

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Relação entre aminoácidos essenciais em dietas para pacu (*Piaractus mesopotamicus*) na fase inicial de crescimento utilizando o método de deleção

André Zuffo Boaratti

Jaboticabal, SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Relação entre aminoácidos essenciais em dietas para pacu (*Piaractus mesopotamicus*) na fase inicial de crescimento utilizando o método de deleção

André Zuffo Boaratti

Orientador: Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes

Co-orientador: 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, SP

2018

B662r Boaratti, André Zuffo
Relação entre aminoácidos essenciais em dietas para pacu
(*Piaractus mesopotamicus*) na fase inicial de crescimento utilizando o
método de deleção / André Zuffo Boaratti. – – Jaboticabal, 2018
vi, 43 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura, 2018
Orientador: João Batista Kochenborger Fernandes
Banca examinadora: Dalton José Carneiro, Eduardo Gianini
Abimorad
Bibliografia

1. Nutrição. 2. Peixe. 3. Proteína ideal. 4. Retenção de nitrogênio. I.
Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Relações entre aminoácidos essenciais em dietas para pacu (*Piaractus mesopotamicus*) na fase inicial de crescimento utilizando o método de deleção

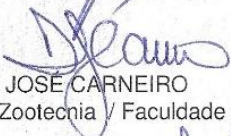
AUTOR: ANDRÉ ZUFFO BOARATTI

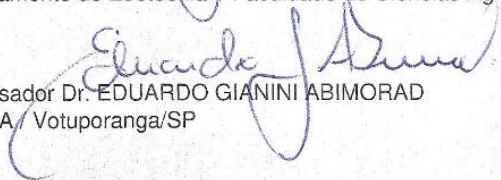
ORIENTADOR: JOÃO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES

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


Pesquisador Dr. EDUARDO GIANINI ABIMORAD
/ APTA / Votuporanga/SP

Jaboticabal, 18 de fevereiro de 2018.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
APOIO FINANCEIRO	iv
Resumo.....	v
Palavras chave.....	v
Abstract	vi
Keywords.....	vi
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. Revisão Bibliográfica	3
4. Material e Métodos.....	13
4.1. Material biológico, Manejo e Condições experimentais.....	13
4.2. Dietas experimentais.....	16
4.3. Coleta de dados.....	21
4.4. Determinação da relação de AA pelo Método de Deleção.....	22
4.5. Análise estatística.....	23
5. Resultados e discussão	23
5.1. Dietas-teste	23
5.2. Desempenho	25
5.3. Retenção de nitrogênio	29
6. Conclusão	35
7. Considerações finais.....	36
8. Referências Bibliográficas	37

DEDICATÓRIA

Aos meus avôs, Oswaldo Zuffo e Pedro Geraldo Boaratti que mesmo não estando fisicamente presentes, se fazem presentes diariamente em meu coração, me tornando a pessoa e o profissional que hoje posso me orgulhar de ser. Deus sabe a importância de vocês nesse importante passo da minha vida.

"If you want to go fast, go alone.

If you want to go far, go together."

African Proverb

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes pela orientação, confiança e todos os ensinamentos.

Ao Dr. Thiago Matias Torres do Nascimento, meu co-orientador, por toda a orientação, ajuda, confiança e palavras de incentivo.

Aos membros da banca de defesa Prof. Dr. Dalton José Carneiro e Dr. Eduardo Gianini Abimorad pela disponibilidade e enorme contribuição para a melhoria e refinamento final deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati e Prof. Dr. Dalton José Carneiro pela enorme contribuição para a melhoria deste trabalho.

À equipe do laboratório de peixes ornamentais dos anos de 2015, 2016 e 2017, pela ajuda intelectual e nas atividades referentes a este projeto. Não citarei nomes para evitar esquecer de algum.

Ao prof. Dr. Euclides Braga Malheiros por todo o tempo dedicado e auxílio nas análises estatísticas.

À profa. Dra. Nilva Kazue Sakomura e toda sua equipe de alunos e funcionários, pela ajuda intelectual e braçal. E pela disponibilização de material de consumo e equipamentos para a elaboração deste projeto.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, ao Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp) e ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura pelo acolhimento e total suporte no mestrado.

Ao meu pai e minha mãe, pelo enorme apoio e incentivo desde o início da realização deste sonho.

A todos da minha família, irmã, avós, tios, tias e primos por todo o incentivo.

À minha filha de quatro patas, Bisteca, que sempre é independente de qualquer coisa, esteve do meu lado nos melhores e piores momentos, sempre muito fiel. Fazendo com que sua alegria contagiante e seu estilo ogro de ser, tornasse qualquer dia ruim em um momento de descontração, risadas e alegria.

À minha noiva, Letícia Aparecida Revolti Praxedes, pela enorme ajuda e determinação durante a fase de alimentação dos peixes, fazendo verdadeiros milagres, e pelo grande apoio e incentivo neste mestrado.

À minha família de amigos que conheci durante a fase final e determinante do mestrado, sem o apoio e ajuda de vocês nada seria possível.

Aos funcionários do Centro de Aquicultura da Unesp, principalmente ao Valdecir, Márcio e Luiz pela ajuda no transporte e em várias outras etapas deste experimento.

- 1 A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste
- 2 trabalho.

APOIO FINANCEIRO

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

FAPESP, bolsa de mestrado (2016/07673-9).



Ajinomoto® do Brasil, doação dos aminoácidos



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



Resumo

Na produção animal busca-se sempre a eficiência, com menor impacto no ambiente e consequentemente maior rentabilidade. Para tal sucesso, uma das principais ferramentas é a alimentação correta e balanceada fornecida para o animal, onde a proteína exerce grande influência. O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma das espécies de peixe nativas mais estudadas e cultivadas principalmente nas regiões sudeste e centro oeste do Brasil, justamente por apresentar características ideais para a aquicultura. Desta forma o presente estudo objetiva estimar, com o uso da metodologia de deleção, a relação dos aminoácidos essenciais (AAE) em dietas para juvenis de pacu, a fim de garantir uma melhor e mais eficiente utilização da proteína fornecida, melhorando consequentemente os aspectos produtivos e ambientais. Sendo assim, 634 juvenis de pacu com peso inicial médio de 6,23g foram distribuídos em 33 tanques de 180L ligados a um sistema de recirculação de água, equipado com filtragem mecânica e biológica, trocador de calor e aeração. O experimento teve duração de 113 dias, onde os peixes foram alimentados até a saciedade aparente. O estudo foi composto por 11 tratamentos com três repetições, em um delineamento inteiramente ao acaso. As 11 dietas experimentais (basal e 10 dietas com um AAE deletado), semipurificadas e extrusadas, foram formuladas pela técnica da deleção e apresentaram a deleção de apenas um AAE para cada tratamento, mantendo-se isonutritivas. Com os valores de retenção de nitrogênio corporal e a quantidade de aminoácido deletado da dieta avaliada obteve-se a seguinte proporção ideal de AAE digestíveis (relativo a lisina): lisina 1,000; metionina 0,089; treonina 0,336; triptofano 0,047; arginina 0,593; histidina 0,154; isoleucina 0,147; leucina 0,358; fenilalanina 0,158; valina 0,282. Os resultados mostraram, com algumas exceções, uma relação semelhante entre as proporções de AAE encontradas neste estudo e em outros estudos utilizando a mesma metodologia para outras espécies de peixes.

Palavras chave

Nutrição, peixe, proteína ideal, retenção de nitrogênio.

Abstract

In animal production, efficiency is always sought, with less environmental impact and consequently increased profitability. One of the main factors that can help in these difficulties is the correct and balanced feeding supplied to the animal, where the protein exerts a great influence. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is one of the most studied and cultivated native fish species mainly in the southeast and central west of Brazil and is considered very suitable for aquaculture because of its ideal characteristics. Thus, the present study aimed to estimate, by the deletion method, the essential amino acids (EAA) ratio for juveniles of pacu in order to ensure better and more efficient use of the provided protein. So 634 juvenile of pacus with an initial average weight of 6.23g were distributed in thirty three 180L tanks connected to a closed water recirculation system, equipped with mechanical and biological filtration, water heater and aeration. The experiment lasted 133 days, and the fish were fed until the apparent satiation. The study was consisted of 11 experimental diets with three replications each, distributed in a completely randomized design. The 11 experimental, semi-purified and extruded diets (basal and 10 diets with EAA deletion), formulated by the deletion technique, present the deletion of just one EAA for each treatment, keeping up isonutrient. With the body nitrogen retention values and the deleted amount of amino acid from evaluated diet, we could obtain the following ideal proportion of digestible EAA (relative to lysine): lysine 1.000, methionine 0.089, threonine 0.336, tryptophan 0.047, arginine 0.593, histidine 0.154, isoleucine 0.147, leucine 0.358, phenylalanine 0.158, valine 0.282. The results showed, with some exceptions, a similar profile between the EAA ratios founded in this study and in other studies using the same methodology for other species of fish.

Keywords

Nutrition, fish, ideal protein concept, nitrogen retention.

1. Introdução

Com a expansão da aquicultura, os principais desafios estão associados a diminuição dos custos sem afetar o desempenho dos animais, ao aumento da produtividade e a redução do impacto dessa produção no ambiente. Um dos aspectos importantes neste contexto é a nutrição de organismos aquáticos, a qual busca, por exemplo, encontrar mecanismos mais precisos para elaboração de dietas equilibradas, fontes alternativas de alimentos e aprimoramento tecnológico dos processos de produção das dietas.

Sabendo que a alimentação corresponde ao maior gasto da produção de peixes, e que a proteína das dietas é um dos maiores responsáveis por este alto custo, os estudos de nutrição que focam nos níveis de proteína, e nos aminoácidos (AA) que as compõem, se tornam uma das principais ferramentas para a melhoria da eficiência na produção e diminuição dos impactos ambientais.

Como os AA são os principais componentes das proteínas, o seu estudo se torna cada vez mais necessário. Os AA não têm papel importante apenas na composição das proteínas, mas também são componentes principais de controle e manutenção das principais vias metabólicas. Alguns aminoácidos não podem ser sintetizados pelo organismo, são esses os aminoácidos essenciais (AAE), que precisam ser ingeridos para que o organismo possa manter, de forma adequada, suas funções metabólicas. Estes são considerados os AA mais importantes a serem estudados e devem ser encontrados nas dietas em quantidades adequadas. Desta forma, pode-se entender o conceito de proteína ideal, como um conjunto de AA com total disponibilidade de digestão e metabolismo, que são determinados em quantidades e proporções que atendam, sem excessos, as exigências do animal para plena realização dos processos de manutenção e da máxima eficiência de crescimento.

Atualmente, uma das principais ferramentas que auxiliam na elaboração de dietas que buscam o conceito de proteína ideal é a suplementação com AA cristalinos. Estes compostos com elevados níveis de concentração e pureza, proporcionam as dietas níveis adequados dos AA desejáveis. Outro ponto positivo é que através da suplementação desses AA sintéticos, torna-se possível utilizar

1 alimentos proteicos de origem vegetal sem perder a eficiência nutricional e
2 diminuindo os custos.

3 Torna-se então necessário o conhecimento dos níveis de AA adequados para
4 pelo menos cada grupo de peixes com importância para a aquicultura. A forma mais
5 rápida de se encontrar esses níveis é a análise do perfil de AA corporal dos animais,
6 partindo do princípio de que o animal é o que ele come. Porém, esta metodologia
7 apresenta apenas valores aproximados, uma vez que não são considerados todos
8 os gastos metabólicos do animal, somente a deposição dos AA nos tecidos
9 corporais. Entretanto, esta metodologia apresenta grande importância por ser
10 rápida e servir como base para iniciar outros estudos.

11 A metodologia mais utilizada para encontrar as exigências de AA é a baseada
12 no efeito dose-resposta. Esta metodologia, através de tratamentos com diferentes
13 níveis do AA estudado, consegue estimar a exigência do mesmo. Porém, para
14 encontrar a exigência de todos os AAE, faz-se necessário que cada AAE seja
15 estudado isoladamente, acarretando altos gastos financeiros e tempo. Além disso,
16 cada experimento pode apresentar indesejáveis particularidades, pois utiliza
17 peixes, dietas e condições ambientais diferentes.

18 Na tentativa de eliminar estas particularidades, o método de deleção tem por
19 objetivo estimar os níveis de cada AAE em um único experimento, mantendo assim,
20 todas as variáveis. Esta metodologia consiste em elaborar tratamentos nos quais
21 as dietas isonutritivas apresentam apenas um AAE deficiente (deletado) em cada
22 tratamento. Desta forma, cada tratamento tem um nível de retenção de nitrogênio
23 (N) corporal específico, de acordo com o AAE deficiente na dieta. Com esta relação
24 entre AAE deletado na dieta e a retenção de N corporal, os níveis de AAE podem
25 ser estimados para a espécie estudada. Assim, o presente estudo tem como
26 objetivo estimar a relação nutricional entre os AAE para melhor desempenho
27 zootécnico de juvenis de pacu, utilizando a metodologia de deleção.

28 O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma das espécies de peixes nativos
29 mais utilizada na piscicultura nacional, principalmente na região sudeste, pois
30 suporta temperaturas mais baixas se comparado com outras espécies do grupo dos
31 peixes redondos. A espécie ainda apresenta alto valor comercial, carne saborosa,
32 rusticidade, rápido crescimento, e fácil adaptação em cativeiro, favorecendo ainda
33 mais sua produção e comercialização. Outra característica favorável está no seu
34 hábito alimentar onívoro e na fácil aceitação de alimento inerte.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer as relações dos dez aminoácidos essenciais (AAE), lisina, metionina, treonina, triptofano, arginina, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina e valina (LYS, MET, THR, TRP, ARG, HIS, ILE, LEU, PHE e VAL), para favorecer o balanceamento de dietas para pacu durante a fase inicial de crescimento e consequentemente melhorar o desempenho zootécnico.

2.2 Objetivos Específicos

Promover a deficiência de um AAE para cada dieta teste a fim de promover efeito na retenção de N corporal.

Relacionar a deficiência do AAE com a retenção de N corporal, pelo método de deleção, para encontrar a proporção ideal dos dez AAE visando favorecer o balanceamento de dietas para pacu durante a fase inicial de crescimento e consequentemente aumentar o desempenho zootécnico.

3. Revisão Bibliográfica

Atualmente a aquicultura, encontra-se em grande expansão (FAO, 2016; FAO, 2017), com desafios na diminuição de custos de produção, aumento da produtividade e redução do impacto ambiental. Para solucionar estes problemas, faz-se necessário o aprimoramento dos vários segmentos da cadeia e seus processos de produção, dentre os quais um dos mais importantes é a nutrição de organismos aquáticos. A ausência de boas práticas de manejo alimentar, altos custos e a má qualidade das dietas, representam um grande obstáculo na aquicultura. Como resultado, tem-se a ocorrência de animais com saúde e crescimentos comprometidos, uma vez que não terão o correto fornecimento dos nutrientes. A alimentação inadequada pode provocar também impactos ambientais, uma vez que nutrientes em excesso em uma dieta desbalanceada ou sobras de ração originárias de um elevado arraçoamento permanecerão no ambiente, gerando eutrofização da água. Isso tudo vai resultar em grandes perdas

1 econômicas para o segmento (Peres e Oliva-Teles, 2005; Li et al., 2009; Resende,
2 2009; Furuya, 2010; Cyrino et al., 2010; Diógenes et al., 2015; FAO, 2016; FAO,
3 2017).

4 A alimentação é sem dúvida o componente de maior custo na produção animal
5 (Hayashi et al., 2002; Scorvo-Filho, 2003; de Andrade et al., 2005; Sidonio et al.,
6 2012; dos Santos et al., 2014), podendo atingir até 70% dependendo da espécie
7 cultivada (Sidonio et al., 2012), sendo a proteína correspondente a uma das
8 maiores frações dos custos dos alimentos (Li et al., 2009; Wilson, 2002). Assim,
9 uma dieta em que a proteína esteja em quantidade correta e com proporções
10 balanceadas de aminoácidos permitirá ao animal apresentar um aproveitamento
11 muito eficaz do nitrogênio fornecido. Este menor desperdício de N auxiliará na
12 redução de gastos com alimentação e em maior rentabilidade. Além disso, a
13 diminuição das excretas nitrogenadas levará a uma menor eutrofização dos
14 mananciais, redução dos impactos ambientais e manutenção da boa qualidade da
15 água, consequentemente beneficiando a produção (Rollin et al., 2003; Peres e
16 Oliva-Teles, 2005; Li et al., 2009; Furuya, 2010; Macedo e Sipaúba-Tavares, 2010;
17 Diógenes et al., 2015). Com isso, a realização de estudos nessa área tem sido
18 incentivada pelos diversos segmentos da cadeia produtiva e ambiental, para tornar
19 a produção de peixes mais sustentável.

20 Outro ponto a ser considerado está na matriz da proteína utilizada na
21 formulação das dietas. Sabe-se que a fonte de proteína que mais se aproxima das
22 exigências dos peixes é a farinha de peixe, o que a torna amplamente empregada.
23 Porém, esse produto está cada vez mais limitado diante do constante e intenso
24 crescimento da piscicultura no mundo, somada a escassez das fontes naturais de
25 pescado, além de apresentarem grande sazonalidade geográfica em relação a sua
26 qualidade e composição, e serem um potencial vetor de doenças (Li et al., 2009;
27 Trushenski et al., 2006). Sendo assim, outras fontes de proteína, principalmente as
28 de origem vegetal, se fazem necessárias. Essas fontes alternativas de proteína
29 normalmente apresentam custos inferiores ao da farinha de peixe, mas para utilizá-
30 las é necessário determinar a relação ideal de aminoácidos essenciais para as
31 espécies alvo, uma vez que para o uso eficiente dessas fontes de proteína é preciso
32 fazer correções no balanceamento de AAE na dieta (Clarke e Wiseman, 2000; Li et
33 al., 2009; Peres e Oliva-Teles, 2005).

Um dos principais componentes, tanto estrutural como visceral, dos organismos animais são as proteínas. Como os AA são os blocos de construção das proteínas, as células necessitam de sua presença para a síntese de polipeptídios (Furuya, 2010). Os AA não apresentam apenas papel na composição e síntese de proteínas, mas também são componentes principais de controle e manutenção das principais vias metabólicas que regulam a manutenção, crescimento, reprodução, respostas imunes, comportamento, estresse, osmorregulação, dentre muitos outros (Li et al., 2009). Sendo assim, pode-se afirmar que os animais não possuem exigência nutricional de proteína, mas sim de quantidades e proporções adequadas de AA (Furuya, 2010), para garantir a máxima retenção de N (deposição de proteína muscular, que é o mais desejado na produção) e a manutenção e saúde dos animais (Green e Hardy, 2002; Peres e Oliva-Teles, 2009; Furuya, 2010; Wu, 2014), além de reduzir a perda de N por excreção, acarretando uma menor degradação do ambiente (Green e Hardy, 2002; Peres e Oliva-Teles, 2009). O catabolismo de N em excesso também acarreta um gasto energético desnecessário. Com níveis adequados de N na dieta, o peixe poderá utilizar essa energia gasta desnecessariamente para fins mais nobres, como o ganho de proteína muscular, por exemplo.

Assim, o conceito de proteína ideal, inicialmente definido por Mitchell (1964), refere-se a um conjunto de AA com total disponibilidade de digestão e metabolismo, que são determinados em quantidades e proporções que atendam, sem excessos, as exigências do animal para plena realização dos processos de manutenção e da máxima eficiência de crescimento por meio da retenção de N (Green e Hardy, 2002; Boisen, 2003; Peres e Oliva-Teles, 2009; Furuya, 2010).

Quando se pensa em exigência de AA, deve-se pensar tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Por exemplo, é possível pensar em quais AA são necessários para garantir que determinadas vias metabólicas ocorram no animal (promovendo o crescimento ou apenas a manutenção, a reprodução, melhoria da resposta imune, etc), mas ao mesmo tempo, deve-se pensar na quantidade desses mesmos AA para se atingir os resultados esperados. Os dois enfoques são muito importantes e estão sendo estudadas na produção animal (Wu, 2013; Wu, 2014).

Do ponto de vista qualitativo, os AA podem ser agrupados de acordo com a sua capacidade de síntese em relação a sua utilização (Tabela 1). Os AA considerados não-essenciais (AANE) são aqueles que, por definição, podem ser

1 sintetizados suficientemente pelo organismo para atender todas as exigências do
2 animal para um máximo crescimento, manutenção e saúde (Li et al., 2009; Wu,
3 2013; Wu, 2014). Pouco se sabe a respeito de requerimento de AANE para peixes,
4 aves e mamíferos (Wu, 2014). Crescentes evidências mostram que dependendo
5 do ambiente, alguns AANE não são sintetizados suficientemente em frangos e
6 suínos, a ponto de não expressarem todo o potencial genético dos mesmos (Wu,
7 2014). Desta forma, alguns autores dividem este grupo, enquadrando alguns
8 desses AANE em um segundo grupo, o dos AA condicionalmente essenciais.
9 Dependendo das condições em que o animal está, a utilização deste grupo de AA
10 pode ser superior ou inferior ao potencial de síntese do animal e, desta forma, sua
11 ingestão pode ou não ser necessária de acordo com as condições em que o animal
12 se encontra (Li et al., 2009).

13 Há também os AA que não podem ou não são suficientemente sintetizados
14 pelas células animais, são estes os denominados aminoácidos essenciais (AAE).
15 Eles devem ser incluídos nas dietas para garantir as funções fisiológicas das
16 células, tecidos, e todo o corpo (Li et al., 2009; Wu, 2013; Wu, 2014). Atualmente,
17 costuma-se considerar dez AA como sendo essenciais (Tabela 1) (Li et al., 2009;
18 Wu, 2013; Wu, 2014), que serão alvo do presente estudo, pois apresentam funções
19 muito importantes para o organismo, sendo fundamental sua disponibilidade na
20 dieta.

21 A arginina costuma apresentar altos níveis de exigência em dietas para
22 peixes, pois é um dos AA mais versáteis como precursor de diversas sínteses,
23 como a da proteína, compondo os peptídeos que as formam, de tecidos fluídos,
24 como por exemplo na forma da fosfoarginina, principal receptor de ATP, ácido
25 nítrico, uréia, poliaminas, prolina, glutamato, creatina e agmatina em animais
26 terrestres. Também apresenta papel nas funções reprodutivas e na regulação
27 endócrina, apresentando, por exemplo, maior importância na ativação da insulina
28 que a própria glicose (Li et al., 2009).

29 Peixes expostos a bactérias apresentaram diferentes taxas de sobrevivência
30 de acordo com a quantidade de arginina presente nas dietas (Buentello and Gatlin,
31 2001), sendo considerada portanto, como promotora da resposta imune (Li et al.,
32 2009).

Tabela 1. Agrupamento¹ dos aminoácidos de acordo com a relação entre síntese e utilização no organismo dos peixes.

AA Essencial (AAE)	AA Não Essencial (AANE)	AA Condicionalmente Essencial
Arginina (Arg)	Alanina (Ala)	Cisteína (Cys)
Histidina (His)	Asparagina (Asn)	Glutamina (Gln)
Isoleucina (Ile)	Aspartato (Asp)	Hidroxiprolina ¹
Leucina (Leu)	Glutamato (Glu)	Prolina (Pro)
Lisina (Lys)	Glicina (Gly)	Taurina ¹
Metionina (Met)	Serina (Ser)	
Fenilalanina (Phe)	Tirosina (Tyr)	
Treonina (Thr)		
Triptofano (Trp)		
Valina (Val)		

¹Segundo Li et al. (2009).

A histidina é muito abundante na albumina do plasma dos peixes, e também em sua musculatura, na forma de AA livre ou na forma de carnosina, um importante antioxidante sintetizado a partir da alanina e histidina. A histidina faz parte do metabolismo ligado a síntese de DNA e de proteínas. Atua como tampão não carbonatado para mudanças de pH corpóreo relacionadas, por exemplo, à hipóxia (Li et al., 2009).

É possível que a exigência nutricional de histidina, assim como seus processos metabólicos envolvidos, seja regulada por muitos fatores ambientais e endócrinos. Estudos mostraram que sua suplementação na dieta aumenta a concentração de histidina intramuscular, resultando na melhora da qualidade do filé em textura e sabor (Ogata, 2002; Førde-Skjærvik et al., 2006; Li et al., 2009).

A Isoleucina, leucina e a valina compõem o grupo dos AA de cadeia ramificada. Os três costumam ser encontrados compondo de 18 a 20% dos AA presentes em plantas e animais. A leucina é considerada o AA funcional da síntese proteica muscular, e inibidora de proteólise (hidrólise de proteína com ruptura de ligações peptídicas) em mamíferos. Porém em animais aquáticos, tal função ainda não foi investigada (Li et al., 2009; Nakashima et al., 2007). Partindo deste princípio, é extremamente importante sua existência em quantidades adequadas nas dietas

1 de peixes, uma vez que a carne do peixe, musculatura, é o produto final a ser
2 vendido, e quanto maior a quantidade de carne, maior será a lucratividade.

3 A lisina é o AA mais limitante para a síntese e retenção de proteína, e quase
4 sempre um dos AA mais limitantes nas dietas para peixes (Bicudo et al., 2009; Li
5 et al., 2009; Abimorad et al., 2010; Furuya, 2010), principalmente se utilizados
6 alimentos vegetais na sua composição, afetando de forma significativa o ganho de
7 peso e saúde do animal. Porém, há uma variedade de compostos produzidos pela
8 indústria na forma pura ou com altos níveis de lisina. Estes já são muito comuns
9 nas indústrias de ração, garantindo que o ganho de peso e saúde não sejam
10 afetados por uma deficiência do AA, viabilizando, assim, a utilização de proteína de
11 origem vegetal e diminuindo custos sem afetar o desempenho produtivo do peixe
12 (Mai et al., 2006; Li et al., 2009). Sua suplementação também afeta positivamente
13 as respostas imunes e a excreção de amônia e fósforo na água (Cheng et al., 2003).
14 Um dos mais importantes compostos sintetizados a partir da lisina é a carnitina,
15 responsável pelo transporte dos ácidos graxos de cadeia longa até as mitocôndrias
16 para a produção de energia (Bicudo et al., 2009; Li et al., 2009).

17 A metionina é considerada um dos AA mais limitantes para peixes (Lovell,
18 1989; Li et al., 2009; Furuya, 2010). É a principal fonte de enxofre para muitos
19 componentes celulares e é extremamente necessária para a formação de proteínas
20 (Alam et al., 2005). É precursora da biossíntese de colina, tiamina e cistina e, no
21 fígado, da síntese da cisteína e taurina (Alam et al., 2005; Li et al., 2009). A
22 metionina, cisteína e taurina apresentam papéis importantes nas regulações de
23 processos metabólicos. A taurina apresenta importante papel na digestão de
24 gordura, defesas antioxidantes, osmorregulação celular e no desenvolvimento dos
25 sistemas visuais, neurais e musculares.

26 A metionina na forma cristalina, produzida industrialmente através de
27 processos químicos, é utilizada como forma de suplemento em rações animais (Li
28 et al., 2009), principalmente quando são usados subprodutos da soja, nos quais a
29 presença desses AA sulfurados é deficiente (Furuya et al., 2001; Furuya, 2010).

30 A fenilalanina apresenta papel como precursora da síntese de tirosina, AA
31 considerado portanto não essencial, e que tem funções relacionadas a precursores
32 de hormônios, neurotransmissores e melanina. Estas moléculas apresentam
33 importantes papéis regulatórios. Desta forma, a suplementação de fenilalanina

1 somada ou não a tirosina pode influenciar a pigmentação, ganho de peso,
2 imunidade e sobrevivência (Li et al., 2009).

3 A treonina não vem recebendo atenção dos pesquisadores quanto às suas
4 funções e potencialidades para peixes. Há alguns estudos relacionados a sua
5 exigência mínima em dietas para peixes, por conta da deficiência em proteínas de
6 origem vegetal e por não ser sintetizado pelo organismo (Li et al., 2009).

7 O triptofano pode ser convertido em serotonina e melatonina,
8 neurotransmissor e antioxidante respectivamente (Fang et al., 2002; Li et al., 2009;
9 Wolkers et al., 2012). Níveis baixos de serotonina podem ser relacionados ao
10 aumento de agressividade e canibalismo em peixes (Li et al., 2009; Wolkers et al.,
11 2012; Wolkers et al., 2014; Backström & Winberg, 2017). A não suplementação
12 deste EAA afeta o ganho de peso, consumo, retenção de nitrogênio e imunidade.
13 Desta forma, sua suplementação na dieta pode diminuir tais comportamentos e
14 melhorar o desempenho e saúde de peixes. Estudos vem apresentando bons
15 resultados na sua utilização como estratégia nutricional para diminuição de stress
16 durante manejos (Vijayan et al., 1996; Li et al., 2009; Wolkers et al., 2012; Wolkers
17 et al., 2014).

18 Uma forma de atender as exigências proteicas dos peixes ao formular dietas
19 ideais é a utilização de AA cristalinos, tanto os essenciais quanto não essenciais,
20 uma vez que podem proporcionar melhor desempenho dos animais e menor
21 impacto no ambiente, por melhorarem o balanceamento e aproveitamento das
22 dietas, sendo este o princípio da nutrição de precisão. Consequentemente o
23 produtor obterá vantagem econômica (Furuya, 2010). Há algumas dificuldades na
24 utilização de AA cristalinos, principalmente quando utilizados em maiores
25 proporções. Como o AA cristalino apresenta-se em forma totalmente disponível, a
26 lixiviação deles quando a ração umedece torna-se consideravelmente alta. Outro
27 ponto está na maior e mais rápida absorção desses AA no organismo, gerando
28 picos indesejáveis de AA e na obstrução de absorção pelos AA cristalinos de outros
29 AA. Desta forma, sua utilização não pode ser indiscriminada e requer certo grau de
30 atenção.

31 Já existe algumas formas de solucionar o problema causado pela alta
32 lixiviação dos AA cristalinos na água e sua alta disponibilidade no organismo. Uma
33 das técnicas mais conhecidas e utilizados é a realização do “coating” de AA. O
34 procedimento consiste em promover uma microencapsulação dos AA cristalinos

1 por meio de um material que apresenta lenta degradação e absorção no organismo,
2 como por exemplo o Agar Agar (Mambrini e Kaushik, 1994). O procedimento tem
3 como objetivo tornar a absorção dos AA cristalinos mais lenta no lúmen intestinal,
4 promovendo a movimentação mais próxima daquela encontrada nas proteínas
5 naturais dos alimentos (Mambrini e Kaushik, 1994; Schuhmacher et al., 1997;
6 Fournier et al., 2002; Segovia-Quintero e Reigh, 2004; Alam et al., 2005; Peres e
7 Oliva-Teles, 2005; Peres e Oliva-Teles, 2009). Além disso, o “coating” reduz a
8 perda destes nutrientes na água, fazendo com que ele permaneça com qualidade
9 por mais tempo, reduzindo a lixiviação dos aminoácidos (Li et al., 2009).

10 Normalmente, utiliza-se o perfil de AA do corpo do animal para definir a
11 exigência de AA para espécies sobre as quais ainda não há estudos de exigência
12 destes nutrientes. Porém, mesmo indicando valores aproximados, esta estimativa
13 pode não condizer com a real exigência do animal (Green e Hardy, 2002; Rollin et
14 al., 2003; Peres e Oliva-Teles, 2009; Furuya, 2010; Diógenes et al., 2015). Esta não
15 considera gastos com manutenção, nem as diferenças entre a exigência de AAE para
16 manutenção e crescimento. Mas, mesmo com estas limitações, esta técnica é muito
17 utilizada como um start para a realização de experimentos a fim de alcançar a
18 relação ideal de AAE (Green e Hardy, 2002; Peres e Oliva-Teles, 2009). Furuya
19 (2010) afirma que as diferenças entre os valores determinados pelo perfil de AA
20 corporal e as exigências de AAE estimadas por experimentos (ex. dose-resposta)
21 devem ser considerados, já que podem representar variações no desempenho
22 produtivo e, conseqüentemente, na resposta econômica em pisciculturas
23 comerciais.

24 Para determinar a relação entre AA em rações, é comumente utilizada a lisina
25 como padrão para relacionar com os demais AA, uma vez que é utilizada com
26 referência exclusivamente para a produção de proteína, sendo o AAE encontrado
27 em maior quantidade no corpo da maioria das espécies de peixes e, de forma geral,
28 é o AA mais limitante para estes animais (Green e Hardy, 2002; Peres e Oliva-
29 Teles, 2009; Abimorad et al., 2010; Furuya, 2010).

30 A metodologia mais utilizada, até o momento, para estimar as exigências de
31 AAE é a dose-resposta. Porém, esta demanda uma grande quantidade de tempo e
32 recursos financeiros, pois necessita de um grande número de experimentos, uma
33 vez que terá que ser realizado um para cada AAE (Green e Hardy, 2002; Rollin et
34 al., 2003; Peres e Oliva-Teles, 2009; Diógenes et al., 2015). Essa técnica também

1 pode apresentar algumas divergências nos valores finais estimados devido a cada
2 experimento apresentar características diferentes, como composição das dietas
3 basais, tamanho e idade dos peixes, variações genéticas, lotes variados de peixes,
4 taxa de alimentação e condições de cultivo (Green e Hardy, 2002; Rollin et al.,
5 2003).

6 Outra metodologia que está sendo utilizada com excelentes resultados para
7 determinação ideal de AAE é o método de deleção, que consegue minimizar os
8 problemas metodológicos apresentados acima, uma vez que todos os AAE são
9 avaliados ao mesmo tempo, local, lote de peixe e dieta basal. Por essas vantagens,
10 esta técnica apresenta um maior grau de uniformidade e consistência, que pode
11 intensificar uma maior precisão ao estabelecer as relações ideais dos AA (Green e
12 Hardy, 2002; Rollin et al., 2003; Peres e Oliva-Teles, 2009; Diógenes et al., 2015).
13 Em tilápias-do-Nilo, por exemplo, Furuya (2010) necessitaram de diversos
14 experimentos para determinar a relação de AAE, enquanto que Diógenes et al.
15 (2015) em apenas um único experimento, determinaram a relação ideal dos
16 mesmos AAE, demonstrando que, de forma muito mais rápida, menos trabalhosa
17 e onerosa, pôde ser estabelecido tal perfil.

18 Esta metodologia foi inicialmente desenvolvida para uso em suínos (Fuller et
19 al. 1989; Wang e Fuller 1989), e vem sendo utilizada com ótimos resultados e
20 aceitação em uma crescente variedade de peixes, como salmonídeos (Green e
21 Hardy, 2002; Rollin et al., 2003), dourada (Peres e Oliva-Teles, 2009) e tilápia-do-
22 Nilo (Diógenes et al., 2015).

23 A deleção determina a relação ideal de AAE com base no método utilizado
24 por Wang e Fuller (1989). O conceito baseia-se no fato de que a diminuição de um
25 AAE não limitante não tem efeito sobre o ganho de N. No entanto, quando um único
26 AA é limitante na dieta, a taxa de crescimento proteico corporal (retenção de N)
27 estará diretamente relacionada a este AA limitante. Assim, cada mudança da
28 retenção de N será influenciada pela deleção de cada AA testado. O conceito pode
29 ser facilmente entendido graficamente por meio de um modelo linear simples
30 (Figura 1) proposto por estes autores. Neste, o tratamento A corresponde ao AAE
31 mais limitante, pois resultou na menor retenção de N. O tratamento C não
32 apresentou redução na retenção de N, portanto, este AAE está em excesso, em
33 pelo menos, na mesma quantidade em que foi deletado. Já o tratamento B
34 apresentou uma quantia intermediária de retenção de N. Desta forma, a quantidade

que ficou em excesso deste AAE pode ser interpolada proporcionalmente com a dieta A e C, obtendo a proporção ideal do AAE de B.

Essas relações serão usadas para calcular o perfil ideal dos AAE para a espécie estudada em cada dieta na qual todos os AAE são igualmente limitantes, pois, com as mudanças no ganho de N em relação a deleção individual do AAE, torna-se possível o cálculo da dieta padrão, baseado no pressuposto da proteína ideal (Green e Hardy, 2002; Rollin et al., 2003; Peres e Oliva-Teles, 2009; Diógenes et al., 2015).

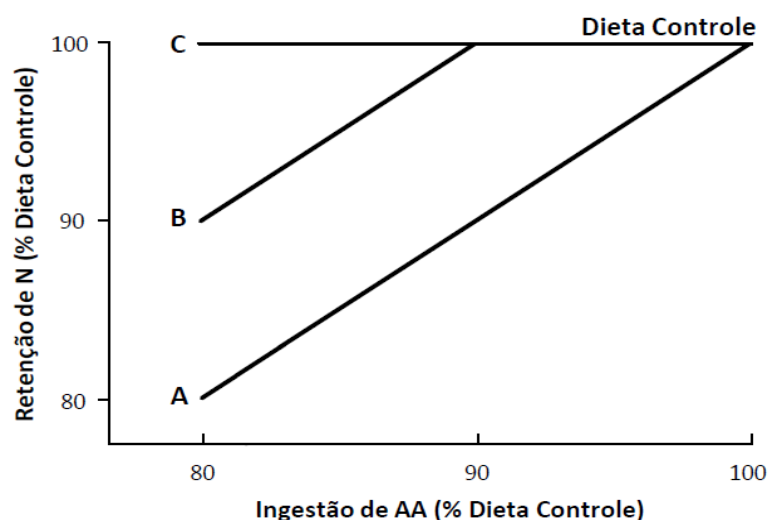


Figura 1. Princípio do método de determinação dos níveis de aminoácidos por dedução. A é o primeiro aminoácido limitante; B e C são aminoácidos que estão respectivamente 10 e 20% em excesso em relação a A (adaptado de Wang e Fuller 1989).

A resposta de crescimento de um animal depende de vários fatores que incluem genética, idade, saúde, fatores ambientais, oferta de alimento, proteína e energia da dieta (Cowey 1994; Boisen et al. 2000; Green e Hardy, 2002). Igualando todos os fatores e alterando apenas um deles, pode ser possível entender o efeito deste fator pela resposta que o animal apresentará. Seguindo essa premissa, o presente estudo teve como objetivo, verificar a resposta de crescimento de juvenis de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com diferentes dietas deficientes em determinados AAE e desta forma determinar a relação nutricional destes AAE para melhor desempenho zootécnico, utilizando como base a retenção de N corporal.

Para este estudo foi utilizado o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que tem origem na Bacia do Rio Prata, composto pelas Sub-bacias dos Rios Paraguai, Uruguai e Paraná. É uma das espécies nativas mais estudadas para aquicultura, principalmente na região sudeste do país (Fiod et al., 2010; Abimorad e Carneiro, 2004). Apresenta grande destaque no cenário da aquicultura brasileira, pois trata-se de um animal rústico, de alto valor comercial, com uma carne saborosa, rápido crescimento, de fácil adaptação ao ambiente de criação. É um peixe de hábito alimentar onívoro e aceita muito bem a alimentação inerte (Fernandes et al., 2000; Abimorad e Carneiro, 2004; Abimorad e Carneiro, 2007; Abimorad et al., 2010; Fiod et al., 2010), sendo também muito procurado como peixe para pesca esportiva.

No estômago de pacus selvagens, pode ser encontrada uma grande variedade de alimentos, desde grandes quantidades de frutas, sementes, plantas e algas até resquícios de peixes, moluscos e crustáceos (Silva, 1985), indicando que trata-se de um peixe onívoro com tendência frugívora (Fernandes et al., 2001; Abimorad e Carneiro, 2004; Abimorad e Carneiro, 2007; Abimorad et al., 2010). Sendo assim, mesmo que rentável, a criação de pacu em cativeiro pode evoluir significativamente no conceito de produção animal sustentável, fazendo necessário, por exemplo, o conhecimento das exigências alimentares da espécie, a fim de elaborar dietas adequadas quanto ao seu aproveitamento e a maximização de crescimento (Abimorad e Carneiro, 2004).

4. Material e Métodos

4.1. Material biológico, Manejo e Condições experimentais

O ensaio foi realizado no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP), em Jaboticabal, no Laboratório de Modelagem em Nutrição de Peixes sob autorização da Comissão de ética no uso de animais - CEUA (protocolo nº 009999/14). O experimento foi distribuído em delineamento inteiramente ao acaso, composto por 11 dietas experimentais com três repetições.

Foram utilizados 594 juvenis de pacu com peso médio inicial de $6,23 \pm 0,40$ g, estocados em um sistema de recirculação de água (Figura 2), equipado com filtragem mecânica e biológica, trocador de calor ($27,8 \pm 0,9$ °C) e aeração (Figura 3), composto por 33 caixas de 180L, com vazão de 120 litros/caixa/hora. 40 peixes

com o mesmo padrão de peso médio foram utilizados para composição corporal inicial. Antes do início do período experimental os animais foram aclimatados por 15 dias recebendo a dieta controle.



Figura 2. Sistema de recirculação composto por 36 unidades experimentais no total.

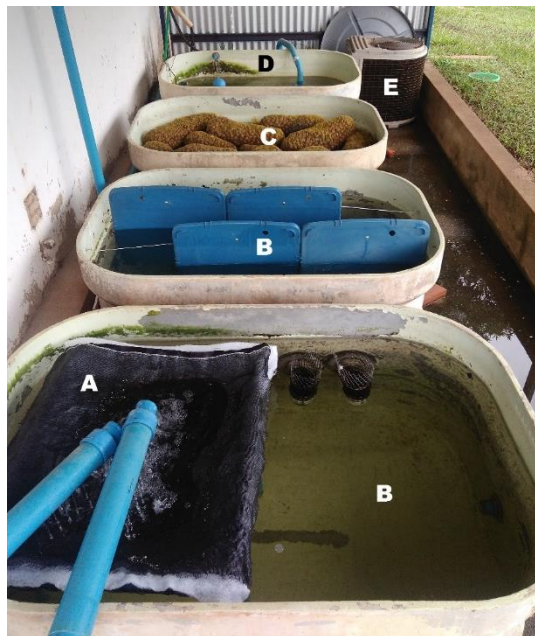


Figura 3. Sistema de filtragem da água. A. Filtro mecânico de tela e lã acrílica; B. Caixas decantadoras; C. Filtro biológico de argila expandida; D. Caixa de distribuição da água para tocador e unidades experimentais; E. Trocador de calor.

Os peixes foram classificados na faixa de peso desejada e após o período de aclimação, com 24 horas de jejum, 18 peixes foram distribuídos aleatoriamente por tanque. Após distribuição, os peixes foram anestesiados em solução de 60mg L-1 Benzocaína (ethyl-p-aminobenzoato) e a biomassa de cada unidade experimental foi verificada em balança analítica de precisão ($\pm 0,01g$). Passados 24 horas da biometria, deu-se início ao período de experimento. As dietas experimentais foram fornecidas aos pacus até a saciedade aparente duas vezes ao dia (8h00min, 17h00min).

Para garantir que a qualidade da água estivesse dentro dos padrões desejados para o pacu, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados. O pH, e o oxigênio foram mensurados semanalmente por meio do pHmetro YSI-EcoSense® pH100A e oxímetro YSI-EcoSense® DO200A. As temperaturas

máxima e mínima foram observadas diariamente por meio de termômetro analógico e digital. As concentrações de amônia, nitrato e nitrito foram determinadas semanalmente pelo método colorimétrico, com leitura no espectrofotômetro, de acordo com Koroleff (1976), Golterman et al. (1978) e Mackereth et al. (1978), respectivamente. Nas Figuras 4, 5 e 6, é possível observar que todos os parâmetros físico-químicos da água mantiveram-se dentro do recomendado para criação de peixes tropicais, permanecendo sempre dentro das faixas consideradas ideais de cultivo (Sipaúba-Tavares, 1995). A temperatura média foi de $27,8^{\circ}\text{C} \pm 0,9$, pH médio de $7,87 \pm 0,23$ e a média de oxigênio dissolvido de $6,26 \pm 0,81$. Para manter os níveis de matéria orgânica não diluída baixos, as unidades experimentais foram sifonadas quando julgado necessário, e o filtro mecânico limpo pelo menos duas vezes ao dia, antes das alimentações.

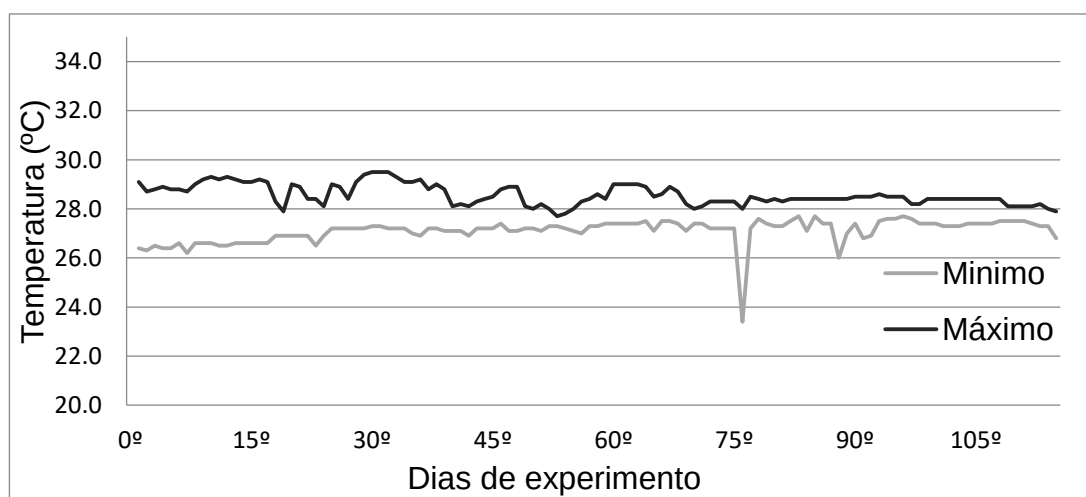


Figura 4. Temperatura máxima e mínima diária do sistema.

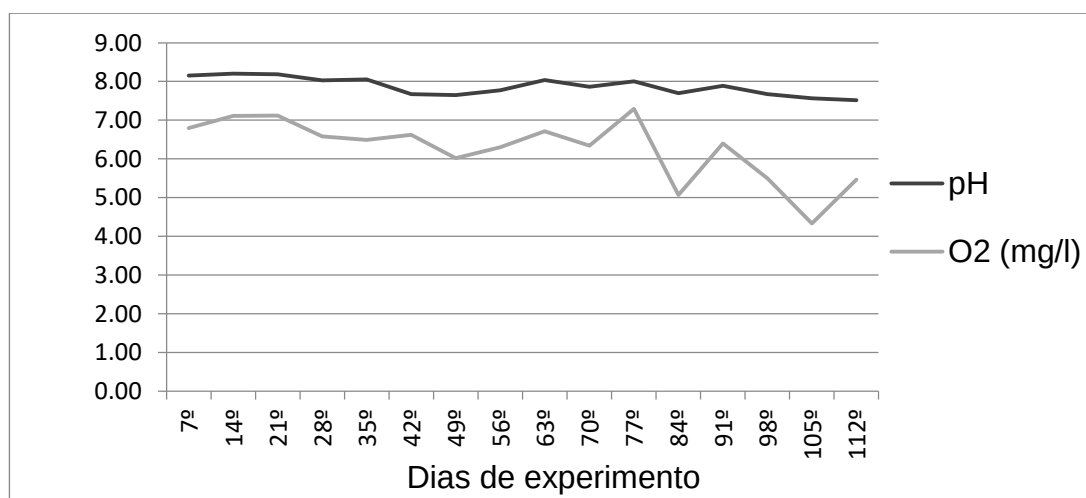


Figura 5. Níveis de pH e oxigênio dissolvido na água do sistema

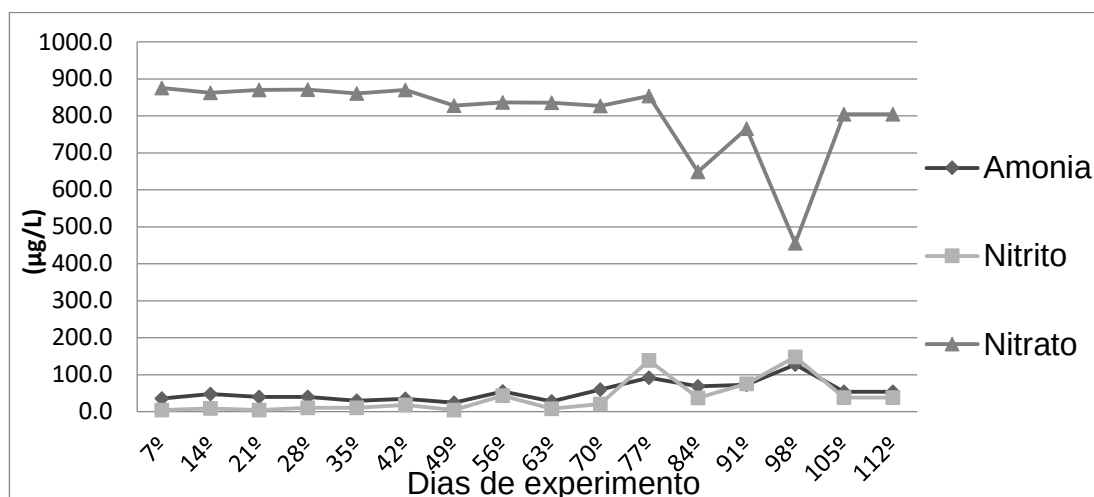


Figura 6. Concentração de compostos nitrogenados na água do sistema

4.2. Dietas experimentais

Para a formulação das dietas, os ingredientes foram previamente analisados (Tabela 2) quanto aos níveis de matéria seca, proteína bruta, lipídios, cinzas e energia bruta (AOAC, 2000), e enviados para um laboratório comercial para análise de teor de AA por espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS). Em seguida, com auxílio do software SuperCrac 6.1 Premium, seguindo as exigências nutricionais para pacu descritas por Fernandes et al. (2000); Fernandes et al. (2001); Abimorad e Carneiro (2004); Abimorad e Carneiro (2007), Abimorad et al. (2008) e Abimorad et al. (2010), foram formuladas 11 dietas experimentais, sendo uma dieta controle (DC) para atender 100% das exigências nutricionais do pacu, e dez dietas testes limitantes em 45% (DL) em um AAE cada uma (DL-LYS, DL-MET, DL-THR, DL-TRP, DL-ARG, DL-HIS, DL-ILE, DL-LEU, DL-PHE e DL-VAL).

Para a elaboração das 11 dietas (Tabela 3), uma dieta basal (DB) à base de alimentos convencionais foi formulada a fim de atender todas as exigências nutricionais. Esta dieta basal compôs 55% das 11 dietas testes, ou seja, atendendo 55% das exigências nutricionais para pacus através de alimentos convencionais. Os 45% restantes foram compostos por alimentos purificados assim como um mix de AA cristalinos. Desta forma, a DC apresentou uma composição nutricional final de 100% da exigida para pacu, e as DL apresentaram também 100% da composição nutricional, com exceção do AAE a ser testado, que não foi incluído no mix de AA, gerando assim, a deleção desejada de 45% apenas do AA testado. Para

1 suprir à quantidade deletada do AAE testado, de forma que as dietas continuassem
2 com a mesma quantidade de nitrogênio da DC, foi adotada a suplementação de
3 três AA não essenciais (glicina, ácido glutâmico e alanina) nas mesmas proporções.
4 Sendo assim, todas as dietas formuladas são isonutritivas e apresentam a mesma
5 quantidade de alimentos naturais e purificados (Tabela 3).

6 Seguindo a metodologia proposta por Mambrini e Kaushik (1994), com
7 algumas adaptações, foi realizado um “coating” com ágar-ágar nos AA cristalinos.
8 Foi aquecido a 100°C uma quantidade de água correspondente a 21% do peso da
9 dieta para que o ágar (1% da dieta) possa ser diluído, após diluição a solução foi
10 resfriada naturalmente até atingir 45°C para que os AA cristalinos possam ser
11 misturados a solução sem que sejam afetados pela temperatura. Para melhor
12 homogeneização do ágar com os AA cristalinos, a mistura foi batida em
13 processador de alimentos industrial. Após, o “coating” foi homogeneizado aos
14 demais ingredientes e então as dietas foram extrusadas em extrusora Extec,
15 modelo Ex Micro, com dimensões de grânulos de 4 a 6 mm e de 2 a 3 mm de
16 diâmetro, em seguida secas em estufa a 55°C e mantidas em câmara fria (-15°C)
17 até utilização. As dietas foram analisadas quanto aos níveis de matéria seca,
18 proteína bruta, energia, lipídios e cinzas (AOAC, 2000). Também foram realizadas
19 análises do teor de aminoácidos por hidrólise ácida e cromatografia de troca iônica
20 (HPLC) no laboratório comercial Invivo Labs, Descalvado, Brasil (Tabela 4).

21

Tabela 2. Composição proximal (AOAC, 2000) e aminoacídica (NIRS) dos ingredientes das dietas experimentais

<i>Composição analisada</i>		Farinha de peixe	Glúten de milho	Milho	Farelo de Trigo	Amido de milho	Celulose purificada	Açúcar	Óleo de soja
Matéria seca	%	93,84	89,22	87,01	87,82	88,50	93,00	99,00	100,00
Proteína Bruta	%	56,20	63,21	8,50	15,40	-	-	-	-
Proteína Digestível ¹	%	47,55	60,43	7,29	13,51	-	-	-	-
Lipídio Bruto	%	10,95	1,85	5,33	4,33	-	-	-	100,00
Lipídio Digestível ¹	%	8,78	1,68	3,68	2,92	-	-	-	85,07
Energia Bruta	kcal/kg	4024	5248	3961	4101	3583	3880	4008	9379
Energia Digestível ¹	kcal/kg	2998	4513	3002	3051	3582	-	3808	7813
ENN ²	%	22,59	15,50	67,01	42,47	88,50	25,00	98,86	-
Fibra Bruta	%	0	3,1	2,00	16,18	-	68,00	-	-
Matéria Mineral	%	4,10	5,56	4,17	9,44	-	-	0,14	-
Cálcio Total ³	%	4,70	0,03	0,03	0,14	-	-	-	-
Fósforo Disponível ³	%	1,94	0,29	0,24	0,90	-	-	-	-
Metionina Bruta	%	1,24	1,49	0,17	0,24	-	-	-	-
Metionina Digestível ¹	%	1,11	1,34	0,14	0,20	-	-	-	-
Lisina Bruta	%	3,11	1,15	0,24	0,65	-	-	-	-
Lisina Digestível ¹	%	2,77	1,02	0,19	0,57	-	-	-	-
Treonina Bruta	%	2,07	2,11	0,30	0,51	-	-	-	-
Treonina Digestível ¹	%	1,81	1,87	0,24	0,43	-	-	-	-
Arginina Bruta	%	3,60	2,12	0,39	1,08	-	-	-	-
Arginina Digestível ¹	%	3,41	2,03	0,36	1,02	-	-	-	-
Isoleucina Bruta	%	1,93	2,51	0,29	0,49	-	-	-	-
Isoleucina Digestível ¹	%	1,69	2,23	0,24	0,41	-	-	-	-
Leucina Bruta	%	3,39	9,86	1,08	0,97	-	-	-	-
Leucina Digestível ¹	%	3,14	9,28	0,98	0,87	-	-	-	-
Valina Bruta	%	2,52	2,92	0,41	0,73	-	-	-	-
Valina Digestível ¹	%	2,20	2,58	0,33	0,62	-	-	-	-
Histidina Bruta	%	0,96	1,29	0,26	0,42	-	-	-	-
Histidina Digestível ¹	%	0,90	1,22	0,24	0,39	-	-	-	-
Fenilalanina Bruta	%	1,97	3,80	0,42	0,63	-	-	-	-
Fenilalanina Digestível ¹	%	1,83	3,57	0,38	0,57	-	-	-	-
Triptofano Bruta	%	0,43	0,35	0,06	0,25	-	-	-	-
Triptofano Digestível ¹	%	0,39	0,32	0,05	0,22	-	-	-	-

¹ Valores digestíveis calculados segundo coeficientes determinados por Abimorad e Carneiro (2004); Abimorad (2008); Fabregat et al. (2008).

² Extrativo não nitrogenado ENN = MS – (PB+EE+MM+FB)

³ Dados de tabela Rostagno (2011).

Tabela 3. Formulação das dietas experimentais (valores com base na matéria natural)

	DB ¹	DC	DL-LYS	DL-MET	DL-THR	DL-TRP	DL-ARG	DL-HIS	DL-ILE	DL-LEU	DL-PHE	DL-VAL
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Farinha de Peixe	8,516	4,684	4,684	4,684	4,684	4,684	4,684	4,684	4,684	4,684	4,684	4,684
Glúten de milho	9,000	4,950	4,950	4,950	4,950	4,950	4,950	4,950	4,950	4,950	4,950	4,950
Milho	42,491	23,370	23,370	23,370	23,370	23,370	23,370	23,370	23,370	23,370	23,370	23,370
Farelo de trigo	10,000	5,500	5,500	5,500	5,500	5,500	5,500	5,500	5,500	5,500	5,500	5,500
Amido de Milho	7,720	29,356	29,360	29,360	29,360	29,360	28,760	29,210	29,360	29,360	29,370	29,360
Celulose purificada	2,120	3,996	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000
Óleo de soja	5,598	5,579	5,579	5,579	5,579	5,579	5,579	5,579	5,579	5,579	5,579	5,579
Açúcar	1,170	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644
L-lisina	1,716	1,985	0,944	1,985	1,985	1,985	1,985	1,985	1,985	1,985	1,985	1,985
DL-metionina	0,167	0,301	0,301	0,092	0,301	0,301	0,301	0,301	0,301	0,301	0,301	0,301
L-treonina	0,439	0,651	0,651	0,651	0,241	0,651	0,651	0,651	0,651	0,651	0,651	0,651
L-arginina	0,554	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885	0,304	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885
L-isoleucina	0,308	0,529	0,529	0,529	0,529	0,529	0,529	0,529	0,169	0,529	0,529	0,529
L-leucina	0,000	0,730	0,730	0,730	0,730	0,730	0,730	0,730	0,730	0,000	0,730	0,730
L-valina	0,250	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,532	0,137
L-histidina	0,158	0,307	0,307	0,307	0,307	0,307	0,307	0,087	0,307	0,307	0,307	0,307
L-phenilalanina	0,120	0,436	0,436	0,436	0,436	0,436	0,436	0,436	0,436	0,436	0,066	0,436
L-triptofano	0,197	0,245	0,245	0,245	0,245	0,108	0,245	0,245	0,245	0,245	0,245	0,245
L-ac. glutâmico	1,850	3,248	3,594	3,317	3,384	3,293	3,641	3,371	3,367	3,490	3,368	3,379
L-glicina	1,850	3,248	3,594	3,317	3,384	3,293	3,641	3,371	3,367	3,490	3,368	3,379
L-alanina	1,850	3,248	3,594	3,317	3,384	3,293	3,641	3,371	3,367	3,490	3,368	3,379
Calcário	1,444	2,024	2,024	2,024	2,024	2,024	2,024	2,024	2,024	2,024	2,024	2,024
Fosfato bicálcico	0,631	1,697	1,697	1,697	1,697	1,697	1,697	1,697	1,697	1,697	1,697	1,697
Ágar	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Premix ²	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
Antifúngico	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300	0,300
BHT antioxidante	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050

¹ Dieta Basal² Suplemento mineral e vitamínico Composição: ácido fólico (1.250 mg); pantotenato de cálcio (1.200 mg); cobre (2.500 mg); ferro (15 g); iodo (375 mg); manganês (12,5 g); selênio (87,5 mg); zinco (12,5 mg); cobalto (125 mg); Vit A (2.500 U I); Vit B12 (4000 mg); Tiamina B1 (4000 mg); Riboflavina B2 (4000 mg); Piridoxina B6 (4000 mg); Vit C (50.000 mg); Vit D3 (600.000 UI); Vit E (37.500); Vit K3 (3.750 mg); niacina (122.500 mg); biotina (15 mg)

Tabela 4, Composição analisada das dietas (valores com base em 100% de matéria seca)

		DC	DL-LYS	DL-MET	DL-THR	DL-TRP	DL-ARG	DL-HIS	DL-ILE	DL-LEU	DL-PHE	DL-VAL
Matéria seca	%	92,91	92,41	93,03	93,21	92,52	92,42	92,43	93,60	92,40	92,96	93,22
Proteína Bruta,	%	28,34	28,48	29,19	27,06	26,95	28,20	26,95	28,15	27,50	27,73	26,55
Proteína Digestível ²	%	27,24	27,37	28,06	26,00	25,90	27,10	25,90	27,05	26,43	26,66	25,52
Lipídio Digestível ²	%	6,56	6,58	6,80	6,66	6,51	6,22	6,43	6,42	6,09	6,39	6,66
Energia Bruta	kcal/kg	4585,2	4683,7	4675,3	4586,4	4671,5	4660,5	4651,7	4646,6	4623,2	4605,3	4654,0
Energia Digestível ²	kcal/kg	3898,7	3980,4	3974,7	3899,5	3971,5	3962,2	3955,3	3949,2	3927,4	3913,8	3955,7
Extrato não nitrogenado ³	%	46,75	46,15	45,86	48,30	47,60	46,90	47,70	47,76	47,40	47,70	48,96
Fibra Bruta ⁴	%	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23	4,23
Matéria Mineral	%	5,55	5,49	5,42	5,47	5,77	5,47	5,68	5,60	5,83	5,46	5,33
Metionina Digestível ²	%	0,42	0,44	0,27	0,47	0,46	0,53	0,47	0,44	0,51	0,52	0,42
Lisina Digestível ²	%	2,11	1,36	2,24	2,27	2,30	2,32	2,28	2,16	2,23	2,22	2,05
Treonina Digestível ²	%	0,94	1,03	1,01	0,61	1,03	1,07	1,05	1,01	1,09	1,07	0,97
Arginina Digestível ²	%	1,40	1,48	1,44	1,51	1,49	0,92	1,47	1,42	1,50	1,50	1,38
Isoleucina Digestível ²	%	0,80	0,98	0,99	0,88	0,99	1,01	0,98	0,44	0,97	0,98	0,81
Leucina Digestível ²	%	1,62	1,72	1,72	1,80	1,74	1,75	1,72	1,68	1,07	1,93	1,62
Valina Digestível ²	%	0,86	0,98	0,96	0,89	0,97	0,99	1,02	0,89	1,05	1,03	0,45
Histidina Digestível ²	%	0,48	0,65	0,62	0,51	0,68	0,75	0,47	0,51	0,75	0,74	0,46
Fenilalanina Digestível ²	%	0,81	0,93	0,93	0,89	0,94	0,96	0,95	0,83	0,86	0,47	0,78
Triptofano Digestível ²	%	0,26	0,29	0,23	0,23	0,15	0,24	0,24	0,26	0,23	0,26	0,25
Acido Glutâmico Digestível ²	%	4,65	5,17	4,92	5,10	4,95	5,28	5,00	4,95	5,23	4,94	4,68
Glicina Digestível ²	%	3,93	4,58	4,24	4,62	4,26	4,75	4,44	4,19	4,48	4,35	4,02
Alanina Digestível ²	%	4,03	4,76	4,41	4,52	4,41	4,77	4,48	4,19	4,90	4,74	4,08

DC–Dieta controle; DL–Dieta limitante; LYS–lisina; MET–metionina; THR–treonina; TRP–triptofano; ARG–arginina; HIS–histidina; ILE–isoleucina; LEU–leucina; PHE–fenilalanina; VAL–valina

² Valores digestíveis calculados segundo coeficientes de digestibilidade determinados por Abimorad e Carneiro (2004); Abimorad (2008),

³ ENN = MS – (PB+EE+MM+FB)

⁴ Fibra Bruta Calculada.

4.3. Coleta de dados

O consumo das dietas experimentais de cada unidade experimental, foi mensurado, os potes cheios antes e após consumo foram pesados.

A biomassa dos peixes foi registrada no início e meio do experimento para acompanhamento do desenvolvimento dos animais. Ao final do experimento, foi realizada biometria individual dos peixes em jejum de 24 horas para cálculo das variáveis: ganho de peso médio por peixe (GP), consumo de ração por peixe (CR) e conversão alimentar (CA), equações (1), (2) e (3) respectivamente.

$$GP = \text{Peso médio final} / \text{Peso médio inicial} \quad (1)$$

$$CR = \frac{\text{Quantidade de alimento consumido}}{N^{\circ} \text{ peixes}} \quad (2)$$

$$CA = CR / GP \quad (3)$$

Tanto os 40 juvenis da amostra inicial quanto os 18 peixes de cada unidade experimental do final do experimento foram submetidos a jejum de 24 horas e eutanasiados através do aprofundamento do plano anestésico, com benzocaína (concentração de 300mg L⁻¹), para em seguida serem congelados. O material congelado foi moído e liofilizado, para determinação da composição de matéria seca e nitrogênio (AOAC, 2000).

Com isso, a composição de N corporal foi utilizada para determinar os níveis de deposição de N (mg N / peso metabólico corporal kg / dia), utilizando-se a equação (4) proposta por Rollin et al. (2003):

$$\text{Deposição de N} = \frac{(P_f \times N_f - P_i \times N_i)}{\frac{1}{2} \left(\left(\frac{P_f}{1000} \right)^{0,75} + \left(\frac{P_i}{1000} \right)^{0,75} \right) \times \Delta t} \quad (4)$$

Onde Pf e Pi são as médias final e inicial do peso corporal em gramas, Δt é a quantidade de dias de duração do experimento, e Nf e Ni são as médias final e inicial da composição de N corporal em porcentagem.

4.4. Determinação da relação de AA pelo Método de Deleção

A relação de AAE para juvenis de pacu foi determinado através da metodologia de deleção. Para melhor entendimento deste método, são assumidas algumas hipóteses: (1) a retirada do primeiro AAE limitante causa uma maior diminuição na retenção de N; (2) caso a retirada do AAE não promova diminuição na retenção de N, então a porção retirada estava em excesso, comparado com o primeiro AAE limitante; (3) quando a retirada de um AAE culmina em leve redução da retenção de N, então a porção que pode ser retirada sem diminuição da retenção, pode ser interpolada proporcionalmente (Wang e Fuller, 1989). Caso as pressuposições sejam atendidas, então o AAE reduzido será considerado o primeiro limitante na dieta. Através desses preceitos, torna-se possível o cálculo da relação mínima para os AAE, sem que ocorra alteração na retenção de N. Após, a relação ideal dos AAE é calculada pela relação entre o primeiro AAE limitante do perfil aminoácídico da dieta controle (Wang e Fuller, 1989; Green e Hardy, 2002, Peres e Oliva-Teles, 2009).

Com a relação dos níveis de deposição de N para cada tratamento definida, por meio da equação (5) também proposta por Rollin et al. (2003), foi possível calcular o nível indicado de cada AAE que maximize a retenção de N:

$$\text{Nível indicado} = (AAE)_{DC} \times \left(2 - DEL - \left(\frac{DN_{AAE}}{DN_{DC}} \right) \right) \quad (5)$$

Onde, nível indicado é a exigência do AAE testado (g Kg⁻¹ MS), (AAE)_{DC} a concentração do AAE na DC (g Kg⁻¹ MS), DEL o nível de deleção (%) obtido ao dividir a concentração do AAE teste pela concentração do mesmo AAE na DC, DN_{AAE} a deposição de N (mg N / peso metabólico corporal kg / dia) correspondente aos peixes da dieta do AAE testado, e DN_{DC} a deposição de N (mg N / peso metabólico corporal kg / dia) correspondente aos peixes da DC. Esta metodologia está baseada no pressuposto de que a retenção de N é uma função linear do teor de AAE dietético quando um AAE particular é limitante. O balanço ótimo entre os AAE é obtido pela divisão do nível indicado estimado para cada AAE pelo nível indicado estimado de lisina (base de lisina = 100) (Green e Hardy, 2002; Rollin et al., 2003). É importante considerar que, embora Rollin et al. (2003) denomine o

1 resultado da equação (5) como requerimento, ela não pode ser utilizada para
2 recomendar níveis nutricionais na dieta; ela somente pode ser usada como base
3 para calcular de forma prática a relação ideal dos AA, desta forma foi utilizado o
4 termo, nível indicado, para evitar desentendimentos.

6 **4.5. Análise estatística**

8 Os dados foram analisados pelos programas R Studio, versão 3.3.3 (2017) e
9 SAS versão 9.3 (2011), por meio de análise de variância (One-way ANOVA).
10 Quando encontrada significância estatística, e com homocedasticidade e
11 normalidade verificada, foi aplicado o teste de Dunnett ($P < 0,05$), para comparação
12 do tratamento controle com os demais tratamentos.

14 **5. Resultados e discussão**

16 Durante os 133 dias experimentais não foram observados sinais clínicos de
17 enfermidades. Os juvenis de pacu permaneceram bem aclimatados às condições
18 ambientais e às dietas oferecidas.

20 **5.1. Dietas-teste**

22 A opção de extrusar as dietas foi feita com base em alguns princípios práticos
23 e nutricionais. Do ponto de vista prático, a extrusão junto com a água gera a
24 expansão do amido e do granulo (Camire et al., 1990), garantindo fluabilidade
25 das dietas e consequentemente melhora o controle da alimentação até a saciedade
26 aparente já que a visualização do consumo é facilitada. Esse processamento, por
27 conta da geleificação do amido (Camire et al., 1990), também resulta em grânulos
28 mais firmes e com poucas perdas por esfarelamento durante manuseio e por
29 dissolução na água se comparada, por exemplo, com a peletização. O que torna
30 este processamento o mais utilizado atualmente na produção das rações para
31 peixes.

32 Do ponto de vista nutricional, os efeitos da extrusão de dietas para peixes
33 ainda não encontram-se bem definidos, uma vez que diversos fatores físicos (ex:
34 temperatura, umidade, velocidade da rosca e diâmetro da matriz da extrusora) e

1 químicos (ex: tipo, disponibilidade, quantidade e composição dos alimentos e
2 nutrientes) afetam diretamente as características nutricionais da dieta após o
3 processamento, causando efeitos positivos e negativos (Camire et al., 1990; Singh
4 et al., 2007; Tjernsbekk et al., 2017). Porém alguns pontos já encontram-se bem
5 estabelecidos para esse tipo de processamento, como a geleificação do amido,
6 aumentando a digestibilidade do mesmo para monogástricos; a destruição em altos
7 níveis de fatores antinutricionais (inibidores da tripsina, hemaglutininas, taninos e
8 fitatatos) que causam a inibição da digestibilidade das proteínas; e a desnaturação
9 das proteínas, que facilita a hidrólise enzimática no corpo dos animais, aumentando
10 também sua digestibilidade (Camire et al., 1990; Singh et al., 2007).

11 Para garantir que, o processamento e elaboração das dietas não tenham
12 afetado e interferido na quantidade dos nutrientes oferecidos para os peixes, a
13 análise dos principais nutrientes e os aminogramas das dietas foram realizados
14 após todos os processos de fabricação das mesmas (moer, misturar, extrusar e
15 secar). Sendo assim, as dietas-teste apresentaram valores satisfatórios e
16 adequados quanto aos níveis dos nutrientes analisados (Tabela 4).

17 A única dieta em que não foram encontrados níveis satisfatórios foi a DL-HIS,
18 que não apresentou qualquer nível de deleção de histidina, se comparada com a
19 dieta controle (Tabela 4 e 5). Desta forma, a relação ideal da histidina não pode ser
20 estimada neste estudo. A proporção de AAE deletado de cada dieta em relação a
21 DC apresentaram considerável oscilação, com dietas deletando de 45% a 33%
22 (Tabela 5). Porém, tal oscilação não prejudica a realização dos objetivos deste
23 estudo, uma vez que a equação utilizada para encontrar as relações de AAE
24 (descrita na metodologia), leva em consideração o quanto que cada AAE foi
25 deletado em cada dieta.

Tabela 5. Níveis encontrados de deleção do AAE específico em cada dieta teste.

Tratamento	Quantidade bruta do AAE na DC	Quantidade bruta do AAE na DL	Quantidade deletada do AAE testado ¹
DL- LYS	2,15	1,41	34,42%
DL- MET	0,44	0,29	34,09%
DL- THR	0,98	0,67	31,63%
DL- TRP	0,27	0,15	44,44%
DL- ARG	1,42	0,95	33,10%
DL- HIS	0,50	0,50	00,00%
DL- ILE	0,84	0,48	42,86%
DL- LEU	1,70	1,16	31,36%
DL- PHE	0,84	0,51	39,29%
DL- VAL	0,92	0,51	45,05%

¹ [1 - (Quantidade bruta do AAE na DL/ quantidade bruta do AEE na DC)] *100

5.2. Desempenho

Os peixes alimentados com a DC resultaram no maior ganho de peso médio ($93,82 \pm 6,94\text{g}$) e na melhor conversão alimentar ($1,32 \pm 0,03\text{g}$) em relação aos demais tratamentos (Tabela 6). Porém, estatisticamente com mais de 95% de confiança, apenas os tratamentos deficientes em lisina, arginina, valina e treonina apresentaram seus desempenhos zootécnicos prejudicados em relação a dieta controle. Os peixes submetidos aos tratamentos com as dietas deficientes em lisina e arginina obtiveram os piores desempenhos ($\text{GP } 18,11 \pm 11,73\text{g}$ e $26,77 \pm 9,13\text{g}$; $\text{CA } 2,69 \pm 0,15\text{g}$ e $1,87 \pm 0,14\text{g}$). A dieta deficiente em lisina promoveu desempenho muito inferior ao das demais (Tabela 6; Figura 9), uma vez que os animais apenas triplicaram seus pesos durante os 113 dias de alimentação, enquanto os peixes do tratamento DC, por exemplo, apresentam um crescimento de aproximadamente 15 vezes o seu tamanho inicial. Como consequência, a conversão alimentar do tratamento DL-LYS também foi muito pior que a das demais, sendo necessário duas vezes a quantidade em gramas de alimento fornecido quando comparado com ao tratamento DC para que o peixe ganhasse a mesma quantidade em gramas de peso corporal (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros de desempenho produtivo de juvenis de pacu alimentados com dietas deficientes em aminoácidos essenciais

Tratamentos	PI (g)	GP (g)	CR (g/peixe)	CA
DC	6,26	93,82 $\pm$ 06,94	123,71 $\pm$ 07,62	1,32 $\pm$ 0,03 ^a
DL-LEU	6,33	84,85 $\pm$ 21,23	108,16 $\pm$ 24,50	1,29 $\pm$ 0,13 ^a
DL-HIS	6,28	78,52 $\pm$ 08,58	108,49 $\pm$ 07,66	1,39 $\pm$ 0,07 ^{ab}
DL-TRP	6,19	74,02 $\pm$ 37,02	101,97 $\pm$ 41,69	1,33 $\pm$ 0,06 ^{ab}
DL-MET	6,09	69,35 $\pm$ 10,23	102,47 $\pm$ 09,97	1,48 $\pm$ 0,08 ^{ab}
DL-ILE	6,28	69,27 $\pm$ 05,61	97,01 $\pm$ 05,94	1,40 $\pm$ 0,04 ^{ab}
DL-PHE	6,30	68,15 $\pm$ 15,13	98,17 $\pm$ 15,86	1,45 $\pm$ 0,10 ^{ab}
DL-THR	6,17	50,39 $\pm$ 19,39*	78,17 $\pm$ 26,34*	1,57 $\pm$ 0,08 ^{ab}
DL-VAL	6,30	47,99 $\pm$ 16,56*	75,60 $\pm$ 21,17*	1,61 $\pm$ 0,14 ^b
DL-ARG	6,20	26,77 $\pm$ 09,13*	49,33 $\pm$ 13,67*	1,87 $\pm$ 0,14 ^c
DL-LYS	6,01	18,11 $\pm$ 11,73*	39,12 $\pm$ 14,92*	2,69 $\pm$ 0,15 ^d
ANOVA				
Valores de P	0,999	<0,001	<0,001	<0,001
CV (%)	7,66	27,45	22,38	7.15

PI = Peso inicial; GP = ganho de peso; CR = consumo de ração; CA = Conversão alimentar; CV = Coeficiente de variação

Valores sinalizados com "*" diferem estatisticamente do tratamento controle (DC) (Teste de Dunnett com $\alpha < 0.05$).

Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente (Student Newman Keuls $\alpha > 0.05$).

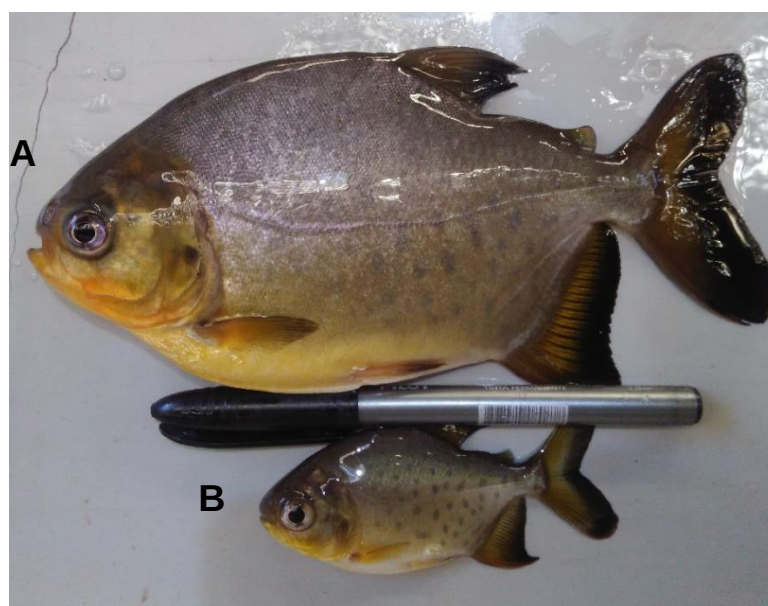


Figura 9. Diferença de ganho de peso (GP) entre tratamento com a melhor e a pior resposta, animais com peso próximo da média das caixas. A. Pacu alimentado com dieta controle (GP = 93,82 $\pm$ 6,94g); B. Pacu alimentado com dieta deficiente em lisina (GP = 18,11 $\pm$ 11,73g).

O fato de seis tratamentos não terem diferido estatisticamente do tratamento DC fez com que algumas hipóteses fossem levantadas na busca de entender o ocorrido.

A primeira hipótese levantaria o fato de que a heterogeneidade no crescimento dos peixes ainda é uma realidade se comparada com outros animais de produção (ex. frango de corte) os quais apresentam domesticação e seleção consolidada, enquanto que a maioria dos organismos aquáticos isto é recente. Em especial, o pacu ainda apresenta pouco grau de domesticação e seleção genética, se comparado com *Oreochromis niloticus*, e principalmente outros peixes marinhos como o *Salmo salar* L. Porém, mesmo sabendo que certa heterogeneidade dentro das unidades experimentais seria naturalmente encontrada, ela poderia ter ocorrido de forma acentuada a ponto de interferir significativamente, e até certo ponto, na não diferenciação entre os seis tratamentos com o tratamento DC. Porém esta hipótese pode ser desconsiderada se for considerado que os níveis de homocedasticidade e normalidade encontrados foram satisfatórios.

Outro ponto a ser considerado, é o manejo alimentar empregado. Pode ser levantada a hipótese de que a alimentação até a saciedade aparente não teria como impedir que os animais se alimentassem até suprir a deficiência do AAE deletado na dieta-teste e excretar os demais nutrientes em excesso, fazendo com que o efeito esperado dos tratamentos fosse suprimido. Porém, tal hipótese pode ser também desconsiderada se forem observados os valores de conversão alimentar (CA) presentes na Tabela 6, onde estatisticamente não ocorreu diferença de CA entre os tratamentos que não diferiram do tratamento DC em relação ao ganho de peso, demonstrando que os animais não consumiram mais da dieta para ganhar a mesma quantidade em gramas de peso corpóreo.

Outra hipótese seria que as respectivas quantidades deletadas do AAE testado podem não ter sido suficientes para gerar deficiência e consequente efeito negativo sobre o desempenho. Tal efeito pode ter ocorrido se os níveis utilizados para a formulação estivessem superestimados e desta forma mesmo com a deleção do AAE o mesmo continuaria suprimindo as necessidades dos peixes.

E a última hipótese questiona se os AA se apresentaram disponíveis para a absorção pelo organismo do pacu. Isso porque, mesmo a extrusão apresentando inúmeros benefícios para as dietas, estudos apontam que a extrusão pode afetar negativamente os AA que as compõe. Uma das formas que vem sendo estudada,

1 está na reação de Maillard, em que, por meio de uma reação química entre o grupo
2 amino livres da proteína e o grupo carbonil do açúcar reduzido, gera-se a redução
3 na disponibilidade do aminoácido envolvido e na digestibilidade da proteína. Essa
4 reação é favorecida pela extrusão (Cheftel, 1986; Camire et al., 1990; Singh et al.,
5 2007) quando a temperatura é superior a 180°C e umidade abaixo de 15% (Cheftel,
6 1986; Camire et al., 1990), parâmetros diferentes do realizado neste estudo, onde
7 essa temperatura não foi atingida e a umidade utilizada estava em torno de 21%.
8 Porém, segundo Singh et al. (2007) e Camire et al. (1990), mais estudos precisam
9 ser realizados para melhor entendimento desta reação e de todos os fatores
10 envolvidos uma vez que um consenso ainda não foi encontrado.

11 Outro ponto considera o fato de os AA na sua forma livre apresentarem maior
12 sensibilidade aos processos de extrusão do que os AA naturalmente presentes nos
13 alimentos (Singh et al., 2007). No presente estudo, foi utilizado o “coating” como
14 forma também de proteção desses AA livres aos processos da extrusão. Estudos
15 seriam necessários para avaliar melhor o grau de proteção que o “coating” exerceu
16 sobre os AA livres e como os nutrientes das dietas-teste se comportaram durante
17 o processo de extrusão com este procedimento pré-processamento (“coating”).
18 Também seria necessário investigar a digestibilidade de cada nutriente antes e
19 após o processamento, uma vez que a extrusão pode afetar a digestibilidade
20 positiva e negativamente, e o “coating” durante o processamento poderia agravar
21 esses efeitos.

22 Se forem compilados os resultados de experimentos já realizados com AAE
23 utilizando a metodologia de deleção em peixes (Tabela 7), a lisina não é
24 considerada um dos AAE mais limitantes (Green e Hardy, 2002; Rollin et al., 2003;
25 Peres e Oliva-Teles, 2009; Diógenes et al., 2015), porém no presente estudo ela se
26 comportou como o AAE mais limitante para pacu. Já a treonina, metionina e
27 fenilalanina são os AAE mais limitantes dentre as espécies que foram estudadas
28 (Tabela 7). Para pacu, a treonina está entre os mais limitantes porém a metionina
29 e fenilalanina não apresentam esta característica (Tabela 7). Desta forma, não foi
30 possível encontrar um padrão para o grupo dos peixes, o que é de se esperar, visto
31 que a diversidade de padrões alimentares é muito grande, com animais carnívoros,
32 insetívoros, herbívoros, onívoros por exemplo. Além disso existem os peixes de
33 água doce, salobra e de ambientes marinhos. Isto resulta em mecanismos

bioquímicos e fisiológicos para a utilização dos AAE que podem variar de espécie para espécie.

Tabela 7. AAE mais limitantes e AAE menos limitantes determinados em estudos utilizando a metodologia de deleção para diferentes espécies de peixes

	AAE mais				AAE menos		
	limitante			>>>	limitante		
Diógenes et al., 2015 ¹	Thr / Met	Val	Leu	...	Lys	Ile	Phe
Peres & Oliva-teles, 2009 ²	Thr	Met	His	...	Lys	Ile	Arg
Rolin et al., 2003 ³	Met	Phe	Trp	...	Val	Leu	Ile
Green & Hardy, 2002 ⁴	Phe	Met	Arg	...		Val	His
Presente estudo ⁵	Lys / Arg	Val	Thr	...	Met	Trp	His

¹*Oreochromis niloticus*

²*Sparus aurata*

³*Salmo salar* L.

⁴*Oncorhynchus mykiss*

⁵*Piaractus mesopotamicus*.

5.3. Retenção de nitrogênio

Assim como nos parâmetros zootécnicos, a retenção de N diferiu do tratamento DC, com mais de 95% de confiança, apenas nos tratamentos deficientes em lisina, arginina, valina e treonina, estes apresentaram retenção de N inferior ao tratamento DC (Tabela 8 e Figura 10). Desta forma, será possível determinar, pela metodologia de deleção, apenas os níveis destes AAE. Pressupondo que nas dietas leucina, histidina, triptofano, fenilalanina, metionina e isoleucina a deleção realizada não foi suficiente para causar deficiência, pode-se indicar que estes AA estão em pelo menos a mesma quantidade que foi deletado em excesso da quantidade existente na DC (Tabela 9).

Tabela 8. Retenção de N (mg N / peso metabólico corporal kg / dia) em cada tratamento

Tratamento	Retenção de N ¹	Desvio Padrão
DC	472,82	21,98
DL-LEU	452,96	62,96
DL-HIS	416,87	21,88
DL-TRP	392,08	124,97
DL-PHE	364,04	41,79
DL-MET	362,74	20,33
DL-ILE	357,27	12,39
DL-THR	292,57*	76,98
DL-VAL	277,48*	69,55
DL-ARG	175,86*	51,88
DL-LYS	99,31*	79,22

ANOVA

Valores de P

CV (%)

<0,001

18.680

¹Retenção de N (mg N / peso metabólico corporal kg / dia)
Normalidade de Cramer-von Mises (p-valor = 0.1763) e homocedasticidade (BoxCox) dentro dos níveis aceitáveis.
Valores sinalizados com “*” diferem estatisticamente do tratamento controle (DC) (Teste de Dunnett com $\alpha < 0.05$).

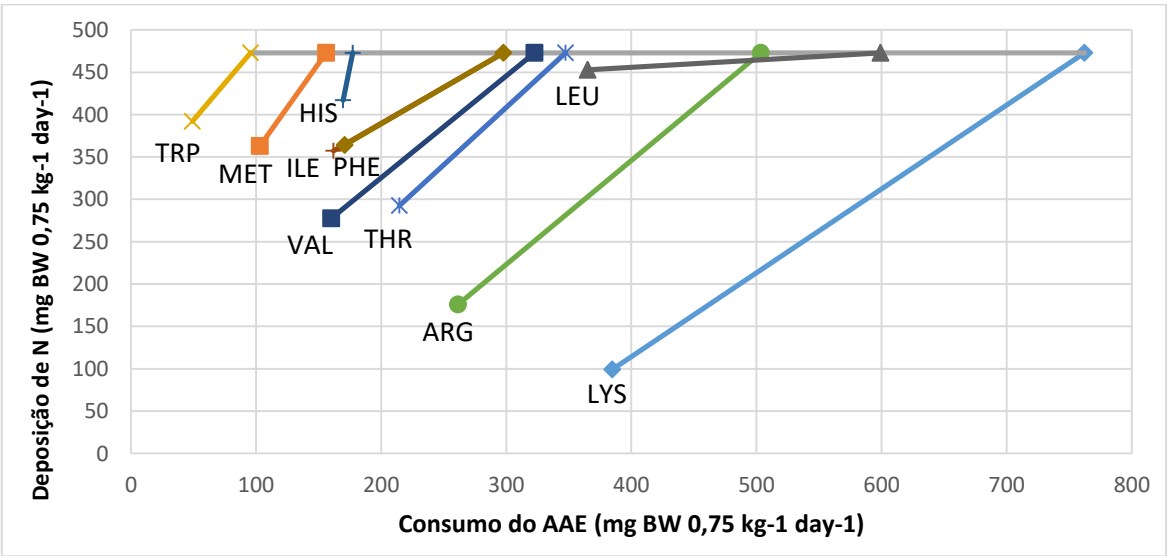


Figura 10. Efeito das dietas teste no ganho de nitrogênio corporal em pacu.

Tabela 9. Cálculo das proporções mínimas de AAE sem que tenha efeito negativo no desempenho de juvenis de pacu utilizando o pressuposto de que se a quantidade deletada não afetou o desempenho do peixe, essa quantidade está em excesso na dieta controle

	Composição analisada na DC (g/kg ms)	Quantidade deletada do AAE %	“Exigência” (g/kg ms) ¹	Proporção na base lisina ²
Lisina			31,08	1,000
Metionina	4,2	34,09	2,77	0,089
Triptofano	2,6	44,44	1,44	0,047
Histidina	4,8	00,00	4,80	0,154
Isoleucina	8,0	42,86	4,57	0,147
Leucina	16,2	31,36	11,12	0,358
Fenilalanina	8,1	39,29	4,92	0,158

¹Composição analisada menos a quantidade deletada do AAE.

²(exigência AAE / Exigência lisina)* 100

Com as proporções de lisina, treonina, arginina e valina calculados pelo método de deleção e com as proporções de metionina, triptofano, histidina, isoleucina, leucina e fenilalanina calculados na tabela 9, foram estimados os valores mínimos de AAE para juvenis de pacu que podem ser observados na primeira coluna da tabela 10.

Atualmente há dois estudos com AAE para pacu, o estudo de Abimorad et al. (2010), em que encontraram a exigência de lisina por dose-resposta e a relação dos demais AAE por composição do filé. Este que serviu de base para a formulação das dietas deste experimento. E o estudo de Khan et al. (submetido) que estudaram a composição corporal do pacu em diferentes fases de crescimento. Como estes dois estudos estimaram a exigência e o presente estudo estima a relação, as exigências foram transformadas em relações entre AAE na base lisina para que os dados possam ser confrontados (Tabela 10). Mesmo um estudo tendo analisado a composição do filé e o outro a composição corporal, pode-se observar na Tabela 10 e Figura 11 que não há grandes diferenças entre os dois estudos. Porém os valores estimados no presente estudo estão mais baixos em relação aos encontrados pelos autores destes dois trabalhos com pacus (Tabela 10 e Figura 11). A relação entre AAE para juvenis de pacus encontrada no presente estudo, também apresentou valores relativamente baixos se comparados com outros estudos que utilizaram a metodologia de deleção em outras espécies (Tabela 10 e Figura 11). Visto que os dados estão apresentados em relação a 100% de LYS, a

1 exigência encontrada de lisina pode estar superestimada, causando diminuição dos
2 demais requerimentos.

3

Tabela 10. Relações entre AAE na base lisina obtidos em estudos pela metodologia de deleção com diferentes espécies e estudos de exigências de AAE, convertidos para relações entre AAE na base lisina, para pacu utilizando outras metodologias

	LYS	MET	THR	TRP	ARG	HIS	ILE	LEU	PHE	VAL
Pacu - Deleção ¹	100	8,9	33,6	4,7	59,3	15,4	14,7	35,8	15,8	28,2
Pacu – Dose-resposta ²	100	23	50	-	71	27	44	89	45	48
Pacu – C. corporal ³	100	27,7	50,9	8,5	82,8	26,1	50,5	79,4	45,0	55,2
<i>Oreochromis niloticus</i> ⁴	100	64,0	93,0	24,0	125,0	34,0	57,0	96,0	101,0	76,0
<i>Sparus aurata</i> ⁵	100	50,8	58,1	14,6	108,3	36,8	49,7	92,7	112,3	62,6
<i>Salmo salar</i> L. ⁶	100	64,0	51,0	14,0	76,0	28,0	-	-	105,0	59,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ⁷	100	53,0	63,1	11,4	86,6	32,9	51,7	89,9	124,8	57,7

¹ Presente estudo

² Abimorad et al., (2010). Valores obtidos por composição de filé em relação a ensaio de dose-resposta com Lys. Estes valores serviram de base na formulação das dietas-teste do presente estudo. Dados convertidos em relações entre AAE na base lisina

³ Khan et al., (submetido). Valores de composição corporal de pacu convertidos em relações entre AAE na base lisina

⁴ Diógenes et al., 2015

⁵ Peres & Oliva-Teles, 2009

⁶ Rolin et al., 2003

⁷ Green & Hardy, 2002.

4

5 Na Figura 11, nota-se que apesar dos valores obtidos neste estudo estarem
6 abaixo daqueles encontrados nas outras pesquisas, é possível verificar que os
7 valores apresentam uma relação entre os AAE, ou seja, as figuras formadas pelos
8 dados no gráfico de radar são semelhantes, apresentando apenas variação quanto
9 ao seu “tamanho”, o que fortalece a hipótese de superestimação do requerimento
10 de Lys. Para melhor visualização e entendimento desta hipótese, os dados de base
11 lisina foram transformados para base histidina (AA escolhido aleatoriamente). Na
12 Figura 12, a lisina encontra-se elevada se comparada com os demais estudos
13 (6,480 e nos demais estudos variando de 3,830 a 2,720) enquanto que os demais
14 AAE estão mais próximos dos pontos relativos aos demais estudos.

15

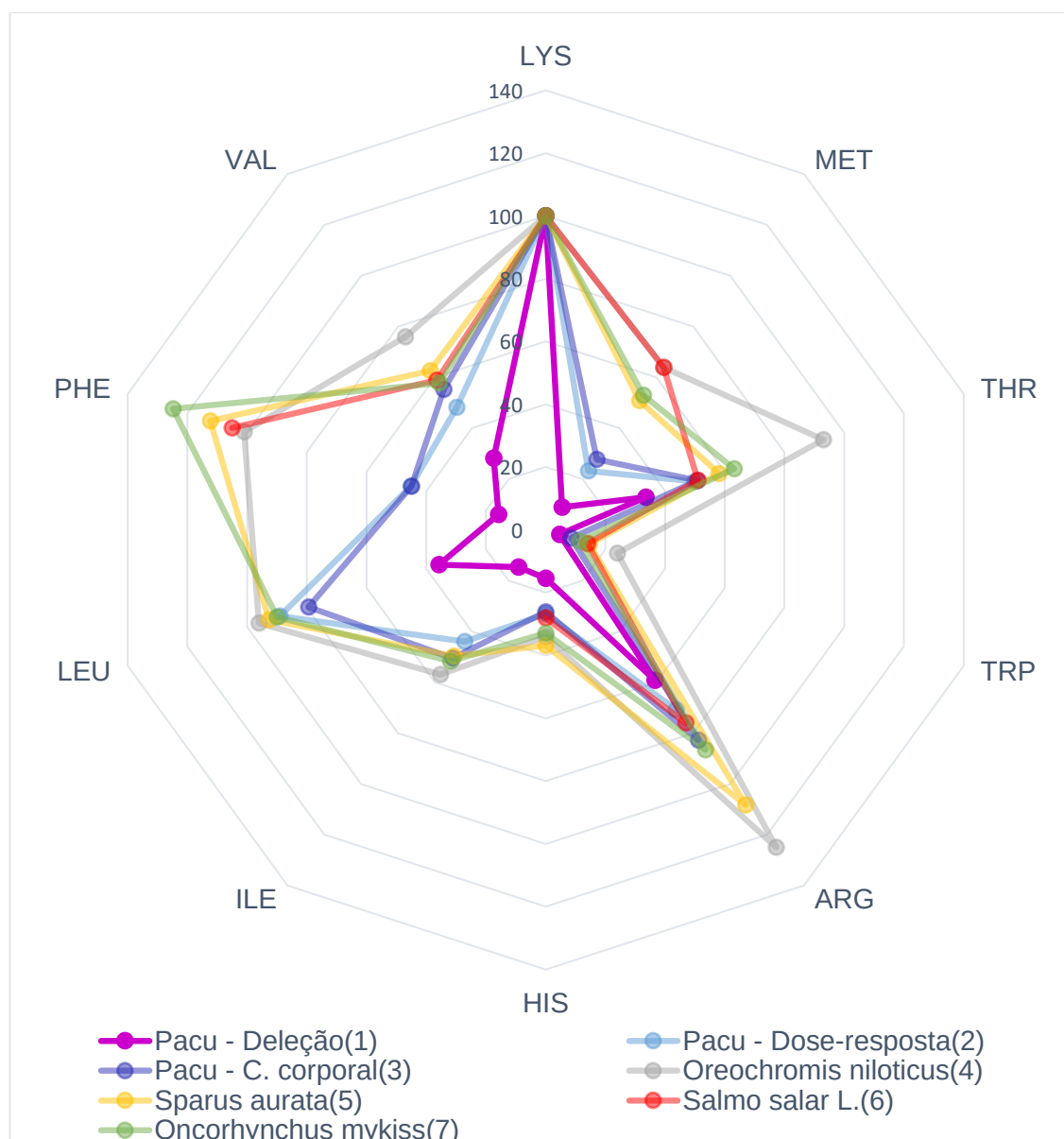


Figura 11. Relação dos AAE, na base lisina, obtidos em trabalhos pela metodologia de deleção (1) Presente estudo; (4) Diógenes et al., 2015; (5) Peres e Oliva-Teles, 2009; (6) Rollin et al., 2003; (7) Green e Hardy, 2002). Relação de Pacu com outras metodologias (2) Requerimento para pacu utilizado como base na formulação das dietas-teste do presente estudo, valores obtidos por composição de filé em relação a ensaio de dose-resposta com Lys (Abimorad et al., 2010); (3) Valores de composição corporal de pacu (Khan et al., submetido).

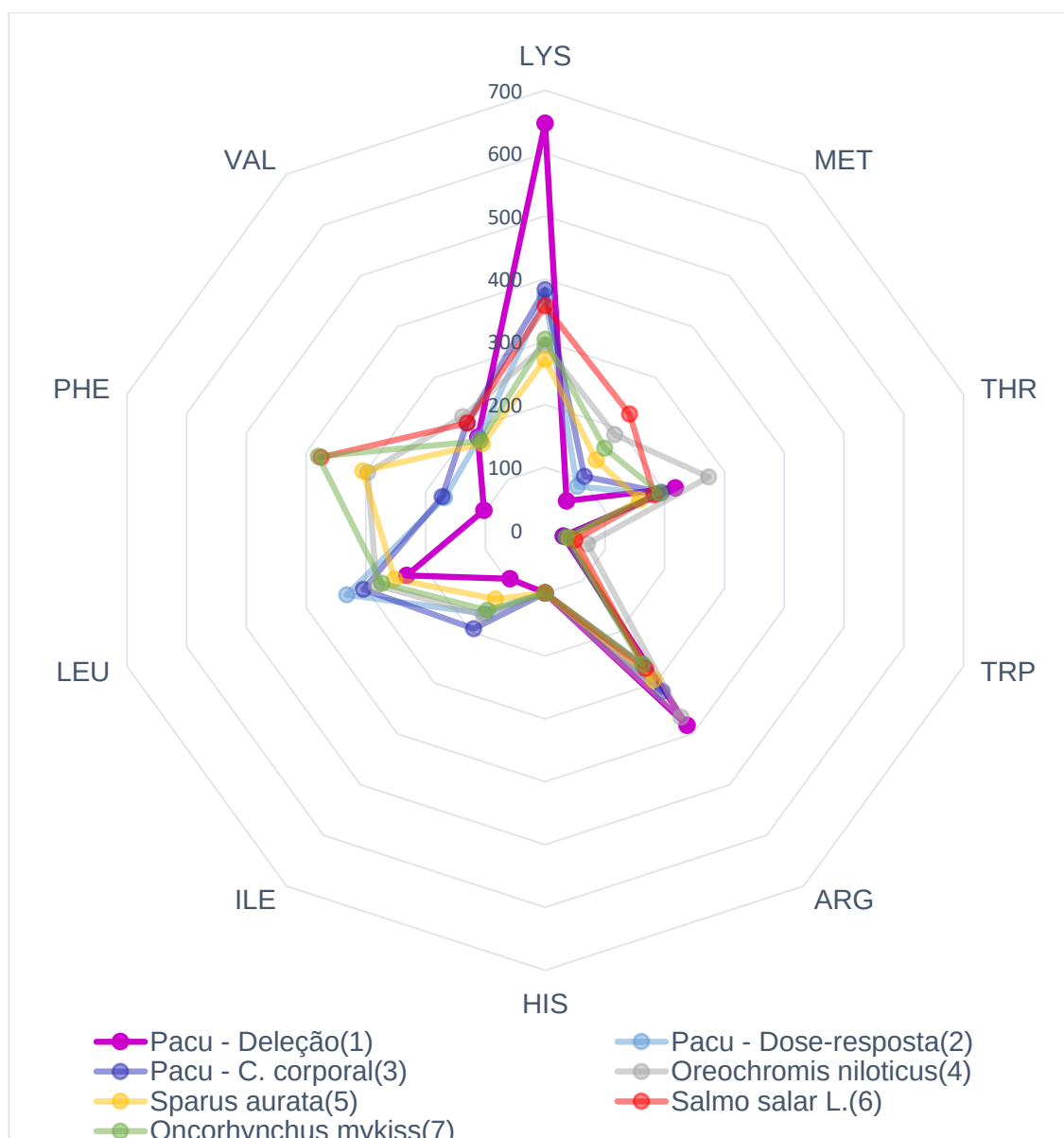


Figura 12. Relação dos AAE, na base histidina, obtidos em trabalhos pela metodologia de deleção (1) Presente estudo; (4) Diógenes et al., 2015; (5) Peres e Oliva-Teles, 2009; (6) Rollin et al., 2003; (7) Green e Hardy, 2002). Relação de Pacu com outras metodologias (2) Requerimento para pacu utilizado como base na formulação das dietas-teste do presente estudo, valores obtidos por composição de filé em relação a ensaio de dose-resposta com Lys (Abimorad et al., 2010); (3) Valores de composição corporal de pacu (Khan et al., submetido).

O único AAE que não condiz com o “padrão de desenho gráfico” descrito é a fenilalanina. Isso porque os trabalhos utilizando a metodologia de deleção apresentam valores muito maiores do que no presente estudo e nos de Abimorad et al. (2010) e Khan et al. (submetido), indicando duas hipóteses a serem testadas. A primeira, que para o pacu, um peixe com hábito alimentar herbívoro/onívoro, este AAE não precisaria ser fornecido em grandes quantidades, enquanto que as

demais espécies, predominantemente carnívoras/onívoras, este AAE seria necessário em maiores níveis (Tabela 10 e Figura 11). A segunda hipótese seria de que esse AAE foi subestimado nesse estudo.

A hipótese da fenilalanina ter sido subestimada no presente estudo, pode estar relacionado ao fato de que no estudo de Abimorad et al. (2010), este AA apresentou baixo valor em relação aos demais AAE, podendo então ter influenciado no resultado do presente estudo. Como pode-se observar na Tabela 10 e mais facilmente na Figura 11, a relação dos valores encontrados seguiu o mesmo padrão do estudo de Abimorad et al. (2010), indicando que os dados base para a formulação das dietas testes para esta metodologia de deleção pode apresentar influência no resultado final. Visto que Abimorad et al. (2010) encontraram apenas a exigência de lisina por dose-resposta e os demais AAE foram estimados apenas por composição do filé, seria indicado mais estudos prévios de exigências de AAE além da lisina para embasar uma dieta mais próxima da exigência para que, por meio da metodologia de deleção, possa ser estimado as relações ideais de AAE para a espécie.

6. Conclusão

Os resultados apontam a lisina e arginina como os AA que mais limitaram o desempenho do pacu, e a relação de AAE para juvenis desta espécie determinado pelo método da deleção, com a lisina sendo usada como referência, foram: lisina 1,000; treonina 0,336; arginina 0,593; valina 0,282. As relações para metionina (0,089), triptofano (0,047), histidina (0,154), Isoleucina (0,147), leucina (0,358), e fenilalanina (0,158) foram baseadas no pressuposto de que a quantidade deletada não causou deficiência em retenção de N por estas quantidades estarem em excesso na DC.

7. Considerações finais

O presente estudo possibilitou o levantamento de várias questões, pontos estes que são de grande interesse não apenas para o melhor entendimento da metodologia de deleção mas também para muitos outros estudos da área de conhecimento em nutrição.

Os resultados de desempenho encontrados mostram que a metodologia de deleção de AAE afeta diretamente o desempenho produtivo (ganho de peso, conversão alimentar) do pacu. Sendo assim, a metodologia apresentou-se viável, desde que para a espécie estudada já hajam estudos prévios que tenham determinado a exigência de pelo menos alguns dos principais AAE para assim garantir a uma formulação mais apurada das dietas-teste, assim a metodologia de deleção deve ser vista como um estudo final para determinar as exigências e relações de AAE para uma determinada espécie, apresentando importante papel como uma metodologia para o refinamento das relações entre os AAE para a espécie alvo.

Acredita-se que os processos de extrusão para esse tipo de dieta semi-purificada e com a adição de *coating* pode ser mais bem estudado, a fim de entender melhor o efeito do processamento na qualidade dos nutrientes e assim produzir uma dieta em que os possíveis efeitos negativos do processamento possam ser minimizados. Um ponto a ser considerado seria a avaliação da digestibilidade das dietas testadas, a fim de entender o efeito do *coating* e do processamento na disponibilidade dos nutrientes.

A implementação de um novo tratamento além dos 11 já descritos poderia possibilitar que uma dieta isonutritiva, mas feita com pouca quantidade de AA cristalinos, fosse comparada com a DC, e assim gerar um melhor entendimento dos efeitos positivos e negativos que uma dieta semi-purificada pode exercer sobre os peixes e na metodologia proposta.

8. Referências Bibliográficas

Abimorad, E. G., e Carneiro, D. J. (2004). Fecal collection methods and determination of crude protein and of gross energy digestibility coefficients of feedstuffs for pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33(5), 1101-1109.

Abimorad, E. G., e Carneiro, D. J. (2007). Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles—fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquaculture Nutrition*, 13(1), 1-9.

Abimorad, E. G., Squassoni, G. H., & Carneiro, D. J. (2008). Apparent digestibility of protein, energy, and amino acids in some selected feed ingredients for pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture nutrition*, 14(4), 374-380.

Abimorad, E. G., Favero, G. C., Squassoni, G. H., e Carneiro, D. (2010). Dietary digestible lysine requirement and essential amino acid to lysine ratio for pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture Nutrition*, 16(4), 370-377.

Alam, M. S., Teshima, S. I., Koshio, S., Ishikawa, M., Uyan, O., Hernandez, L. H. H., e Michael, F. R. (2005). Supplemental effects of coated methionine and/or lysine to soy protein isolate diet for juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 248(1), 13-19.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists (2000). *Official Methods of Analysis*, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.

Backström, T., & Winberg, S. (2017). Serotonin coordinates responses to social stress—What we can learn from fish. *Frontiers in neuroscience*, 11.

Bicudo, Á. J., Sado, R. Y., & Cyrino, J. E. (2009). Dietary lysine requirement of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Aquaculture*, 297(1), 151-156.

Boisen, S., Hvelplund, T., e Weisbjerg, M. R. (2000). Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation. *Livestock Production Science*, 64(2), 239-251.

Boisen, S., e D'Mello, J. P. F. (2003). Ideal dietary amino acid profiles for pigs. *Amino acids in animal nutrition*, (Ed. 2), 157-168.

Buentello, J. A., & Gatlin III, D. M. (2001). Effects of elevated dietary arginine on resistance of channel catfish to exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13(3), 194-201.

1 Camire, M. E., Camire, A., & Krumhar, K. (1990). Chemical and nutritional
2 changes in foods during extrusion. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*,
3 29(1), 35-57.

4 Cheftel, J. C. (1986). Nutritional effects of extrusion-cooking. *Food chemistry*,
5 20(4), 263-283.

6 Cheng, Z. J., Hardy, R. W., Usry, J. L. (2003). Plant protein ingredients with
7 lysine supplementation reduce dietary protein level in rainbow trout (*Oncorhynchus*
8 *mykiss*) diets, and reduce ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion.
9 *Aquaculture*, 218(1), 553-565.

10 Clarke, E. J., e Wiseman, J. (2000). Developments in plant breeding for
11 improved nutritional quality of soya beans II. Anti-nutritional factors. *The Journal of*
12 *Agricultural Science*, 134(02), 125-136.

13 Cowey, C. B. (1994). Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of
14 present values. *Aquaculture*, 124(1-4), 1-11.

15 Cyrino, J. E. P., Bicudo, A. J. A., Sado, R. Y., Borghesi, R., e Dairiki, J. K.
16 (2010). A piscicultura e o ambiente—o uso de alimentos ambientalmente corretos
17 em piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(supl spe), 68-87.

18 Diógenes, A. F., Fernandes, J. B. K., Dorigam, J. C. P., Sakomura, N. K.,
19 Rodrigues, F. H. F., Lima, B. T. M., e Gonçalves, F. H. (2015). Establishing the
20 optimal essential amino acid ratios in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)
21 by the deletion method. *Aquaculture Nutrition*.

22 dos Santos, L. D., de Negreiros Sousa, S. M., da Silva, L. C. R., Bombardelli,
23 R. A., e Meurer, F. (2014). Efeitos da peletização e extrusão sobre a digestibilidade
24 de ingredientes alternativos do Semi-árido Nordeste para a tilápia do Nilo.
25 *Semina: Ciências Agrárias*, 35(6), 3367-3376.

26 de Andrade Ricardo, R. L. B., Wagner, L., e Martins, I. M. R. S. (2005). Custos
27 de produção de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em um modelo de propriedade da
28 região oeste do Estado do Paraná, Brasil. *Ciência Rural*, 35(1).

29 Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition.
30 *Nutrition*, 18(10), 872-879.

31 FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016). The
32 State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition
33 for all. Rome. 200 pp.

1 FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017). Short-
2 term projection of global fish demand and supply gaps. Rome. 128 pp.

3 Fernandes, J. B. K., Carneiro, D. J., e Sakomura, N. K. (2000). Sources and
4 levels of crude protein in diets for pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fingerlings.
5 Revista Brasileira de Zootecnia, 29(3), 646-653.

6 Fernandes, J. B. K., Carneiro, D. J., e Sakomura, N. K. (2001). Sources and
7 levels of crude protein in diets for pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fingerlings.
8 Revista Brasileira de Zootecnia, 30(3), 617-626.

9 Fiod, M. S. D. R., Ducatti, C., Cabral, M. C., Teixeira, R. B. G., Abimorad, E.
10 G., e Jomori, R. K. (2010). Efeito da frequência alimentar sobre o crescimento e a
11 composição isotópica ($\delta^{13}C$ e $\delta^{15}N$) de juvenis de pacu *piaractus mesopotamicus*.
12 Nucleus Animalium, 2(2), 1-12.

13 Førde-Skjærvik, O., Skjærvik, O., Mørkøre, T., Thomassen, M. S., Rørvik, K.
14 A. (2006). Dietary influence on quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*): effect
15 on glycolysis and buffering capacity in white muscle. Aquaculture, 252(2), 409-420.

16 Fournier, V., Gouillou-Coustans, M. F., Metailler, R., Vachot, C., Guedes, M.
17 J., Tulli, F., Kaushik, S. J. (2002). Protein and arginine requirements for
18 maintenance and nitrogen gain in four teleosts. British Journal of Nutrition, 87(05),
19 459-469.

20 Fuller, M. F., McWilliam, R., Wang, T. C., e Giles, L. R. (1989). The optimum
21 dietary amino acid pattern for growing pigs. British Journal of Nutrition, 62(02), 255-
22 267.

23 Furuya, W. M., Pezzato, L. E., Pezzato, A. C., Barros, M. M., & Miranda, E. C.
24 D. (2001). Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de
25 alguns ingredientes para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira
26 de Zootecnia, 1143-1149.

27 Furuya, W. M. F. (Ed.). (2010). Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias.
28 GFM.

29 Golterman, H.L., Clymo, R.S., Ohnstad, M.A.M. Methods for physical and
30 Chemical Analysis of Freshwaters. Blackweel Sci. Publ., London, IBP Handbook,
31 v.8, p.214, 1978.

32 Green, J. A., e Hardy, R. W. (2002). The optimum dietary essential amino acid
33 pattern for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), to maximize nitrogen retention and
34 minimize nitrogen excretion. Fish Physiology and Biochemistry, 27(1-2), 97-108.

Hayashi, C., Boscolo, W. R., Soares, C. M., e Meurer, F. (2002). Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a reversão sexual. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(2), 823-828.

Khan, K. U., Mansano, C. F., Nascimento, T. M. T., Boaratti, A. Z., Rodrigues, A. T., Queiroz, D. M. A., Romaneli, R. S., Sakomura, N. K., Fernandes, J. B. K. (submetido). Whole body amino acid composition of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and an estimation of dietary essential amino acid requirements for the formulation of its basal diets. *Animal Feed Science and Technology*.

Koroleff, F. Determination of nutrients. In: Grasshoff (ed.). *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie Weinheim, p.117-181, 1976.

Li, P., Mai, K., Trushenski, J., & Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino acids*, 37(1), 43-53.

Lovell, T., 1989. *Nutrition and Feeding of Fish*. Van Nostrand-Reinhold, New York. 260 pp.

Macedo, C. F., e Sipaúba-Tavares, L. H. (2010). Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. *Bol. Inst. Pesca*, 36(2), 149-163.

Mackereth, F.J.H., Heron, J., Talling, J.F. *Water Analysis: Some revised methods for limnologists*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, London, n.36, p.121, 1978.

Mai, K., Zhang, L., Ai, Q., Duan, Q., Zhang, C., Li, H., ... & Liufu, Z. (2006). Dietary lysine requirement of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 258(1), 535-542.

Mambrini, M., e Kaushik, S. J. (1994). Partial replacement of dietary protein nitrogen with dispensable amino acids in diets of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(2), 469-477.

Mitchell, H.H. 1964. *Comparative nutrition of man and domestic animals*. Academic Press, New York, NY, USA.

Nakashima, K., Yakabe, Y., Ishida, A., Yamazaki, M., & Abe, H. (2007). Suppression of myofibrillar proteolysis in chick skeletal muscles by α -ketoisocaproate. *Amino acids*, 33(3), 499-503.

Ogata, H. Y. (2002). Muscle buffering capacity of yellowtail fed diets supplemented with crystalline histidine. *Journal of fish biology*, 61(6), 1504-1512.

1 Peres, H., e Oliva-Teles, A. (2005). The effect of dietary protein replacement
2 by crystalline amino acid on growth and nitrogen utilization of turbot *Scophthalmus*
3 *maximus* juveniles. *Aquaculture*, 250(3), 755-764.

4 Peres, H., e Oliva-Teles, A. (2009). The optimum dietary essential amino acid
5 profile for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 296(1), 81-86.

6 Resende, E. K. D. (2009). Pesquisa em rede em aquicultura: bases
7 tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil.
8 *Aquabrazil. Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 52-57.

9 Rollin, X., Mambrini, M., Abboudi, T., Larondelle, Y., e Kaushik, S. J. (2003).
10 The optimum dietary indispensable amino acid pattern for growing Atlantic salmon
11 (*Salmo salar* L.) fry. *British Journal of Nutrition*, 90(05), 865-876.

12 Schuhmacher, A., Wax, C., e Gropp, J. M. (1997). Plasma amino acids in
13 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed intact protein or a crystalline amino acid
14 diet. *Aquaculture*, 151(1), 15-28.

15 Scorvo-Filho, J. D. (2003). Panorama da aquicultura nacional. *Informes*
16 *Técnicos—Associação Catarinense de Aquicultura*.

17 Segovia-Quintero, M. A., e Reigh, R. C. (2004). Coating crystalline methionine
18 with tripalmitin-polyvinyl alcohol slows its absorption in the intestine of Nile tilapia,
19 *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 238(1), 355-367.

20 Sidonio, L., Cavalcanti, I., Capanema, L., Morch, R., Magalhães, G., Lima, J.,
21 ... e Mungioli, R. (2012). Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e
22 oportunidades. *BNDES Setorial*, 35, 421-463.

23 Silva, A. J. (1985). Aspectos da alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei*
24 (Berg, 1895) (Pisces Characidae), no Pantanal de Mato Grosso. Universidade
25 Federal do rio de Janeiro (Tese de mestrado).

26 Singh, S., Gamalath, S., & Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of food
27 extrusion: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 42(8), 916-
28 929.

29 Sipaúba-Tavares, L. H. (1995). Limnologia aplicada à aquicultura. Funep.

30 Tjernsbekk, M. T., Tauson, A. H., Kraugerud, O. F., & Ahlstrøm, Ø. (2017).
31 Raw mechanically separated chicken meat and salmon protein hydrolysate as
32 protein sources in extruded dog food: effect on protein and amino acid digestibility.
33 *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 101(5), 323-331.

1 Trushenski JT, Kasper CS, Kohler CC (2006) Challenges and opportunities in
2 finfish nutrition. *North Am J Aquac* 68:122–140

3 Vijayan, M. M., Mommsen, T. P., Glémet, H. C., Moon, T. W. (1996). Metabolic
4 effects of cortisol treatment in a marine teleost, the sea raven. *Journal of*
5 *Experimental Biology*, 199(7), 1509-1514.

6 Wang, T. C., e Fuller, M. F. (1989). The optimum dietary amino acid pattern
7 for growing pigs. *British Journal of Nutrition*, 62(01), 77-89.

8 Wilson, R.P. (2002). Protein and amino acids. In: Halver JE, Hardy RW (eds)
9 *Fish Nutrition*, 3rd version. Elsevier Science, San Diego, USA, pp 144–179.

10 Wolkers, C. P. B., Serra, M., Hoshiba, M. A., & Urbinati, E. C. (2012). Dietary
11 L-tryptophan alters aggression in juvenile matrinxã *Brycon amazonicus*. *Fish*
12 *physiology and biochemistry*, 38(3), 819-827.

13 Wolkers, C. P. B., Serra, M., Szawka, R. E., & Urbinati, E. C. (2014). The time
14 course of aggressive behaviour in juvenile matrinxã *Brycon amazonicus* fed with
15 dietary L-tryptophan supplementation. *Journal of fish biology*, 84(1), 45-57.

16 Wu, G. (2013). Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*,
17 45(3), 407-411.

18 Wu, G. (2014). Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals:
19 a paradigm shift in protein nutrition. *Journal of animal science and biotechnology*,
20 5(1), 1.