados a triacilgliceróis nos hepatócitos, posteriormente excretados na circulação por meio da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), colesterol. Fato que pode ter contribuído com o aumento do triacilglicerol no soro dos animais que receberam dietas suplementadas de cálcio e fósforo (Novelli 2005; Sligte et al. 2003).

Os sinais de deficiência de fósforo incluem crescimento deficiente e perda de apetite (Yuan *et al.* 2011), estes fatores podem influenciar o aporte de nutrientes para os animais. A falta de nutrientes poderia prejudicar a taxa de crescimento específico, bem como a produção de lipoproteínas hepáticas reduzindo o teor de colesterol sérico, sendo que a utilização de fontes alternativas de triacilglicerol pelos peixes alimentados com dieta sem inclusão de cálcio e fósforo pode explicar a redução em seus teores.

As concentrações de orto fosfato na água dos aquários dos peixes alimentados com dietas contendo 5,1:5,1 e 10,0:10,0g kg⁻¹ de cálcio e fósforo foram inferiores aos níveis máximos permitidos de 0,035mg L⁻¹ (Conama, 2009). Contudo, a água do aquário de peixes alimentados com as demais dietas apresentaram concentrações bastante reduzidas de orto fosfato. O fósforo não absorvido pelo animal pode ser excretado e perdido na água (WEISMANN *et al.*, 1988), este fato está diretamente relacionado com a quantidade e qualidade do fósforo presente na ração (ROY *et al.*, 2002).

A retenção de fósforo ter aumentado de acordo com a inclusão do mineral na dieta pode ser explicado devido ao fato de que os processos de formação, mineralização e reabsorção óssea são influenciados pelo nível de fósforo nas dietas (Roy *et al.* 2003). A deficiência de fósforo na dieta de peixes teleósteos diminui com o teor mineral do osso, significando atraso na mineralização (Vielma *et al.* 2002).

O nível de 6,7:10,0g kg⁻¹ de cálcio e fósforo para juvenis da tilápia-do-nilo foi adequado devido ao fato da água do aquário destes peixes apresentarem teor reduzido de orto fosfato, sem alterar parâmetros de crescimento específico e produção de energia.

Rerências Bibliográficas

- Brown, M. L., Jaramillo, F. & Gatlin, D. M. III (1993) Dietary phosphorus requirement of juvenile sunshine bass, *Morone chysops* x *M. saxatilis*. *Aquacult.*, **113**, 355-363.
- Cho, C.Y., Slinger, S.J. & Bayley, H.S. (1982) Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B, 25–41.
- Cho, C. Y. & Kaushik, S.J. (1990) "Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." *World review of nutrition and dietetics*, 61, 132-172.
- Cho, C. Y. (1992) Feeding systems for rainbow trout and other salmonids with reference to current estimates of energy and protein requirements. *Aquaculture*, 100 (1), 107-123.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução no 420, de 28 de dezembro de 2009. "Classificação dos limites do uso de águas.", *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, DF, nº 249, de 30/12/2009. p.81-84.
- Cowey, C.B. & Cho, C.Y. (1991) *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste. Proceedings of the First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste.* University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 1990p.
- Dabrowski, K., Zhang, Y., Kwasek, K., Hliwa, P., & Ostaszewska, T. (2010). Effects of protein, peptide and free amino acid based diets in fish nutrition. *Aquaculture Research*, 41(5), 668-683.
- Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Boscolo, W.R., Cyrino, J.E.P., Furuya, V.R.V. & Feiden, A. (2010) *Tabelas brasileiras para nutrição de Tilápias.* Toledo G.F.M., 100p.
- Hua, K., & D. P. Bureau. 2010. Quantification of differences in digestibility of phosphorus among cyprinids, cichlids, and salmonids through a mathematical modeling approach. *Aquaculture* 308: 152-158
- Jahan, P., Watanabe, T., Satoh, S. & Viswanath, K. (2000) Effect of dietary fish meal levels on environmental phosphorus loading from carp culture. *Fish Sci.*, 66, 204–210.

- Lall, S.P. (1991) Digestibility, metabolism and excretion of dietary phosphorus in fish. In: Nutritional Strategies and Aquaculture Waste. Proceedings of the First International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste (Cowey, C.B. & Cho, C.Y. eds), pp. 21–36. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 1990p.
- Lall, S.P. The minerals, Fish Nutrition, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2002, p. 259-308.
- Lall, S.P. & Lewis-McCrea, L.M. (2007) Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. *Aquaculture Nutr.*, 267, 3–19.
- Nelson e Cox, A.L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. Princípios de Bioquímica. São Paulo, Sarvier, Brazil, 2011, 1271p.
- Moody, D.E., Hancock, D.L., & Anderson, D.B. (2000). Phenetanolamine repartitioning agents. In: Farm animal Metabolism and Nutrition (D’Mello, J.P.F. ed) pp 65-95. CABI international, New York.
- Novelli, E. L., Souza, G. A., Ebaid, G. M., Rocha, K. K., Seiva, F. R., Mani, F. & Sforcin, J. M. (2010) Energy Expenditure and Oxygen Consumption as Novel Biomarkers of Obesity induced Cardiac Disease in Rats. *Obesity*, 18 (9), 1754-1761.
- Novelli E.L.B. Nutrição e vida saudável. Ribeirão Preto. Tecmed, Brasil, 2005, 288p.
- NRC -National Research Council (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academy Press (Washington, D.C).
- Pillay, T.V.R. (1992) Aquaculture and the Environment. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA.
- Rodehustscord, M., Gregus, Z. & Pfeffer, E. (2000) Effect of phosphorus intake on faecal and non-faecal phosphorus excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the consequences for comparative phosphorus availability studies. *Aquaculture*, 188, 383-398.
- Sligte, K., Bourass I., Driessen, I.N., Stockbrogger, R.W., Koek, G. H. (2004) Non-alcoholic esteatohepatitis: review of growing medical problem. *Eur. J. of Inter. Medicine.*, 15, 10-21.

- Sugiura, S.H., Dong, F.M. & Hardy, R.W. (2000a) A new approach to estimating the minimum dietary requirement of phosphorus for large rainbow trout based on nonfaecal excretions of phosphorus and nitrogen. *J. Nutr.*, 130, 865–872.
- Sugiura, S.H., Dong, F.M. & Hardy, R.W. (2000b) Primary responses of rainbow trout to dietary phosphorus concentrations. *Aquacult. Nutr.*, 6, 235–246.
- Talbot, C. & Hole, R. (1994) Fish diets and the control of eutrophication resulting from aquaculture. *J. Appl. Ichthyol.*, 10, 258–270.
- Tocher, D.R. (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11 (2), 107-184.
- Vielma, J. & Lall, S.P. (1998) Phosphorus utilization by Atlantic salmon (*Salmo Salar*) reared in freshwater is not influence by higher dietary calcium intake. *Aquaculture*, 160, 117-128.
- Vielma, J., Makinen, T., Ekholm, P. & Koskela, J. (2000) Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture*, 183, 349–362.
- Vielma, J., Koskela, J. & Ruohonen, K. (2002) Growth, bone mineralization, and heat and low oxygen tolerance in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) fed with graded levels of phosphorus. *Aquacul.*, 212, 321–333.
- Yuan, Y. C., Yang, H. J., Gong, S. Y., Luo, Z., Yu, D. H., Yan, J. L. & Yang, X. F. (2011) Dietary phosphorus requirement of juvenile Chinese, *Myxocyprinus asiaticus*. *Aquaculture Nutrition*, 17, 159-169.

Table 1. Composition of basal and experimental diets (dry matter 100%)

Ingredients (g kg ⁻¹)	0:0	3.4:5.1	5.1:5.1	6.7:10.0	10.0:10.0
Soybean meal	458.70	465.14	465.92	468.19	468.90
Corn, gluten-60	57.60	55.03	54.82	59.00	59.00
Wheat middling	100.00	100.00	97.98	90.00	90.00
Corn grain	367.70	349.13	349.40	316.24	311.97
Soybean oil	-	-	-	11.81	13.09
HCL-Lysine	2.58	2.49	2.48	2.49	2.48
Methionine	2.41	2.45	2.45	2.46	2.46
Threonine	3.37	3.37	3.37	3.39	3.39
Tryptophan	0.01	-	-	0.01	0.01
Bicalcic phosphates	-	7.37	14.22	20.67	33.95
Monopotassium phosphates	-	7.42	1.78	18.14	7.14
Chromium oxide III	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Butylated hydroxy toluene	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Salt	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin C	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Vitamin and mineral premix ¹	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Estimated composition					
Digestible energy (kca kg ⁻¹)	3086	3039	3036	3036	3036
Digestible protein (%)	26.81	26.81	26.81	26.81	26.81
Crude fiber (%)	4.40	4.41	4.40	4.29	4.29
Crude lipid (%)	0.90	0.88	0.87	2.03	2.16
Calcium (%)	0.16	0.34	0.51	0.67	1.00
Available phosphous (%)	0.20	0.51	0.51	1.00	1.00
Lysin (%)	1.53	1.53	1.53	1.53	1.53
Methionine (%)	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
Methionine+Cystine (%)	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
Threonine (%)	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18
Tryptophan (%)	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30

¹Vitamin and mineral premix: Vitamin A = 1.000.000 IU kg⁻¹; Vitamin D3 = 500.000 IU kg⁻¹; Vitamin E = 20.000 IU kg⁻¹; Vitamin K3 = 500 mg kg⁻¹; Vitamin B1 = 1.900 mg kg⁻¹; Vitamin B2 = 2.000 mg kg⁻¹; Vitamin B6 = 2.400 mg kg⁻¹; Vitamin B12 = 3.500 mg kg⁻¹; Vitamin C = 25 g kg⁻¹; Niacin = 5.000 mg kg⁻¹; calcium pantothenate = 4.800 mg kg⁻¹; Folic acid = 200 mg kg⁻¹; Biotin = 40 mg kg⁻¹; Manganese = 7.500 mg kg⁻¹; Zinc = 210 g kg⁻¹; Iron = 12.50 g kg⁻¹; Copper = 2.000 mg kg⁻¹; Iodine = 200 mg kg⁻¹; Selenium = 70 mg kg⁻¹; Butylated hydroxyl toluene = 300 mg kg⁻¹.

Table2. Analyzed values of Total calcium (Ca_{total}), Phosphorus available ($P_{available}$), Total phosphorus (P_{total}) and Digestibility coefficient (CDA) of Nile tilapia juvenile

	0:0	3.4:5.1	5.1:5.1	6.7:10.0	10.0:10.0
Analyzed values (%)					
$P_{available}$	0.18	0.50	0.52	1.06	1.07
P_{total}	0.76	1.31	1.41	2.12	2.21
CDA Crude protein	93	94	95	95	94
CDA Gross energy	77	79	81	84	82

Values are as means \pm standard deviation of three replicates. Means followed by the same letter in the column do not differ among themselves by Duncan test ($p < 0.05$). Apparent digestibility coefficient (CDA) = $100 - [100 * (\% Cr_2O_3 \text{ diet} / \% Cr_2O_3 \text{ feces}) * (\% \text{ nutrient feces} / \% \text{ nutrient diet})]$;

Table 3. Values of protein efficiency rate (PER), specific growth rate (SGR), Ortho-Phosphate (OP) and Phosphorus retention (PR) of Nile tilapia juvenile

	0:0	3.4:5.1	5.1:5.1	6.7:10.0	10.0:10.0
PER	2.45 ± 0.2	3.41 ± 1.2	3.20 ± 0.1	3.10 ± 0.65	2.91 ± 0.28
SGR	9.13 ± 1.9 ^c	91.37 ± 36.6 ^{ab}	81.79 ± 4.5 ^b	132.73 ± 33.3 ^a	129.42 ± 13.5 ^a
OP	0.007 ± 0,00 ^b	0.007 ± 0,00 ^b	0.034 ± 0,02 ^a	0.004 ± 0,00 ^b	0.031 ± 0,00 ^a
PR	-	6.44 ± 0.9 ^b	4.98 ± 0.5 ^b	14.94 ± 1.1 ^a	16.39 ± 6.1 ^a

Values are as means ± standard deviation of three replicates. Means followed by the same letter in the column do not differ among themselves by Duncan test ($p < 0.05$). SGR: $[(\ln(\text{final weight}) - \ln(\text{initial weight})) / (\text{total experiment days})] * 100$;

Table 4. Cholesterol, Triglycerides, Calcium, Protein Alkaline phosphatase enzymatic activity (AF), aspartate aminotransferase (AST) in serum and adenosine triphosphate synthetase (ATPase) in liver of juvenile Nile-tilapia fed diets containing various levels of calcium and phosphorus

	0:0	3.4:5.1	5.1:5.1	6.7:10.0	10.0:10.0
Serum analyzis					
Cholesterol (mg dL ⁻¹)	151.07 ± 7.47 ^b	182.78 ± 15.49 ^a	181.59 ± 4.69 ^a	107.16 ± 2.87 ^c	156.23 ± 12.28 ^b
Triglycerides (mg dL ⁻¹)	82.61 ± 14.83 ^b	331.16 ± 9.85 ^a	371.30 ± 167.38 ^a	470.10 ± 38.87 ^a	471.55 ± 222.33 ^a
Calcium (mg dL ⁻¹)	20.28 ± 3.14	21.62 ± 1.47	20.16 ± 1.35	21.96 ± 1.39	20.06 ± 2.21
Protein (g dL ⁻¹)	4.32 ± 0.92	4.37 ± 0.41	4.48 ± 0.50	3.50 ± 0.36	4.15 ± 0.54
Serum' enzymatic activity					
AF (U L ⁻¹)	28.25 ± 4.28	18.89 ± 2.43	24.42 ± 6.53	31.86 ± 2.59	27.59 ± 10.72
AST (UL ⁻¹)	11.17 ± 1.96	12.51 ± 2.48	13.51 ± 3.84	12.75 ± 1.53	12.78 ± 3.61
Liver' enzymatic activity					
ATPase (U g ⁻¹ protein)	0.86 ± 0.37 ^c	1.45 ± 0.2 ^b	2.06 ± 0.22 ^{ab}	1.50 ± 0.05 ^b	2.53 ± 0.56 ^a

Values are as means ± standard deviation of six replicates. Means followed by the same letter in the column do not differ among themselves by Duncan test (p<0.05).

CAPÍTULO IV

Implicações

Os juvenis da tilápia-do-nilo podem regular o cálcio e fósforo ingerido a fim de manter no corpo a relação 1:1. Este fato pode ocorrer desde que em condições necessárias como: quantidades suficientes de cálcio na água, ou se necessário, suplementação do mineral por meio da dieta. Além de atender as necessidades de fósforo disponível para a espécie. Desta forma, ao utilizar as relações deve-se atentar aos níveis destes minerais nas dietas. O fato de que a relação cálcio e fósforo adequada pode ser de 1:1 ou de 1:1,5 propicia aos profissionais de aquicultura meios para a utilização de fontes de fósforo economicamente e sazonalmente mais propícias.

Associar as necessidades minerais dos peixes formulando dietas com o máximo aproveitamento do nutriente pode reduzir o impacto ambiental proveniente da atividade aquícola. A relação cálcio e fósforo adequada, associada à energia e a proteína, bem como a relação entre eles podem nos dar informações a respeito da lixiviação de fósforo e nitrogênio para o meio além de contribuir com a utilização correta dos nutrientes propiciando ótimo crescimento, melhorando a saúde dos animais e conseqüentemente aumentando a produção.