

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

FÓSFORO DISPONÍVEL NA MINERALIZAÇÃO ÓSSEA DE
ALEVINOS DA TILÁPIA DO NILO

MARIUCHA KARINA HONÓRIO RIBEIRO ROCHA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre.

BOTUCATU - SP
JUNHO – 2012

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

FÓSFORO DISPONÍVEL NA MINERALIZAÇÃO ÓSSEA DE
ALEVINOS DA TILÁPIA DO NILO

MARIUCHA KARINA HONÓRIO RIBEIRO ROCHA
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato
Co-orientadora: Prof. Dr. Edma Miranda de
Carvalho

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre.

BOTUCATU – SP
JUNHO – 2012

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

R673f Rocha, Mariucha Karina Honório Ribeiro, 1983-
Fósforo disponível na mineralização óssea de alevinos da tilápia do Nilo / Mariucha Karina Honório Ribeiro Rocha. - Botucatu : [s.n.], 2012
vi, 43 f. : il. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2012

Orientador: Luiz Edivaldo Pezzato
Co-orientador: Edma Miranda de Carvalho
Inclui bibliografia

1. Biomineralização. 2. Densitometria óssea. 3. Peixe - Nutrição. 4. Tilápia (Peixe). 5. Tomografia. I. Pezzato, Luiz Edivaldo. II. Carvalho, Edma Miranda de. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e a capacidade de realizações.

Pai, Mãe e Irmã,

É difícil descrever em tão poucas palavras a importância de vocês na minha vida, esteio a cada tropeço, um abraço em cada tristeza, a explosão de felicidade toda vez que eu subia mais um degrau, a luta para ajudar na realização dos meus sonhos e a participação com torcida em cada um deles. Amor eterno.

Rafa,

Gostaria de agradecer pelos auxílios prestados durante meu mestrado e dizer que foi inspirador trabalhar com alguém apaixonado pelo que faz. Às vezes Deus coloca anjos em nossas vidas na forma de amigos e você para mim é um deles. Obrigada.

Edma,

Agradeço pelo auxílio na minha formação e pela amizade. Passou tão brevemente pela minha vida, mais deixou carinho, amizade e uma saudade imensa. Você é muito especial, obrigada por tudo.

Vivian,

Ainda me lembro de quando ingressei no mestrado e o Vado me disse: “... a Vivian vai te ensinar muito...” sábias palavras. Mesmo com tantas responsabilidades ainda arrumava tempo para ajudar. Você é uma amiga muito querida e gostaria de agradecer não só o apoio profissional mais o psicológico e por ser exemplo de comprometimento e trabalho. Obrigada.

Felipe

Obrigada por tudo meu amigo, protetor e irmão porque família não é apenas aquela em que nascemos mais também a que escolhemos de coração. Vou sentir imensamente sua falta.

Flávia, Isliana, Lara, Renan e Pedro,

Agradeço pela ajuda, apoio, socorro nas horas de necessidade e pela amizade, nossa convivência transforma meu cotidiano em dias mais felizes. Muito Obrigada.

AquaNutri

Agradeço aos membros do AquaNutri por todo aprendizado obtido pela participação no grupo.

Pezzato

E finalmente agradeço ao meu orientador, exemplo de dedicação profissional e ser humano, que mostra paixão pelo que faz e inspira. Sinto-me imensamente honrada por ter sido sua aluna na graduação e orientada na pós-graduação. Obrigada pela fé em mim depositada.

Lembrando também com muito carinho da Gisele do laboratório de Bromatologia, a equipe do professor Padilha do laboratório de química, ao Heraldo da radiologia veterinária, aos funcionários da pós-graduação Seila, Carlos e aos professores Heraldo, Vânia e Margarida. Agradeço a todos pelos auxílios prestados durante o desenvolvimento da minha dissertação.

Agradecimento especial à CNPq.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
Fósforo na estrutura óssea	4
Exigência de fósforo para peixes.....	5
Tomografia computadorizada.....	11
Densitometria óssea.....	12
Escala de Hounsfield	12
Uso da radiação X na experimentação animal.....	13
Referências bibliográficas	15
CAPÍTULO II	20
FÓSFORO DISPONÍVEL NA MINERALIZAÇÃO ÓSSEA DE ALEVINOS DA TILÁPIA DO NILO.....	21
Resumo	21
Abstract.....	22
Introdução	23
Material e métodos	24
Dietas experimentais.....	24
Determinação da disponibilidade de fósforo nas rações	25
Determinação da exigência de fósforo	26
Ganho de peso e sobrevivência	26
Cálcio e fósforo presentes nas vértebras.....	27
Coletas de água.....	27
Análises químicas	27
Tomografia e densitometria óssea	27
Análises estatísticas	28
Resultados.....	28
Discussão	29
Referências bibliográficas	34
Tabelas.....	39

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (100% da matéria seca).....	39
Tabela 2. Valores de desempenho, composição química de cálcio e fósforo nas vértebras e densitometria dos ossos e das vértebras de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis de fósforo	40
Tabela 3. Concentração de fósforo total (mg L^{-1}) presente na água dos aquários de peixes alimentados com níveis de fósforo nos períodos de coleta de (dias)	40
Figura.....	41
Figura I. Imagens tomográficas A ($6,0\text{g kg}^{-1}$); B ($4,0\text{g kg}^{-1}$); C ($2,0\text{g kg}^{-1}$); D ($1,5\text{g kg}^{-1}$) dos ossos e vértebras de alevinos de tilápia alimentados com níveis de fósforo.....	41
CAPÍTULO III.....	42
IMPLICAÇÕES	43

CAPÍTULO I

Considerações iniciais

O balanceamento adequado de minerais em dietas para peixes reduzem perdas urinárias e fecais, diminuindo a possibilidade de eutrofização do ambiente aquático (RICHIE e BROWN, 1996). Os sete principais minerais, assim como os quinze elementos traços considerados essenciais para os animais terrestres, também são exigidos pelos peixes. Entretanto, fósforo, cálcio, magnésio, ferro, zinco, iodo e selênio foram os mais estudados. Diferente dos demais animais, os peixes possuem como fonte de suprimento mineral a dieta, porém alguns elementos podem ser absorvidos da água (MIRANDA *et al.*, 2000).

O fósforo é um macromineral fundamental para o crescimento e a reprodução dos peixes, além de importante constituinte estrutural do tecido esquelético (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, fosfolipídeos, enzimas, compostos glicolíticos e de alta energia. Atua como moderador covalente de numerosas enzimas, sendo um dos principais ânions da estrutura cristalina dos ossos (BERNE, 1980).

A importância do fósforo na nutrição animal é devido a sua participação no processo de crescimento e mineralização óssea. A sua deficiência influencia o metabolismo intermediário exercendo papel importante na transferência de energia química no organismo por meio do trifosfato de adenosina (LEHNINGER *et al.*, 1995) 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. O mesmo é retirado do osso na forma de fosfato de cálcio e é utilizado para o crescimento de tecidos moles e o cálcio é descartado para o meio (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). Os

peixes podem absorver o fósforo da água pelas brânquias, porém a concentração de fósforo dissolvido em águas naturais é relativamente baixa (LOVELL, 1988). Devido a esta baixa concentração e ao fato do mineral presente nos alimentos convencionais encontrar-se parcialmente indisponível na forma de fitato, devido a mucosa intestinal dos peixes não secretar a enzima fitase (VIELMA *et al.*, 1998), as rações para peixes devem ser suplementadas com fontes de fósforo (LI e ROBINSON, 1996).

A assimilação do fósforo do alimento pelos peixes é duzentas vezes superior à quantidade absorvida da água (HEPHER, 1990). O aproveitamento desse mineral proveniente da dieta é eficiente, e seu quociente (mg de fósforo/mg de fósforo do peixe) esta entre 2 e 3 %. O fósforo absorvido em excesso volta a ser excretado na forma hidrossolúvel por meio da urina (STEFFENS, 1987).

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

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), sendo que estes ingredientes possuem cerca de 75% do fósforo na forma indisponível (POPMA e GREEN, 1990). 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 fosfatos de baixa solubilidade é superior 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, o fósforo inorgânico da alimentação é absorvido em considerável quantidade mediante trocas de formas não iônicas no trato digestório e, por transporte na forma iônica por meio do estômago até músculos e tecidos estruturais (STEFFENS, 1987). O fósforo, quando liberado ao ambiente, é considerado significativo efluente aquícola, sendo fonte de eutrofização dos ecossistemas de água doce devido ao aumento na população de cianobactérias e consequente piora na qualidade da água (VAN DER PLOEG e BOYD, 1991).

Em concentrações excessivas no meio aquático pode levar a eutrofização, comprometendo a qualidade da água e a capacidade de suporte dos sistemas aquícolas (ENGLISH *et al.*, 1993). Dietas estão sendo formuladas com o intuito de fornecer níveis adequados de fósforo para atender a necessidade dos peixes e garantir níveis mínimos aceitáveis a serem liberados para os efluentes.

O fósforo na estrutura óssea

Ossos de peixes são encontrados em todas as formas e tamanhos, com grande diversidade de cartilagens e células-condro osteogênicas. Ossos e cartilagens podem se desenvolver durante as fases embrionárias, larval, juvenil ou adulta sob a ontogenia normal ou durante estados patológicos como a cicatrização e regeneração óssea (LALL e MCCREA, 2007).

Durante as fases larval e juvenil podem ocorrer distúrbios no desenvolvimento do esqueleto dos peixes, os quais podem incluir malformações vertebrais. Estes distúrbios estão associados ao ambiente, fatores genéticos e principalmente a nutrição dos animais (ROY *et al.*, 2002).

O cálcio e o fósforo atuam em conjunto no desenvolvimento, manutenção do sistema esquelético e estabilidade das vértebras. Estes minerais são exigidos em grandes quantidades, quando comparados a outros elementos minerais (ROBINSON *et al.*, 1987).

O fósforo é o constituinte de 16% da estrutura óssea, com 85 a 90 % deste mineral presente em ossos e escamas (LOVELL, 1988), já o cálcio contribui com 37% para a formação do esqueleto (STEFFENS, 1987).

Nutrientes provenientes da dieta desempenham papel importante no metabolismo do tecido esquelético. Deficiência e toxicidade de nutrientes foram associadas a deformidades ósseas em peixes nas fases larval e juvenil (LEWIS-McCREA e LALL, 2010).

Exigência do fósforo para peixes

Nose *et al.* (1976) recomendam, para normal crescimento e mineralização óssea dos peixes, níveis de fósforo disponível entre 0,27 e 0,80%. Segundo Dougall *et al.* (1996) a exigência neste mineral para as diversas espécies de peixes varia entre 0,25 e 1,0% da dieta, sendo esta variação relacionada à fase de crescimento. Lall (2002) relatou que as exigências variam entre 0,3 e 1,5% da dieta. A variabilidade nos resultados sobre as exigências de fósforo pelas espécies é devido a diferenças na sua disponibilidade nas dietas (NRC, 2011).

A exigência dietética de fósforo para juvenis de salmão do Atlântico (*Salmo salar L.*), alimentados com dietas contendo 4, 8, 10, 15 e 25 g kg⁻¹ de Ca (H₂PO₄) 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 concentração de fósforo corporal normais indicaram que a exigência para esta fase foi de aproximadamente 10g kg⁻¹(ASGARD e SHEARER,1997).

Baeverfjord *et al.* (1998) relataram que juvenis de salmão do Atlântico cresceram adequadamente por cerca de seis semanas, com dieta deficiente de fósforo (0,35%), enquanto os níveis de cálcio e fósforo corporal foram reduzidos. Após nove semanas, peixes consumindo dieta deficiente em fósforo apresentaram níveis iniciais de cálcio e fósforo corporal de 65 e 40%, respectivamente, e crescimento reduzido. Essas observações indicaram que a necessidade estimada de fósforo na dieta baseada na taxa de crescimento não foi precisa, podendo subestimar a necessidade real em curto prazo.

Foram investigados os efeitos de alta e baixa concentração de fósforo na dieta para salmão do Atlântico, após 30 dias de experimento não foram observados efeitos sobre o peso corporal dos peixes, enquanto as dietas com baixo teor de fósforo resultou 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. Não houve evidência de que a baixa qualidade da água teve efeito potenciador no desequilíbrio mineral dos peixes (HELLAND *et al.*, 2005).

Ogino e Takeda (1976) relataram que a necessidade de fósforo disponível na dieta para crescimento máximo de juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*) foi de 0,6 e

0,7%, e, com peso de 4g a 12g, foi de 0,6-0,7%. Para máxima mineralização óssea, o nível ótimo recomendado para a espécie foi de 1,5%.

Em experimento de 120 dias para determinação da exigência de fósforo para alevinos de carpa (*Catla catla*), formulou-se oito dietas para conter 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3; 1,5%. Os teores de umidade e proteína bruta corporal dos peixes foram semelhantes entre os tratamentos. O teor de fósforo corporal aumentou significativamente 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 0,64; 0,71 e 0,6%, respectivamente (SUKUMARAM *et al.*, 2009).

Eya e Lovell (1997) relataram que bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, com peso inicial de 61g e final de 634g, criados em viveiros, alimentados com níveis de fósforo disponível de 0,2 a 0,6% não apresentaram diferença significativa de ganho de peso, taxa de conversão alimentar ou porcentagem de carcaça em ensaio de 140 dias. Porém, o fósforo sérico, cinzas e fósforo no osso aumentaram linearmente com o aumento dos níveis do mineral na dieta. Para alevinos de bagre do canal alimentados com dietas contendo níveis dietéticos e relações de cálcio (0,5 a 2,0%) e fósforo (0,5 a 1,2%), a exigência de fósforo disponível foi de aproximadamente 0,8% da dieta. Nestes experimentos os ganhos foram máximos em peixes alimentados com dieta contendo 1,5% de cálcio, porém, os valores de cinza nos ossos do crânio e nas vértebras indicaram que a exigência de cálcio para mineralização óssea máxima pode ser maior que para o crescimento ótimo (ANDREWS *et al.*, 1973).

Sekine e Sato (1933) relataram resultados de estudo com salmões, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), alimentados durante 391 dias. Estes autores estudaram o efeito do fosfato tricálcio e ferro citrato adicionados à dieta. Peixes alimentados com dietas suplementadas de fósforo e ferro mostraram melhor crescimento, comparados aos alimentados com dieta basal e não apresentaram diferença estatística na taxa de sobrevivência. Peixes alimentados com dieta suplementada de fósforo e ferro apresentaram porcentagem elevada de cinzas, cálcio, fósforo, ferro e magnésio no corpo (matéria seca) quando comparados aos alimentados com dieta basal, enquanto que os teores de proteína e gordura não diferiram.

Juvenis de “milk-fish” (*Chanos chanos*) alimentados com dietas contendo 0,28; 0,43; 0,58; 0,73; 0,88; 1,03 e 1,18% de fósforo disponível por 16 semanas. O

ganho de peso e as concentrações de cinza nos ossos, cálcio e fósforo nas escamas aumentaram linearmente até a concentração de fósforo de 0,88% da dieta. O nível de fósforo necessário para o crescimento ótimo e a mineralização de juvenil de “milk-fish” é 0,85%, com base na matéria seca (BORLONGAN e SATOH, 2001).

Juvenis de “sunshine bass” (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) foram alimentados com dietas contendo níveis de KH_2PO_4 para fornecer 0,34; 0,44; 0,54; 0,64; 0,74, 0,84; 0,94 e 1,04% de fósforo disponível por nove semanas. No decorrer do período experimental, os peixes alimentados com a dieta base apresentaram tetania. Os valores referentes ao ganho de peso e eficiência alimentar indicaram que as exigências mínimas de fósforo disponível para a espécie foram de 0,41 e 0,46% (com base na matéria seca), respectivamente. Análises de cálcio nos ossos, fósforo dos ossos e escamas indicaram a necessidade mínima de fósforo disponível na dieta de 0,54% para a máxima mineralização óssea (BROWN *et al.*, 1993).

Dato-Cajegas e Yakupitiyage (1996) em estudo realizado para avaliar a necessidade de suplementação mineral na dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), relataram que a adição de fósforo afetou significativamente o ganho de peso, conversão alimentar e eficiência proteica.

Os efeitos do aumento da concentração de fósforo na ração foram estudados para juvenis de “tiger barb” (*Barbus tetrazona*) por Elangovan e Shim (1998). Os peixes foram alimentados com rações contendo níveis de KH_2PO_4 para fornecer 0,17; 0,37; 0,57; 0,77; 0,97; 1,17; 1,37 e 1,57% de fósforo disponível na dieta durante oito semanas. O ganho de peso, eficiência alimentar e composição mineral do corpo e ossos foram afetados pelo fósforo presente na dieta. O nível de fósforo mínimo para crescimento máximo dos peixes foi de 0,52%. Os peixes alimentados com a dieta contendo baixos níveis de fósforo apresentaram elevado teor de gordura corporal.

Experimento foi realizado com juvenis de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), alimentados com dietas contendo níveis de 0,53; 0,54; 0,74; 1,02 e 1,04% de fósforo total, durante 91 dias. Com o aumento da suplementação de fósforo, houve aumento significativo do comprimento do peixe e melhor eficiência alimentar. A suplementação de cálcio não proporcionou efeito sobre as taxas de crescimento, conversão alimentar ou eficiência de utilização de fósforo. Observou-se grande número de peixes com deformações, identificadas por radiografia. Os peixes alimentados com as dietas deficientes em fósforo apresentaram mineralização óssea

deficiente e os alimentados com dietas suplementadas, apresentaram mineralização óssea adequada (KOUSOULAKI, 2010).

Truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dietas isentas de minerais 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). Em estudo com essa mesma espécie, se avaliou por meio de dietas contendo mistura equilibrada de proteínas vegetais e suplementada com farinha de osso de peixe ou fosfato bicálcico. Farinha de ossos de peixes mostrou-se como fonte de cálcio suplementar, mas não como a fonte primária de fósforo por sua baixa biodisponibilidade (LEE *et al.*, 2010).

Skonberg *et al.* (1997) relataram que cinzas, níveis de fósforo e cálcio corporal e pele (com escamas) foram altamente responsivos para níveis de fósforo na dieta (0,23-1,16%), enquanto o crescimento dos peixes e a eficiência alimentar não responderam aos níveis de fósforo após 12 semanas em estudo com juvenis de truta-arco-íris.

Estimou-se a exigência de fósforo para corvina amarela grande (*Pseudosciaena crocea* R) com dietas práticas contendo 0,30; 0,55; 0,69; 0,91 e 1,16% de fósforo disponível a partir de ingredientes alimentares e fosfato monocálcico. A taxa de crescimento específico aumentou significativamente com o aumento do fósforo disponível de 0,30 a 0,69% da 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 0,70% e para órgãos ou vértebras, de 0,89 e 0,91%, respectivamente (MAI *et al.*, 2006).

A exigência de fósforo foi avaliada para juvenis de robalo japonês (*Lateolabrax japonicus*), por meio de dietas práticas formuladas contendo níveis de 0,31; 0,56; 0,70; 0,93 e 1,17% de fósforo disponível. Os teores de cinza, lipídios, proteína, fósforo corporal, vértebras e escamas, responderam significativamente ao fósforo disponível na dieta, sendo a necessidade mínima de fósforo disponível para esta espécie foi entre 0,68 e 0,90% (ZHANG *et al.*, 2006).

Estudo conduzido para investigar a exigência de fósforo e a ótima relação cálcio e fósforo no crescimento e composição tecidual da carcaça de “mrígal”

(*Cirrhinus mrigala*) com dietas formuladas para conter as relações de 1: 0 (0,35: 0), 1: 1 (0,35: 0,35), 1: 2 (0,31: 0,63), 1: 3 (0,24: 0,71) e 1:4 (0,19: 0,75), respectivamente apresentou desempenho e conversão alimentar responsiva para a relação 1:4 na dieta. Porcentagem de proteína da carcaça, lipídios e fósforo também aumentou com o nível superior de fósforo. A relação Ca/P ótima determinada neste estudo para “mrigal” foi de 0,19: 0,75 (PAUL *et al.*, 2004).

A deficiência de fósforo na dieta de peixes teleósteos diminui o conteúdo mineral do osso. Juvenis de arinca (*Melanogrammus aeglefinus* L.), alimentados com dietas contendo níveis baixo (0,42% dieta), ótimo (1,02% da dieta) e excesso (1,42% dieta). Foram submetidos a radiografias, assim como analisados o conteúdo mineral do plasma e vértebras. A dieta deficiente causou atraso na mineralização óssea. O excesso do mineral aumentou a deposição na matriz óssea e resultou em mineralização acelerada. A deficiência de fósforo aumentou inicialmente a reabsorção e mineralização óssea, seguido por diminuição na formação do osso. O grupo de peixes com baixa mineralização óssea mostrou ossos deformados observados em raios-X, resultado da diminuição na mineralização da matriz óssea (ROY *et al.*, 2003).

Dois experimentos, com água livre de cálcio, foram conduzidos para avaliar as necessidades de cálcio e fósforo para alevinos de tilápia azul (*Oreochromis aureus*). Concentrações de cálcio na dieta variaram de 0,17 a 1,00% e de fósforo entre 0,20 e 1,00%. Os resultados indicaram que 0,70% de cálcio na dieta foram ideais para ganho de peso e conversão alimentar. Os valores dos minerais presentes no corpo, ossos, ou escamas não definiu claramente a exigência de cálcio, conforme o estabelecido para crescimento (ROBINSON *et al.*, 1987).

Estudou-se a exigência de fósforo para o “black seabream” (*Sparus macrocephalus*) alimentados com rações contendo 0,18; 0,36; 0,54; 0,72; 0,89 e 1,07% de fósforo disponível, cujo nível estimado para o melhor ganho de peso foi de 0,55% de fósforo disponível. O conteúdo de fósforo presente no corpo, vértebras e escamas dos peixes indicou que as necessidades para esta espécie foram atendidas com os níveis de 0,81; 0,87 e 0,88%, respectivamente. Os sinais de deficiência de fósforo foram caracterizados pelo reduzido crescimento, menor mineralização óssea e aumento no teor de lipídios corpo (SHAO *et al.*, 2008).

Estudo para determinar a necessidade de fósforo para “whitefish” (*Coregonus lavaretus* L.) mostrou que os peixes alimentados sem suplementação de

fósforo apresentaram hipofosfatemia típica de ossos mal mineralizados, baixo teor de fósforo corporal e baixa concentração de fosfato plasmático. Peixes hipofosfatêmicos cresceram menos e com concentrações elevadas de lipídeos corporais. Para obter 95% da concentração máxima de cinzas nas vértebras e crescimento máximo, as necessidades de fósforo disponível foram de 6,5 e 6,2g kg⁻¹, respectivamente. Peixes alimentados com baixos teores de fósforo apresentaram níveis de lipídeos no corpo igual ou superior ao nível de exigência determinada (VIELMA *et al.*, 2002).

Estudo com juvenis de perca prateada (*Bidyanu bidyanus*) avaliou oito dietas semipurificadas formuladas para conter níveis de fósforo entre 0,24 a 1,08%. A porcentagem de ganho de peso aumentou significativamente com o aumento do fósforo na dieta (0,24 a 0,72%). Os resultados indicaram que o crescimento máximo foi obtido com dieta contendo 0,71% de fósforo. As concentrações de fósforo inorgânico no plasma aumentaram com o aumento dos níveis de fósforo de 0,72 e 1,08%, porém sem efeitos na concentração de cálcio plasmático, magnésio, zinco e em atividade da fosfatase alcalina de plasma e menores em peixes alimentados com dietas insuficientes em fósforo. Os 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).

Estudou-se a exigência de fósforo na dieta para juvenis de chinês sucker (*Myxocyprinus asiaticus*), alimentados com rações contendo 3,1; 5,3; 7,5; 9,6 e 11,8 g kg⁻¹ de fósforo disponível. A exigência mínima foi de 7,4 g kg⁻¹. O teor de fósforo corporal, vértebras e escama, estabeleceu as necessidades de fósforo disponível de 8,3, 8,8 e 8,6 g kg⁻¹, respectivamente (YUAN *et al.*, 2011).

Os estudos apresentados elucidam a importância do fósforo na alimentação dos peixes visando ótimo crescimento e mineralização óssea eficiente.

Tomografia Computadorizada

A tomografia computadorizada é uma técnica utilizada para diagnóstico por meio de imagens utilizando a radiação X. Esta técnica associada à informática gera imagens digitais reproduzindo detalhadamente o material a ser avaliado (THRALL, 2007).

O princípio básico de funcionamento de um equipamento de tomografia computadorizada se baseia na emissão de um feixe de radiação laminar em forma de

leque e de espessura fina, em um tubo de raios-X, que atravessa o material a ser avaliado sensibilizando um conjunto de detectores que coletam o feixe de radiação residual. Os detectores transmitem os sinais obtidos em forma de correntes elétricas de pequena intensidade a um dispositivo eletrônico que transforma os sinais obtidos em dígitos de computador (THRALL, 2007).

A tomografia computadorizada permite medir a intensidade da radiação residual através da subtração da radiação absorvida pelo material, da radiação incidente, podendo ser obtida pela equação (THRALL, 2007):

$$N = N_0 \cdot e^{-(\mu)x}$$

Sendo:

N = intensidade de radiação residual

N₀ = intensidade de radiação incidente

e = base de logaritmo natural (2,718)

μ = coeficiente de atenuação linear

x = espessura do objeto

O número de equações utilizadas para a reconstrução de uma imagem aumenta em função do número de detectores do equipamento e do número de projeções utilizadas na construção da imagem (THRALL, 2007).

O método matemático utilizado na reconstrução das imagens é denominado algoritmo, a razão entre ao deslocamento da mesa pela espessura de corte é representada pelo Pitch e a área examinada pela tomografia referente ao campo de visão é denominada FOV (THRALL, 2007).

Densitometria óssea

A densidade mineral óssea pode ser obtida por meio da tomografia computadorizada quantificando a massa óssea, sendo seus valores expressos em unidades Hounsfield (HU). Com o surgimento da densitometria, informações sobre o desenvolvimento da massa óssea tornaram possíveis os avanços na prevenção e tratamento de deficiências.

Escala de Hounsfield

O método de tomografia computadorizada é avaliado adotando-se uma escala de densidades conhecida por escala de Hounsfield, considerando o valor correspondente a densidade da água de zero, materiais com densidade maior assumem valores positivos, e menor, valores negativos (THRALL, 2007), como apresentado na tabela a seguir:

Escala de Housfield	
Unidades Hounsfield (HU)/Tecido	
300 a 1000	Osso denso cortical
100 a 200	Osso normal
60	Fígado
50	Pâncreas
20	Músculo
0	Água
-20 a-60	Gordura
...	...
-500 a -600	Pulmão
-1000	Ar

Adaptada de Thrall (2007)

Uso da radiação X na experimentação animal

A técnica de raio-X para determinar exigência nutricional dos minerais envolvidos na formação da estrutura óssea foi utilizada para diversas espécies animais, incluindo peixes. Avaliando crescimento e mineralização óssea do bacalhau do Atlântico, Kousoulak et al.(2010), observaram através de radiografias a formação óssea devido a deficiência de fósforo na dieta. Estudos avaliando dietas

com níveis de fósforo para arrinca (ROY et al., 2002) e truta arco íris (FONTAGNE et al., 2009) identificaram deformidades ósseas através de imagens de raio-X. Helland et al.(2005), avaliaram a formação óssea de Salmão do Atlântico alimentados com níveis de fósforo, através da técnica de raio-X por meio de equipamento de mamografia.

A tomografia computadorizada é utilizada atualmente para diagnosticar patologias. Na nutrição animal esta técnica pode ser empregada para avaliar problemas causados por deficiências nutricionais, e/ou excessos. Devido a melhor resolução de imagem quando comparada a técnica de raio X, a tomografia pode ser utilizada como ferramenta acurada na identificação de deformidades estruturais, como as deformidades ósseas.

O capítulo II intitulado “Fósforo disponível na mineralização óssea de alevinos da tilápia do Nilo” tem como objetivo avaliar a exigência de fósforo disponível em dietas para a espécie visando obter crescimento e mineralização ósseas adequados para esta fase de desenvolvimento.

A redação deste capítulo foi realizada de acordo com as normas de justificação da Aquaculture Nutrition.

Referências bibliográficas

ANDREWS, J.W.; DAVIS, J.M.; CAMPBELL, C. Effects of dietary calcium and phosphorus on growth, food conversion, bone ash and hematocrit levels of catfish. **Journal Nutrition**, Philadelphia, 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.

BAEVERFJORD, G.; ASGARD, T.; SHEARER, K.D. Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr and post-smolts. **Aquaculture Nutrition**, v.4, p.1–11, 1998.

BERNE, R.M. *Fisiologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980, p.829.

BORLONGAN, I.G.; SATOH, S. Dietary phosphorus requirement of juvenile milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal). **Aquaculture Research**, v.32 (Suppl.1), p.26-32, 2001.

BROWN, M.L.; JARAMILLO Jr.,F.; GATLIN III, D.M. Dietary phosphorus requirement of juvenile sunshine bass, *Morone chrysops* × *M. saxatilis*. **Aquaculture**, v.113, p.355-363, 1993.

DATO-CAJEGAS, C.R.S.; YAKUPITIYAGE, A. The need for dietary mineral supplementation for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. **Aquaculture**, v.144, p.227-237, 1996.

DOUGALL, D.S.; WOODS, L.C. III; DOUGLASS, L.A.; SOARES, J.H. Dietary phosphorus requirement of juvenile striped bass, *Morone saxatilis*. **J. World Aquac. Soc.**, v.27, p.82–91, 1996.

ELANGOVAN, 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-quae, a toxic blue green alga in commercial channel catfish, *Ictalurus punctatus*, ponds: a case history. **Journal of Applied Aquaculture**, 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.

FONTAGNE *et al.* Effects of a dietary phosphorus and calcium level on growth and skeletal development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. **Aquaculture**, v. 297, p.141-150, 2009.

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.

KOUSOULAKI, 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.

LALL, S.P. *The minerals, Fish Nutrition*, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2002, p. 259–308.

LALL, S.P.; LEWIS-McCREA, L.M. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — an overview. **Aquaculture**, v.267, p.3–19, 2007.

LEE, K.-J *et al.* Evaluation of supplemental fish bone meal made from Alaska seafood processing byproducts and dicalcium phosphate in plant protein based diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.303, p.248-255, 2010.

LEHNIINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. São Paulo, Sarvier, 1995, 839p.

LEWIS-McCREA, L.M.; LALL, S.P. Effects of phosphorus and vitamin C deficiency, vitamin A toxicity, and lipid peroxidation on skeletal abnormalities in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **J. Appl. Ichthyol.**, v.26, p.334-343, 2010.

LI, M.H.; ROBINSON, E.H. Phosphorus availability of common feedstuffs to channel catfish *Ictalurus punctatus* as measured by weight gain and bone mineralisation. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.27, p.297–302, 1996.

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, p.346–353, 2006.
- McDOWELL, L.R. Zinc. In: *Minerals in Animal and Human Nutrition* (McDOWELL, L.R. ed.), Academic Press, London, UK, 1992, p. 265–293.
- MIRANDA, E.C. *et al.* Relação cálcio/fósforo disponível em rações para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.6, p.2162-2171, 2000.
- MUKHOPADHYAY, N.; RAY, A.K. The apparent total and nutrient digestibility of sal seed (*Shorea robusta*) meal in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. **Aquaculture Research**, v.28 (09), p.683-689, 1997.
- National Research Council (NRC) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academic Press, Washington, DC, 2011, 376p.
- NOSE T, *et al.* (1976) Recent advances in studies on mineral nutrition of fish in Japan. In: *Advances in Aquaculture. Papers presented at the FAO Technical Conference on Aquaculture*, 26 May - 2 June 1976, Kyoto, Japan (ed. by T.V.R. Pillay & W.A. Dill), pp. 584-589. Fishing News Books, Farnham, UK.
- 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.
- PAUL, B.N. *et al.* Phosphorus requirement and optimum calcium/phosphorus ratio in the diet of mrigal *Cirrhinus mrigala* (Ham.) fingerlings. **Journal of Applied Ichthyology**, v.20, p.306-309, 2004.
- PEÑAFLORES, A.D. Interaction between dietary levels of calcium and phosphorus on growth of juvenile shrimp, (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, n. 3-4, p.281-289, 1999.
- POPMA, T.J., GREEN, B.W. Sex reversal of tilapia in earthen ponds. *Aquaculture production manual*. Alabama: Auburn University, Alabama Research and Development. Series 35. p.15, 1990.
- RICHIE, M.; BROWN, P.B. Availability of phosphorus from feedstuffs fed to rainbow

- ROBINSON, E.H. *et al.* Dietary calcium and phosphorus requirement of *Oreochromis aureus* reared in calcium-free water. **Aquaculture**, v.64, p.267–276, 1987.
- RODEHUTSCORD, M. *et al.* Availability and utilization of free lysine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2. Comparison of L-lysine –HCl and L-lysine sulphate. **Aquaculture**, v. 187, p. 177- 183, 2000.
- ROY, P.K. *et al.* Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralisation of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). **Fish Physiol. Biochem**, v.27, p.35–48, 2002.
- ROY, P.K.; LALL, S.P. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). **Aquaculture**, v.221, p.451–468, 2003.
- 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 seabream, *Sparus macrocephalus*. **Aquaculture**, v.277, p.92–100, 2008.
- SKONBERG, D.I. *et al.* Metabolic response to dietary phosphorus intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.157, p.11–24, 1997.
- STEFFENS, W. *Principios fundamentales de la alimentación de los peces*. Editora Acribia. Zaragoza, 1987, 272p.
- 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.; 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.
- THRALL, D. E. *Veterinary diagnostic radiology*. Editora Elsevier. North Carolina, 2007, 848p.
- trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v.142, p.269-282, 1996.
- 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.; KOSKEIA J.; RUOHONEN K. Growth, bone mineralization, and heat and low oxygen tolerance in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) fed with graded levels of phosphorus. **Aquaculture**, v.212, p.321-333, 2002.

WILSON, R.P. *et al.* Dietary phosphorus requirement of channel catfish. **Journal Nutrition**, v.112, p.1197-1292, 1982.

VIELMA, J.; LALL, S.P. Phosphorus utilization by Atlantic salmon (*Salmo sala*) reared in freshwater is not influenced by higher dietary calcium intake. **Aquaculture**, v.160, p.117-128, 1998.

YANG S.-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.

YUAN, Y.C. *et al.* Dietary phosphorus requirement of juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. **Aquaculture Nutrition**, v.17, p.159-169, 2011.

ZHANG, C. *et al.* Dietary phosphorus requirement of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**, v. 255, p.2001-2009, 2006.

CAPÍTULO II

FÓSFORO DISPONÍVEL NA MINERALIZAÇÃO ÓSSEA DE ALEVINOS DA TILÁPIA DO NILO

Resumo – Os objetivos desta pesquisa foram avaliar a quantidade de fósforo disponível presente em rações experimentais e por meio delas determinar a exigência do mineral para adequada mineralização óssea de alevinos da tilápia do Nilo. Foram formuladas quatro dietas para conter níveis de 2,0; 4,0 e 6,0g kg⁻¹ de fósforo disponível utilizando-se fosfato bicálcico e uma dieta sem suplementação (1,5g kg⁻¹). Todas acrescidas de 1,0g kg⁻¹ de Cr₂O₃. Para a determinação do coeficiente de disponibilidade do fósforo foram distribuídos 160 peixes (peso médio de 30g ± 0,5) em oito aquários, alimentados com as dietas experimentais para coleta de fezes. A exigência de fósforo foi avaliada utilizando grupos de peixes com peso inicial médio de 1,2g ± 0,5; sendo alimentados quatro vezes ao dia durante 90 dias até a saciedade aparente. Foram avaliados sobrevivência, ganho de peso, porcentagem de cálcio e fósforo presentes nas vértebras, concentração de fósforo presente na água, densitometria óssea (vértebras e corpo) e imagens tomográficas. As melhores respostas apresentadas pelos peixes foram entre 4,0 e 6,0g kg⁻¹ de fósforo disponível nas dietas.

Palavras-chave: densitometria óssea, tomografia computadorizada, nutrição, mineralização óssea, peixes.

AVAILABLE PHOSPHORUS IN BONE MINERALIZATION OF FINGERLINGS NILE TILAPIA

Abstract – The aim of this study were to evaluate the amount of present available phosphorus in the experimental diets and through them to determine minimum requirement of the mineral for proper bone mineralization of Nile tilapia fingerlings. Four diets were formulated to contain levels of 2.0, 4.0 and 6.0 g kg⁻¹ available phosphorus by calcium phosphate and a diet without supplementation (1.5 g kg⁻¹). All diets were added 1,0g kg⁻¹ Cr₂O₃. To determine the coefficient of phosphorus availability were distributed 160 fish (average weight 30g + 0.5) in eight tanks, fed the experimental diets for feces. The requirement of phosphorus was evaluated in fish with initial average weight of 1.2g+ 0.5, being fed four times daily for 90 days until satiation. Were evaluated survival, weight gain, percentage of calcium and phosphorus in the vertebrae, phosphorus concentration in the water, bone densitometry (vertebrae and body) and tomography images. The best responses were submitted by the fish between 4.0 and 6.0 g kg⁻¹ of available phosphorus in the diets.

Keywords: bone densitometry, computed tomography, nutrition, bone mineralization, fish.

Introdução

Altas produções de peixes elevam o volume de resíduos liberados no ambiente, acelerando os processos de eutrofização dos ecossistemas e poluindo os corpos de água (Boyd 1998), devido a elevadas concentrações de fósforo e nitrogênio, excretada pela biomassa de peixes oriundos dos sistemas intensivos (Bueno *et al.* 2008). A liberação de grandes quantidades deste mineral para o meio é indesejável e pesquisas têm sido realizadas para determinar a exigência ótima de fósforo para os diferentes estádios de desenvolvimento dos peixes, como McCrea e Lall (2010), Liang *et al.* (2011) e Yuan *et al.* (2011).

O fósforo é um macromineral essencial para o adequado crescimento e reprodução dos peixes, importante constituinte estrutural do tecido esquelético (Roy & Lall 2003) e se encontra distribuído em todas as células do organismo (Lovell 1988). Cerca de 85 a 90% do fósforo nos peixes está presente em ossos e escamas (Lovell 1998). Este mineral é exigido pelos peixes em grandes quantidades na dieta e pode ser retirado da água, porém com baixa eficiência de absorção (NRC 1993). A razão de absorção do fósforo da água pelos peixes é de 0,01% em relação à do cálcio (Phillips 1962). Assim, a exigência de fósforo é preferencialmente satisfeita por meio da ração (Wilson *et al.* 1982).

Recomenda-se 0,27 e 0,80% de fósforo disponível para crescimento e mineralização óssea normal em peixes (Nose & Araí 1976). Segundo Miranda *et al.* (2000) alevinos de tilápia do Nilo apresentaram exigência mínima de 0,25% de fósforo disponível para mineralização óssea satisfatória.

A carência de fósforo na dieta pode levar os peixes a apresentarem sinais de deficiência (Dato-Cajegas & Yakupitiyage 1996) como baixo desempenho e mineralização óssea deficiente, sendo imprescindível que a dieta atenda a exigência nutricional do animal.

A tomografia computadorizada é utilizada atualmente para diagnosticar patologias. Na nutrição animal esta técnica pode ser empregada para avaliar problemas causados por deficiências nutricionais, e/ou excessos. Devido a melhor resolução de imagem quando comparada a técnica de raio X e pela obtenção de medidas numéricas por meio da densitometria, esta técnica pode ser utilizada como ferramenta acurada na identificação de deformidades estruturais, como as deformidades ósseas.

Com a finalidade de atender as exigências nutricionais em alevinos da tilápia do Nilo foram realizadas avaliações de crescimento, mineralização ossea e liberação de fósforo na água em sistema controlado.

Material e métodos

A pesquisa foi conduzida na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, no Laboratório de Nutrição e Saúde de Organismos Aquáticos – AquaNutri, Botucatu, SP. Os peixes utilizados nos estudos foram obtidos do setor de reprodução do CAUNESP (Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP).

Dietas experimentais

Foram formuladas quatro dietas práticas atendendo as exigências nutricionais para a fase de pós-reversão da tilápia do Nilo, contendo 268,1 g kg⁻¹ de proteína digestível e 3036 kcal kg⁻¹ de energia digestível (Furuya *et al.* 2010). As composições das dietas encontram-se na Tabela 1.

As dietas experimentais foram formuladas para conter níveis de fósforo disponível (P_{disp}) de 1,5; 2,0; 4,0 e 6,0 g kg⁻¹, obtidos por meio da suplementação de fosfato bicálcico, com exceção da dieta de 1,5 g kg⁻¹, cujo nível de P_{disp} foi proveniente dos ingredientes utilizados. Todas as dietas foram acrescidas de 1,0 g kg⁻¹ de Cr₂O₃ para determinação do coeficiente de disponibilidade aparente do fósforo.

Para a confecção das rações, os ingredientes foram moídos em moinho tipo facas de forma a apresentarem grânulos com diâmetro inferior a 0,42mm. Após pesagem, os ingredientes foram homogeneizados em misturador automático (Ação científica, Piracicaba, Brasil). As misturas foram peletizadas em equipamento modelo ML-4.0/Weguline e desidratadas em estufa de circulação forçada de ar (55°C por 24 horas). Os péletes foram desintegrados para obtenção de grânulos compatíveis com a capacidade de apreensão dos peixes e armazenados em freezer a -20°C.

Foram determinados os coeficientes de disponibilidade aparente do fósforo presente nas rações confeccionadas e a exigência do mineral para determinar a mineralização óssea adequada de alevinos da tilápia do Nilo.

Determinação da disponibilidade do fósforo nas rações

Para a determinação da disponibilidade do fósforo nas rações, foram utilizados oito aquários de 250L para o procedimento de alimentação e quatro aquários cônicos com colunas de decantação para a coleta das fezes. Os sistemas foram conectados a um filtro biológico, a temperatura da água foi mantida a 26^oC por termostato eletrônico e a circulação de água foi de 6,59L min⁻¹.

Peixes com peso médio de 30 ± 0,5 g foram estocados na densidade de 20 animais por unidade experimental (gaiolas circulares dentro dos aquários de alimentação de 250L). As quatro dietas foram distribuídas aleatoriamente para os aquários de alimentação sendo consumidas pelos peixes sete dias antes da primeira coleta (período de adaptação). Após aclimatação, quatro grupos de peixes foram transferidos para os aquários de coleta de fezes, no dia consecutivo as fezes foram recolhidas e os quatro grupos restantes foram transferidos. Este procedimento foi realizado até obter volume representativo de fezes para realização das análises.

No dia da coleta, os peixes foram alimentados duas vezes na parte da manhã e a cada hora na parte de tarde. O processo de coleta foi repetido até obter volume para realização das análises. As gaiolas foram transferidas após a última alimentação do período da tarde para os aquários de coleta até a manhã do dia seguinte quando retornavam aos seus respectivos aquários de alimentação.

Os peixes foram alimentados em sistema independente de coleta de fezes para evitar a presença de alimentos nas amostras fecais (Pezzato *et al.* 2002). As fezes coletadas foram desidratadas a 52^oC por 48 horas, maceradas, retiradas escamas e homogeneizadas para a realização das análises (Pezzato *et al.* 2004). O conteúdo de óxido de cromo-III das dietas e das fezes foram determinadas de acordo com Bremer-Neto *et al.* (2005).

Os coeficientes de disponibilidade aparente (CDA) das dietas foram calculados de acordo com a equação descrita por Cho (1993).

$$CDA_{(n)} = 100 - \left[100 \left(\frac{\% Cr_2O_{3r}}{\% Cr_2O_{3f}} \right) \times \left(\frac{\% N_f}{\% N_r} \right) \right]$$

Sendo, $CDA_{(n)}$ = CDA do nutriente na ração, $Cr_2O_{3(r)}$ = % óxido de cromo-III na ração, $Cr_2O_{3(f)}$ = % óxido de cromo-III nas fezes, $N_{(r)}$ = nutrientes na ração e $N_{(f)}$ = nutrientes nas fezes.

Determinação da exigência de fósforo

Para avaliar as respostas dos peixes em relação aos níveis de fósforo disponível nas dietas foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo provenientes da mesma desova, revertidos sexualmente, estocados durante sete dias em tanques de 500L em sistema provido de biofiltro, aeração e controle digital da temperatura, regulado para $26,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, de forma a adaptá-los às condições experimentais.

Após aclimação, sessenta peixes com peso médio inicial de $1,2 \pm 0,5\text{g}$ foram distribuídos em 12 aquários de 50L cada, providos de filtro físico e biológico individuais para manter a qualidade físico-química da água e a temperatura da água foi mantida na faixa de conforto térmico para a espécie, $26 \pm 1^\circ\text{C}$, por termostato digital. Foram realizadas sifonagens para retirada de fezes e sobras de alimentos do sistema estático, resultando na renovação de aproximadamente dois terços do volume total da água do sistema, sendo efetuadas coletas de água.

Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia durante toda a fase experimental, objetivando a saciedade aparente. O período experimental teve duração de 90 dias e foi mantido fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e três repetições, considerando cada aquário como unidade experimental. No final do experimento os animais foram eutanasiados por meio do anestésico benzocaína ($0,1\text{g L}^{-1}$) e armazenados em freezer para posterior análise.

Ganho de peso e sobrevivência

Os peixes foram pesados no início e final do experimento para determinação do ganho de peso e quantificados para estabelecer a taxa de sobrevivência.

Cálcio e fósforo presentes nas vértebras

Para a quantificação do cálcio e fósforo disponível no osso, foram retiradas a coluna vertebral de três peixes por aquário, lavadas em água destilada para remoção

da matéria orgânica e desengorduradas em éter por 24 horas, segundo Furuya *et al.* (2001).

Coletas de água

Coletas de água foram efetuadas a cada 30 dias experimentais para quantificação de fósforo, antes e após renovação de água do sistema. As concentrações de fósforo, presente na água dos aquários estão apresentadas na Tabela 3. Os resultados foram obtidos por diferença nas concentrações, antes e após renovação.

Análises químicas

A determinação das concentrações de fósforo das fezes, vértebras e água e, cálcio das vértebras foram realizadas no Laboratório de Química da Unesp, Botucatu. Exceto a água, todas as amostras sofreram digestão ácida. As análises de cálcio foram realizadas segundo metodologia descrita por Ramirez-Munoz (1968) e as quantificações de fósforo segundo Markzent (1976), com espectrômetro de absorção atômica.

Os parâmetros de qualidade da água mantiveram-se estáveis de acordo com a faixa de conforto recomendada para a espécie por Boyd (1998). As médias obtidas foram pH de $7,5 \pm 0,5$; oxigênio dissolvido de $5,5 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e amônia de $0,04 \text{ mg L}^{-1}$.

Tomografia e densitometria

Um peixe de cada unidade experimental foi submetido a realização de tomografia computadorizada “multi detectores” sendo utilizado aparelho Shimadzu, modelo SCT-780 CT, seguindo os parâmetros: 50mm de campo de visão (FOV), Algoritmo 120kv, 60mA, intervalo de corte de 1mm (gap) e 1mm de espessura de corte (fatia). Cortes tomográficos dos animais mostraram imagens dos ossos do corpo e coluna vertebral na posição de decúbito lateral direito e proporcionaram medidas quantitativas da densidade mineral óssea permitindo diagnóstico das alterações da estrutura óssea para comparação entre os tratamentos.

A tomografia computadorizada permite medir a intensidade da radiação residual através da subtração da radiação absorvida pelo material, da radiação incidente, podendo ser obtida pela equação (Thrall 2007):

$$N = N_0 \cdot e^{-(\mu)x}$$

Sendo:

N = intensidade de radiação residual

N₀ = intensidade de radiação incidente

e = base de logaritmo natural (2,718)

μ = coeficiente de atenuação linear

x = espessura do objeto

O número de equações utilizadas para a reconstrução de uma imagem aumenta em função do número de detectores do equipamento e do número de projeções utilizadas na construção da imagem (Thrall 2007).

O método matemático utilizado na reconstrução das imagens é denominado algoritmo, a razão entre ao deslocamento da mesa pela espessura de corte é representada pelo Pitch e a área examinada pela tomografia referente ao campo de visão é denominada FOV (Thrall 2007).

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A concentração de fósforo presente na água dos aquários foi submetida a teste de comparação de médias, Tukey (Stell & Torrie 1984). As demais variáveis foram complementadas com análise de regressão polinomial quando apresentadas diferenças significativas. Os resultados foram obtidos ao nível de 5 % de significância e utilizou-se o programa estatístico SAEG (2007).

Resultados

Os valores de fósforo disponível (P_{disp}) obtidos por meio do coeficiente de disponibilidade aparente das rações experimentais encontram-se na Tabela 1. Os valores encontrados foram de 1,6g kg⁻¹; 2,2g kg⁻¹; 4,1g kg⁻¹ e 5,7g kg⁻¹ de P_{disp}. Não foram observados sinais externos de deformidades ósseas e, não ocorreu diferença significativa no parâmetro sobrevivência dos peixes (P<0,05) (Tabela 2).

Observou-se correlação direta para ganho de peso, porcentagem de cálcio e de fósforo nas vértebras e, ainda, na densitometria óssea do corpo, em função do

aumento da quantidade de P_{disp} nas dietas. Observou-se correlação inversa para a variável densitometria óssea das vértebras, Tabela 2, sendo que os valores reduziram proporcionalmente ao aumento do P_{disp} na dieta ($P < 0,05$).

A Tabela 3 apresenta a concentração de fósforo total (mg L^{-1}) presente na água dos aquários. A quantidade de fósforo na água se mostrou negativa, nos aquários cujos peixes foram alimentados com as dietas contendo 1,5 e 2,0 g kg^{-1} de P_{disp} . Nos aquários em que os peixes foram alimentados com as dietas de 4,0 e 6,0 g kg^{-1} P_{disp} , a concentração do mineral na água aumentou proporcionalmente com a presença de fósforo na dieta.

As imagens A, B, C, e D obtidas por meio de tomografia computadorizada mostraram alterações na formação da estrutura óssea dos peixes, de acordo com as quantidades de P_{disp} nas dietas. A coluna vertebral apresentou formação nítida nas imagens A e B em peixes alimentados com as dietas de 4,0 e 6,0 g kg^{-1} P_{disp} , respectivamente. Entretanto, a visibilidade da vértebra reduziu nos peixes alimentados com as dietas de 1,5 e 2,0 g kg^{-1} de P_{disp} , como mostra as imagens C e D (Figura 1).

Discussão

O ganho de peso dos peixes alimentados com a dieta de 6,0 g kg^{-1} foi maior comparado aos alimentados com as demais dietas, sendo que os valores de ganho de peso aumentaram com os níveis de fósforo disponível. Os resultados indicaram que a quantidade de fósforo na dieta interferiu no crescimento dos peixes.

O baixo ganho de peso dos peixes está relacionado às quantidades de 1,5 e 2,0 g kg^{-1} de P_{disp} nas dietas. Este fato pode ser atribuído à mobilização deste elemento para outras funções fisiológicas, tornando-o insuficiente para o crescimento (Brown *et al.* 1993). O fósforo atua no metabolismo intermediário, participando dos processos metabólicos e transformação da energia química através do trifosfato de adenosina (Lehninger *et al.* 1995). A deficiência pode prejudicar a digestibilidade de lipídeos, carboidratos e, conseqüentemente, da energia (Rodehutschord *et al.* 2000).

Respostas semelhantes foram observadas para o robalo japonês, (*Lateolabrax japonicus*) por Zhang *et al.* (2006), corvina grande amarela (*Pseudosciaena crocea*) por Mai *et al.* (2006), juvenis de milkfish (*Chanos chanos*) por Borlongan & Satoh (2001), chinês sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) por Yuan *et al.* (2011) e carpa capim (*Ctenopharyngodon idella* Val) por Liang *et al.* (2011).

Resultados contrários relataram que o crescimento de peixes alimentados com dietas contendo baixos níveis de fósforo não diferiu dos alimentados com níveis adequados (Nordrum *et al.* 1997; Skonberg *et al.* 1997; Chaimongkol & Boonyaratpalin 2001).

Não foram observadas diferenças na taxa de crescimento do salmão (*Oncorhynchus keta*) alimentado com quantidades diferentes de fósforo na dieta durante oito semanas, com exceção da dieta que continha 2,7g kg⁻¹ de fósforo (Watanabe *et al.* 1980). As divergências nos resultados apresentados por estes estudos podem ser atribuídas a fase de desenvolvimento do peixe, composição da dieta, condução experimental e, as condições de saúde (Roy & Lall 2003).

A análise da porcentagem de fósforo presente nas vértebras dos peixes indicou aumento da quantidade do mineral de acordo com a sua inclusão na dieta. Os maiores valores apresentados foram nas vértebras de peixes alimentados com as dietas de 4,0 e 6,0g kg⁻¹ de P_{disp}. A análise de cálcio no osso também indicou aumento da porcentagem deste mineral de acordo com a inclusão de P_{disp} nas dietas, a partir da dieta formulada para conter 2,0g kg⁻¹. Os maiores valores de cálcio presente nos ossos foram apresentados pelos peixes que consumiram as dietas de 4,0 e 6,0g kg⁻¹ de P_{disp}.

O aumento nas porcentagens de cálcio e fósforo nas vértebras pode ser atribuído à inclusão de fósforo disponível nas dietas, aumentando a deposição destes minerais. O cálcio e o fósforo estão intimamente relacionados ao desenvolvimento, manutenção do sistema esquelético e estabilidade das vértebras (Mc Dowell 1992). Peixes alimentados com dietas deficientes em fósforo retiram e/ou retardam a deposição do mineral do osso na forma de fosfato de cálcio (Fontagne *et al.* 2009), sendo o fósforo utilizado para o crescimento dos tecidos moles e o cálcio descartado (Sugiura *et al.* 2004).

A análise baseada no conteúdo de fósforo das vértebras indicou que a concentração ótima de fósforo na dieta foi de 6,0g kg⁻¹, igual ao ganho de peso de 6,0g kg⁻¹. Resultados diferentes foram relatados para tilápia azul (*Oreochromis aureus*) por Robinson *et al.* (1987), “sunshine bass” (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) por Brown *et al.* (1993), “chinese sucker” (*Myxocyprinus asiaticus*) por Yuan *et al.* (2011). Estes estudos sugerem que as vértebras tenham a capacidade de reserva e que mudanças na suplementação de fósforo e deposição do mineral não precisam ser máximas para atingir melhor ganho de peso.

No presente estudo, as variáveis ganho de peso, porcentagem de cálcio e fósforo das vértebras apresentaram melhores resultados nas dietas formuladas para conter $6,0\text{g kg}^{-1}$ de fósforo disponível. Haylor *et al.* (1998) determinaram valores de 0,46% para tilápia azul (*Oreochromis aureus*) e 0,50% para tilápia do Nilo e Viola *et al.* (1986) apresentaram valores para as mesmas espécies de 0,7 e 1,0%, respectivamente.

O nível de fósforo encontrado foi inferior às exigências relatadas para robalo japonês (*Lateolabrax japonicus*) de $6,8\text{ g kg}^{-1}$ (Zhang *et al.* 2006), corvina amarela de $7,0\text{ g kg}^{-1}$ (Mai *et al.* 2006), arinca (*Melanogrammus aeglefinus* L.) de $7,2\text{ g kg}^{-1}$ (Roy & Lall 2003) e gilthead pargo (*Sparus aurata* L.) de $7,5\text{ g kg}^{-1}$ (Pimentel-Rodrigues & Oliva-Teles 2001). Entretanto, a exigência de fósforo disponível para alevinos de tilápia do Nilo é comparável às exigências para “tiger bard” (*Barbus tetrazona*) de $5,2\text{g kg}^{-1}$ (Elangovan & Shim 1998) e Salmão de $5,6\text{g kg}^{-1}$ (Watanabe *et al.* 1980). Valores inferiores foram encontrados para “sunshine bass” de $4,1\text{g kg}^{-1}$ (Brown *et al.* 1993) e robalo (*Morone saxatilis*) de $3,5\text{ g kg}^{-1}$ (Dougall *et al.* 1996).

A concentração de fósforo total presente na água não apresentou diferenças para os aquários cujos peixes foram alimentados com as dietas de $1,5$ e $2,0\text{g kg}^{-1}$ de fósforo disponível (P_{disp}), respectivamente. Para estas dietas, foram observadas concentrações positivas de fósforo na água no período de 30 dias e negativas nos períodos de 60 e 90. Devido aos baixos níveis de fósforo presentes nas dietas os peixes podem ter retirado fósforo da água para manter a homeostase após esgotamento das reservas corporais (Sugiura *et al.* 2004).

O aumento nas concentrações de fósforo na água aumentou com a suplementação de P_{disp} nas dietas. A concentração do fósforo presente nas águas dos aquários em que os peixes foram alimentados com as dietas de $4,0$ e $6,0\text{g kg}^{-1}$ de P_{disp} foi superior em todos os períodos de coleta. O fósforo na forma de fosfato insolúvel pode ter sido lixiviado para a água aumentando as concentrações de fósforo total para o meio. As dietas utilizadas no presente estudo foram compostas por alimentos de origem vegetal, cujo ingrediente presente em maior quantidade na ração é o farelo de soja que possui quantidade elevada de fósforo total, onde a presença do fitato torna o fósforo presente no alimento indisponível ao peixe, sendo excretado em grande quantidade para o meio (Furuya *et al.* 2010).

Observou-se aumento nos valores densitométricos das vértebras com a diminuição dos níveis de fósforo disponível nas dietas. Os menores valores

densitométricos condizem com as imagens A e B, as quais mostraram formação nítida da vértebra. A redução ou atraso na ossificação da vértebra pode ser consequência da diminuição de fosfato de cálcio devido á sua mobilização ou, favorecimento ao acúmulo deste (mesmo que reduzido) durante o desenvolvimento esquelético para que ocorra calcificação do tecido em dietas deficientes em fósforo (Fontagné *et al.* 2009).

O atraso na ossificação das vértebras em peixes com deposição de fosfato de cálcio pode explicar o aumento dos valores densitométricos com a redução das quantidades de fósforo presentes na dieta, o acúmulo de fosfato de cálcio pode ter superestimado os valores médios das leituras do tomógrafo, devido a amplitude das janelas de detecção (Thrall, 2007). Os valores densitométricos médios dos ossos presentes no corpo dos peixes condizem aos preconizados para ossos por Hounsfield (1973). O crescimento de massa óssea aumentou com os níveis de fósforo disponível nas dietas.

As imagens tomográficas mostram nitidamente o formato das vértebras responsivo às quantidades de fósforo disponível nas dietas. Na Figura 1 pode-se observar que as imagens A e B (peixes alimentados com 6,0g e 4,0kg⁻¹ de P_{disp}, respectivamente) mostram a vértebra definida. A imagem B apresenta formação completa da estrutura, porém, comparada com a imagem A, sua formação é menos evidente. A melhor visualização da imagem pode ser atribuída a aumento na deposição de cálcio e fósforo nas vértebras, estando estes relacionados ao desenvolvimento, manutenção do sistema esquelético e estabilidade das vértebras (Mc Dowell 1992).

As imagens C e D (peixes alimentados com 2,0g e 1,5kg⁻¹ de P_{disp}, respectivamente) não apresentaram formação nítida da vértebra, podendo conter quantidades de fósforo insuficientes para a formação da estrutura óssea. Peixes alimentados com dietas deficientes em fósforo retiram e/ou retardam a deposição do mineral do osso na forma de fosfato de cálcio (Fontagne *et al.* 2009), sendo o fósforo utilizado para o crescimento dos tecidos moles e o cálcio descartado (Sugiura *et al.* 2004), impossibilitando sua visualização.

Os processos de formação óssea, mineralização e reabsorção são influenciados pelo fósforo presente nas dietas (Roy *et al.* 2002). Estudos avaliando dietas com níveis de fósforo para arrinca (Roy *et al.* 2002), truta arco íris (Fontagne

et al. 2009) e salmão do Atlântico (Helland *et al.* 2005) identificaram deformidades ósseas através de imagens de raio-X.

As maiores respostas obtidas neste estudo para ganho de peso, cálcio e fósforo no osso, densitometria dos ossos do corpo e presença de fósforo na água foram observadas em peixes alimentados com dietas 4,0g e 6,0kg⁻¹ de P_{disp}, com melhor resposta com a dieta formulada para conter 6,0g kg⁻¹. As imagens tomográficas mostraram a formação nítida da coluna vertebral em peixes alimentados com as dietas de 4,0g e 6,0kg⁻¹ de P_{disp}.

A utilização de dietas contendo entre 4,0 e 6,0 g kg⁻¹ de fósforo disponível atendem adequadamente as exigências nutricionais para crescimento e mineralização óssea de alevinos da tilápia do Nilo.

Referências bibliográficas

- Borlongan, I.G. & Satoh, S. (2001) Dietary phosphorus requirement of juvenile milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal). *Aquac. Res.*, **32**(Suppl. 1), 26–32.
- Boyd, C. E. (1998) Water quality in ponds for aquaculture. pp.482, Bermingham, Auburn.
- Bremer-Neto, H., Graner, C.A.F., Pezzato, L.E. & Padovani, C.R. (2005) The spectrophotometric method on the routine of 1,5- diphenylcarbazide was adjusted on chromium determination in feces, after its utilization as a biological marker as chromium (III) oxide. *Ciência Rural*, **35**, 691–697.
- Brown, M.L., Jaramillo, F. & Gatlin, D.M. III (1993) Dietary phosphorus requirement of juvenile sunshine bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. *Aquaculture*, **113**, 355–363.
- Bueno, G. W., Marengoni, N. G., Gonçalves Júnior, A. C., Boscolo, W. R. & Teixeira, R. A. (2008) Estado trófico e bioacumulação do fósforo total no cultivo de peixes em tanques-rede na área aquícola do reservatório de Itaipu. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, **30**(Suppl. 3), 237-243.
- Chaimongkol, A. & Boonyaratpalin, M. (2001) Effects of ash and inorganic phosphorus in diets on growth and mineral composition of seabass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquac. Res.*, **32** (Suppl. 1), 53– 59.
- Cho, C.Y. (1993) Digestibility of feedstuffs as a major factor in aquaculture waste management. In: *Fish nutrition in practice*, (Kaushik, S.J. & Laquet, P. eds), pp. 363–374. INRA.
- Dato-Cajegas, C. R. S. & Yakupitiyage, A. (1996) The need for dietary mineral supplementation for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultured in a semi-intensive system. *Aquaculture*, **144**, 227-237.
- Dougall, D.S., Woods, L.C. III, Douglass, L.A. & Soares, J.H. (1996) Dietary phosphorus requirement of juvenile striped bass, *Morone saxatilis*. *J. World Aquac. Soc.*, **27**, 82–91.
- Elangovan, A. & Shim, K.F. (1998) Dietary phosphorus requirement of juvenile tiger barb, *Barbus tetrazona* (Bleeker, 1855). *Aquar. Sci. Conserv.*, **2**, 9–19.
- 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. *Aquaculture*, **297**, 141-150.

- Furuya, W.M., Furuya, V.R.B., Boscolo, W.R., Feiden, A., Cyrino, J.E.P., Pezzato, L.E. & Barros, M.M. (2010) Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias (Furuya, W.M. ed.). pp. 100, GFM Gráfica & Editora, Toledo.
- Furuya, W.M., Pezzato, L. E., Pezzato, A. C., Barros, M. M. & Miranda, E. C. (2001) Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, 30 (Suppl. 4), 1143-1149.
- Haylor, G.S., Beveridge, M.C.M. & Jauncey, K. (1988) Phosphorus nutrition of juvenile *Oreochromis niloticus*. In: The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture (Pullin, R.S.V., Bhukaswan, T., Tonguthai, K. & Maclean, J.L. eds), pp. 341–345. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines (ICLARM Conference Proceedings 15).
- Helland, S. *et al.* (2005) 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*, 250, 364-376.
- Lehninger, A.L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. (1995) Princípios de bioquímica. pp. 839, Sarvier, São Paulo.
- Lewis-McCrea, L.M.; Lall, S.P. (2010) Effects of phosphorus and vitamin C deficiency, vitamin A toxicity, and lipid peroxidation on skeletal abnormalities in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *J. Appl. Ichthyol.*, 26, 334-343.
- Liang, J. J., Liu Y. J., Tian, L. X., Yang, H. J. & Liang, G. Y. (2011) Effects of dietary phosphorus and starch levels on growth performance, body composition and nutrient utilization of grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.). *Aquaculture Research*, 1-9.
- Lovell, T. (1988) Nutrition and feeding of fish. New York: Van Nostrand Reinhold, 260 pp.
- Mai, K.S., Zhang, C.X., Ai, Q.H., Duan, Q.Y., Xu, W., Zhang, L., Liufu, Z.G. & Tan, B.P. (2006) Dietary phosphorus requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture*, 251, 346–353.
- Markzent, Z. (1976) Spectrophotometric determination of elements. Ellis Howood, Chichester, 211-215.

- McDowell, L.R. (1992) Zinc. In: Minerals in Animal and Human Nutrition (McDowell, L.R. ed.), pp. 265–293. Academic Press, London, UK.
- Miranda, E.C., Pezzato, A. C., Pezzato, L. E., Graner, C. F., Rosa, G. J. & Pinto, L. G. Q. (2000) Disponibilidade aparente de fósforo em ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum*, 22 (Suppl. 3), 669–675.
- Nordrum, S., Asgard, T., Shearer, K.D. & Arnessen, P. (1997) Availability of phosphorus in fish bone meal and inorganic salts to Atlantic salmon (*Salmo salar*) as determined by retention. *Aquaculture*, 157, 51–61.
- Nose T. & Arai S. (1976) Recent advances in studies on mineral nutrition of fish in Japan. In: Advances in Aquaculture. Papers presented at the FAO Technical Conference on Aquaculture, 26 May - 2 June 1976, Kyoto, Japan (ed. by T.V.R. Pillay & W.A. Dill), pp. 584-589. Fishing News Books, Farnham, UK.
- NRC – National Research Council (1993) Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington DC.
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C., Barros, M.M., Pinto, L.G.Q., Furuya, W.M. & Pezzato, A.C. (2002) Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Braz. J. Anim. Sci.*, 31, 1595–1604.
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C., Barros, M.M.; Furuya, W.M. & Pinto, L.G.Q. (2004) Digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta e a energia digestível de alguns alimentos alternativos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 26 (Suppl. 3), 329-337.
- Phillips Jr, A.M. (1962) Effect of dietary and water temperature on the blood phosphorus of brook trout. *Prog. Fish-Cult.* 24, 22–25.
- Pimentel-Rodrigues, A.M. & Oliva-Teles, A. (2001) Phosphorus requirement of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquac. Res.*, 32 (Suppl. 1), 157–161.
- Ramirez-Munoz, J. (1968) Atomic absorption spectrophotometer and analysis by atomic-absorption flame photometry. Elsevier, New York, 389 pp.
- Robinson, E.H., Bomascus, D.L., Brown, P.B. & Linton, T.L. (1987) Dietary calcium and phosphorus requirement of *Oreochromis aureus* reared in calcium-free water. *Aquaculture*, 64, 267–276.

- 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.
- Rodehustscord, M. (1996) Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growing from 50 to 200 g to supplements of dibasic sodium phosphate in a semipurified diet. *J. Nutr.*, 126, 324–331.
- Roy, P.K. & Lall, S.P. (2003) Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture*, 221, 451–468.
- Roy, P.K.; Lall, S.P. (2003) Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture*, 221, 451–468.
- Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas – Saeg. (1997) Manual do usuário. Versão 7.1. pp. 150, UFV - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Skonberg, D. I., Yogev, L., Hardy, R. W. & Dong, F. M. (1997) Metabolic response to dietary phosphorus intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 157, 11 – 24.
- Stell, R.G.D. & Torrie, S.H. (1984) Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2nd ed. pp. 633, McGraw-Hill International, Auckland.
- Sugiura, S.H., Hardy, R.W. & Roberts, R.J. (2004) The pathology of phosphorus deficiency in fish – a review. *Journal of Fish Disease*, 27, 255-265.
- Sullivan, M., Reid, S. W. J., Ternent, H., Manchester, N. J., Roberts, R. J., Stone, A. J. & Hardy, R. W. (2007) The aetiology of spinal deformity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., influence of different commercial diets on the incidence and severity of the preclinical condition in salmon parr under two contrasting husbandry regimes. *Journal of Fish Diseases*, 30, 759-767.
- Thrall, D. E. (2007) *Veterinary diagnostic radiology*. Elsevier. North Carolina, 848p.
- Viola, S., Zohar, G. & Ariele, Y. (1986) Requirements of phosphorus and its availability from different sources for intensive pond culture species in Israel. part II - carp culture. *Bamidgeh*, 38, 44-54.
- Watanabe, T., Murakami, A., Takeuchi, T., Nose, T. & Ogino, C. (1980) Requirement of chum salmon held in fish eater for dietary phosphorus. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46, 36-367.

- Wilson, R.P., Robinson, H.E., Gatlin III, D.M. & Poe, W.E. (1982) Dietary phosphorus requirement of Channel Catfish. *J. Nutr.*, 112 (Suppl.6),1197-1202.
- 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 sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Aquaculture Nutrition*, 17, 159-169.
- Zhang, C.X., Mai, K.S., Ai, Q.H., Zhang, W.B., Duan, Q.Y., Tan, B.P., Ma, H. M., Xu, W., Liufu, Z.G. & Wang, X.J. (2006) Dietary phosphorus requirement of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 255, 201–209.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (100% da matéria seca)

Ingrediente (g/kg ⁻¹)	Dieta (g/kg ⁻¹ P _{disp})			
	1,5	2,0	4,0	6,0
Farelo de soja ¹	459,50	461,00	464,00	467,00
Glúten de milho ¹	60,00	60,00	60,00	60,00
Milho (moído) ¹	392,80	391,40	368,30	345,30
Farelo de trigo ¹	71,60	67,10	70,70	74,30
Óleo de soja ²	0,00	1,20	6,90	12,60
Lisina ³	0,20	0,20	0,10	0,00
Metionina ³	1,90	1,90	1,90	1,90
Treonina ³	3,00	3,00	3,00	3,00
Triptofano ³	0,40	0,40	0,40	0,40
Fosfato bicálcico ⁴	0,00	3,00	13,90	24,80
BHT (antioxidante) ⁵	0,20	0,20	0,20	0,20
Premix Vit/Min ⁶	8,00	8,00	8,00	8,00
Vitamina C ⁷	0,50	0,50	0,50	0,50
Sal comum ⁴	1,00	1,00	1,00	1,00
Óxido de crômio-III ⁸	1,00	1,00	1,00	1,00
Composição química (g/kg ⁻¹)				
Matéria Seca	877,00	876,10	872,50	868,90
Energia Digestível (kcal/kg ⁻¹)	3036	3036	3036	3036
Proteína Bruta	295,70	295,70	295,60	295,50
Proteína digestível	268,10	268,10	268,10	268,10
Fibra Bruta	40,30	40,00	40,00	40,00
Extrato etéreo	23,80	24,90	29,90	34,90
Lisina	15,30	15,30	15,30	15,30
Metionina	5,20	5,20	5,20	5,20
Treonina	11,80	11,80	11,80	11,80
Ptotal (g/kg ⁻¹) ⁹	3,30	3,70	5,50	8,40
Pdisp (g/kg ⁻¹) ⁹	1,60	2,20	4,10	5,70
ED/PD	11,32	11,32	11,32	11,32

¹Cargill Inc., Rio Verde, GO, Brazil

²Bunge Inc., Santos, SP, Brazil.

³Ajinomoto Biolatina Inc., Valparaíso, SP, Brazil

⁴Tortuga Inc., Mairinque, SP, Brazil

⁵Antioxidant: butylated hydroxytoluene.

⁶Premix mineral e vitamínico (Supremais): níveis de garantia por kg do produto: Vit. A = 1200.000UI; vit. D3 = 200.000UI; vit. E = 12.000mg; vit. K3 = 2.400mg; vit. B1 = 4.800mg; vit. B2 = 4.800mg; vit. B6 = 4.000mg; vit. B12 = 4.800mg; ác. fólico = 1.200mg; pantotenato de Ca = 12.000mg; vitamina C = 48.000mg; biotina = 48mg; colina = 65.000mg; niacina = 24.000mg; ferro = 10.000mg; cobre = 600mg; manganês = 4.000mg; zinco = 6.000mg; iodo = 20mg; cobalto = 2mg e selênio = 20mg;

⁷DSM Nutritional Products Corp., Basel, Switzerland.

⁸Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brazil

⁹valor determinado

Tabela 2. Valores de desempenho, composição química de cálcio e fósforo nas vértebras e densitometria dos ossos e das vértebras de alevinos da tilápia do Nilo alimentados com níveis de fósforo

Variável	Dieta (g/kg ⁻¹ _{Pdisp})			
	1,5	2,0	4,0	6,0
Ganho de peso (g/kg ⁻¹) ⁽¹⁾	6,97	8,17	14,54	16,69
Fósforo no osso (%) ⁽²⁾	4,83	5,49	6,30	6,55
Cálcio no osso (%) ⁽³⁾	8,20	7,55	10,22	10,67
Densitometria vértebras (HU) ⁽⁴⁾	313,60	304,57	276,53	271,33
Densitometria ossos (HU) ⁽⁵⁾	173,80	170,43	274,07	292,33
Sobrevivência (%) ⁽⁶⁾	93,33	86,67	80,00	93,33

¹ Efeito linear: $Y = 1,98198 + 28,9810X$; CV = 2,32%; $R^2 = 96,60\%$;

² Efeito linear: $Y = 4,23253 + 4,72444X$; CV = 6,58%; $R^2 = 96,39\%$;

³ Efeito linear: $Y = 6,41948 + 8,30995X$; CV = 5,92%; $R^2 = 79,55\%$;

⁴ Efeito linear: $Y = 332,191 - 122,903X$; CV = 15,04%; $R^2 = 94,93\%$;

⁵ Efeito linear: $Y = 374,678 + 103,889X$; CV = 3,87%; $R^2 = 88,55\%$;

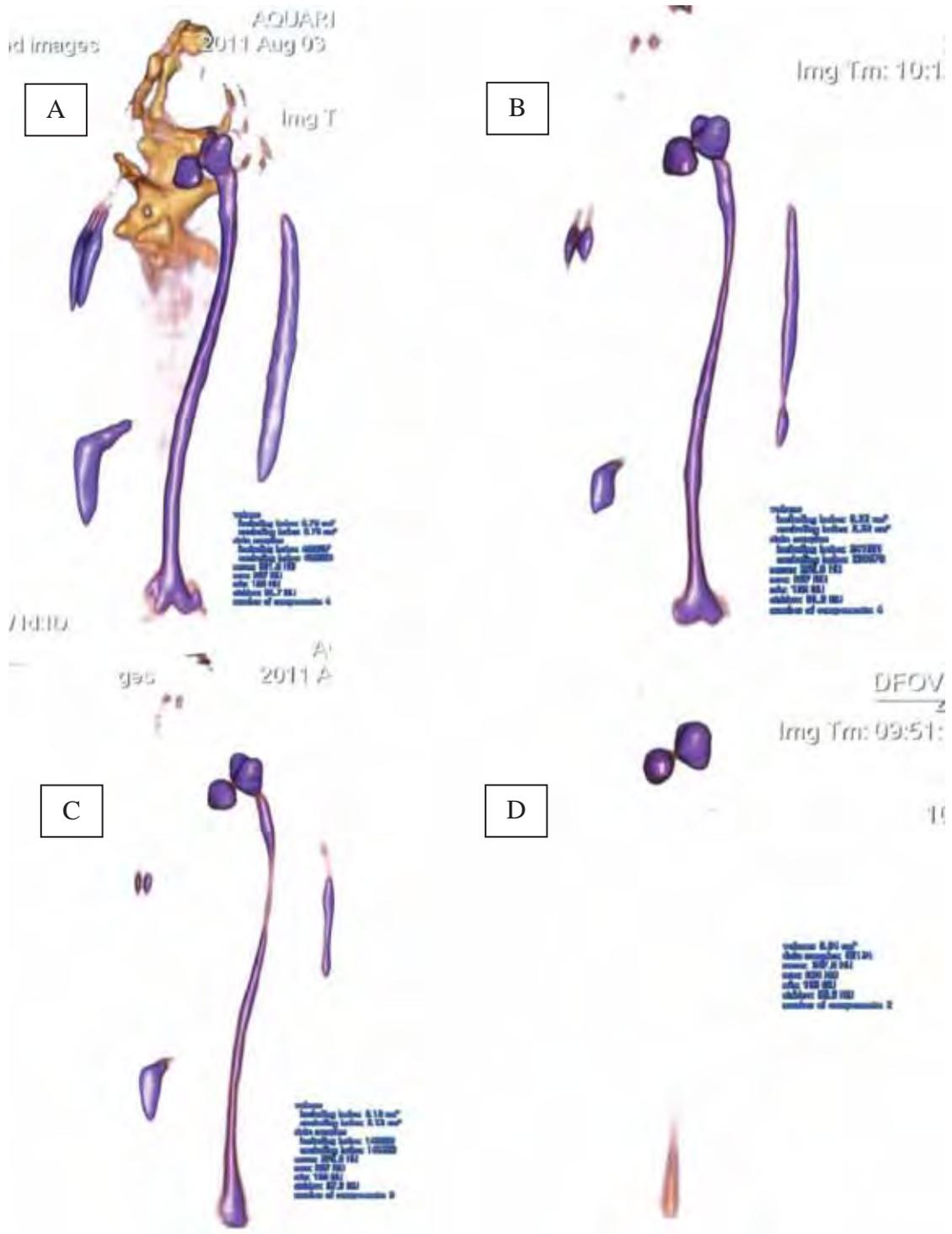
⁶ CV = 5,57%; $R^2 = \text{NS}$.

Tabela 3. . Concentração de fósforo total (mg L⁻¹) presente na água dos aquários de peixes alimentados com níveis de fósforo nos períodos de coleta de água (dias)

Dieta (g/kg ⁻¹ _{Pdisp})	Fósforo total (mg L ⁻¹)		
	Período de coleta (dias)		
	30	60	90
1,5	0,03±0,05 ^C	-0,09±0,20 ^B	-0,23±0,09 ^C
2,0	0,09±0,07 ^C	-0,26±0,05 ^B	-0,13±0,08 ^C
4,0	0,23±0,05 ^B	0,25±0,20 ^B	0,87±0,15 ^B
6,0	0,84±0,11 ^A	1,38±0,70 ^A	2,87±1,20 ^A

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si (P<0,05).

Figura I. Imagens tomográficas A ($6,0\text{g kg}^{-1}$); B ($4,0\text{g kg}^{-1}$); C ($2,0\text{g kg}^{-1}$) e D ($1,5\text{g kg}^{-1}$) dos ossos e vértebras de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis de fósforo



CAPÍTULO III

Implicações

O fósforo é um macromineral essencial para o metabolismo e desenvolvimento esquelético dos peixes. O aumento nas concentrações de cálcio e fósforo nas vértebras dos animais devido ao aumento das concentrações do mineral na dieta esta relacionado às funções que estes minerais exercem no desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético e na homeostase do fósforo corporal, importantes nas fases de crescimento onde são intensificadas as reações metabólicas.

A deficiência do mineral na dieta causa prejuízos zootécnicos devido a redução no crescimento e formação da estrutura óssea dos animais, contudo, a crescente demanda por produtos oriundos da pesca elevou a produção aquícola e consequentemente a lixiviação do mineral para o meio.

Visando diminuir a descarga do mineral nos efluentes e o impacto ambiental, se torna interessante a busca por dietas contendo níveis que atendam minimamente a exigência do mineral para os peixes, porém é imprescindível o uso de ferramentas que possam auxiliar na determinação destas exigências.

A utilização da tomografia computadorizada como ferramenta de análise forneceu imagens e valores numéricos que possibilitaram a percepção das alterações ósseas indicando a deficiência do mineral pela má formação estrutural do peixe.