

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/02/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**DIETARY LYSINE REQUIREMENT IN
DIFFERENT GROWTH STAGES OF NILE
TILAPIA BY THE DILUTION TECHNIQUE**

**(Exigência de lisina para tilápia do Nilo em diferentes fases
de crescimento pela técnica da diluição)**

Rafael de Souza Romaneli

Jaboticabal, São Paulo
2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**DIETARY LYSINE REQUIREMENT IN
DIFFERENT GROWTH STAGES OF NILE
TILAPIA BY THE DILUTION TECHNIQUE**

**(Exigência de lisina para tilápia do Nilo em diferentes fases
de crescimento pela técnica da diluição)**

Rafael de Souza Romaneli

**Orientador: Dr. João Batista Kochenborger Fernandes
Coorientador: Dr. Thiago Matias Torres do Nascimento**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Aquicultura do
Centro de Aquicultura da UNESP -
CAUNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre

Jaboticabal, São Paulo
2019

Romaneli, Rafael de Souza
R758d Dietary lysine requirement in different growth stages of Nile tilapia
by the dilution technique / Rafael de Souza Romaneli. – – Jaboticabal,
2019
v, 41 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2019
Orientador: João Batista Kochenborger Fernandes
Coorientador: Thiago Matias Torres do Nascimento
Banca examinadora: Dalton José Carneiro, Cleber Fernando
Menegasso Mansano
Bibliografia

1. Aminoácidos. 2. Dose resposta. 3. Exigência de manutenção. 4.
Eficiência de utilização da lisina. I. Título. II. Jaboticabal - Centro de
Aquicultura.

CDU 639.3.043



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

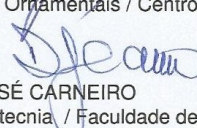
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

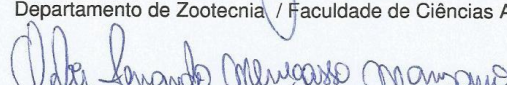
Título: Dietary Lysine Requirement in Different Growth Stages
of Nile Tilapia by the Dilution Technique

AUTOR: RAFAEL DE SOUZA ROMANELI
ORIENTADOR: JOÃO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES
COORIENTADOR: THIAGO MATIAS TORRES DO NASCIMENTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA,
pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOÃO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES
Laboratório de Peixes Ornamentais / Centro de Aquicultura - CAUNESP


Prof. Dr. DALTON JOSÉ CARNEIRO
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/ UNESP


Prof. Dr. CLEBER FERNANDO MENEGASSO MANSANO
. / Universidade Brasil, Fernandópolis-SP

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2019.

Sumário

Dedicatória	I
Agradecimentos.....	II
Apoio Financeiro.....	IV
Introdução geral.....	1
MANUSCRITO - DIETARY LYSINE REQUIREMENT IN DIFFERENT GROWTH STAGES OF NILE TILAPIA BY THE DILUTION TECHNIQUE	5
Resumo.....	6
Abstract.....	7
Introduction.....	8
Materials and methods	10
Ethics on Animal Care and Use	10
Fish and experimental design	10
Experimental diets.....	11
Samples collection and chemical analyses.....	15
Calculations.....	15
Maintenance and efficiency of lysine utilization.....	16
Statistical analysis.....	17
Results	17
Growth responses	17
Maintenance and efficiency of lysine utilization.....	22
Ideal protein concept.....	23
Whole-body composition.....	25
Discussion	26
Conclusion.....	31
Acknowledgments	31
References	31
Lista de figuras	39
Lista de tabelas.....	39
Considerações Finais	40
Referências complementares.....	41

Dedicatória

À minha mãe Luzia e ao meu pai Aeriton, que são dois anjos que Deus me deu a oportunidade de nascer como filho,

À minha irmã Gabriela, por todos esses anos de muito amor,

À minha companheira de todas as horas Sílvia, por todo amor oferecido e que tanto me fez crescer como ser humano,

Dedico.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, e auxílio à pesquisa.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP e ao LAVINESP, por toda a estrutura disponibilizada.

À Evonik Industries e em especial, ao Nei André Arruda Barbosa pela disponibilização das análises dos ingredientes e as dietas experimentais.

Ao Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes, pela oportunidade oferecida que mudou a minha vida e pela sua orientação.

Ao Dr. Thiago Matias Torres do Nascimento, pela coorientação e todo conhecimento passado durante todo este período, que me capacitaram para executar diversas atividades desenvolvidas durante o mestrado e para a finalização deste estudo.

Ao Dr. Cleber Fernando Menegasso Mansano, pelo acolhimento no período de estágio, pela confiança deposita e ensinamentos na condução do seu projeto de pesquisa. Como também, pelo suporte dado neste presente estudo.

À Profa. Dra. Nilva Kazue Sakomura, pela oportunidade e disponibilização da estrutura do LAVINESP.

Ao Dr. Matheus de Paula Reis, por todo suporte e ensinamentos oferecidos com a estatística.

Ao Dr. Gabriel da Silva Viana, pela amizade, pelas dicas e pelo suporte oferecido.

Ao Prof. Dr. Rob Gous, por toda a dedicação em transmitir o seu conhecimento.

Aos membros da banca examinafora Prof. Dr. Dalton José Carneiro e Prof. Dr. Cleber Fernando Menegasso Mansano pelas críticas e sugestões positivas.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ornamentais: Kifayat, Daniel, André, Andressa, Thais, Monique, pela troca de conhecimentos, pelas boas risadas, pelas brigas, pela amizade e por todo o suporte oferecido.

À toda equipe do LAVINESP: Mariana, Mirella, Letícia (Pomba), Rafael (Kuki), Jefferson, Paloma, Marlon, Renata, Warley, Raian, Heloísa, Bruno, Robson e à todos que aqui não foram citados.

À todos os professores do CAUNESP, com um carinho especial ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro, por toda a paciência em transmitir seu conhecimento e pela

disponibilização da estrutura do laboratório de nutrição para as análises bromatológicas e à Profa. Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares, por todas as dicas e pelo seu afetado.

À Profa. Msc. Juliana Bertolazzi, que foi o anjo responsável pelo início de tudo, no qual me conduziu ao CAUNESP.

Aos funcionários do CAUNESP: Valdecir, Marcio, Luiz, pelas conversas, ensinamentos, brincadeiras e por todo o suporte à esta pesquisa. Ao Donizete, pelas viagens que rendiam ótimas conversas. À Silvinha, pela ajuda com as análises de água. À Eleusa, Eleine, Lúcia, Su, por todo carinho. Ao David, Veralice, Mayara, Elisandra, Robson e Mônica, por toda disponibilidade e esclarecimentos.

Às pisciculturas, Projeto Peixes, Vavá e Tuiuiú, pelo cuidado em classificar os peixes para os experimentos.

Ao Jamil, que sempre nos salvava quando um problema elétrico acontecia.

Aos amigos da pós-graduação pelo qual eu tenho muito carinho: Mariana, Larissa, Rabera, Valter, Maicon, Naor, Inácio, Allana, Juliane, Bruno, Valéria, Stefany, Daiane, Adriane, Mariana Maluli, Aurea, Raissa, Rafael (Jack), Rafael Sato, Xina, Mari, Laiza. Ao Juliano, por ser sempre solícito e à todos que não foram citados.

À todos da Família Souza e Romaneli, que me ensinaram o valor de ter pessoas que nos amam em nossas vidas.

À minha mais nova família, Zezinho, Maria “in memoriam”, Eliza, Ana Beatriz, Dandara, Gustavo, Manuella, Carolina e João.

Aos amigos de infância: Gabriel e Julimar.

À Sílvia, minha companheira de vida, por todo o apoio e que me fez sempre seguir em frente.

Aos meu pais, Luzia e Aerton, pelo exemplo de vida, no qual eu procuro sempre me espelhar.

À Deus e aos amigos de outras vidas, por todo o amparo e iluminação.

À todos, eu deixo o meu muito obrigado. Gratidão!

“Ninguém cruza a nossa vida por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão.”

Chico Xavier

Apoio Financeiro

FAPESP, auxílio proveniente do Projeto Temático ao qual este estudo está vinculado (2013/25761-4).



CNPq, Bolsa de Mestrado, Processo (170465/2017-9)



Ajinomoto® do Brasil, doação dos aminoácidos



Evonik industries, doação dos aminoácidos e pelos aminogramas dos alimentos e dietas.



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado **"Exigência de lisina digestível para tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, para diferentes fases de crescimento"**, protocolo nº 012035/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 03 de Agosto de 2017.

Vigência do Projeto	01/09/2017 a 28/04/2018
Espécie / Linhagem	Tilápia do Nilo
Nº de animais	945
Peso / Idade	3g / 400g / 800g
Sexo	Masculino
Origem	Piscicultura comercial "Projeto Peixes"

Jaboticabal, 03 de Agosto de 2017.



Prof. Dr. Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

Introdução geral

A produção de peixes de água doce cresce continuamente, dados recentes mostram que em 2016 foram produzidos mundialmente cerca de 51,4 milhões de toneladas. Neste cenário o Brasil representa apenas o 13º lugar entre os produtores, contribuindo com 1,93% da produção mundial. As maiores potências do setor são China e Índia, com 19,93 e 12,57% da produção mundial, respectivamente (FAO, 2018).

No Brasil, a tilápia do Nilo é a espécie mais produzida, representa 58.4% de todo pescado produzido, ou seja, 283,36 mil toneladas em 2017 (IBGE, 2017). O motivo para esta grande representatividade está associado a diversos fatores, como a boa adaptação aos diferentes sistemas de produção (Michelato et al., 2016), rápido crescimento (He et al., 2013), rusticidade (Takashita et al., 2009; He et al., 2013), filé com boas características organolépticas e ausência de espinhas intramusculares em forma de “Y” (Furuya et al., 2005), o que facilita o processamento e a aceitação pelo consumidor. Além disso, a espécie possui potencial de produção tanto em regiões tropicais quanto em subtropicais (Fitzsimmons, 2000).

Diante das qualidades da espécie, o filé é o principal produto da produção de tilápias e a aceitação do mercado pelo filé de tilápia cresce a cada ano (Schulter e Vieira Filho, 2017). Contudo, para que haja um bom desempenho dos animais, a alimentação fornecida deve atender à exigência nutricional da espécie (Ghomi et al., 2012). Neste contexto, a proteína é o nutriente que mais eleva os custos para formulação das dietas (Secco et al., 2002; Wilson et al. 2002), implicando na realização de diversas pesquisas para determinar a exigência nutricional que permita o melhor crescimento do animal e viabilize economicamente a produção (Borin et al., 2002).

Embora a proteína tenha importância na alimentação dos peixes, eles não possuem exigência neste nutriente, mas sim em quantidades balanceadas de aminoácidos que garantem o melhor desempenho zootécnico (Wilson e Poe, 1985; Wilson, 2002; Webster e Lim, 2002).

Os aminoácidos são classificados como essenciais e não essenciais. Os aminoácidos essenciais não são sintetizados pelos peixes e por isso devem estar

disponíveis na dieta. Isso significa que eles podem ser disponibilizados através de sua forma sintética, quando suplementados na dieta, ou pela quebra da proteína de origem vegetal ou animal dos ingredientes dietéticos. Por outro lado, os aminoácidos não essenciais são sintetizados pelo organismo do animal (Li et al., 2009). Os aminoácidos são essenciais a diversas funções do organismo, como a síntese de proteína e de outros compostos associados ao metabolismo, incluindo hormônios, neurotransmissores, purinas e enzimas. Também, poderão ser catabolizados para suprir a demanda energética na ausência de gorduras e carboidratos (Ballantyne, 2001).

Os aminoácidos são extremamente importantes para o ótimo crescimento dos peixes, no entanto, o excesso e a deficiência destes componentes na dieta podem provocar prejuízos na produção. A deficiência de lisina, por exemplo, pode promover a diminuição do crescimento e a eficiência alimentar, como também podem provocar a erosão das nadadeiras dorsais e caudais, como constatado em truta arco-íris e carpa comum (Ketola, 1983; Guillaume et al., 1999; NRC, 2011). Os aminoácidos em excesso, podem promover a redução da qualidade da água e impactos negativos ao ambiente aquático, em virtude do aumento da excreção de nitrogênio (Furuya, 2001a; Furuya, 2001b; Henry-Silva et al., 2006).

Deste modo, o conceito de “proteína ideal” é aplicado em diversos trabalhos, cujo objetivo é determinar, através de um aminoácido referência, a exigência de outros aminoácidos de forma balanceada (Green e Hardy, 2002; Rollin et al., 2003; Pezzato et al., 2004; Bomfim et al., 2005; Furuya et al., 2005). A partir desse conceito, a lisina é utilizada como aminoácido de referência em estudos com proteína ideal, porque além da sua importante função na síntese proteica, ela atua em conjunto com outros aminoácidos (Furuya et al., 2004; Furuya et al., 2005; Ball et al., 2007).

Segundo Sandell e Daniel, 1988; Boisen et al., 2000; Hauler e Carter, 2001; Furuya et al., 2004; Rollin et al., 2003; Furuya et al., 2006; Mai et al., 2006 e Gatlin et al., 2007, a lisina é geralmente o aminoácido mais limitante em ingredientes de origem vegetal que substituem a farinha de peixe. Já no corpo e no filé, a lisina é o aminoácido encontrado em maior proporção (Teixeira et al., 2008).

Em quantidades balanceadas com outros aminoácidos, a lisina pode promover algumas vantagens, como a melhora no ganho de peso, conversão alimentar, retenção de nitrogênio e redução da gordura corporal (Bai e Gatlin, 1994; Davies et al., 1997; Berge et al., 1998; Furuya et al., 2006; Marcouli et al., 2006; Nguyen et al., 2014). Além disso a lisina, em ação conjunta com a metionina, promove a síntese da L-carnitina, responsável pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro da membrana mitocondrial e que gera energia necessária para as funções fisiológicas do animal (Tanphaichitr et al. 1971).

Para determinação do nível adequado de aminoácidos uma opção é a utilização do método de dose-resposta. Nesta metodologia duas técnicas podem ser aplicadas, a suplementação ou a diluição. A técnica da suplementação é utilizada em diversos estudos tendo como objetivo estimar a exigência de aminoácidos, no qual envolve a adição gradual deste componentes em uma dieta basal deficiente no aminoácido limitante (D'Mello, 1982). Contudo, esse procedimento é criticado, uma vez que a suplementação dos níveis do aminoácido testado pode gerar mudanças na relação com outros aminoácidos, podendo provocar respostas não relacionadas ao aminoácido estudado (Fisher e Morris, 1970; Gous, 1980; Gous e Morris, 1985). Outra desvantagem da técnica de suplementação é a dificuldade de obtenção de níveis mais baixos do aminoácido teste (limitante na dieta), sendo necessário aumentar a inclusão de aminoácidos cristalinos nas dietas experimentais (Gous e Morris, 1985).

Já a técnica da diluição, proposta por Fisher e Morris (1970), consiste em promover uma série de diluições de uma dieta com alto teor proteico, limitante no aminoácido teste, com uma dieta isenta de proteína, mantendo os níveis iguais de energia. Com a aplicação do método é possível obter os níveis intermediários do aminoácido teste e manter a relação entre os aminoácidos, colaborando para a avaliação das respostas do aminoácido em estudo, sem a interferência de outros componentes da dieta (Gous e Morris, 1985). Além disso, a técnica evita a inclusão de uma elevada quantidade de aminoácidos sintéticos nas dietas (Abboudi et al., 2007).

Desta forma, os estudos de avaliação de exigência de lisina são de relevância para o avanço da pesquisa em nutrição de peixes, pois o uso da técnica da diluição é

uma alternativa para estimar a exigência de lisina e dos demais aminoácidos através da aplicação do conceito de proteína ideal, para tilápias em fases de crescimento ainda não estudadas. A contribuição de informações geradas complementarão os estudos anteriores realizados pela técnica de suplementação, fornecendo subsídios para novas pesquisas que visem por dietas mais precisas e que impactem menos o ambiente aquático.

MANUSCRITO - DIETARY LYSINE REQUIREMENT IN DIFFERENT GROWTH STAGES OF NILE TILAPIA BY THE DILUTION TECHNIQUE

A ser enviado para a revista Aquaculture.

Rafael de Souza Romaneli^a, Thiago Mathias Torres Nascimento^b, Kifayat Ullah Khan^a, Cleber Fernando Menegasso Mansano^c, Matheus De Paula Reis^d, Nilva Kasue Sakomura^d, João Batista Kochenborger Fernandes^a

^aAquaculture Center, São Paulo State University (UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884900, Jaboticabal, SP, Brazil

^bMCassab Company & Industry Ltd., Avenida das Nações Unidas, 20822. Via Almeida, 04795000, São Paulo, SP, Brazil

^cBrazil University (Univ. Brasil), Campus Fernandópolis, Est. Projetada F-1, s/n – Fazenda 12 Santa Rita, 15600000, Fernandópolis, SP, Brazil

^dDepartament of Animal Science, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Via de Acesso Paulo Donato Castellane, Jaboticabal, SP, Brazil

Correspondence: Rafael de Souza Romaneli, Aquaculture Center, São Paulo State University (UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884900, Jaboticabal, SP, Brazil

Email: romanelirafael@gmail.com

Resumo

Três experimentos foram conduzidos para determinar a exigência de lisina digestível, manutenção e eficiência de utilização da lisina para estabelecer o perfil de aminoácidos essenciais pelo conceito de proteína ideal para diferentes fases de crescimento da tilápia do Nilo. Os peixes foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso com oito tratamentos e quatro repetições com 15 peixes por caixa na fase inicial ($2,35 \pm 0,05$ g) e sete tratamentos e três repetições com 11 peixes e 9 peixes por caixa nas fases de crescimento ($433,18 \pm 12,49$ g) e terminação ($733,34 \pm 11,24$ g). Os tratamentos foram organizados em sete dietas isoenergéticas com níveis crescentes de lisina digestível e uma dieta adicional contraprova (3,59; 5,94; 8,85; 12,03; 15,03; 18,74 e $23,05 \text{ g kg}^{-1}$) na fase inicial e seis níveis crescentes de lisina digestível e uma dieta adicional contraprova (3,68; 7,14; 10,40; 13,58; 17,10 e $20,02 \text{ g kg}^{-1}$) para as fases de crescimento e terminação, formulados pela técnica da diluição. O variáveis ganho de peso, deposição de proteína, taxa de eficiência alimentar e rendimento de filé (apenas para as fases de crescimento e terminação) obtiveram maiores respostas mediante ao nível crescente de lisina na dieta. A taxa de eficiência proteica apresentou melhores resultados na dieta contendo 5.94 g kg^{-1} de lisina, na fase inicial e para as fases posteriores, entre os níveis de 10.40 e 13.58 g kg^{-1} . Os níveis ótimos de lisina digestível foram estimados pela variável ganho de peso, resultando nas exigências de 19,4, 14,6 e 13.6 g kg^{-1} (matéria natural) para fases inicial, crescimento e terminação, respectivamente. A exigência de manutenção e a eficiência de utilização da lisina foram $19.87 \text{ mg kg}^{-0.8}.\text{dia}^{-1}$ e 67.68% na fase inicial, $40.26 \text{ mg kg}^{-0.8}.\text{dia}^{-1}$ e 67.54% na fase de crescimento; $50.25 \text{ mg kg}^{-0.8}.\text{dia}^{-1}$ e 64.32% na fase de terminação. O perfil ideal de aminoácidos foi determinado para as diferentes fases de crescimento da tilápia do Nilo, sendo importante para a fabricação de dietas com conteúdo aminoacídico balanceado, para juvenis e principalmente para tilápias adultas, no qual pouco se conhece a respeito da exigência de aminoácidos.

Palavras chave: Aminoácidos, dose resposta, exigência de manutenção, eficiência de utilização da lisina.

Abstract

Three trials were conducted to determine the requirement of digestible lysine for growth and maintenance and efficiency of lysine utilization and establish the amino acid profile by “ideal protein concept” in different growth stages of Nile tilapia. A completely randomized design was used which consisted of 8 treatments and 4 replicates each and a total of 15 fish with an initial average body weight of $2.35 \pm 0.05\text{g}$ were stocked per tank in the started growth phase. The grower and the finisher phase consisted of 7 treatments and 3 replicates each, with 11 (initial average body weight, $433.18 \pm 12.49\text{g}$) and 9 (initial average body weight, $733.34 \pm 11.24\text{g}$) fish stocked per tank, respectively. Isoenergetic diets formulated according to the dilution technique with the supplementation of seven increasing levels of digestible lysine and an additional diet (counter-proof) ($3.59, 5.94, 8.85, 12.03, 15.03, 18.74$ and 23.05 g kg^{-1}) in the started phase and six increasing levels of digestible lysine and an additional diet (counter-proof) ($3.68, 7.14, 10.40, 13.58, 17.10$ and 20.02 g kg^{-1}) in the grower and finisher phase, respectively were fed to fish. The body weight gain, protein gain, feed efficiency ratio and fillet yield (only in the grower and finisher phase) were improved with increasing dietary lysine levels in all the trials. Protein efficiency ratio was improved with the supplementation of diets containing 5.94 g kg^{-1} of lysine in the juvenile and from 10.40 to 13.58 g kg^{-1} lysine in the adult tilapias. Based on the weight gain data, the optimum lysine levels were determined to be $19.4, 14.6$ and 13.6 g kg^{-1} (as fed basis) in the started, grower and finisher phase, respectively. Maintenance requirement and the efficiency of lysine utilization were $19.87 \text{ mg kg}^{-0.8}$ and 67.68% in the started phase, $40.26 \text{ mg kg}^{-0.8}$ and 67.54% in the grower phase, and $50.25 \text{ mg kg}^{-0.8} \cdot \text{day}^{-1}$ and 64.32% in the finisher phase, respectively. The ideal amino acid profile was evaluated in different life stages of Nile tilapia being relevant to improve the quality of practical diets in terms of amino acid balance.

Keywords: Amino acids; dose-response; maintenance requirement; lysine utilization efficiency.

Introduction

Protein composed of balanced quantities of amino acids is an essential nutrient in aquafeeds due to its important role in growth and physiological functions of animals (Wilson and Poe, 1985; Wilson, 2002; Webster and Lim, 2002). Providing the exact amount of dietary amino acids required by fish for maintenance purposes and body protein accretion is essential to achieve maximum growth and nitrogen utilization efficiency. Amongst essential amino acids, lysine is often referred to as the first limiting in feed ingredients with plant feedstuffs sources (Mai et al., 2006; Gatlin et al., 2007). Lysine is commonly used as a reference amino acid in the concept of ideal protein, because it has an important role in protein deposition and metabolic interaction with other amino acids (Ball et al., 2007). The proper supplementation of dietary lysine improves growth performance and health status (Li et al., 2009), nitrogen retention (Cao et al., 2012) and reduces body fat content in fish (Nguyen et al., 2014). As well as, it is responsible for the synthesis of L-carnitine and in combination with methionine, vitamin C and other compounds having an important role to transport the long-chain fatty acids into the mitochondria (Harpaz, 2005).

These advantages are just met, when maintenance demands were satisfied (He et al., 2013). In this context, several studies have been conducted to determine maintenance requirement and utilization efficiency of amino acids of many fish species (Abboudi et al., 2006, 2007; Bodin et al., 2009; He et al., 2013; Kroeckel et al., 2013). These parameters in combination with other inputs obtained by different methodologies are important to elaborate factorial models, that allows the estimation of the essential amino acids requirements at different size of fish (NRC, 2011).

To determine the optimum amino acid level, the most common method used in fish is the dose-response (Madrid et al. 2019). In this procedure two methods can be applied, the supplementation and dilution techniques. The graded supplementation technique is widely used to determine amino acids requirement, which involves the gradual addition of test amino acids in a basal diet deficient in the limiting amino acid (D'Mello, 1982). Even though, this procedure is criticized, since the gradual increase of the levels of test amino acid can cause changes in the amino acid ratio that may result

in responses related to another amino acids (Fisher and Morris, 1970; Gous and Morris, 1985). Moreover, at high levels of supplementation the test amino acid could not be the first-limiting in the diet. Another limitation is that to formulate a basal diet with the test amino acid at such a low level, being necessary adding more crystalline amino acids to maintain the other amino acids in adequate proportions (Gous and Morris, 1985).

The dilution technique proposed by Fisher and Morris (1970) is an alternative to supplementation technique, where successive dilutions are made by the mixing of a high protein diet with a nitrogen-free diet in proper proportions maintaining the same energy level. The method allows obtaining the intermediary levels of the test amino acid and maintains the relationship among the amino acids (Gous and Morris, 1985). In addition, the dilution technique allows using a wide range of levels and formulating diets at lowest level without high inclusion of crystalline amino acids, thus enabling determine maintenance requirement.

Among commercially cultured fish species in the world, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* production has been increased because of its fast growth, good disease resistance capability, tolerance to different environmental conditions and high meat quality (Michelato et al., 2016; Xiao et al., 2017). The previous studies regarding the determination of lysine requirements have been based on the graded supplementation method, which in small tilapias are ranging from 13.1 to 21.7g kg⁻¹ of lysine in the diet (Santiago and Lovell, 1988; Furuya et al., 2006; Liebert, 2009; Takishita et al., 2009; Bomfim et al., 2010; Furuya et al., 2012; Furuya et al., 2013; Rampe et al., 2014; Diogenes et al., 2016). Little is known about this topic and to our knowledge a single dose-response study is published about adult Nile tilapia reporting the lysine requirement of 14.6 g kg⁻¹ (Michelato et al., 2016). Therefore, the current study aimed to assess the optimum digestible lysine requirement for growth and maintenance and efficiency of lysine utilization and the establishment of ideal AA profile for different growth phases of Nile tilapia using dilution technique.

Conclusion

In conclusion, the optimum lysine level established in the present study for Nile tilapia was in agreement with previous literature for the same species. The digestible lysine requirements determined in different growth stages based on weight gain were 19.4, 14.6 and 13.6 g kg⁻¹ (on fed basis) in the started, grower and finisher phase, respectively. The maintenance requirement and efficiency of lysine utilization established was 19.87 mg kg^{-0.8} day⁻¹ and 67.68% in the started phase, 40.26 mg kg^{-0.8} day⁻¹ and 67.54% in the grower phase; 50.25 mg kg^{-0.8}.day⁻¹ and 64.32% in the finisher phase. The ideal AA profile determined in our work may help to improve practical diets for Nile tilapia in different life stages through adequate amino acids balance with low dietary protein levels. Moreover, the present profile also provides information that may be important to determine amino acids requirements for large fish in future researches.

Acknowledgments

The authors thank the Sao Paulo State Research Foundation for provision of the financial support (2013/25761-4), the National Council for Scientific and Technological Development by the master's scholarship (170465/2017-9). We wish to thank the Aquaculture Center, Sao Paulo State University and Evonik Industries, for providing necessary facilities during the trials. There is no conflict of interest declared in this article.

References

- Abboudi, T., Mambrini, M., Ooghe, W., Larondelle, Y., Rollin, X., 2006. Protein and lysine requirements for maintenance and for tissue accretion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture* 261, 369-383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.041>.
- Abboudi, T., Ooghe, W., Larondelle, Y., Rollin, X., 2007. Determination of the threonine requirement for maintenance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry with the diet

- dilution procedure. *Aquacult. Nutr.* 13, 281–290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00475.x>.
- Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Khattab, Y.A.E., Shalaby, A.M.E., 2010. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 298, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.027>.
- Abimorad, E.G., Favero, G.C., Squassoni, G.H., Carneiro, D., 2009. Dietary digestible lysine requirement and essential amino acid to lysine ratio for pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquacult. Nutr.* 16, 370 – 377. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00674.x>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005. Official Methods of Analysis. 16th ed Association of Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.
- Arai, S., 1981. A purified test diet for coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, fry. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47, 547-550. <https://doi.org/10.2331/suisan.47.547>.
- Árnason, J., Björnsdóttir, R., Arnarsson, I., Arnadóttir, G.S., Thorarensen, H., 2010. Protein requirements of Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquacult. Res.* 41, 385–393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02439.x>.
- Ball, R.O., Urschel, K.L., Pencharz, P.B., 2007. Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *J. Nutrition* 137, 1626–1641. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1626S>.
- Bicudo, A.J.A., Sado, R.Y., Cyrino, J.E.P., 2009. Dietary lysine requirement of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Aquaculture* 297, 151 – 156. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.031>.
- Bodin, N., Govaerts, B., Abboudi, T., Detavernier, C., De Saeger, S., Larondelle, Y., Rollin, X. 2009. Protein level affects the relative lysine requirement of growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Br. J. Nutr.* 102, 37-53. <https://doi.org/10.1017/S0007114508158986>.
- Bomfim, M.A.D., Lanna, E.T.A., Donzele, J.L.D., Quadros, M., Ribeiro, F.B., Sousa, M.P., 2010. Níveis de lisina, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia-do-nilo. *R. Bras. Zootec.* 39, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010000100001>.

- Cao, J.M., Chen, Y., Zhu, X., Huang, Y.H., Zhao, H.X., Li, G.L., Lan, H.B., Chen, B., Pan, Q., 2012. A study on dietary L-lysine requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquacult. Nutr.* 18, 35–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00874.x>.
- Castillo, J.D.A., Nascimento, T.M.T., Mansano, C.F.M., Sakomura, N.K., Silva, E.P., Fernandes, J.B.K., 2017. Determining the daily digestible protein intake for Nile tilapia at different growth stages. *Bol. Inst. Pesca* 44, 54 -63. <http://dx.doi.org/10.20950/1678-2305.2017.54.63>.
- Darmani Kuhi, H., Kebreab, E., Owen, E., France, J., 2001. Application of the law of diminishing returns to describing the relationship between metabolizable energy intake and growth rate in broilers. *J. Anim. Feed Sci.* 10, 661–670. <https://doi.org/10.22358/jafs/68018/2001>.
- Deng, D-F., Dominy, W., Ju, Z.Y., Koshio, S., Murashige, R., Wilson, R.P., 2010. Dietary lysine requirement of juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*). *Aquaculture* 308, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.041>.
- Diógenes, A. F., Fernandes, J. B. K., Dorigam, J.C.P., Sakomura, N. K., Rodrigues, F. H. F., Lima, B. T. M., Gonçalves, F. H., 2016. Establishing the optimal essential amino acid ratios in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the deletion method, *Aquacult. Nutr.* 22, 435-443. <https://doi.org/10.1111/anu.12262>.
- D'Mello, J.P.F., 1982. A comparison of two empirical methods of determining amino acid requirements. *World's Poult. Sci. J.* 138, 114–119. <https://doi.org/10.1017/WPS19820010>.
- D'Mello, J.P.F., 2003. Amino acids in animal nutrition. Edinburgh, UK: CABI Publishing.
- Einen, O., Roem, A.J., 1997. Dietary protein/energy ratios for Atlantic salmon in relation to fish size: growth, feed utilization and slaughter quality. *Aquacult. Nutr.* 3, 115–126. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1997.00084.x>.
- Encarnação, P.M., de Lange, C.F.M., Rodehutscord, M., Hoehler, D., Bureau, W., Bureau, D.P., 2004. Diet digestible energy content affects lysine utilization, but not dietary lysine requirement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for maximum growth. *Aquaculture* 235, 569–586. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.001>.

- Encarnação, P., de Lange, C., Bureau, D.P., 2006. Diet energy source affects lysine utilization for protein deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261, 1371–1381. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.001>.
- Etheridge, R.D., Pesti, G.M., Foster, E.H., 1998. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Anim. Feed Sci. Tech.* 73, 21–28. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00136-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00136-9).
- Furuya, W.M., Santos, V.G., Silva, L.C.R., Furuya, V.R.B., Sakaguti, E.S., 2006. Exigência de lisina digestível para juvenis de tilápia-do-Nilo. *R. Bras. Zootec.* 35, 937-942. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982006000400001>.
- Furuya, W.M., 2010. Tabelas brasileiras para nutrição de Tilápias. Toledo: GFM. 21, 100.
- Furuya, W. M., Graciano, T. S., Vidal, L. V. O., Xavier T. O., Gongora, L.D., Righetti, J. S., Furuya, V.R.B., 2012. Digestible lysine requirement of Nile tilapia fingerlings fed arginine-to lysine-balanced diets. *R. Bras. Zootec.* 41(3), 485-490. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000300003>.
- Furuya, W.M., Michelato, M., Graciano, T.S., Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Furuya, V.R.B., Moura, L.B., 2013. Digestible lysine requirement of Nile tilapia from 86 to 227 g fed arginine to lysine balanced diets. *Cienc. Agrar.* 34(4), 1945-1954. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n4p1945>.
- Fisher, C., Morris, T.R., 1970. The determination of the methionine requirements of laying pullets by a diet dilution technique. *Bri. Poult. Sci.* 11, 67-82. <https://doi.org/10.1080/00071667008415793>.
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G.S., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac. Res.* 38, 404, 551 -579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>.
- Gous, R.M., Morris, T.R., 1985. Evaluation of a diet dilution technique for measuring the response of broiler chickens to increasing concentrations of lysine. *Br. Poult. Sci.* 26,147–161. <https://doi.org/10.1080/00071668508416799>.

- Gous, R. M., Faulkner, A. S., Swatson H. K., 2018. The effect of dietary energy:protein ratio, protein quality and food allocation on the efficiency of utilization of protein by broiler chickens. Br. Poul. Sci. 59(1), 100-109. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1390211>.
- Glencross, B.D, 2008. A factorial growth and feed utilization model for barramundi, *Lates calcarifer* based on Australian production conditions. Aquacult. Nutr. 14, 360–373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00543.x>.
- Grisdale-Helland, B., Hatlen, B., Mundheim, H., Helland, S.J., 2011a. Dietary lysine requirement and efficiency of lysine utilization for growth of Atlantic cod. Aquaculture 315, 260 -268. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.015>.
- Grisdale-Helland, B., Gatlin, D.M. III, Corrent, E. & Helland, S.J, 2011b. The minimum dietary lysine requirement, maintenance requirement and efficiency of lysine utilization for growth of Atlantic salmon smolts. Aquacult. Res. 42, 1509–1529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02743.x>.
- Harpaz, S., 2005. L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition—a review. Aquaculture 249, 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.007>.
- Hau, k., 2013. Estimating maintenance amino acids requirements of fish through a nonlinear mixed modelling approach. Aquacult. Res. 44, 542 – 553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03057.x>.
- He, J.-Y., Tian, L.-X., Lemme, A., Gao, W., Yang, H.-Y., Niu, J., Liang, P.-F., Liu, Y.-J., 2013. Methionine and lysine requirments for maintenance and efficiency of utilization for growth of two sizes of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquacult. Nutr. 19, 629 – 640. <https://doi.org/10.1111/anu.12012>.
- Kaushik, S.J., 1998. Whole body amino acid composition of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. Aquat. Living Resour. 11, 355 -358. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(98\)80007-7](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(98)80007-7).
- Kroeckel, S., Dietz, C., Schulz, C., Susenbeth, A., 2013. Effect of diet composition and lysine supply on growth and body composition in juvenile turbot (*Psetta maxima*). Arch. Anim. Nutr. 67(4), 330-345. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2013.823305>.

- Liebert, F., Benkendorff, K., 2007a. Modeling lysine requirements of *Oreochromis niloticus* due to principles of the diet dilution technique. *Aquaculture* 267, 100-110. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.022>.
- Liebert, F., Benkendorff, K., 2007b. Modelling of threonine and methionine requirements of *Oreochromis niloticus* due to principles of the diet dilution technique. *Aquacult. Nutr.* 13, 397–406. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00490.x>.
- Liebert, F., 2009. Amino acid requirement studies in *Oreochromis niloticus* with application of principles of the diet dilution technique. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93, 787-793. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2008.00869.x>.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G., 2009. New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *J. Amino Acids* 37, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0171-1>.
- Mai, K.S., Zhang, L., Ai, Q.H., Duan, Q.Y., Zhang, C.X., Li, H.T., Wan, J.L., Liufu, Z.G., 2006. Dietary lysine requirement of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 258, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.043>.
- Madrid, J., Pohlenz, C., Viana, M.T., Lazo, R.P., 2019. Dietary lysine requirement for juvenile, *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 500, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.003>.
- Michelato, M., Vidal, L., Xavier, T.O., Moura, L.B., Almeida, F.L.A., Pedrosa, V.B., Furuya, V.R.B., Furuya, W.M., 2016. Dietary lysine requirement to enhance muscle development and fillet yield of finishing Nile tilapia. *Aquaculture* 457, 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.022>.
- Montes-Girao, P.J., Fracalossi, D.M., 2006. Dietary lysine requirement as basis to estimate the essential dietary amino acid profile for jundiá, *Rhanda quelen*. *J. World Aquacult. Soc.* 37, 388-396. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00052.x>.
- National Research Council– NRC, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.: National Academy Press. 360.
- Nang Thu, T.T., Parkouda, C., de Saeger, S., Larondelle, Y., Rollin, X., 2009. Protein level does not affect lysine utilization efficiency at marginal lysine intake in growing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquaculture* 288, 312-320. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.007>.

- Nguyen, M.V., Rønnestad, I., Buttle, L., Lai, H.V., Espe, M., 2014. Imbalanced lysine to arginine ratios reduced performance in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) fed high plant protein diets. *Aquacult. Nutr.* 20, 25–35. <https://doi.org/10.1111/anu.12043>.
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 2008. Lysine requirement and efficiency of lysine utilization in turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture* 275, 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.015>.
- Rampe, M.C.C., Pacheco, M.L., Vargas Júnior, J.G., Giannotti, D.G., Demuner, L.F., Marin, J.F.V., 2014. Adição de lisina digestível em rações experimentais para juvenis de tilápia-do-nilo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66(5), 1557-1566. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5729>.
- Rodehutscord, M., Becker, A., Pfeffer, E., 1997. Response of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Supplements of Individual Essential Amino Acids in a Semi purified Diet, Including an Estimate of the Maintenance Requirement for Essential Amino Acids. *J. Nutr.* 127, 1166-1175. <https://doi.org/10.1093/jn/127.6.1166>.
- Rodehutscord, M., Borchert, F., Gregus, Z., Pack, M., Pfeffer, E., 2000. Availability and utilisation of free lysine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): 1. Effect of dietary crude protein level. *Aquaculture* 187, 163–176. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00388-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00388-9).
- Sá, R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2008. Dietary protein requirement of white sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. *Aquacult. Nutr.* 14, 309–317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00532.x>.
- Sabzi, E., Mohammadiazarm, H., Salati, A.P., 2017. Effect of dietary L-carnitine and lipid levels on growth performance, blood biochemical parameters and antioxidant status in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 480, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.013>.
- Santiago, C.B., Lovell, R.T., 1988. Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. *J. Nutr.* 118, 1540–1546. <https://doi.org/10.1093/jn/118.12.1540>.
- SAS Institute. SAS/STAT, 2010. User's Guide: Statistics. Version 9.4. SAS Inst. Inc., Cary, NC.388.

- Takashita, S.S., Lanna, E.A.T., Donzele, J.L., Bomfim, M.A.D., Quadros, M., Sousa, M.P., 2009. Digestible lysine level in feed for Nile tilapia fingerlings. *R. Bras. Zootec.* 38(11), 2099-2105. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009001100004>.
- Trung, D.V., Diu, N.T., Hao, N.T., Glencross, B., 2011. Development of a nutritional model to define the energy and protein requirements of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 320, 69 – 75. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.029>.
- Walton, M.J., Cowey, C.B., Adron, J.W., 1984. The effect of dietary lysine levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 52,115-122. <https://doi.org/10.1079/BJN19840077>.
- Wang, S., Liu, Y.J., Tian, L.X., Xie, M.Q., Yang, H.J., Wang, Y., Liang, G.Y., 2005. Quantitative dietary lysine requirement of juvenile grass carp *Ctenopharyngodon Idella*. *Aquaculture* 249, 419-429. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.005>.
- Webster, C.D., Lim, C., 2002. Introduction to Fish Nutrition. In: Webster, C.D.; Lim, C. (Eds.). *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture*. New York: CABI Publishing. 388-395.
- Webb, K.A. and Gatlin III, D.M. 2003. Effects of dietary protein level and form on production characteristics and ammonia excretion of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 225, 17-26. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00274-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00274-6).
- Wilson, R.P., Poe, W.E., 1985. Relationship of whole and egg essential amino acid patterns to amino acid requirement patterns in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 80b, 385 – 388. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(85\)90224-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(85)90224-X).
- Wilson, R. P., 2002. Amino acids and proteins. In: J.E. Halver, and R.w. Hardy, (Ed.). *Fish nutrition*. Academic Press. Amsterdam, AM, The Netherlands. 143 - 179.
- Yang, S-D., Liu, F-G., Liou, C-H., 2011. Assessment of dietary lysine requirement for silver perch (*Bidyanus bidyanus*) juveniles. *Aquaculture* 312, 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.011>.
- Yang, S-D., Liu, F-G., Liou, C-H. 2012. Effects of dietary l-carnitine, plant proteins and lipid levels on growth performance, body composition, blood traits and muscular carnitine status in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 342–343, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.002>.

- Ye, W., Han, D., Zhu, X., Yang, Y., Jin, J., Xie, S., 2017. Comparative study on dietary protein requirements for juvenile and pre-adult gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). *Aquacult. Nutr.* 23, 755 – 765. <https://doi.org/10.1111/anu.12442>.
- Xiao, W., Li, D.Y., Zhu, J.L., Zou, Z.Y., Yue, Y.R., Yang, H., 2017. Dietary valine requirement of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquacult. Nutr.* 24, 315 – 323. <https://doi.org/10.1111/anu.12562>.
- Zhou, Q.-C., Wu, Z.-H., Yang, S.-Y., 2007. Dietary lysine requirement of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 273, 634-640. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.056>.

Lista de figuras

Figure 1 - Body weight gain in started phase ($Y = 52.90 + (-3.60 * (19.37 - \text{lysI}))$; $R^2 = 0.97$), fitted by linear response plateau, fed with different levels of digestible lysine during 44 days. Each point represent one group of fish (N=15). Where lysI = lysine in intake (g kg^{-1}). 21

Figure 2 - Body weight gain for grower phase ($Y = (193.43 + (-19.03) * (14.59 - \text{lysI}))$; $R^2 = 0.95$), fitted by linear response plateau, fed with different levels of digestible lysine during 44 days. Each point represent one group of fish (N=11). Where lysI = lysine intake (g kg^{-1}). 22

Figure 3 - Body weight gain in finisher phase ($Y = 257.75 + (-30.25 * (13.60 - \text{lysI}))$; $R^2 = 0.96$), fitted by linear response plateau, fed with different levels of digestible lysine during 41 days. Each point represent one group of fish (N=9). Where lysI = lysine intake (g kg^{-1}). 22

Figure 4 - Lysine requirement for maintenance in the started phase (black balls) [$y = 157.60 * (1 - \exp(-0.01 * (x - 19.87)))$], grower phase (diamonds) [$y = 162.6 * (1 - \exp(-0.01 * (x - 40.26)))$] and finisher phase (squares) [$y = 112 * (1 - \exp(-0.01 * (x - 50.25)))$] fitted by the monomolecular model. 23

Lista de tabelas

Table 1 Formulation of the basal diets in the started, grower and finisher phase (g kg^{-1} diet). 12

Table 2 Chemical composition (g kg ⁻¹) of the experimental diets in the started phase (trial 1).	13
Table 3 Chemical composition (g kg ⁻¹) of the experimental diets in the grower (trial 2) and finisher (trial 3) phase.	14
Table 4 Growth performance of Nile tilapia in the started phase fed graded levels of dietary digestible lysine.	19
Table 5 Growth performance of Nile tilapia in the grower and finisher phases fed graded levels of dietary digestible lysine.	20
Table 6 Equations fitted by broken-line model for feed intake, feed efficiency ratio and protein gain of Nile tilapia feed with increased level of digestible lysine.....	21
Table 7 The requirement of digestible essential amino acids (EAA) for different growth stages of Nile tilapia calculated by the concept of “ideal protein”.....	24
Table 8 Whole-body proximate composition (g 100 g ⁻¹) of Nile tilapia, corresponding to started phase, fed graded levels of dietary lysine.	25
Table 9 Whole-body proximate composition (g 100 g ⁻¹) of Nile tilapia, corresponding to grower and finisher phases, fed graded levels of dietary lysine.	25

Considerações Finais

Em conclusão aos trabalhos desenvolvidos, foi possível estimar a exigência de lisina digestível para diferentes fases de crescimento com a aplicação da técnica de diluição. Os dados obtidos no presente estudo irão colaborar para a elaboração de modelos fatoriais, cujo produto final será o desenvolvimento de uma planilha eletrônica. No entanto, algumas considerações sobre a aplicação do método de formulação devem ser apontados. Primeiro, a variação dos níveis de gordura nas dietas, no qual estão relacionadas a alta inclusão de óleo de soja na dieta “isenta em

proteína”, medida aplicada para manter as dietas isoenergética. A técnica preconiza manter os mesmo níveis dos nutrientes entre as dietas, no entanto com a grande discrepância entre os níveis de gordura, o procedimento realizado foi de encontro aos princípios do método. Deste modo, para estudos futuros será necessário estabelecer medidas que resolvam este problema.

A segunda consideração é sobre a utilização de valores mais baixos para manter a deficiência relativa do aminoácido estudado. No presente estudo, a lisina foi formulada para extrapolar 50% da exigência recomendada em literatura e os demais aminoácidos essenciais foram extrapolados em 80% da exigência, com isso foi obtido uma deficiência relativa de 30%. A medida foi aplicada para termos certeza que a lisina seria limitante nas dietas experimentais, visto que, há uma grande discrepância entre os dados de exigência de lisina em literatura. Como sugestão para futuros estudos, sugere-se a utilização de valores mais baixos, como 20% acima da exigência para o aminoácido em estudo e 40% para os demais aminoácidos, procedimento aplicado em estudos para aves e suínos. Isto diminuiria a porcentagem de lisina em relação à proteína, no qual apresentou-se elevada em relação a outros estudos. Como também, facilitaria a formulação das dietas por não precisar atingir níveis tão altos de aminoácidos.

Portanto, a técnica da diluição atentou as demandas do presente estudo, sendo aplicável em pesquisas que visem estimar a exigência de aminoácidos. No entanto, mais estudos devem ser realizados com peixes para levantar informações sobre a aplicabilidade da técnica.

Referências complementares

- ABBOUDI, T.; OOGHE, W.; LARONDELLE, Y.; ROLLIN, X. **Determination of the threonine requirement for maintenance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry with the diet dilution procedure.** Aquaculture Nutrition, v.13, p. 281–290, 2007.
- BAI, S.C.; GATLIN, D.M. **Effects of L-lysine supplementation of diets with different protein levels and sources on channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque).** Aquaculture and Fisheries Management, v.25, p.465-474, 1994.

- BALL, R.O.; URSCHER, K.L.; PENCHARZ, P.B. **Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism.** J. Nutrition., v.137, 1626–1641, 2007.
- BALLANTYNE, J. S. **Amino acid Metabolism.** In: Wright, P. e Anderson, P. (eds). Nitrogen Excretion. Fish Physiology Series, vol. XX, Academic Press. p.77-107, 2001.
- BERGE, G.E.; SVEIER, H.; LIED, E. **Nutrition of Atlantic salmon (*Salmo salar*); the requirement and metabolic effect of lysine.** Comparative Biochemistry and Physiology, v.120a, p.477-485, 1998.
- BOISEN, S.; HVELPLUND, T.; WEISBJERG, M.R. **Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation.** Livestock Production Science, v.64, p.239-251, 2000.
- BORIN, K.; OGLE, B.; LINDBERG, J.E. **Methods and techniques for the determination of amino acid digestibility: A Review.** Livestock Research for Rural Development, v.14, n.6, 2002.
- D'MELLO, J.P.F. **A comparison of two empirical methods of determining amino acid requirements.** World's Poult. Sci. J., v. 138, p. 114–119, 1982.
- DAVIES, S.J.; MORRIS, P.C.; BAKER, R.T. **Partial substitution of fish meal and full-fat soya bean meal with wheat gluten and influence of lysine supplementation in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).** Aquaculture Research, v.28, p.317-328, 1997.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals.** Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2018.
- FISHER, C.; MORRIS, T.R. **The determination of the methionine requirements of laying pullets by a diet dilution technique.** Bri. Poult. Sci., v. 11, p. 67-82, 1970.

- FITZSIMMONS, K. **Future trends of tilapia aquaculture in the Americas**. In: **Tilapia Aquaculture in the Americas** (ed. by B.A. Costa Pierce & J. Rakocy),. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, p. 252 – 264, 2000.
- FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C. et al. **Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.4, p.1125-1131, 2001a.
- FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C. et al. **Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) (linhagem tailandesa)**. Acta Scientiarum, v.23, n.2, p. 465-469, 2001b.
- FURUYA, W.M.; SILVA, L.C.R.; NEVES, P.R. et al. **Exigência de metionina + cistina para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Ciência Rural, v.34, n.6, p.1933-1937, 2004.
- FURUYA, W.M.; BOTARO, D.; MACEDO, R.M.G. et al. **Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.34, p.1433-1441, 2005.
- FURUYA, W.M.; BOTARO, D.; SANTOS, V.G. et al. **Exigência de lisina digestível para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.34, n.6, p.1933-1937, 2006.
- GATLIN, D.M.; BARROWS, F.T.; BROWN, P.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, T.G.; HARDY, R.W.; HERMAN, E.; HU, G.S.; KROGDAHL, A.; NELSON, R.; OVERTURF, K.; RUST, M.; SEALEY, W.; SKONBERG, D.; SOUZA, E.J.; STONE, D.; WILSON, R., Wurtele, E. **Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review**. Aquac. Res., v.38, p.551 -579, 2007.
- GHOMI, M.R.; SHAHRIARI, R.; FAGHANILANGROUDI, H.; NIKOO, M. **The effects of dietary enzyme on some blood biochemical parameters of the cultured**

- great sturgeon *Husohuso juveniles***. *Comp. Clin. Pathol.*, v.21, n.2, p.201-204, 2012.
- GOUS, R.M. **An improved method for measuring the response of broiler chickens to increasing dietary concentrations of an amino acid**. *Proceedings of the 6nd European Poultry Conference*. Hamburg. Alemanha. p. 32-39, 1980.
- GOUS, R.M.; MORRIS, T.R. **Evaluation of a diet dilution technique for measuring the response of broiler chickens to increasing concentrations of lysine**. *Br. Poult. Sci.*, v.26, p.147–161, 1985.
- GUILLAUME, J.; KAUSHIK, S.; BERGOT, P.; MÉTAILLER, R. **Nutrition et alimentation des poissons et crustacés**. Paris: INRA Edition, 1999.
- GREEN, J.A.; HARDY, R.W. **The optimum dietary essential amino acid pattern for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), to maximize nitrogen retention and minimize nitrogen excretion**. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.27, p.97-108, 2002.
- HAULER, R.C.; CARTER, C.G. **Reevaluation of the quantitative dietary lysine requirements of fish**. *Reviews in Fisheries Science*, v.9, n.3, p.133-166, 2001.
- HE, J.-Y; TIAN, L.-X; LEMME, A; GAO, W. et al. **Methionine and lysine requirements for maintenance and efficiency of utilization for growth of two sizes of tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. *Aquaculture Nutrition*, v. 19, n. 4, p. 629-640, 2014.
- HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M.; PEZZATO, L.E. **Digestibilidade aparente de macrófitas aquáticas pela tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água em relação às concentrações de nutrientes**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.3, p.641-647, 2006.
- IBGE. (2017). **Produção Pecuária municipal**, Rio de Janeiro, v. 45, p.1-8, 2017
- KETOLA, H.G. **Requirement for dietary lysine and arginine by fry of rainbow trout**. *J. Anim. Sci.*, v.56, p.101 - 107, 1983.

- LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSKI, J. **New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds.** Amino Acids, v. 37, p.43–53, 2009.
- MARCOULI, P.A.; ALEXIS, M.N.; ANDRIOPOULOU, A. et al. **Dietary lysine requirement of juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* L.** Aquaculture Nutrition, v.12, p.25-33, 2006.
- MICHELATO, M.; VIDAL, L.; XAVIER, T. et al. **Dietary lysine requirement to enhance muscle development and fillet yield of finishing Nile tilapia.** Aquaculture, v.457, p.124-130, 2016.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp.** Washington, D.C.: National Academy Press, p.360, 2011.
- NGUYEN, M.V.; RØNNESTAD, I.; BUTTLE, L.; LAI, H.V.; ESPE, M. **Imbalanced lysine to arginine ratios reduced performance in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) fed high plant protein diets.** Aquac. Nutr. v. 20, p. 25–35, 2014.
- PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; FRACALOSSI, D.M. et al. **Nutrição de peixes.** In: CYRINO, J.E.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSI, D.M. *et al.* **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** São Paulo: Tec. Art, p.75-169, 2004.
- ROLLIN, X.; MAMBRINI, M.; ABOUDI, T. et al. **The optimum dietary indispensable amino acid pattern for growing Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry.** British Journal of Nutrition, v.90, p.865-876, 2003.
- SECCO, E. M.; STÉFANI, M. V.; VIDOTTI, R. M. **Substituição da farinha de peixe pela silagem de peixe na alimentação de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*).** Ciência Rural, v.32, n.3, p.505-509, 2002.
- SANDNELL, L.J.; DANEIL, J.C. **Effect of ascorbic acid on RNA levels in short term chondrocyte cultures.** Connect. Tissue Res., v.17, p.11–22, 1988.

- SCHULTER, E.P.; VIEIRA FILHO, J.E.R. **Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de Tilápia**. Texto para discussão/ Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada- Brasília. Rio de Janeiro: Ipea, 2017.
- TANPHAICHITR, V.; HOME, D. W. e BROQUIST, H. P. **Lysine, a Precursor of Carnitine in the Rat**. Journal of Biological Chemistry, v. 246, p. 6364- 6366, 1971.
- TAKASHITA, S; LANNA, E; DONZELE, J. et al. **Níveis de lisina digestível em rações para alevinos de tilápia-do-nilo**. R. Bras. Zootec., v.38, n.11, p.2099-2105, 2009.
- TEIXEIRA, E.A.; D.V. CREPALDI, P.M.C. FARIA, L.P. RIBEIRO, D.C. MELO, e A.C.C. EULER. **Composição corporal e exigências nutricionais de aminoácidos para alevinos de tilápia (*Oreochromis sp.*)**. Revista Brasileira e Saúde e Produção Animal, v. 9, p.239-246, 2008.
- WEBSTER, C.D.; LIM, C. Introduction to Fish Nutrition. In: WEBSTER, C.D.; LIM, C. (Eds.). **Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture**. New York: CABI Publishing, p.388-395, 2002.
- WILSON R.P.; POE W.E. **Relationship of whole and egg essential amino acid patterns to amino acid requirement patterns in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)**. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 80b, p.385 - 388, 1985.
- WILSON, R, P. **Amino acids and proteins**. In: J.E. Halver, and R.w. Hardy, (Ed.). Fish nutrition. Academic Press. Amesterdam, AM, The Netherlands, p. 143-179, 2002.