

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**CÂMPUS DE DRACENA**

**EXIGÊNCIA PROTEICA E RESPOSTAS METABÓLICAS DE**  
**JUVENIS DE PIAPARA (*Megaleporinus obtusidens*)**

**Viviane do Nascimento Santana de Almeida**

Zootecnista

**Dracena**  
**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**CÂMPUS DE DRACENA**

**EXIGÊNCIA PROTEICA E RESPOSTAS METABÓLICAS DE**  
**JUVENIS DE PIAPARA (*Megaleporinus obtusidens*)**

**Viviane do Nascimento Santana de Almeida**  
**Orientador: Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp - Campus de Dracena, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

**Dracena**  
**2019**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação  
Campus de Dracena

A447e

Almeida, Viviane do Nascimento Santana de.  
Exigência proteica e respostas metabólicas de juvenis de piapara (*Megaleporinus obtusidens*) / Viviane do Nascimento Santana de Almeida. -- Dracena: [s.n.], 2019.  
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2019.

Orientador: Leonardo Susumu Takahashi  
Inclui bibliografia.

1. Nutrição. 2. Piscicultura. 3. Nativos. 4. Enzimas. I. Título.



Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas  
CRB 8/6665



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Exigência proteica e respostas metabólicas de juvenis de piapara

**AUTORA: VIVIANE DO NASCIMENTO SANTANA DE ALMEIDA**

**ORIENTADOR: LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI  
Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Prof. Dr. PAULO RENATO MATOS LOPES  
Curso de Engenharia Agrônoma / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Dr. THIAGO MATIAS TORRES DO NASCIMENTO  
Nutrição e Saúde Animal / Mcassab

Dracena, 27 de fevereiro de 2019

## **DADOS CURRICULARES DO ALUNO**

VIVIANE DO NASCIMENTO SANTANA DE ALMEIDA – Nascida em São Paulo, SP. No ano de 2016, concluiu sua graduação em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena (UNESP-FCAT), no município de Dracena, SP. Durante a graduação, participou no Grupo de Aquicultura da UNESP de Dracena. Após se formar, durante um semestre, iniciou estágio voluntário no Centro de Aquicultura da UNESP, em Jaboticabal, auxiliando os alunos da Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Animal no desenvolvimento de seus projetos de Mestrado. Atualmente é discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – UNESP Campus de Dracena, sendo que em fevereiro do ano de 2019 submeteu sua dissertação à banca examinadora.

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.”

Eleanor Roosevelt

Dedico:

A Deus, minha família e aos meus amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por me guiar e dar forças nos momentos mais difíceis nessa caminhada.

À minha Família, em especial a minha Mãe Dijanira, meu pai Adil, meus irmãos Thiago e Igor e minhas primas Vitória e Le, pelos conselhos, apoio, motivação, acompanhamento, amizade e principalmente por acreditar e depositar confiança em mim. A eles sou eternamente grata.

Ao Prof. Adj. Leonardo Susumu Takahashi pela orientação, apoio, paciência, dedicação, compreensão, confiança depositada e por ser a peça fundamental para meu desenvolvimento acadêmico e exemplo a ser seguido. Obrigado por contribuir para meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal, especialmente pela atenção, carinho e amizade. A você professor, minha admiração e gratidão.

Aos meus amigos (as) do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Animal, Luana, Carolina, Jeisson, Ubiracy, Gabriela, Juliana, Sandie, Lucas, Camila e Hugo e, especialmente a Letícia e ao André, por toda ajuda durante o experimento e companheirismo durante nossos dias de trabalho, pelos conselhos e apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas que me ajudaram no Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal - LABECOM em São Vicente, em especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alessandra pela sua paciência e confiança durante as análises de energia.

Ao Leonardo pela companhia, apoio, conselhos e compreensão nos momentos de dificuldade na minha vida pessoal e profissional.

Aos meus amigos e às Repúblicas EternaMent e Marvados, pela amizade, aprendizado, confiança, convivência e por proporcionar várias histórias em minha vida.

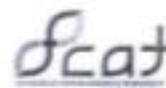
O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Obrigada!

# CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Dracena



## Comissão de Ética no Uso de Animais

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Valor nutricional de alimentos e determinação da exigência proteica e metabolismo de aminoácidos da piapara *Leporinus elongatus*" (Nutritional value of foods and determination of the protein requirement and amino acid metabolism of the piapara *Leporinus elongatus*), registrada com o nº 23/2018.R2 – CEUA, sob a responsabilidade do(a) Prof(o). Dr(a). Leonardo Susumu Takahashi – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de 24/10/2018.

Dracena, 24 de outubro de 2018.

Profa. Dra. Sirlei Aparecida Maestá  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – FCA

Rod. Celso João Ribeiro de Barros, km 831 – Bairro das Amas – CEP: 17200-000 – Dracena/SP – Brasil

Tel. (18) 3821-6200 – [www.cca.unesp.br](http://www.cca.unesp.br) – [cca@cca.unesp.br](mailto:cca@cca.unesp.br)

## EXIGÊNCIA PROTEICA E RESPOSTAS METABÓLICAS DE JUVENIS DE PIAPARA (*Megaleporinus obtusidens*)

**RESUMO** - O objetivo do trabalho foi determinar a exigência proteica e os efeitos da proteína da dieta em indicadores fisiológicos e bioquímicos da piapara (*Megaleporinus obtusidens*). Para tanto, 300 juvenis ( $24 \pm 1,26$  g) foram distribuídos em 20 caixas de 130 L, totalizando 15 peixes/caixa. Foram formuladas 5 dietas isoenergéticas e com níveis crescentes de proteína digestível (21, 24, 27, 30 e 33% PD). Após 77 dias de alimentação, foi realizada a biometria dos peixes para avaliação dos parâmetros de desempenho produtivo e os indicadores fisiológicos: concentração de metabólitos no sangue (amônia sérica e triglicerídeos), relações somáticas, atividade hepática da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e atividade da enzima málica e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). A cada sete dias, foram determinadas a concentração de amônia total, pH, condutividade elétrica e concentração de oxigênio dissolvido na água das caixas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 3 repetições. Os resultados de desempenho produtivo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e à regressão polinomial. No peso final, taxa de crescimento específico, ganho de peso e conversão alimentar foi observado efeito linear ( $p < 0,05$ ) e no consumo não houve efeito significativo. Na concentração de amônia na água foi observada diferença ( $p < 0,05$ ), sendo observado efeito linear com o aumento de proteína. Na concentração de triglicerídeos sérico, amônia sérica, índice hepatossomático (IHS), concentração de glicogênio hepático e lipídio hepático, não foram observadas diferenças ( $p > 0,05$ ). No índice gorduro-viscerossomático (IGVS) e enzima málica, foi observado um efeito quadrático, com ponto máximo de 25,77% PD e 27,08% PD, respectivamente. No lipídio muscular e na atividade da G6PDH, houve um efeito linear, sendo observado nos animais que receberam a dieta com o menor nível proteico a maior concentração de lipídio. Na atividade hepática da AST houve um efeito linear, sugerindo um desbalanço de aminoácidos essenciais na dieta, enquanto a atividade da ALT não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ). Nas condições experimentais do presente estudo, quando maior o nível de proteína digestível da dieta maior foi crescimento dos peixes, com reflexos nos indicadores fisiológicos dos peixes, não sendo possível a determinação da exigência proteica da piapara, sugerindo a necessidade de novos estudos.

**Palavras-chave:** Nutrição, piscicultura, nativos, enzimas.

## PROTEIN REQUIREMENT AND METABOLIC RESPONSES OF JUVENILE PIAPARA (*Megaleporinus obtusidens*)

**ABSTRACT** - The objective of this work was to determine the protein requirement and the effects of dietary protein on physiological and biochemical indicators of piapara (*Megaleporinus obtusidens*). For this, 300 juveniles ( $24 \pm 1.26$  g) were distributed in 20 boxes of 130 L, totaling 15 fish / box. Five diets were formulated isoenergetic and with increasing levels of digestible protein (21, 24, 27, 30 and 33% PD). After 77 days of feeding, the fish biometry was performed to evaluate the parameters of productive performance and the physiological indicators: concentration of metabolites in the blood (serum ammonia and triglycerides), somatic relations, liver enzymatic activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity and lipogenesis, malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). Every 7 days, the concentration of total ammonia, pH, electrical conductivity and oxygen concentration dissolved in the water of the boxes were determined. The experimental design was completely randomized, with 5 treatments and 3 replicates. The results of productive performance were submitted to analysis of variance (ANOVA) and polynomial regression. In the final weight, specific growth rate, weight gain and feed conversion was observed linear effect ( $p < 0,05$ ) and in consumption there was no significant effect ( $p > 0,05$ ). At the concentration of ammonia in the water, a significant difference ( $p < 0.05$ ) was observed with a linear effect. In the serum triglycerides concentration, serum ammonia, hepatosomatic index (HSI), level of hepatic glycogen and hepatic lipid, no significant differences were observed. In the fat-viscerosomal index (IGVS) and malic activity, a quadratic effect was observed, with a maximum point of 25.77 and 27.08% PD, respectively. In the muscle lipid level and G6PDH activity, there was a linear effect ( $p < 0,05$ ), where the animals that received the diet with the lowest protein level had the largest reserve. In the liver, a linear effect ( $p < 0,05$ ) was observed in the AST activity, suggesting an imbalance of essential amino acids in the diet, while in the ALT activity no significant difference was observed. At the experimental conditions, growth increased with increasing in the digestible protein, with reflexes on the physiological indicators of fish, and it is not possible to determine the protein content of piapara, suggesting the need for further studies.

**Keywords** - Nutrition, fish farming, natives, enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral do catabolismo dos aminoácidos.....	21
Figura 2. Alimentação dos peixes. ....	27
Figura 3. Fornecimento da ração em pequenas porções .....	27
Figura 4. Potes de armazenamento das dietas experimentais .....	28
Figura 5. Imersão dos peixes no eugenol .....	30
Figura 6. Pesagem dos peixes.....	30
Figura 7. Coleta de sangue por punção caudal.....	32
Figura 8. Sangue utilizado para as análises.....	32
Figura 9. Análise de amônia sérica .....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação e composição analisada das dietas experimentais .....	26
Tabela 2. Análise da regressão das variáveis de desempenho produtivo de juvenis de piapara alimentados com níveis crescentes de proteína digestível. ....	36
Tabela 3. Análise de regressão das variáveis físico-químicas da água de juvenis de piapara alimentados com níveis crescentes de proteína digestível. ....	38
Tabela 4. Análise de regressão das variáveis bioquímicas sanguíneas e relações somáticas de juvenis de piapara alimentados com níveis crescentes de proteína digestível. ....	41
Tabela 5. Análise de regressão das variáveis atividade hepática de enzimas do metabolismo de aminoácidos de juvenis de piapara alimentados com níveis crescentes de proteína digestível. ....	43

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
	2.1 Exigência Proteica em Peixe.....	18
	2.2 Metabolismo de Aminoácidos e Excreção Nitrogenada .....	19
	2.3 <i>Megaleporinus</i> .....	22
3	OBJETIVO .....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	23
	4.1 Comissão de Ética.....	23
	4.2 Adequações das Instalações e Manejo dos Peixes .....	23
	4.3 Dietas Experimentais.....	24
	4.4 Parâmetros de Avaliação.....	29
	4.4.1 Desempenho produtivo .....	29
	4.4.2 Metabólitos no sangue.....	31
	4.4.3 Relações somáticas .....	33
	4.4.4 Atividade enzimática hepática .....	33
	4.4.5 Excreção de amônia na água.....	34
	4.4.6 Reservas energéticas teciduais .....	34
	4.5 Análises Estatísticas.....	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
	5.1 Desempenho Produtivo .....	35
	5.2 Excreção de Amônia na Água .....	38
	5.3 Metabólitos Sanguíneos e Reserva Energética .....	40
	5.4 Amônia Sérica e Análise Enzimática Hepática.....	42
6.	CONCLUSÃO .....	44
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

No corpo dos peixes, as proteínas se apresentam como constituintes principais dos tecidos estruturais de proteção (ossos, ligamentos, escamas e pele), tecidos moles (órgãos, músculos) e fluídos corporais, principalmente para manutenção e crescimento (LALL; ANDERSON, 2005). Portanto, a determinação de um nível ideal de proteína na dieta ou exigência representa um passo fundamental para o desenvolvimento de rações comerciais altamente eficientes e de baixo custo (DENG *et al.*, 2011). Afinal, em estudos econômicos, a dieta comercial pode representar até 70% do custo total de produção (GONÇALVES, 2011).

De acordo com NRC (2011), para o crescimento máximo, a maior parte das espécies de peixes cultivadas comercialmente no mundo necessita de dietas com níveis de proteína que variam entre 31 e 56%. Dietas com quantidades inadequadas de proteína podem resultar em diminuição do crescimento e da eficiência alimentar, pois o animal acaba mobilizando a proteína tecidual para manutenção de funções vitais. E quando a proteína está em excesso, possibilitam a utilização dos aminoácidos como energia e não para formação de tecido muscular e crescimento, encarecendo dessa forma a dieta (WILSON, 2002; MEYER; FRACALOSSO, 2004).

A utilização de ingredientes de baixo valor biológico ou altamente protéicos podem ocasionar a eutrofização do ambiente, uma vez que peixes excretam amônia, que é um dos principais responsáveis por deteriorar a qualidade da água (CYRINO *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2012). A quantificação da produção de amônia em sistemas de produção está ligada a quantidade e qualidade da proteína na alimentação. Se uma proteína é pobre em aminoácidos essenciais, ou excede o total de aminoácidos para ótimo crescimento, ocorre uma menor síntese de proteínas por unidade de proteína ingerida e os aminoácidos são desaminados e o nitrogênio é excretado (FOSS *et al.*, 2003).

A espécie escolhida para a realização deste estudo foi a piapara (*Megaleporinus obtusidens*), peixe pertencente à ordem Characiforme, família Anostomidae e gênero *Megaleporinus*. Apresenta grande importância comercial, sendo uma das espécies que alcança o maior porte da família, podendo atingir até 60 cm e mais de um quilograma de peso vivo durante o período de um ano (REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO, 2010). Sendo encontrada nas regiões Sudeste e Sul, nas

bacias do rio São Francisco e do rio Paraná (SANTOS; FORMAGGIO, 2000). Mesmo sendo uma espécie nativa com um alto potencial produtivo, tornam-se necessários estudos relacionados à sua nutrição e manejo, uma vez que pouco se conhece sobre esta espécie em condições de cultivo.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Exigência Proteica em Peixe**

Na piscicultura, a alimentação é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento eficiente e saudável dos peixes. No entanto, um dos grandes problemas é o elevado número de espécies com potencial para cultivo (BITTENCOURT *et al.*, 2010), principalmente no que se refere à necessidade e qualidade da proteína dietética, sendo um dos campos de maior relevância na nutrição de peixes (COSTA *et al.*, 2009).

As proteínas são polímeros de aminoácidos, que podem desempenhar diversas funções como catálise (enzimas), elementos estruturais, receptores de sinal ou transportadores que carregam substâncias específicas para dentro ou para fora das células (NELSON; COX, 2014). Esse nutriente é considerado como o principal constituinte orgânico do tecido dos peixes. Quando digeridas, elas são quebradas em aminoácidos livres que são transportados por meio da corrente sanguínea para órgãos e tecidos, formando novas proteínas, utilizadas para crescimento, reprodução e manutenção do indivíduo. Com isso, são essenciais para a formação e manutenção dos tecidos, formação do sistema imune, hormônios, enzimas, transporte de minerais e, fonte de energia para os peixes, principalmente carnívoros (NRC, 2011).

Como a proteína é o nutriente mais caro da dieta, é de grande importância determinar a concentração mínima desse nutriente que produza crescimento máximo nos animais (CLARK *et al.*, 1990). Na nutrição de peixes carnívoros e onívoros, existe à necessidade de se reduzir o custo de produção dos mesmos, sendo uma alternativa o efeito poupador de proteína, que consiste em atender as exigências energéticas dos peixes via carboidratos e/ou lipídios, e não através de proteínas, diminuindo assim, a

gliconeogênese e a oxidação dos aminoácidos, reduzindo o custo da ração e minimizando o impacto ao ambiente (ALMEIDA FILHO *et al.*, 2012).

Para evitar o aumento no custo de produção e o impacto ambiental, a exigência proteica dos peixes é determinada a partir de curvas de dose-resposta, obtendo-se a quantidade mínima de proteína da dieta que resultará no crescimento máximo para aquela espécie em particular, não sendo aceita a extrapolação para espécies distintas. Além de se estudar o efeito que determinado nutriente tem nos parâmetros zootécnicos, é de grande importância conhecer também os efeitos do excesso ou deficiência deste nutriente nos processos fisiológicos e metabólicos do animal (FRACALOSSÍ *et al.*, 2013).

O valor biológico da proteína está ligado a quantidade de aminoácidos essenciais presentes naquele determinado ingrediente, portanto se o valor biológico é baixo ou se a quantidade de aminoácido for excessiva, ocorrerá uma menor síntese de proteína e os aminoácidos presentes serão utilizados através da desaminação, onde o nitrogênio será excretado em maior quantidade pelo animal (CYRINO *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2012; ZEHRA; KHAN, 2011). Essa correlação é mediada pelos processos de desaminação e/ou transaminação que liberam o grupo amino não reciclado por meio dos processos metabólicos, aumentando sua excreção. O não aproveitamento do nitrogênio amoniacal para o crescimento dos peixes é considerada como perda energética (DAS, 2002).

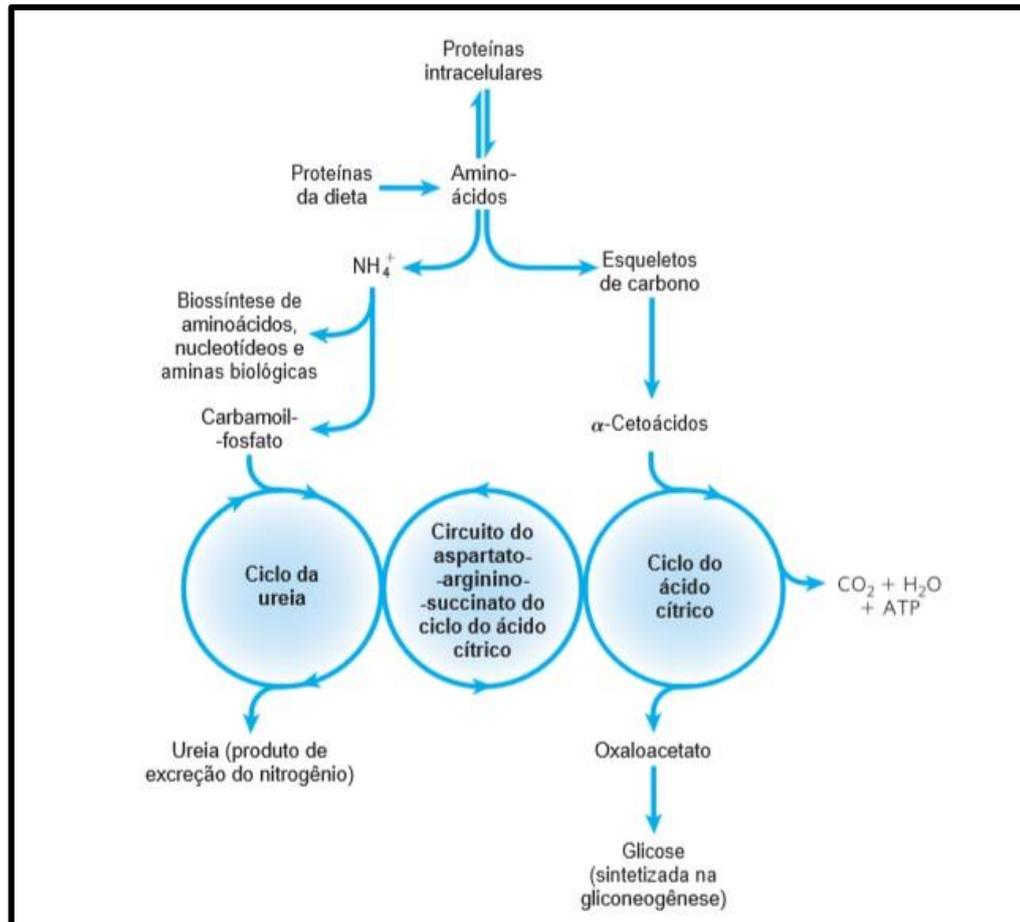
## **2.2 Metabolismo de Aminoácidos e Excreção Nitrogenada**

O catabolismo dos aminoácidos é parte do processo do metabolismo dos compostos nitrogenados. O nitrogênio se encontra no organismo através de uma variedade de compostos presentes nos alimentos, e, é liberado do organismo na forma de ureia, amônia e outros produtos derivados do metabolismo dos aminoácidos.

O papel das proteínas corporais nessas transformações envolve dois conceitos importantes: o conjunto (pool) dos aminoácidos e a renovação das proteínas (HARVEY; FERRIER, 2012). A manutenção das concentrações de aminoácidos no plasma circulante depende do equilíbrio efetivo entre a liberação das reservas endógenas de proteínas e a sua utilização por vários tecidos. No músculo fica mais

da metade do reservatório corporal total dos aminoácidos livres, e o fígado constitui o local das enzimas do ciclo da ureia necessárias para o processamento do excesso de nitrogênio. Sendo assim, o músculo e o fígado desempenham importantes papéis na manutenção dos níveis circulantes de aminoácidos (RODWELL *et al.*, 2017).

Os aminoácidos livres estão presentes em todo o organismo, como por exemplo, nas células, no sangue e nos fluídos extracelulares e todos esses aminoácidos pertencendo a uma única entidade, o chamado conjunto dos aminoácidos. Esse conjunto provém de três fontes: aminoácidos liberados pela hidrólise das proteínas teciduais; aminoácidos derivados de proteínas da dieta; aminoácidos não essenciais sintetizados a partir de intermediários simples do metabolismo (HARVEY; FERRIER, 2012). Todos os aminoácidos contêm um grupo amino, e as vias para a degradação dos aminoácidos incluem, portanto, uma etapa fundamental, na qual o grupo  $\alpha$ -amino é separado do esqueleto de carbono e desviado para as vias do metabolismo do grupo amino (Figura 1) (NELSON; COX, 2014).



(Fonte: NELSON; COX, 2014)

Figura 1. Visão geral do catabolismo dos aminoácidos.

Os aminoácidos derivados das proteínas da dieta são a origem da maioria dos grupos amino. A maior parte dos aminoácidos é metabolizada no fígado. Parte da amônia gerada nesse processo é reciclada e utilizada em uma variedade de vias biossintéticas; o excesso é excretado diretamente ou convertido em uréia, ácido úrico ou amônia para excreção, dependendo do organismo. O excesso de amônia produzido em outros tecidos (extra-hepáticos) é enviado ao fígado (na forma de grupo amino) para a conversão em sua forma de excreção (NELSON; COX, 2014).

A enzima alanina-aminotransferase (ALT) catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o  $\alpha$ -cetoglutarato, resultando na formação de piruvato e glutamato. Durante o catabolismo dos aminoácidos, no entanto, essa enzima (como a maioria das aminotransferases) funciona na direção da síntese de glutamato. Desse modo, o glutamato atua, efetivamente, como um "coletor" de nitrogênio a partir da

alanina (RODWELL *et al.*, 2017). A enzima aspartato-aminotransferase (AST) é uma exceção à regra do grupo das aminotransferases que afunilam os grupos amino para formar glutamato. Durante o catabolismo dos aminoácidos, a AST transfere grupos amino do glutamato para o oxalacetato, formando aspartato, que é utilizado como fonte de nitrogênio no ciclo da uréia (RODWELL *et al.*, 2017).

### **2.3 *Megaleporinus obtusidens***

O nome científico da piapara, após um estudo de reclassificação, deixou de ser *Leporinus* e passou a ser empregado o termo *Megaleporinus*, pois esse gênero foi identificado por ter uma combinação exclusiva de três dentes unicúspides em cada osso pré-maxilar e dentário, uma a quatro manchas medianas escuras, e, uma exclusividade nos machos adultos, onde a primeira costela é alongada e associada a músculos intercostais hipertrofiados, sendo a espécie encontrada na bacia do rio Paraná e objeto deste estudo (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI, 2017).

Os peixes da família Anostomidae de importância econômica (piauí, piaçu, piava e piapara) tiveram um total produzido de 3.173 t de carne (IBGE, 2015). A piapara possui hábito alimentar onívoro, com preferência por plantas e insetos que crescem na região marginal dos rios (DURÃES *et al.*, 2001). A espécie é classificada como onívoro de amplo espectro, o que, do ponto de vista nutricional, proporciona vantagem no aproveitamento dos alimentos (RIBEIRO *et al.*, 2001).

Tem grande aceitação no mercado, apesar de apresentar espinhos em forma “Y” e leve acúmulo de gordura na região ventral. Este peixe apresenta excelente sabor e qualidade da carne, rápido crescimento, boa conversão alimentar, bom ganho de peso e apresenta comportamento agressivo quando capturada em anzol, sendo muito apreciada também para a pesca esportiva (MORO *et al.*, 2013). Ainda possui algumas outras características zootécnicas, como: bom rendimento de filé, resposta positiva à reprodução em cativeiro, tolerância ao manejo, fácil aceitação de ração e popularidade no mercado consumidor (TATAJE; ZANIBONIFILHO, 2010).

Apesar do potencial produtivo e do interesse pela espécie, estudos sobre exigências nutricionais e metabolismo em piapara (*Megaleporinus obtusidens*) não estão disponíveis na literatura. Existem trabalhos apenas com alimentos alternativos

de origem vegetal em dietas para o piavuçu, entretanto, não existem dados sobre a necessidade de utilização de proteína de origem animal em dietas para este peixe (NAGAE, 2000; QUINTEIRO, 2000; SOARES *et al.*, 2000). Sendo estas informações imprescindíveis para o desenvolvimento de pacotes tecnológicos para a produção de qualquer espécie animal, além da contribuição científica que estes resultados podem trazer.

### **3 OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo determinar a exigência proteica e os efeitos da proteína da dieta em indicadores fisiológicos e bioquímicos da piapara (*Megaleporinus obtusidens*) e analisar a qualidade da água em relação a excreção de N total na água.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Comissão de Ética**

Os procedimentos de manipulação de animais foram submetidos à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Unesp - Campus de Dracena e estavam de acordo com os preceitos e normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Certificado n°. 23/2018.R2-CEUA).

### **4.2 Adequações das Instalações e Manejo dos Peixes**

O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), Unesp, Campus de Dracena, no Laboratório de Aquicultura, no município de Dracena-SP. Foram utilizados 300 juvenis de piapara com peso médio inicial de  $24 \pm 1,3$  g, distribuídos aleatoriamente em 20 tanques de 130 L, na densidade de 15 peixes/tanque, providos de aeração e abastecimento contínuo, por água

proveniente de poço artesiano, com taxa de renovação de aproximadamente 3,5 vezes ao dia. Os juvenis de piapara foram obtidos a partir de doação pela CESP (Companhia energética do estado de São Paulo) de Castilho - SP. Durante o período de adaptação (15 dias), os peixes foram aclimatados às condições laboratoriais, recebendo alimentação duas vezes ao dia com ração comercial extrusada contendo 42% PB.

Durante o ensaio, no período da tarde (14:00), foram monitoradas a cada sete dias as variáveis físico-químicas (oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH) da água nas caixas, por meio dos equipamentos (YSI - Pro ODO oxímetro, Yellow Springs Instrument, Ohio, USA) e (YSI – Professional Plus, Yellow Springs Instrument, Ohio, USA). A temperatura média apresentou um valor de  $26,39 \pm 0,08$  °C, pH  $7,96 \pm 0,05$ , oxigênio dissolvido  $7,42 \pm 0,21$  mg/L, condutividade elétrica  $216,04 \pm 1,37$  µS. A cada cinco dias foram realizadas sifonagens do fundo dos tanques para a retirada dos resíduos de alimento e fezes, e lavagem das pedras porosas. Valores dentro do ideal para peixes tropicais de água doce, sendo eles: a temperatura média entre 26 a 30°C, variando de acordo com a espécie, pH de 6 a 9, oxigênio dissolvido >5,0 mg/L (TORRES; PINHEIRO, 2002).

### **4.3 Dietas Experimentais**

Os valores nutricionais utilizados neste experimento foram determinados em um experimento anterior realizado pelo nosso grupo pesquisa, no qual foram determinados os coeficientes de digestibilidade de alimentos proteicos (farinha de resíduos da filetagem de tilápia, farinha de vísceras de aves, farinha de carne e ossos, farinha de penas e sangue de aves, farelo de soja, glúten de milho e farelo de algodão) e energéticos (sorgo moído, milho moído, gérmen de milho desengordurado, farelo de arroz e farelo de trigo) (TANAKA, 2018).

Foram formuladas dietas práticas isoenergéticas e com cinco níveis de proteína digestível (21, 24, 27, 30 e 33% PD) (Tabela 1). As dietas experimentais, após a formulação, moagem (0,8 mm) e mistura dos ingredientes, foram processadas em extrusora comercial (Ex Micro Model, Exteec, Ribeirão Preto, Brasil) e secas em estufa

com circulação de ar à 45°C, durante 24 horas. Após secas, as dietas foram colocadas em sacos plásticos etiquetados e armazenadas em freezer (-18°C).

Os peixes foram alimentados (Figura 2) até a saciedade aparente em duas refeições diárias (10:00h e 16:00h), durante 77 dias. Foi considerada saciedade aparente o momento em que os animais deixavam de consumir os peletes, desta forma as dietas foram fornecidas em pequenas porções/quantidades durante alguns minutos, com cautela e observação do comportamento animal, para não sobrar alimento nas caixas (Figura 3). O consumo de ração foi quantificado pela de pesagem dos recipientes de armazenagem das dietas (potes) de cada unidade (Figura 4).

Tabela 1. Formulação e composição analisada das dietas experimentais

Ingredientes <sup>1</sup> (%)	<i>Proteína digestível (% PD)</i>				
	21	24	27	30	33
Farelo de soja	34,00	36,00	38,00	40,00	42,00
Farinha de peixe	11,50	15,70	19,90	24,10	28,30
Milho	17,00	16,50	16,00	15,50	15,00
Amido	30,00	25,50	21,00	16,50	12,00
Óleo de soja	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40
Fosfato bicálcico	2,35	1,90	1,45	1,00	0,55
Suplem. vit. e min. <sup>2</sup>	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Celulose microfina <sup>3</sup>	1,25	1,10	0,95	0,80	0,65
Vitamina C <sup>4</sup>	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Calcário calcítico	1,65	1,32	0,98	0,65	0,32
Caolin	0,97	0,80	0,64	0,47	0,30
Antioxidante <sup>5</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>Composição analisada (% MS)</b>					
Matéria seca, %	92,46	92,03	94,08	92,66	92,63
Proteína bruta, %	24,79	28,57	30,69	34,13	37,48
Proteína digestíveis <sup>6</sup> , %	21,00	24,01	27,02	30,02	33,03
Extrato etéreo, %	6,52	3,34	3,04	3,30	7,55
Fibra bruta, %	1,60	1,58	1,99	2,55	2,52
Matéria mineral, %	10,62	12,37	12,90	13,12	14,20
Energia bruta, kcal/kg	3883,63	3928,78	3992,79	4093,10	4131,79
Energia digestível <sup>6</sup> , kcal/kg	3339,68	3340,30	3340,92	3341,54	3342,16
Relação Energia/Proteína, kcal/g	15,90	13,89	12,36	11,13	10,12

<sup>1</sup> Todos os ingredientes foram obtidos através de uma fonte comercial local

<sup>2</sup> Suplemento vitamínico e mineral. Fri-Ribe, Pitangueiras, Brazil. Enriquecimento por kg de dieta: vit. A - 3.000 UI; vit. D3 - 3.000 UI; vit. E - 200,0 mg; vit. B1 - 6,0 mg; vit. B2 - 8,0 mg; vit. B6 - 3,0 mg; vit. B12 - 20,0 mg; vit. C - 350,0 mg; vit. K - 6,0 mg; ácido fólico - 1,0 mg; ácido pantotênico - 20,0 mg; biotina - 0,1 mg; colina 150,0 mg; niacina - 100,0 mg; cobre - 10,0 mg; ferro - 100,0 mg; iodo - 5,0 mg; manganês - 70,0 mg; zinco - 150,0 mg; B.H.T. - 125,0 mg

<sup>3</sup> Celulose microfina. Rhooster Industria e Comercio Ltda, Vargem Grande Paulista, SP, Brazil.

<sup>4</sup> Vitamina C Rovimix Stay-35, DSM Nutritional Product, Switzeland.

<sup>5</sup> Etoxiqum.

<sup>6</sup> Valores determinados em ensaio de digestibilidade (TANAKA, 2018)



(Fonte: Arquivo pessoal)

Figura 2. Alimentação dos peixes.



(Fonte: Arquivo pessoal)

Figura 3. Fornecimento da ração em pequenas porções.



(Fonte: Arquivo pessoal)

Figura 4. Potes de armazenamento das dietas experimentais.

Uma amostra das dietas experimentais foi armazenada no freezer para posteriormente realização das análises bromatológicas. As dietas foram moídas e homogeneizadas para a determinação das análises laboratoriais. A determinação da matéria seca (MS) foi realizada em estufa à 105° C por 12 horas. A matéria mineral foi determinada nas mesmas amostras e colocadas na mufla à 550° C, por incineração. A determinação do extrato etéreo foi realizada por meio da extração com éter de petróleo no aparelho Soxlet. O nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl. Todas as análises foram realizadas de acordo com a metodologia da AOAC (2019), realizadas no Laboratório de Bromatologia da FCAT-Unesp de Dracena. As análises de energia bruta foram realizadas por combustão das amostras em bomba calorimétrica (Calorímetro de combustão compacto- C-200, IKA, Staufen, Alemanha) no Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal - LABECOM do Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista - Unesp – Câmpus de São Vicente) (AOAC, 2019).

## 4.4 Parâmetros de Avaliação

### 4.4.1 Desempenho produtivo

Não houve mortalidade durante todo o ensaio. Ao final do período experimental, 12 horas após a última refeição, os peixes foram insensibilizados, por meio da imersão dos animais em um balde com anestésico (eugenol, 50 mg/L) (Figura 5). E foram pesados (Balança semi-analítica – ATX224, Shimadzu, São Paulo) (Figura 6) para determinar as variáveis de desempenho produtivo. Para o desempenho foram determinadas as seguintes variáveis: peso final (PF), taxa de crescimento específico (TCE), consumo alimentar, ganho de peso (GP) e conversão alimentar aparente (CA). De acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{Taxa de crescimento específico (\%/dia)} = \frac{\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})}{\text{tempo (dias)}} \times 100$$

$$\text{Consumo de ração} = \frac{\text{recipiente de ração do dia anterior} - \text{recipiente de ração do dia atual}}{\text{tempo do experimento (dias)}}$$

$$\text{Ganho de peso} = \text{peso final} - \text{peso inicial}$$

$$\text{Conversão alimentar (g/g)} = \frac{\text{consumo de alimento}}{\text{ganho de peso vivo}}$$



(Fonte: Arquivo pessoal)

Figura 5. Imersão dos peixes no eugenol.



(Fonte: Arquivo pessoal)

Figura 6. Pesagem dos peixes.

#### **4.4.2 Metabólitos no sangue**

Após a biometria, a coleta de sangue foi realizada por punção caudal (3 peixes/caixa) (Figura 7), sendo separadas duas alíquotas, uma para o plasma e a outra para soro. A separação das frações foi realizada pela centrifugação das amostras de sangue (10 min, 3.000 rpm, a 10° C) logo após a coleta, para o plasma, e após uma hora em temperatura ambiente, para o soro. No sangue foram analisados (Figura 8) a concentração de triglicerídeos sérico, determinado através de metodologia enzimático-colorimétricas (Triglicérides-PP, Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte, Brasil) e leitura em espectrofotômetro (Espectrofotômetro – Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison – USA), de onda de 500 nm.

E a concentração de amônia sérica, que foi determinada segundo metodologia de Verdouw *et al.* (1978) adaptada por Gimbo (2015). Resumidamente, 20 µL de ácido tricloroacético (15%) foram adicionados a uma alíquota de 60 µL de soro. Após centrifugação (10.000 rpm, 3 min), o sobrenadante foi separado para realização da análise. A reação foi iniciada com a adição de nitroprussiato de sódio (0,01 mM), hipoclorito de sódio (0,32%), hidróxido de sódio (64,5 mM), citrato de sódio (87,1 mM) e salicilato de sódio (161,16 mM) (Figura 9). Após homogeneização, a amostra foi incubada por 2 h no escuro, com posterior leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Diluições seriadas de uma solução de cloreto de amônio foram utilizadas para estabelecimento de uma curva-padrão e determinação da concentração de amônia das amostras.



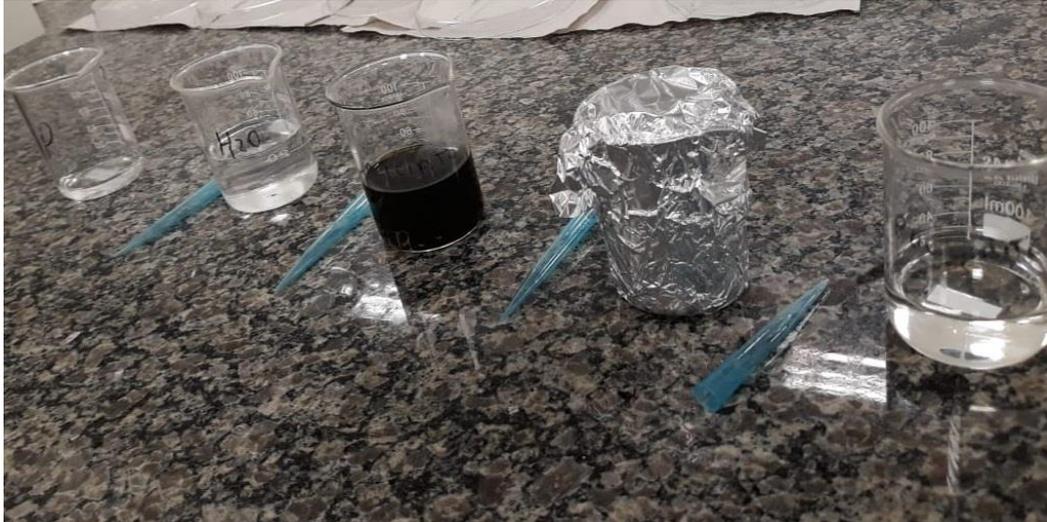
(Fonte: Arquivo pessoal)

Figura 7. Coleta de sangue por punção caudal.



(Fonte: Arquivo pessoal)

Figura 8. Sangue utilizado para as análises.



(Fonte: Arquivo pessoal)

Figura 9. Análise de amônia sérica

#### **4.4.3 Relações somáticas**

Os animais utilizados nas coletas de sangue foram laparotomizados (3 peixes/caixa) para retirada e pesagem da gordura visceral, do fígado e a porção anterior do intestino dos peixes. Foram avaliadas as relações somáticas: índice gorduro-viscerossomático (IGVS) e índice hepatossomático (IHS) de acordo com a fórmula:

$$\text{Índice} = [100 \times (\text{peso do tecido} / \text{peso vivo})].$$

#### **4.4.4 Atividade enzimática hepática**

As amostras de fígado (12 amostras/tratamento) foram homogeneizadas em homogeneizador do tipo Potter e centrifugadas em uma centrífuga refrigerada por 30 minutos, 16.000 rpm, à 4°C. No sobrenadante foi determinada a atividade das enzimas indicadoras do metabolismo de aminoácidos: a alanina aminotransferase (ALT) (ALT; EC 2.6.1.2) e a aspartato aminotransferase (AST) (AST; EC 2.6.1.1). As atividades hepáticas destas enzimas foram determinadas segundo metodologia de Enes *et al.* (2006) e Perez-Jimenez *et al.* (2009), utilizando metodologias enzimático-colorimétricas por meio de kits comerciais (ALT - PP, Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte, Brasil e AST - PP, Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte, Brasil). As atividades enzimáticas da ALT e AST na amostra são calculadas com base

na redução da absorbância em leitura cinética em espectrofotômetro (Espectrofotômetro – Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison – USA) a 340 nm, quando o NADH se transforma em NAD<sup>+</sup>.

#### **4.4.5 Excreção de amônia na água**

A concentração do N-Amônico foi feita uma vez por semana, durante todo o período experimental. O fluxo de água e oxigênio era interrompido 2 horas antes da coleta, para não ter influência da renovação de água.

A análise ocorreu por meio da metodologia de Koroleff (1976). O método se baseia na quantificação do nitrogênio amoniacal em ambas as formas: N-NH<sub>3</sub> e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. A análise foi determinada por meio de numa alíquota de 5 mL de água de cada caixa, com a adição de 1 mL da solução de fenol-nitroprussiato, 0,5 mL de solução de citrato e 1mL da solução alcalina oxidante. Os tubos de ensaio foram incubados por 1 hora no escuro e realizada a leitura em espectrofotômetro (Espectrofotômetro – Evolution 60S, Thermo Scientific, Madison, USA) à 630nm.

#### **4.4.6 Reservas energéticas teciduais**

Com uma parte dos fragmentos de fígado (3 peixes/caixa; 12 peixes/tratamento) foram realizadas as análises para determinação do lipídio total hepático (metodologia de extração com solvente, BLIGH; DYER, 1959) e do glicogênio hepático (metodologia enzimático colorimétrica, PERRY *et al.*, 1988). E ainda, foi determinada a concentração do lipídio total no musculo branco (12 peixes/tratamento), pela mesma metodologia já citada.

### **4.5 Análises Estatísticas**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e três repetições. Para avaliar as variáveis de crescimento, cada caixa foi considerada uma unidade experimental (repetição), em um total de três para cada tratamento. Os resultados, após teste de normalidade e homogeneidade da variância,

foram submetidos a análise de variância (ANOVA). E, quando necessário os resultados foram submetidos a transformação Log obter normalidade. A determinação do nível ótimo de proteína para melhores respostas das variáveis avaliadas foi realizada por meio da regressão polinomial de primeiro e segundo grau. As análises estatísticas foram realizadas através do software SAS 9.2.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desempenho Produtivo

Não houve mortalidade durante o período experimental. Em condições experimentais semelhantes, foram utilizados juvenis de piapara ( $14,4 \pm 4,7$  g) com três densidades diferentes (0,13, 0,20 e 0,40 peixes/L), durante 70 dias. Foi observado ganho de peso variando entre 13 e 16,4 g; consumo entre 23,2 a 27,5 g; e CA entre 1,62 a 1,94 (GONÇALVES *et al.*, 2014), dados inferiores quando comparados com o presente experimento.

As análises de regressão polinomial das variáveis de desempenho produtivo estão apresentadas na Tabela 2. O aumento do nível proteico na dieta resultou no aumento do peso final (PF), taxa de crescimento específico (TEC) e ganho de peso (GP) e redução na conversão alimentar (CA) de forma linear, enquanto para consumo (CONS) não foi observado efeito significativo.

Com os níveis testados, pode-se observar que com o aumento da proteína há um melhor aproveitamento da dieta e, conseqüentemente um melhor desempenho produtivo, porém sua exigência proteica não pôde ser determinada, pois se encontra acima dos níveis testados, sendo importante a realização de mais estudos. Níveis abaixo da exigência faz com que o peixe não tenha um crescimento máximo e, níveis superiores do valor da exigência são desnecessárias, pois elevam custo da dieta, sem resultar em incremento significativo no peso dos peixes. A proteína deve ser incorporada na dieta somente para atender a manutenção (GONÇALVES; FURUYA, 2004).

O uso de proteína como fonte energética é indesejável, pois encarece a ração (WATANABE, 2002). Trabalhos com exigência nutricional para peixes tem como

objetivo alcançar o máximo do desempenho produtivo do animal, com o menor nível de nutriente, para que tenha uma melhor relação custo-benefício na dieta. Quando estabelecidas as exigências e empregado o fornecimento adequado deste nutriente, além de reduzir os custos de produção, pode-se diminuir a excreção de nutriente no ambiente aquático (GONÇALVES; FURUYA, 2004).

Tabela 2. Análise da regressão das variáveis de desempenho produtivo de juvenis de piapara alimentados com níveis crescentes de proteína digestível.

Variáveis	Proteína Digestível (%)					EPM	Valor de p	
	21	24	27	30	33		Linear	Quadrática
<b>PF (g)</b>	43,48	46,21	47,37	48,09	47,44	0,61	0,02	0,11
<b>TEC (%)</b>	0,80	0,83	0,84	0,87	0,91	0,02	0,03	0,73
<b>CONS (g)</b>	30,33	31,40	31,70	33,33	31,00	0,62	0,50	0,34
<b>GP (g)</b>	19,95	21,90	22,56	23,50	23,92	0,53	0,014	0,474
<b>CA</b>	1,52	1,43	1,40	1,43	1,29	0,03	0,012	0,861

PF: peso final, TEC: taxa de crescimento específico, CONS: consumo de ração, GP: ganho de peso, CA: conversão alimentar.

Os peixes do gênero *Megaleporinus* possuem hábito alimentar onívoro, podendo se alimentar de insetos, restos de peixes e vegetais (SANTOS,2000). Ele pode ser classificado como peixe onívoro de amplo espectro, que pensando no ponto de vista nutricional, possui vantagens no aproveitamento dos alimentos (RIBEIRO *et al.*, 2001). Em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), peixes da mesma família da piapara, os melhores resultados de desempenho zootécnico foram obtidos com dietas com 34-35% de PB (FEIDEN *et al.*, 2008; BITTENCOURT *et al.*, 2010).

Para o pacu (4,62 e 11,31g), espécie com hábito alimentar semelhante ao da piapara, o maior ganho de peso, taxa de crescimento específico, peso e conversão alimentar, foi alcançado com 26% de PB, não sendo observada diferença no consumo (FERNANDES; CARNEIRO; SAKOMURA, 2000). A mesma espécie (15,5 ± 0,4 g) alimentada com diferentes níveis proteicos, foi determinado a exigência protéica de

27% PB (BICUDO; SADO; CYRINO, 2010). E em tambaquis ( $6,53 \pm 0,43$  g), alimentados com diferentes níveis de proteína digestível, foi observado que o nível de 29% PD resultou em melhor peso final, ganho de peso e taxa de crescimento específico (BUZOLLO *et al.*, 2019). Para esta mesma espécie ( $225,33 \text{ g} \pm 11,31$ ), foi determinado a exigência de 28% de PB (SOUSA *et al.*, 2016), demonstrando que a exigência proteica depende de vários fatores como hábito alimentar, fase de desenvolvimento, entre outros.

Outro fator de importância é a relação proteína/energia (P/E), que desempenha um papel importante na nutrição dos peixes, e que pode afetar diretamente no desempenho produtivo (WANG *et al.*, 2016; MEYER; FRACALLOSSI, 2004). Na literatura existem diferentes condições e formulações das dietas e os valores para a relação energia/proteína oscila entre 6,9 a 14,3 kcal ED/g PB ou PD. Existem vários estudos realizados, porém é difícil interpretar qual a melhor relação energia/proteína, dado que, a forma de avaliação é diferente em cada estudo, sendo que essas diferenças estão relacionadas à espécie, hábito alimentar, peso dos peixes, ingredientes, forma de apresentação dos nutrientes (bruto, digestível, metabolizável), entre outros (GONÇALVES, 2007).

Em jundiás (31 a 82 g) na fase de recria foi observado maior ganho de peso com a relação ED/PD de 9,08 kcal/g numa dieta contendo 38,28% PD e  $3.437,5 \text{ kcal kg}^{-1}$  ED (PAULINO, 2018). Tilápias do Nilo (200 e 450 g), alimentadas com ração à base de farelo de soja e milho, com 24% de PD e  $3.000 \text{ kcal ED kg}^{-1}$ , apresentaram um maior peso final, ganho de peso e rendimento de filé, sendo a relação ideal de 12,5 kcal ED/g (CARNEIRO, 2016).

As relações ED/PD destes trabalhos foram superiores aquelas avaliadas com as piaparas e que resultaram em melhores respostas produtivas, possivelmente devido ao fato dos peixes destes trabalhos apresentarem idade e peso superiores às piaparas e, conseqüentemente, menor exigência proteica.

Juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) ( $0,40 \pm 0,08$  g) apresentaram melhores resultados no desempenho zootécnico com dietas com 35% de PB e  $3.500 \text{ kcal ED kg}^{-1}$ , correspondendo a uma relação de 10 kcal ED/g de PB (BITTENCOURT *et al.*, 2010).

Outro ponto de destaque é que o consumo desses animais foi baixo quando comparado a literatura disponível, sendo de 1,62, 1,41, 1,37, 1,48, 1,41% peso inicial, para 21, 24, 27, 30 e 33% PD, respectivamente. Em tambaquis o consumo variou entre 9,23 a 25,57% do seu peso inicial com diferentes níveis proteicos (BUZOLLO *et al.*, 2019). Para matrinxã teve uma variação de 6,72 a 7,68% do seu peso inicial (LEITE, 2018). O consumo baixo faz com que a proteína seja ingerida em quantidade menor do que a exigida pelo animal, resultando na redução do crescimento e síntese proteica (BOMFIM *et al.*, 2008). Porém a formulação de rações com excesso de proteína, pode resultar em elevada quantidade de aminoácidos não essenciais, o que aumentar a excreção de nitrogênio (BRANDÃO *et al.*, 2009), ambas as observações podem ter ocorrido no presente experimento.

## 5.2 Excreção de Amônia na Água

A análise de regressão polinomial da concentração de amônia na água está apresentada na Tabela 3. O aumento do nível proteico na dieta resultou no aumento da concentração de amônia na água de forma linear ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3. Análise de regressão das variáveis físico-químicas da água de juvenis de piapara alimentados com níveis crescentes de proteína digestível.

Variáveis	Proteína Digestível (%)					EPM	Valor de p	
	21	24	27	30	33		Linear	Quadrática
<b><i>NH<sub>3</sub></i> (mg/L)</b>	8,64	11,21	10,90	12,39	13,03	0,47	0.00	0.40

NH<sub>3</sub>: Amônia na água

De acordo com a regressão linear é possível observar que os níveis de amônia são crescentes com o aumento da PD na dieta, o que possivelmente está relacionado ao fato da amônia, resultante do catabolismo de proteínas, ser excretada pelas brânquias por difusão (COWEY, 1980). Com o aumento no nível de PD, o catabolismo de aminoácidos pode aumentar, resultando em maior remoção do grupo amina dos

aminoácidos, que conseqüentemente precisa ser excretado por difusão para a água, pois grandes quantidades de amônia sérica são prejudiciais à saúde dos peixes.

Como o fluxo de água foi interrompido antes das coletas de água para a análise da concentração da amônia, foi possível observar o efeito da proteína da dieta na concentração de amônia na água. Por outro lado, durante todo o experimento os peixes foram mantidos em caixas com sistema de circulação aberto, com renovação contínua da água das caixas, não expondo os animais à concentrações tóxicas.

Além disso, o pH médio durante todo o experimento foi de aproximadamente 8. Quando o valor do pH é inferior a 8,5, a forma do N amoniacal é predominante na forma de  $\text{NH}_4^+$ , enquanto que para pH acima de 10, prevalece a forma de  $\text{NH}_3$ . Ou seja, quanto mais elevado for o pH, maior será a porcentagem da amônia total presente na forma de  $\text{NH}_3$ , sendo mais tóxico aos peixes (PEREIRA; MERCANTE, 2005).

É recomendado que a concentração de nitrogênio amoniacal total seja inferior à 2 mg/L para evitar os efeitos adversos pela toxicidade de  $\text{NH}_3$  para os peixes (BARTONE, 1986). Porém a exposição contínua de concentrações de  $\text{NH}_3$  superiores a 0,02 mg/L pode ser tóxico ao animal (PEREIRA; MERCANTE, 2005). Embora haja uma variação de 0,2 a 2,0 mg/L para a toxicidade de  $\text{NH}_3$ , a tolerância ao composto varia também para cada espécie de peixe (PESCOD, 1992).

O recomendável é que a concentração de amônia não ionizada não exceda 0,05 mg/L para peixes tropicais e 0,012 mg/L para salmonídeos (KUBITZA, 1998). Exposição dos peixes acima destes limites pode resultar em um crescimento reduzido e baixa eficiência alimentar (KUBITZA, 1998). A amônia na forma não-ionizada ( $\text{NH}_4$ ) e em concentração elevada pode prejudicar a transformação da energia dos alimentos em ATP, com isso inibindo o crescimento dos peixes e provocando a desaminação dos aminoácidos, o que, por sua vez, impede a formação de proteínas, elemento essencial no crescimento dos animais (PARKER, DAVIS, 1981). Mesmo o valor mais elevado (13,0  $\mu\text{g/L}$ ) de amônia encontrado no presente trabalho, este sempre esteve abaixo do nível máximo da concentração de amônia recomendada para peixes tropicais.

### 5.3 Metabólitos Sanguíneos e Reserva Energética

As análises de regressão polinomial das variáveis: concentração sérica de triglicerídeos, o índice gorduro-viscerossomático (IGVS) e índice hepatossomático (IHS), concentração de glicogênio hepático (GLIC HEP), concentração de lipídio hepático (LIP HEP), concentração de lipídio muscular (LIP MUSC), atividade hepática da Glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e atividade hepática da enzima Málica (MALIC), estão apresentadas na Tabela 4.

O aumento da proteína na dieta resultou em um acréscimo do lipídio muscular e G6PDH de forma linear, enquanto no IGVS e atividade da málica se comportou de maneira quadrática. As variáveis: triglicerídeos, IHS, glicogênio hepático, lipídio hepático não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

Analisando as regressões quadráticas, podemos observar que o ponto de máximo do IGVS é de 25,77 e da enzima málica é de 27,08, esses resultados podem estar correlacionados com a lipogênese e síntese de ácidos graxos, porque as dietas com menores níveis de proteína digestível, apresentam também maiores níveis de carboidratos.

Para a variável lipídio muscular, foi observado um comportamento linear, com maiores concentrações nas dietas com o menor teor proteico e, conseqüentemente, maior teor de carboidratos amiláceos. Estes resultados podem estar relacionados as respostas de desempenho produtivo da piapara, pois com o aumento do nível proteico aconteceu o inverso, isto é, menor lipídio e maior crescimento.

Dietas com elevada relação E/P inadequadas podem levar a diminuição do consumo voluntário, antes que haja o consumo da quantidade suficiente de aminoácidos e outros nutrientes essenciais (PAGE; ANDREWS, 1973). Isso pode causar um acúmulo excessivo de deposição de lipídio visceral e prejudicar a utilização de outros nutrientes (LOVELL, 1988; COLIN *et al.*, 1993).

Por outro lado, dietas que apresentam baixa relação entre E/P resultam em reduzida taxa de crescimento e de deposição proteica, pois parte da proteína será consumida como fonte energética (NRC, 2011), proporcionando, ainda, aumento na excreção de amônia para o meio, produzindo um efluente com maior potencial poluente (KAUSHIK; OLIVA-TELES, 1985). No presente experimento ocorreu as duas características, os animais submetidos a uma dieta com menores níveis de proteína,

resultou em uma maior lipogênese, e animais que foram submetidos a uma dieta com o valor superior ao encontrado como ideal (29,88% PD), produziram uma maior excreção de amônia no meio.

Tabela 4. Análise de regressão das variáveis bioquímicas sanguíneas e relações somáticas de juvenis de piapara alimentados com níveis crescentes de proteína digestível.

Variáveis	Proteína Digestível					EPM	Valor de p	
	21	24	27	30	33		Linear	Quadrática
<b>TRI (mg/dL)</b>	459,02	398,13	454,70	489,08	417,58	11,28	0,914	0,624
<b>IGVS (%)</b>	0,93	1,00	1,29	0,85	0,65	0,04	0,001	<0,001
<b>IHS (%)</b>	0,88	0,85	0,89	0,87	0,91	0,01	0,140	0,310
<b>GH (g100/g)</b>	5,91	5,20	5,67	5,80	5,40	0,16	0,722	0,850
<b>LH (g100/g)</b>	4,59	3,58	3,64	4,00	3,62	0,17	0,212	0,273
<b>LM (g100/g)</b>	1,10	1,50	0,83	0,73	0,78	0,06	0,001	0,878
<b>G6PDH (μmol/mg)</b>	118,93	137,48	174,75	184,89	200,17	0,02	<0,000	0,193
<b>MA (μmol/mg)</b>	170,43	69,05	113,50	128,13	137,44	6,02	0,803	<0,000

TRI: Triglicerídeos, IGVS: índice gorduro-viscerossomático, IHS: índice hepatossomático, GH: glicogênio hepático, LH: lipídio hepático, LM: lipídio muscular, MA: málica.

Juvenis de matrinxã ( $29,03 \pm 1,16$  g) alimentados com diferentes níveis proteicos apresentaram uma diminuição na concentração de triglicerídeos circulantes com o aumento de PB na dieta, apresentando um melhor desempenho zootécnico e menor quantidade de triglicerídeos séricos a relação de ED/PB de 10,0 kcal/kg (LEITE, 2018). Nos juvenis de piapara isto não pôde ser observado, possivelmente pelo fato da coleta de sangue ter ocorrido 24 horas após a última refeição, não sendo possível observar diferença significativa entre os diferentes níveis proteicos avaliados.

Em triangular bream (*Megalobrama terminalis*) ( $1,30 \pm 0,02$  g) alimentados com diferentes níveis de proteína, não foram observadas diferenças ( $p > 0,05$ ) nos índices IGVS e IHS, porém foram observadas diferenças ( $p < 0,05$ ) no glicogênio hepático dos peixes submetidos ao menor nível proteico e maior nível de carboidrato (YANG *et al.*, 2017). Já em bluegill (*Lepomis macrochirus*) (1,20 g) alimentados com diferentes

níveis de proteína, foram constatados maiores valores no IHS, IGVS e glicogênio hepático nos níveis mais baixos de PB (20,77 e 28,16%) e mais altos de carboidrato, com a relação de 11,21 e 15,27 kJ/mg de PB/EB. Essa relação mais baixa pode ser explicada possivelmente devido ao hábito alimentar carnívoro desse animal e a idade, pois ele necessita de maior quantidade de proteína para o seu crescimento. No presente experimento, os peixes alimentados com os diferentes níveis de proteína digestível, não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ) nas variáveis: triglicerídeos, IHS, glicogênio hepático e lipídio hepático, porém diferenças ( $p < 0,05$ ) foram observadas no IGVS e atividade hepática da enzima málica, sendo seu ponto máximo de 25,77 e 27,08% PD, respectivamente, se aproximando mais entre a relação de 17,4 a 18,4kJ<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> PB/EB, onde possivelmente ocorreu um desbalanço entre proteína e energia. Dietas contendo baixo nível proteico ou alta relação energia/proteína favorecem a deposição de gordura nos peixes, onde grande parte dessa gordura é depositada na cavidade abdominal, resultando em menor rendimento de carcaça e maior proporção de resíduos no processamento (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Há evidências de que o acréscimo de carboidrato na dieta estimula a atividade de enzimas lipogênicas no fígado de diferentes espécies (BARROSO *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2004). Em juvenis de Zebra seabream (*Diplodus cervinus*) alimentados com diferentes níveis de proteína, houve uma diminuição da enzima málica com o aumento proteico (COUTINHO, 2012). Assim como no presente experimento, que ao analisar a regressão quadrática, a enzima málica teve uma maior atividade no nível de 27,08% PD, confirmando que em valores acima desse nível, houve uma menor lipogênese, tendo um crescimento maior desses animais. Essa afirmação é feita, porque a enzima málica é uma das principais enzimas responsáveis pelo fornecimento de energia redutora, necessárias para a lipogênese (COUTINHO, 2012).

#### **5.4 Amônia Sérica e Análise Enzimática Hepática**

As análises de regressão polinomial das variáveis de amônia sérica e a atividade hepática das enzimas do metabolismo intermediário estão apresentadas na Tabela 5. O aumento do nível proteico resultou no aumento da atividade hepática da aspartato aminotransferase (AST) de forma linear, no enquanto para as variáveis

atividade hepática da alanina aminotransferase (ALT) e concentração de amônia sérica não foram constatadas diferenças ( $p > 0,05$ ).

A atividade da AST foi maior no ponto de menor nível proteico e maior carboidrato, diminuindo com o aumento de proteína. Uma possível explicação é que nos menores níveis proteicos, houve um desbalanço de aminoácidos essenciais fazendo com que houvesse uma maior desanimação de aminoácidos não essenciais, sendo oxidados como fonte de energia, porém limitando o crescimento desses animais e aumentando sua reserva energética. Confirmando os dados de IGVS, enzima málica e lipídio muscular já citados.

O aumento na excreção de amônia pelo peixe na água conforme discutido anteriormente, sugere que houve a quebra da proteína, a explicação para a variável amônia sérica não apresentar diferença significativa pode ser o jejum de 24 horas após a última refeição, fazendo com que não seja observada diferença entre os tratamentos após esse período. Outra possível explicação para essa variável é devido ao fluxo de água com constante renovação da água, facilitando a difusão da amônia para o meio. A amônia é o resíduo nitrogenado primário do catabolismo proteico em peixes (BUTTERY; LINDSAY, 2013), e é facilmente liberada para água através da difusão pelas brânquias, quando o gradiente de concentração é favorável (HARGREAVES; KUCUK, 2001).

Tabela 5. Análise de regressão das variáveis atividade hepática de enzimas do metabolismo de aminoácidos de juvenis de piapara alimentados com níveis crescentes de proteína digestível.

Variáveis	Proteína Digestível (%)					EPM	Valor de p	
	21	24	27	30	33		Linear	Quadrática
<b>ALT (U/L)</b>	37,80	38,13	39,28	38,81	54,65	0,02	0,065	0,178
<b>AST (U/L)</b>	67,72	54,42	43,23	42,84	45,59	3,11	0,008	0,075
<b>AS (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b>	0,74	0,67	0,74	0,66	0,73	0,02	0,762	0,481

ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, AS: amônia sérica

Em tilápias (5 g) alimentadas com dietas contendo diferentes relações proteína/carboidrato foi observado que com o aumento da proteína nas dietas, aumentou também a atividade hepática da AST e ALT, concluindo que os excessos de aminoácidos foram desaminados e oxidados no ciclo de Krebs ou convertidos em gordura e carboidratos (GAYE-SIESSEGGER; FOCKEN; BECKER, 2006). Da mesma forma, em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas isocalóricas contendo diferentes níveis de PB também foi verificado um aumento na atividade da AST e ALT com o aumento da proteína na dieta, sugerindo aumento do catabolismo proteico (MELO *et al.*, 2006).

Desta maneira, a concentração de amônia sérica pode ser um indicador de que a energia proveniente de fontes não proteicas da dieta não está sendo suficiente para suprir a exigência do animal, seja pelo desequilíbrio com outros substratos energéticos, seja pelo limitado consumo, precisando obter energia através da oxidação de aminoácidos, resultado que possivelmente ocorreu com as piaparas do presente experimento.

## **6 CONCLUSÃO**

Dietas inferiores a 27% de PD resultaram em maior reserva energética, catabolismo de aminoácidos e lipogênese. O aumento de proteína dietética resultou em aumento no desempenho produtivo, com o aumento da excreção de amônia na água. Com o níveis proteicos avaliados, não foi possível para determinar a exigência proteica dos juvenis de piapara.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA FILHO, R. L.; HONORATO, C. A.; ALMEIDA, L. C.; USHIZIMA, T. T., SANTAMARIA, F. M. Nutrição de surubim (*Pseudoplatystoma* sp.): desafio para aquicultura. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 9, n. 178, p.1995-2010, out. 2012. Disponível em: [www.nutritime.com.br](http://www.nutritime.com.br). Acesso em: 03 dez. 2018.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 21. ed. Arlington: AOAC, 2019.

BARTONE, C. R. Reutilización de aguas residuales en las lagunas de estabilización de San Juan de Miraflores. Repercusiones sanitarias, ambientales y socioeconómicas. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)**, v. 101, n. 5, p. 425-451, 1986.

BARROSO, J. B.; PERAGÓN, J.; GARCÍA-SALGUERO, L.; HIGUERA, M.; LUPIÁÑEZ, J.A. Carbohydrate deprivation reduces NADPH-production in fish liver but not in adipose tissue. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 33, p. 785-796, 2001.

BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; CYRINO, J. E. P. Growth performance and body composition of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) in response to dietary protein and energy levels. **Aquaculture Nutrition**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.213-222, abr. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00653.x>. Acesso em: 16 abr. 2019.

BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; FREITAS, J. M. A. Proteína e energia em rações para alevinos de piavuçu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, p.2553- 2559, 2010.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOMFIM, M. A. D.; LANNA, E. A. T.; DONZELE, J. L.; FERREIRA, A. S.; RIBEIRO, F. B.; SOUSA, M. P. TAKISHITA, S. S. Exigência de metionina mais cistina, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n.5, p.783-790, 2008

BRANDÃO, L.V; PEREIRA-FILHO, M.; GUIMARÃES, S. F.; FONSECA, F.A.L.; Suplementação de metionina e/ou lisina em rações para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*Cuvier, 1818), **Acta Amazônica**. vol. 39, n. 3, p.675 – 680, 2009.

BUTTERY, P. J.; LINDSAY, D. B. **Protein deposition in animals: proceedings of previous easter schools in agricultural science**. [S.l.]: Butterworth-Heinemann, 2013.

BUZOLLO, H.; SANDRE, L. C. G.; NEIRA, L. M.; NASCIMENTO, T. M. T.; JOMORI, R. K.; CARNEIRO D. J.. Digestible protein requirements and muscle growth in juvenile

tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture Nutrition**, p.1-11, 7 fev. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12888>. Acesso em: 16 abr. 2019.

CARNEIRO, W. F. **Determinação da exigência de proteína/energia digestível para a tilápia do Nilo com rações a base de farelo de soja e milho**. 2016. 62 f. Tese (Doutorado em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, Zootecnia) - Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2016.

CLARK, A. E.; WATANABE, W. O.; OLLA B. L.; WICKLUNDAD R. I. Growth, feed conversión and protein utilization of Florida red tilapia fed isocaloric diets with different protein levels in seawater pools. **Aquaculture**, v. 88, p. 75-85, 1990.

COLIN, B.; COWEY, C. B.; YOUNG CHO, C. Nutritional requirements of fish. Proceedings-nutrition society of London. **Anais....** 1993. Cambridge Univ Press. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/production/action/cjoGetFulltext?fulltextid=764176>. Acesso em: 27 jan. 2019. v. 52. p.417–417.

COSTA, M. L. S.; MELO, F. P.; CORREIA, E. S. Efeitos de diferentes níveis protéicos da ração no crescimento na tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757), variedade chitralada, criadas em tanques rede. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 285–294, 2009.

COUTINHO, F. F. **Dietary protein requirement and intermediary metabolism response to protein/carbohydrate ratio in zebra seabream (*Diplodus cervinus*, Lowe 1838) juveniles**. 2012. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Recursos Biológicos Aquáticos, Biologia, Faculdade de Ciências - Universidade do Porto, 2012.

COWEY, C. B. Protein metabolism in fish. *In*: BUTTERY, P.J., LINDSAY, D.B. **Protein deposition in animals**. London: Butterworths, 1980. p.271-288

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 68-87, 2010.

DAS, D. Metabolism of proteins. *In*: DAS, D. (ed). **Biochemistry**. New York: Academic Publishers, 2002. p.463-504.

DENG, D.F.; JU, Z. Y.; DOMINY, W.; MURASHIGE, R.; WILSON, R. P. Optimal dietary protein levels for juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) fed diets with two levels of lipid. **Aquaculture**, v. 316, p. 25-30, 2011.

DIAS, J.; RUEDA-JASSO, R.; PANSERAT, S.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; GOMES, E. F.; DINIS, M. T. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). **Aquac Res.**, v. 35, p. 1122-1130, 2004.

DURÃES, R.; POMPEU, P. S.; GODINHO, A. L. Alimentação de quatro espécies de *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) durante a formação de um reservatório no sudeste do Brasil. **Iheringia, Serie Zoologia**, v. 90, p.183-191, 2001.

ENES, P.; PANSERAT S.; KAUSHIK, S.; OLIVA-TELES, A. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.143 p.89-96, 2006.

FEIDEN, A.; SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A.; REIDEL, A. Exigência de proteína de alevinos de piavuçu. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 39, n. 3, p. 859-865, 12 dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782008005000102>. Acesso em: 16 abr. 2019.

FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N. K. Fontes e Níveis de Proteína Bruta em Dietas para Alevinos de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Rev. Brasileira de Zootecnia**, Jaboticabal, v. 3, n. 29, p.646-653, 2000.

FOSS, A.; EVENSEN, T. H.; VOLLEN, T.; OIESTAD, V. Effects of chronic ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolffish. **Aquaculture**, v.228, p.215-224, 2003.

FRACALOSSO, D. M.; RODRIGUES, A. P. O.; SILVA, T. S. C.; CYRINO, J. E. P. Técnicas experimentais em nutrição de peixes. *In*: NUTRIAQUA: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: **aquabio**; 2013. p.37-63.

GAYE-SIESSEGGER, J.; FOCKEN, U.; BECKER, K. Effect of dietary protein/carbohydrate ratio on activities of hepatic enzymes involved in the amino acid metabolism of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.275-282, 29 set. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-006-9000-1>. Acesso em: 16 abr. 2019.

GIMBO, R. Y. **Ajuste metabólico e respostas imunes de pacus juvenis alimentados com diferentes níveis de carboidratos e submetidos a jejum prolongado**: Serum ammonia as indicator of unbalanced diet in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 2015. 63 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista - Unesp, Jaboticabal, 2015. Cap. 4.

GONÇALVES, A. F. N.; HA, N.; BILLER-TAKAHASHI, J. D.; SATO L. S.; KISHIMOTO M. K.; TAKAHASHI L. S. Densidade de estocagem e restrição alimentar em juvenis de piapara. **Boletim Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 3, n. 40, p.431-439, jun. 2014.

GONÇALVES, G. S. **Piscicultura**. Campinas: Cati, 2011. 245 p.

GONÇALVES, G. S. **Digestibilidade e exigência de lisina, proteína e energia em dietas para tilápia-do-nilo**. 2007. 98 f. Tese (Doutorado) – Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

GONÇALVES, G. S.; FURUYA, W. M. Digestibilidade aparente de alimentos pelo piavuçu, *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 2, p. 165–169, 2004. DOI 10.4025/actascianimsci.v26i2.1861.

GUO, Z.; ZHU, X.; LIU, J.; HAN, D.; YANG, Y.; LAN, Z.; XIE, S. Effects of dietary protein level on growth performance, nitrogen and energy budget of juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser baerii* x *A. gueldenstaedtii*. **Aquaculture**, v. 338-341, p. 89-95, 2012.

HARGREAVES, J. A.; KUCUK, S. Effects of diel un-ionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish, and blue tilapia. **Aquaculture**, v. 195, n. 1–2, p. 163–181, 2001.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada: aminoácidos: destino do nitrogênio**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 519 p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal 2015: piscicultura**. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. 49 p.

KAUSHIK, S. J.; DE OLIVA TELES, A. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 50, n. 1, p. 89–101, 1985.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. *In*: GRANSHOFF, K. **Methods of seawater analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1976. p. 117- 181.

KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes - parte iii (final): qualidade da água em sistemas de alto fluxo. **Panorama da Aquicultura**, v. 8, n. 47, p.35-43, jul. 1998.

LALL, S. P.; ANDERSON, S. Amino acid nutrition of salmonids: dietary requirements and bioavailability. **Cahiers Options Méditerranéennes**, n.63, p. 73-90, 2005.

LEITE, A. C. V. **Avaliação do desempenho zootécnico, hematologia e atividade enzimática de juvenis de matrinxã alimentados com níveis crescentes de proteína**. 2018. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988. p.11-18,

MELO, J. F. B.; LUNDSTEDT, L. M.; METÓN, I.; BAANANTE, I. V.; MORAES, G. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen*

(Teleostei: Pimelodidae). **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l.], v. 145, n. 2, p.181-187, out. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.06.007>. Acesso em: 16 abr. 2019.

MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 204, p. 301-343, 2004.

MORO, G. V.; REZENDE, F. P.; ALVES, A. L.; HASHIMOTO, D. T.; VARELA, E. S.; TORATI, L. S. Espécies de peixe para a piscicultura. In: RODRIGUEZ, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; DOS SANTOS, V. R. V. (Ed.). **Piscicultura de água doce, multiplicando conhecimentos**. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura; Brasília: Embrapa, 2013. p. 29-70.

NAGAE, M. Y. **Triticale e milho em rações para alevinos de piavuçu, *Leporinus macrocephalus***. 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2000

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger: oxidação de aminoácidos e produção de ureia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of fish**. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.

PAGE, J. W.; ANDREWS, J. W. Interactions of Dietary Levels of Protein and Energy on Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). **The Journal of Nutrition**, v. 103, n. 9, p. 1339–1346, 1973.

PARKER, N.; DAVIS, K. Requirements of warm water fish. In: THE BIOENGINEERING SYMPOSIUM FOR FISH CULTURE, 4., 1981, Bethesda. **Proceedings...** Bethesda: Fish Culture Section of the American Fisheries Society, 1981. p.21-28

PAULINO, G. S. F. **Exigência de energia digestível para o crescimento inicial do tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2018. 81 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, 2018.

PEREIRA, L. P. F.; MERCANTE, C. T. J. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma revisão. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 1, n. 31, p.81-88, 17 jun. 2005.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; HIDALGO, C. M.; MORALES, A. E.; ARIZCUN, M.; ABELLÁN E.; CARDENETE, G. Use of different combinations of macronutrients in diets for dentex (*Dentex dentex*). Effects on intermediary metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.152, p.314-321, 2009.

PESCOD, M. B. **Wastewater treatment and use in agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO). 1992.

QUINTEIRO, L.G.P. Tanino em rações para peixes tropicais. 2000. **Dissertação (Mestrado)** - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L. O.; GALETTI, P. M. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes). **Molecular Phylogenetics And Evolution**, [s.l.], v. 107, p.308-323, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.11.012>

REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E. Cultivo de piapara, piaçu, piava e piauí: gênero *Leporinus*. *In*: BALDISSEROTTO, B.; CARVALHO-GOMES, L. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2010. p.73-99.

RIBEIRO, R. P.; HAYASHI, C.; MARTINS, E. N.; MARTIN-NIETO, L.; SUSSEL, F. R. Hábito e seletividade alimentar de pós-larvas de piavuçu, *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988), submetidos a diferentes dietas em cultivos experimentais. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 829-834, 2001.

RIBEIRO, F. M.; FREITAS, P. V. D. X.; SANTOS, E. O.; SOUSA, R. M.; CARVALHO, T. A.; ALMEIDA, E. M.; SANTOS, T. O.; COSTA, A. C. Alimentação e nutrição de Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e Tambaqui (*Colossoma macropomum*): revisão. **Pubvet**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.873-882, dez. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v10n12.873-882>. Acesso em: 16 abr. 2019.

RODWELL, V. W. **Bioquímica ilustrada de Harper**: catabolismo das proteínas e do nitrogênio dos aminoácidos. 30. ed. Porto Alegre: Amgh, 2017. p. 817.

SANTOS, G. B.; FORMAGIO, P. S. Estrutura da ictiofauna dos reservatórios do Rio Grande, com ênfase no estabelecimento de peixes piscívoros exóticos. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 203, p. 98-106, 2000.

SOARES, C. M.; HAYASHI, C.; FURUYA, V. R. B.; FURUYA W. M.; GALDIOLI, E. M. Substituição parcial e total da proteína do farelo de soja pela do farelo de canola na alimentação de alevinos de piaçu (*Leporinus macrocephalus* L.). **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 109-117, 2000.

SOUSA, R. G. C.; PRADO, G. F.; PYÑEIRO, J. I. G.; NETO, E. B. B. Avaliação do Ganho de Peso do Tambaqui Cultivado com Diferentes Taxas de Proteínas na Alimentação. **Biota Amazônia**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.40-45, 30 mar. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n1p40-45>. Acesso em: 16 abr. 2019.

TANAKA, R. A. **Digestibilidade aparente de ingredientes, parâmetros bioquímicos sanguíneos e morfometria intestinal de Piapara (*Leporinus***

**obtusidens**). 2018. 109 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Jaboticabal, 2018.

TATAJE, D. R.; ZANIBONI-FILHO, E. Cultivo de piapara, piauçu, piava e piau: gênero Leporinus. *In*: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2010. p. 73-99.

TORRES, T. E. L.; PINHEIRO, P. R. C. Reúso das águas tratadas por lodos ativados na aquicultura. **Sanare: Revista técnica da Saranepar**, v. 1, n. 1, p. 20-81, jan. 2002.

VERDOUW, H.; VAN ECHELD, C. J. A.; DEKKERS, E. M. J. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, v. 12, n. 6, p. 399-402, 1978.

WANG, J.; JIANG, Y.; LI, X.; HAN, T.; YANG, Y.; HU, S.; YANG, M. Dietary protein requirement of juvenile red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). **Aquaculture**, p. 289–294, 2016.

WATANABE, T. Strategies for further development of aquatic feeds. **Fisheries Science**, v. 68, n. 2, p. 242–252, 2002.

WILSON, R. P. Amino Acids and Proteins. *In*: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. **Fish nutrition**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p.144-179.

YANG, M.; WANG, J.; HAN, T.; YANG, Y.; LI, X.; JIANG, Y. Dietary protein requirement of juvenile bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). **Aquaculture**, [s.l.], v. 459, p.191-197, jun. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.044>. Acesso em: 16 abr. 2019.

ZEHRA, S.; KHAN, M. A. Dietary protein requirement for fingerling *Channa punctatus* (Bloch), based on growth, feed conversion, protein retention and biochemical composition. **Aquaculture International**, v. 20, p. 383-395, 2011.