

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DOS  
AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS PARA JUVENIS  
DE TILÁPIA-DO-NILO, PELO MÉTODO DA  
DELEÇÃO**

**Alexandre Firmino Diógenes**

**Jaboticabal, SP**

**2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DOS  
AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS PARA JUVENIS  
DE TILÁPIA-DO-NILO, PELO MÉTODO DA  
DELEÇÃO**

**Alexandre Firmino Diógenes**

**Orientador: Dr. João Batista Kochenborger Fernandes**

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**

**2013**

Diógenes, Alexandre Firmino  
D591d Determinação da Relação dos Aminoácidos Essenciais para  
Juvenis de tilápia-do-Nilo, Pelo Método da Deleção / Alexandre  
Firmino Diógenes. -- Jaboticabal, 2013  
v, 49 p. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013  
Orientador: João Batista Kochenborger Fernandes  
Banca examinadora: Luiz Edivaldo Pezzato, Fábio Rosa Sussel  
Bibliografia

1. Tilápia. 2. Nutrição. 3. Proteína. 4. Aminoácido. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3.043

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

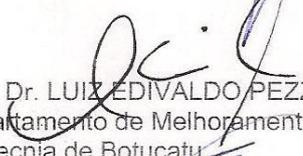
**TÍTULO:** Determinação da Relação dos Aminoácidos Essenciais para Juvenis de tilápia-do-Nilo, pelo Método da Deleção

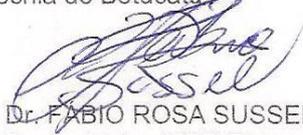
**AUTOR:** ALEXANDRE FIRMINO DIOGENES

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. JOAO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES

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

  
Prof. Dr. JOAO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES  
Laboratório de Peixes Ornamentais / Centro de Aquicultura da UNESP

  
Prof. Dr. LUIZ EDIVALDO PEZZATO  
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

  
Prof. Dr. FABIO ROSA SUSSEL  
Pólo Centro leste - UPD Pirassununga/SP, Cachoeira de Emas, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Data da realização: 05 de dezembro de 2013.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>v</b>
<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>01</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>02</b>
<b>APOIO FINANCEIRO.....</b>	<b>04</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>05</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>06</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>07</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>09</b>
<b>2.2. Principais aminoácidos em dietas de peixes.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.1. Aminoácidos essenciais.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2. Aminoácidos não essenciais.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Determinação de exigências de aminoácidos pelos peixes.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4. Método da deleção.....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Experimento.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Desempenho e parâmetros de eficiência alimentar.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Monitoramento das condições.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Determinação de nitrogênio corporal retido.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Análise de dados.....</b>	<b>24</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Desempenho.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. Composição corporal.....</b>	<b>28</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Princípio do método para determinar a exigência de aminoácidos por dedução. A é o primeiro aminoácido limitante; (B) e (C) são aminoácidos que estão, respectivamente, 10 e 20% (ou mais) em excesso relativo à (A) (Wang e Fuller, 1989).....**17**
- Figura 2.** Efeito da dieta com deleção de aminoácidos essenciais em 45% no ganho de nitrogênio corporal em tilápia-do-Nilo.....**29**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Aminoácidos essenciais e não essenciais, seguidos de suas abreviações.....	<b>10</b>
<b>Tabela 2.</b> Composição das dietas tratamento (%) em que um dos aminoácidos está deficiente.....	<b>21</b>
<b>Tabela 3.</b> Atendimento das exigências nutricionais (%) nos tratamentos de acordo com a composição na tabela 2.....	<b>22</b>
<b>Tabela 4.</b> Efeito das dietas na performance de crescimento e ganho de peso.....	<b>26</b>
<b>Tabela 5.</b> Efeito das dietas na performance de ingestão, conversão alimentar, eficiência alimentar e mortalidade.....	<b>27</b>
<b>Tabela 6.</b> Efeito das dietas na deposição de nitrogênio corporal em juvenis de tilápia-do-Nilo.....	<b>28</b>
<b>Tabela 7.</b> Comparação entre a relação de aminoácidos essenciais expressos em % da lisina com a relação ideal dos aminoácidos corporais obtidas nesse experimento.....	<b>29</b>
<b>Tabela 8.</b> Comparação entre a relação de aminoácidos essenciais expressos em % da lisina obtidas nesse experimento com outro autor. Ambos encontrados pela mesma metodologia.....	<b>30</b>
<b>Tabela 9.</b> Comparação entre a relação de aminoácidos essenciais expressos em % da lisina obtidas nesse experimento com a composição de aminoácidos essenciais, como porcentagem da relação aminoácido/lisina corporal em tilápia-do-Nilo.....	<b>31</b>

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antônio e Sandra, aos meus irmãos Alessandro e Alessandra, ao meu sobrinho e afilhado Arthur. Agradeço ao apoio, a dedicação e a confiança, mesmo com a distância.

Aos meus amigos presentes, que se fizeram família: Noele, Hugo e Rafael.

Amo Vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me dar forças para continuar lutando pelos meus objetivos.

Aos meus pais, Antônio e Sandra, obrigado pelo exagero de amor! À vocês devo meu eterno obrigado pelos ensinamentos e educação.

Aos meus irmãos, Alessandro e Alessandra, que apesar de longe sempre estiveram ao meu lado, apoiando minhas escolhas.

Aos meus familiares (TODOS), que sabem a importância da união em família. Aos que me apoiam e que me dão carinho na dosagem certa. Agradeço aos tios, primos e agregados, em especial a minha avó Antônia, que faz o favor de deixar a distância sempre mais difícil. Saudades sempre!

Ao meu orientador, João Batista. Agradeço pela oportunidade, confiança, e orientação.

Aos membros da minha banca de defesa Prof. Dr. Luiz Pezzato e Dr. Fábio Sussel, pelo tempo disponível, por se deslocarem até Jaboticabal e pelas correções e dicas na minha dissertação.

Ao apoio e conselho dos eternos professores e amigos: Felipe Ribeiro, Carol Feitosa, Inês Xavier e Rodrigo Costa.

A equipe do laboratório: Marreta, Kuketi, Silvinha, Jefferson, Daniel, Bruno, Julian, Nathaly, Jeff e Maycon. Obrigado pela ajuda! Em especial ao Valdecir, pelo apoio e dedicação 24 horas!

Aos meus amigos que mesmo longe, me apoiam sempre: Noninhas, Nivaldinho e Pepeu. À Juinim, Felipe, Natália, Lycia, Nycolau e Laylex. Aos CEFET-VIP: Galo, Jo&Jo (sem Jordana), Deinha, Twynnys, MaRy\_GiRI, Lalu e Aracatxi. E aos universitários: Natália, Totola, Danny, Café, Lelin, Daniel e Cris.

À republica Boate Azul, minha atual família: Bigo, Pó, Bags, PBR, Peds, Boy, Kuds, Qxo, Mói, Feips, Pumba e Leitaum. Obrigado pelo apoio e pelos momentos de felicidade que me proporcionaram nesses quase 2 anos juntos.

Agradecer em especial ao Hugo, Ivan, Luiz Fernando, Rafael, Henrique e Rodrigo, por estarem sempre ao meu lado, por serem meus amigos e irmãos!

Obrigado pelos conselhos e principalmente por deixarem os momentos difíceis mais fáceis. Amo vocês! (Já sinto saudades).

Aos amigos: To-Ki-Tô, Sacumé, AZT, Dou, Fanfan, Chris, Monique, Léo, Lombo, Hôorse, Pocotó, Myrelle, Luísa, Matuta e Manú, que de diversas maneiras contribuíram pra minha felicidade!

Ao pessoal do aviário, laboratório modelo, em especial ao Edney, Juliano, Melina, Daniella, Nayara, Letícia e Camila. Admiro muito o trabalho de vocês! Obrigado pelas festas!

Ao CNPq pela bolsa de mestrado, que sem o qual, nada disto poderia ser feito  
À empresa Ajinomoto® Animal Nutrition, pelo apoio, pelas análises e doação de insumos e viabilização desta dissertação.

**Muito Obrigado!**

## **APOIO FINANCEIRO**

CNPQ, Bolsa de mestrado.

Ajinomoto® do Brasil, doação dos aminoácidos

*If you are not willing to learn, no one can help you.*

*If you are determined to learn, no one can stop you.*

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo determinar a melhor relação dos principais aminoácidos limitantes na dieta, pelo método da deleção, para juvenis de tilápia-do-Nilo da linhagem GIFT. Peixes com peso inicial  $20,0 \pm 0,8$ g foram condicionados, por 57 dias, em tanques de alvenaria (1500 L) com sistema de recirculação de água. A alimentação ocorreu três vezes ao dia (08:00, 12:00 e 16:00 horas) com dietas formuladas com base na composição dos aminoácidos corporais e conforme citado por Furuya (2010). Sendo a dieta controle positivo formulada atendendo a todas as exigências dos peixes, e as demais formuladas pela diluição desta com amido de milho, gerando deficiência de 45%. Com exceção do aminoácido teste, os demais aminoácidos foram suplementados na dieta com aminoácidos industriais na mesma concentração da dieta controle positivo (100%). O delineamento foi inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e 4 repetições no tempo tomadas duas a duas. A determinação da relação ideal foi feita com base na linha de regressão entre o grupo teste, cujo aminoácido limitante proporcionou a maior redução na retenção de nitrogênio e o grupo controle, traçando uma reta até atingir o platô formado pela retenção proporcionado pela dieta controle positivo, de acordo com o método utilizado por Wang & Fuller (1989). O tratamento controle obteve o maior ganho de peso, resultando na maior deposição de nitrogênio. A relação dos aminoácidos essenciais, expressos em relação a lisina (=100)/taxa estimada do aminoácido foi: metionina, 64; treonina, 94; triptofano, 24; arginina, 126; histidina, 34; isoleucina, 57; leucina, 96; e valina, 76.

## PALAVRAS-CHAVE

Tilápia, Nutrição, Proteína, Aminoácido, Retenção de nitrogênio.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the optimal ratio of the main limiting amino acids in the diet, by deletion method, for juvenile Nile tilapia GIFT strain. Fishes with an initial weight  $\pm 20.0$  g were conditioned for 57 days in tanks (1500 L) with recirculating water system. Fed three times a day (08:00am, 12:00pm and 4:00pm) with diets based on amino acid composition and Furuya (2010). The positive control diet formulated had all the requirements for fishes, and the other made by diluting this with corn starch, had a 45% of deficiency. With the exception of the amino acid test, the other amino acids in the diet were supplemented with synthetic amino acids at the same concentration of positive control diet (100%). A completely randomized design with 11 treatments and 4 replications taken two at a time was used. The determination of the optimum ratio was based on the regression line between group test, whose limiting amino acid provided the greatest reduction in nitrogen retention and the control group, drawing a straight line until it reaches the plateau formed by the retention provided by positive control diet, according to the method used by Wang & Fuller (1989). Thus, the control treatment had the highest weight gain, resulting in higher nitrogen deposition. The ideal ratio of essential amino acids, expressed relative to lysine (=100)/estimated rate of amino acid was: methionine, 64; threonine 94, tryptophan 24, arginine 126, histidine, 34, isoleucine 57, leucine 96, valine and, 76.

## KEY-WORDS

Tilapia, Nutrition, Protein, Amino acid, Nitrogen retention.

## 1. INTRODUÇÃO

Com o fortalecimento da aquicultura, a produção de tilápia-do-Nilo tem se intensificado a cada dia no Brasil e no mundo, surgindo à necessidade do desenvolvimento de técnicas de cultivo mais eficientes. Nesse contexto, a alimentação dos peixes ostenta importância econômica fundamental, sendo responsável por mais de 60% das despesas operacionais (Teixeira, 2008) \*, gerando a necessidade do desenvolvimento de dietas mais eficientes, com menor custo e baixo impacto ambiental. Rações devem ser desenvolvidas para atender as exigências das linhagens nas diferentes fases de vida, além de apresentarem ótima capacidade nutricional, alta digestibilidade e palatabilidade.

O custo da ração é estabelecido, principalmente, pela sua composição proteica, que deve ser confiável e de boa procedência, apresentando alta digestibilidade. Segundo Wilson *et al.* (2002), a proteína é o componente principal e mais caro na formulação de uma dieta de animal aquático. Ela pode ser definida pela sua sequência única de aminoácidos, e de forma como são decodificadas geneticamente no organismo (NRC, 2011), apresentando, desta forma, numerosas estruturas e funções metabólicas distintas.

Os estudos realizados para determinar a exigências de aminoácidos pelos peixes tem sido feito, em sua grande parte, pelo método da dose-reposta (Wilson, 2003). Essa técnica é de simples compreensão, pois se baseia no uso de dietas com diferentes níveis do aminoácido a ser testado sendo ofertadas ao animal, onde o consumo da dieta juntamente com as variáveis zootécnicas (resposta) resultam na escolha da dieta com melhor perfil de aminoácido.

Em geral, as dietas testes são formuladas por duas técnicas: da suplementação e da diluição. A primeira consiste no aumento gradativo da concentração do aminoácido nas dietas. A segunda, método da diluição da dieta, consiste em diluir sequencialmente uma dieta alta em proteína e deficiente no aminoácido teste, com uma dieta isoenergética livre de proteína, obtendo-se níveis intermediários do aminoácido. Ambos processos de formulação podem resultar na mesma composição das dietas, geralmente testadas pelo método da dose-reposta,

que, para sua realização, é necessário a demanda de muito espaço, tempo e dinheiro.

Além das técnicas descritas existe o método da deleção, que se baseia na diluição da dieta com um ingrediente inerte e na posterior suplementação de todos os nutrientes menos o que vai ser avaliado. Este método foi desenvolvido por Bender (1965), em estudos com nutrição de ratos. Posteriormente foi aprimorado por Wang & Fuller (1989), em estudos com porcos, que afirmam que a remoção de um aminoácido não limitante não tem efeito sobre a retenção de nitrogênio. Logo, as mudanças na retenção de nitrogênio pela remoção proporcional de cada aminoácido pode ser usadas para calcular um perfil de aminoácidos na qual todos estes aminoácidos foram igualmente limitantes.

A técnica da diluição, foi utilizada pela primeira vez em peixes por Rollin *et al.* (2003), com salmão do Atlântico (*Salmo salar L.*). Estes autores perceberam que as alterações no ganho de nitrogênio relacionados com a deleção de um aminoácido essencial, pode calcular uma dieta padrão, com base no conceito de proteína ideal, em que todos os aminoácidos essenciais foram igualmente limitantes.

Devido ao menor custo de dinheiro, tempo e espaço, esta técnica também torna-se de grande importância para a determinação dos requerimentos de aminoácidos essenciais para outras espécies de peixes. Logo, esse estudo teve por objetivo determinar a relação dos principais aminoácidos limitantes na dieta (lisina, metionina, treonina, triptofano, arginina, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina e valina) pelo método da deleção para juvenis de tilápia-do-Nilo da linhagem GIFT.

---

\*Citação conforme Aquaculture Nutrition

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A proteína ideal é definida como o balanço de aminoácidos (AAs) que atendem as exigências dos animais sem deficiência ou excesso. Assim a proteína ideal pode ser classificada como a relação entre a lisina com os demais aminoácidos, tendo em vista que a lisina é considerada aminoácido referência por apresentar amplo conhecimento na literatura, além de participar da síntese proteica muscular e ter baixo custo na determinação em laboratório. Logo estudos com determinação do perfil de proteína ideal visam a eficiência proteica, redução de gastos com alimentação e redução do impacto ambiental.

Os aminoácidos são moléculas que contêm um grupo amina e um grupo carboxila, e que apresentam geralmente a fórmula  $H_2NCHR\text{COOH}$ , no qual o R é uma cadeia lateral, sendo os alfa-aminoácidos metabolicamente mais importantes e naturalmente abundantes (Brody, 1999). Esses são responsáveis pela formação das proteínas. E, geralmente, apresentam como estrutura um carbono central (carbono alfa, quase sempre quiral) ao qual se ligam quatro grupos: o grupo amina ( $NH_2$ ), grupo carboxílico ( $COOH$ ), hidrogênio e um substituinte característico de cada AA.

Em dietas para crescimento, os AAs são tradicionalmente classificados em dois grupos: os nutricionalmente essenciais (indispensáveis) e os não essenciais (dispensáveis) para peixes. Os aminoácidos essenciais (AAE) são de grande importância ao desenvolvimento dos animais, uma vez que estes não são capazes de sintetizá-lo, sendo necessário a inserção destes nas dietas. Já os aminoácidos não essenciais (AANE) são sintetizados no próprio organismo. São geralmente representados por três letras e/ou pela abreviação de uma letra (Tabela 1) (IUPAC-IUB-JCBN, 1984; Buxbaum, 2007). A abreviação de três letras é comumente usado em nutrição animal (NRC, 2011).

**Tabela 1.** Aminoácidos essenciais e não essenciais, seguidos de suas abreviações.

<b>Essencial (AAE)</b>	<b>Abreviações</b>		<b>Não Essencial (AANE)</b>		
<b>Arginina</b>	Arg	R	<b>Alanina</b>	Ala	A
<b>Histidina</b>	His	H	<b>Asparagina</b>	Asn	N
<b>Isoleucina</b>	Ile	I	<b>Aspartato</b>	Asp	D
<b>Leucina</b>	Leu	L	<b>Cisteína</b>	Cys	C
<b>Lisina</b>	Lys	K	<b>Glicina</b>	Gly	G
<b>Metionina</b>	Met	M	<b>Glutamina</b>	Gln	E
<b>Fenilalanina</b>	Phe	F	<b>Glutamato</b>	Glu	Q
<b>Treonina</b>	Thr	T	<b>Prolina</b>	Pro	P
<b>Triptofano</b>	Trp	W	<b>Serina</b>	Ser	S
<b>Valina</b>	Val	V	<b>Tirosina</b>	Tyr	Y

## 2.2. Principais aminoácidos em dietas de peixes

### 2.2.1. Aminoácidos Essenciais

A lisina é o aminoácido essencial com o maior número de estudos em dietas para peixes. Isso se deve ao fato de ser encontrada em alta concentração em ingredientes como farinha de peixe e farinha de sangue, e em baixas concentrações em ingredientes de origem vegetal. A lisina torna-se, muitas vezes, o aminoácido mais limitante em ingredientes na produção de dietas, principalmente quando há substituição de proteína de origem animal por origem vegetal (Mai *et al.*, 2006). A inclusão desse aminoácido em rações está cada dia mais fácil, devido sua disponibilidade comercial. A adição de lisina nas dietas à base de proteínas vegetais permite a redução do custo-benefício de proteína bruta na ração, sem afetar o desempenho do crescimento dos peixes (Mai *et al.*, 2006).

Estudos com a redução da lisina na dieta demonstraram diminuição no crescimento e eficiência alimentar, além de problemas de saúde, tais como erosão barbatana dorsal e caudal em truta arco-íris e carpa comum (Ketola, 1983;

Guillaume *et al.*, 1999). O mesmo foi observado por Li *et al.* (2008), que descrevem que dietas com distintos níveis de lisina podem interferir diretamente na performance de crescimento e saúde do peixe (Li *et al.*, 2008).

Em outro estudo, Cheng *et al.* (2003) determinaram que a suplementação de dietas a base de proteína vegetal com a lisina cristalina pode diminuir a excreção de amoníaco e de fósforo solúvel no ambiente aquático. Além disso, sua suplementação na dieta é eficaz na melhoria da resposta imune e o desenvolvimento gastrointestinal de Jian carpa (Zhou, 2005).

A metionina é também considerado o primeiro aminoácido limitante em muitas dietas para peixes, em especial os que contêm elevados níveis de fontes de proteínas vegetais, tais como farelo de soja e farelo de amendoim (Mai *et al.*, 2006). Usualmente este aminoácido é encontrado juntamente com a cistina, que facilita sua síntese, apesar de existir informações limitadas sobre essencialidade nutricional da cistina para os peixes. Porém, estima-se que a cistina pode poupar 40-60% de metionina na dieta para vários peixes (Wilson, 2002).

A metionina é comumente disponível na forma DL. A maioria dos animais utilizam os isômeros da L e D - metionina, semelhantemente eficaz (Baker, 2006). A truta arco-íris, por exemplo, pode usar D-metionina para substituir a L-metionina em uma base equimolar (Kim *et al.*, 1992). Em contraste com os mamíferos, a utilização do análogo hidróxido metionina (composto sintético não nitrogenado) por peixes ou crustáceos é altamente ineficiente (Wilson, 2002).

O estudo da treonina na alimentação de animais aquáticos tem recebido pouca atenção da comunidade científica. Segundo Li *et al.* (2008) a maioria das pesquisas com a treonina foi focada nas necessidades mínimas nutricionais para vários peixes, devido sua deficiência em proteínas vegetais. Porém é sabido que a treonina, o maior componente de mucina no intestino delgado, é responsável pela integridade e o funcionamento da barreira intestinal.

Li *et al.* (2007) relatam que dietas com níveis reduzidos de treonina podem afetar a imunidade em mamíferos. Assim, é possível assimilar o uso de dietas ricas em treonina, na imunidade dos peixes, já que segundo Eddy & Fraser (1982), os

peixes produzem significantes quantidades de muco, em situações de estresses, trocas de água, exposições a metais pesados, amônia e poluentes.

Outro aminoácido essencial conhecido em estudos com peixes é o triptofano. Ele pode ser convertido em serotonina (5-hidroxitriptamina, neurotransmissor) e em melatonina (antioxidante) (Fang *et al.*, 2002). O uso desse aminoácido pode ter futuro promissor na gestão de saúde aquícola, em casos onde o manuseio e transporte possa afetar a saúde animal. A serotonina, tanto endógena, quanto exógena pode inibir a ingestão de alimentos pelos peixes (em robalos, por exemplo) e animais terrestres (Rubio *et al.*, 2006). Já a síntese da melatonina em peixes é regulada pelo fotoperíodo e desempenha papel importante na mediação de maturação sexual de determinados peixes, como o salmão (Amano *et al.*, 2004) e a carpa indiana (Bhattacharya *et al.*, 2007).

A suplementação de L-triptofano na dieta pode inibir a agressividade em juvenis de truta arco-íris (Hseu *et al.*, 2003), reduzir o canibalismo e anorexia induzida pelo estresse em juvenis garoupa (Höglund *et al.*, 2007), e evitar aumento de cortisol induzida pelo estresse (Lepage *et al.*, 2003). A utilização deste aminoácido em dietas para peixes é importante em situações de pré-estresse, uma vez que a elevação prolongada de cortisol afeta negativamente o crescimento, consumo de ração, aumento da proteína, a imunidade e a doença desafio (Vijayan *et al.*, 1996).

### **2.2.2. Aminoácidos não essenciais**

A alanina pertence ao grupo de aminoácidos não essenciais, e representa os principais substratos energéticos e o maior precursor glicogênico para peixes. Como este aminoácido apresenta alta palatabilidade para peixes pode ser considerado estimulante alimentar, embora os mecanismos precursores sejam desconhecidos (Shamushaki *et al.*, 2007).

Esse aminoácido é considerado o veículo preferido para o metabolismo de nitrogênio intercelular de peixe (Mommsen *et al.*, 1980), apresentando rápida oxidação e baixa toxicidade. Assim, juntamente com o aspartato, frequentemente utilizados para estudos com balanço de nitrogênio em nutrição de organismos

aquáticos. A descarboxilação do aspartato gera a formação da  $\beta$ -alanina, que dentre outros, é constituinte da carnosina ( $\beta$ -alanil-L-histidina) e da anserina ( $\beta$ -alanil-1-metil-L-histidina), antioxidantes importantes no músculo esquelético de animais aquáticos, principalmente peixes marinhos pelágicos, especialmente as espécies migratórias (Snyder *et al.*, 2008).

Estudos foram realizados com a suplementação de  $\beta$ -alanina na dieta. Ogata (2002), por exemplo, constatou o aumento da concentração intramuscular de carnosina em *Seriola lalandi*. Entretanto, Kim *et al.* (2003) não observaram efeito positivo dessa suplementação sobre o desempenho de crescimento da *Kamchatka flounder*. Há também estudos com  $\beta$ -alanina em animais aquáticos sobre o comportamento e respostas ao estresse (Araga *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 1982).

Outro aminoácido não essencial bastante utilizado na nutrição de peixes é a glutamina. Este aminoácido é um dos mais abundantes nos plasma e musculatura de peixes, sendo o glutamato e seu produto de descarboxilação (GABA) neurotransmissores presentes em concentrações elevadas no cérebro (Li *et al.*, 2008). Através amoniagenese renal, a glutamina, também desempenha papel importante na regulação do equilíbrio ácido-base do corpo e estimula a síntese da proteica muscular em mamíferos (Wu *et al.*, 2007), apesar dessas informações não serem confirmadas para peixes (Li *et al.*, 2008).

Lin & Zhou (2006) descreveram que a suplementação de glutamina na dieta aumenta o ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, desenvolvimento intestinal e atividade das enzimas digestivas em *Hypophthalmichthys molitrix*. Já os autores Buentello & Gatlin (1999) e Li *et al.* (2007) destacaram que a glutamina seja essencial para a resposta imune de peixes.

### **2.3. Determinação de exigências de aminoácidos pelos peixes**

A formulação de dietas com bom perfil dos aminoácidos essenciais e teor adequado de proteína, é pré-requisito para o aumento da utilização de aminoácidos no crescimento, com redução de excreção de nitrogênio (Peres & Oliva-Teles,

2009). Logo, diversos estudos têm sido realizados para a determinação das exigências dos aminoácidos na dieta de peixes.

De acordo com Wilson (2003), as exigências de aminoácidos pelos peixes são, em grande parte, determinados pelo método dose-resposta. Segundo esse mesmo autor, esse método dificulta o estudo por exigir bastante tempo de pesquisa, além de inviabilizar o projeto por requerer grandes investimentos. Quando se refere à execução, esse método também apresenta problemas (Cowey & Luquet, 1983; Cowey & Tacon, 1983; Cowey, 1988, 1994; Wilson, 1989; Dabrowski & Guderley, 2002), como grandes variações nos valores de exigências de aminoácidos essenciais (Tacon & Cowey, 1985; Cowey, 1994; Kaushik, 1995; Fournier *et al.* 2002), que podem ser gerados pelas diferenças entre as espécies, além das diferentes fases e da composição da dieta.

Geralmente as dietas empregadas para a determinação da exigência dos aminoácidos são formuladas pela técnica da suplementação, que se baseia no aumento da concentração do aminoácido nas dietas e, segundo Owens & Pettigrew (1989), as respostas podem ser observadas por meio da conversão alimentar, do ganho de peso, deposição proteica corporal, balanço de nitrogênio, concentrações plasmáticas e taxa de oxidação. Outro método que vem sendo utilizado com sucesso para estudos com aminoácidos é a técnica de diluição da dieta. Esta consiste em diluir sequencialmente uma dieta alta em proteína e deficiente no aminoácido teste, com uma dieta isoenergética livre de proteína, obtendo-se níveis intermediários do aminoácido. Gous (1980) relata que essa técnica é um “método melhorado”, baseando-se no princípio que ela proporciona relações aminoacídicas constantes entre os níveis avaliados, produzindo resultados mais confiáveis que a técnica da suplementação, apesar da proteína bruta variar. Por outro lado, em países europeus tem-se utilizado o método de deleção para a determinação dessas exigências (Rollin *et al.*, 2003), tendo em vista que as técnicas da suplementação e da diluição proporcionam diferenças nas relações aminoacídicas entre os níveis dos aminoácidos avaliados.

Considerando as dificuldades e as divergências citadas no método dose-resposta e que o perfil ideal dos aminoácidos pode ser calculado pela ingestão de determinada quantidade de nitrogênio resultando em maior retenção da mesma.

Outra técnica vem sendo utilizada para a determinação da relação ideal dos aminoácidos, com base no ganho de aminoácidos corporais, é a técnica do abate comparativo na deleção dos nutrientes. Este modelo segue como princípio, que a diferença entre a quantidade de aminoácidos corporais iniciais e finais deve-se à quantidade de aminoácidos ingerido. Segundo o NRC (2011), a maioria das espécies de peixes alimentadas com dietas de alta qualidade apresentam deposição de aminoácidos na proteína corporal de 25 a 55% do aminoácido consumido.

Alguns autores estimaram as exigências de aminoácidos essenciais através de aumentos diários dos aminoácidos essenciais na proteína corporal de peixes alimentados (Ogino, 1980; Kaushik *et al.*, 1991), quando a exigência de apenas um aminoácido essencial é conhecido. Porém, fica difícil avaliar a confiabilidade das estimativas referidas, na ausência de qualquer medida experimental da composição de proteína ideal. Para tanto, um método foi estabelecido inicialmente para leitões (Fuller *et al.*, 1989;. Wang & Fuller, 1989), posteriormente sendo utilizado em outras espécies animais, como no estudo de Rollin *et al.* (2003), com salmão do Atlântico. Este método é baseado no conceito de que a redução de um aminoácido essencial não limitante não tem efeito sobre o ganho de nitrogênio. Porém, quando um único aminoácido é limitante na dieta, a taxa de crescimento de proteína corporal está diretamente relacionada com o aminoácido limitante. Quando há alterações no ganho de nitrogênio relacionados com a deleção de um aminoácido essencial por vez, pode-se calcular uma dieta padrão, com base no conceito de proteína ideal, em que todos os aminoácidos essenciais são igualmente limitantes.

Como a técnica de deleção foi utilizada apenas com salmão do Atlântico (Rollin *et al.*, 2003) e com a Dourada (*Sparus aurata*) (Peres & Oliva-Teles, 2009), é possível a determinação da relação ideal dos aminoácidos, e que nenhuma particularidade do metabolismo proteico de peixe parece invalidar a aplicação desses conceitos (Cowey, 1994). Assim, esta técnica torna-se de grande importância para a determinação das exigências de aminoácidos essenciais para tilápia-do-Nilo.

## 2.4. Método da deleção

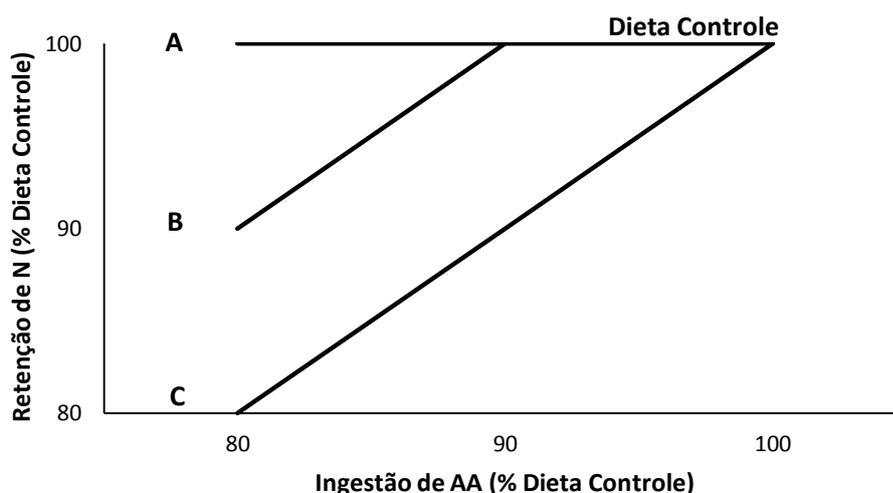
A determinação da relação ideal de AAs foi feita com base no método utilizado por Wang & Fuller (1989). Este método se baseia no conceito de que a remoção de um aminoácido não-limitante não tem efeito sobre a retenção de nitrogênio. Assim, as mudanças da retenção de nitrogênio serão influenciadas pela deleção do aminoácido testado, e usadas para calcular o perfil ideal dos aminoácidos em cada dieta na qual todos os aminoácidos são igualmente limitantes. Logo, a análise de regressão é feita por meio do nitrogênio retido (determinado pela técnica do abate comparativo) e o aminoácido ingerido.

A determinação da quantidade de cada aminoácido que pode ser removido sem afetar a retenção de nitrogênio deve ser estabelecida a partir dos resultados do ensaio de balanço de nitrogênio. Para fazer a estimativa do perfil “ideal” Wang & Fuller (1989) propuseram um modelo linear demonstrado graficamente na figura 1. Neste modelo assume-se que:

1) A remoção do primeiro aminoácido limitante (A) causaria a maior redução na retenção de nitrogênio,

2) Se a remoção de um aminoácido não causar redução na retenção de nitrogênio (C), então a quantidade removida estava em excesso relativo ao primeiro aminoácido limitante,

3) Se a remoção de um aminoácido resultar na redução da retenção de nitrogênio intermediário a 1 e 2 (B), então a proporção que poderia ter sido removida sem reduzir a retenção de nitrogênio poderia ser interpolada proporcionalmente.



**Figura 1.** Princípio do método para determinar a exigência de aminoácidos por dedução. A é o primeiro aminoácido limitante; (B) e (C) são aminoácidos que estão, respectivamente, 10 e 20% (ou mais) em excesso relativo à (A) (Wang e Fuller, 1989).

Sendo o y conhecido pode-se calcular x pela fórmula:  $y = y_0 + (x - x_0)(y_1 - y_0)/(x_1 - x_0)$ . Presumindo-se que a inclinação da reta para cada aminoácido seja idêntica, pode-se calcular um ponto no eixo x (interpolação linear) para cada aminoácido até o qual uma redução do aminoácido não teria efeito sobre a retenção de nitrogênio. Assim, para determinar os resultados, os valores de retenção de nitrogênio e a ingestão de aminoácidos determinados, são transformados em porcentagem da dieta controle (%) para realização dos cálculos. A concentração dos aminoácidos, assim como a retenção de nitrogênio determinada com a dieta controle, são fixados para 100%.

Com base na linha de regressão entre o grupo teste, cujo aminoácido limitante proporciona a maior redução na retenção de nitrogênio e o grupo controle, são interpolados valores na qual um ponto no eixo x pode ser calculado para cada aminoácido até um ponto em que a redução do aminoácido não tenha efeito sobre a retenção de nitrogênio, ou seja, até atingir o platô formado pela retenção proporcionado pela dieta controle positivo.

Entre outros fatores, a sustentabilidade na produção de peixes é dependente principalmente de um programa nutricional adequado que permita reduzir custos e o impacto ambiental. Um balanço adequado da oferta de nutrientes de acordo com conhecimentos das exigências nutricionais dos animais é essencial visando produção sustentável e econômica. Nesse sentido, programas nutricionais bem ajustados dependem da definição precisa das exigências nutricionais assim como de ferramentas que permitam estabelecer as exigências considerando os fatores que interferem nas mesmas. Desta forma, o objetivo deste estudo determinar a relação dos principais aminoácidos limitantes na dieta (LYS, MET, THR, TRP, ARG, HIS, ILE, LEU, PHE E VAL) pelo método da deleção para juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Experimento

O estudo foi conduzido no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP), localizado no município de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Para determinação da relação dos principais aminoácidos limitantes na dieta de juvenis de tilápia do Nilo, foram realizados 11 ensaios metabólicos distribuídos em um delineamento em blocos inteiramente casualizado, com quatro repetições no tempo tomadas duas a duas. Juvenis de tilápia-do-Nilo ( $20 \pm 0,9g$ ), invertidas sexualmente, da linhagem GIFT foram estocados em tanques de alvenaria de 1500 litros, passando por observação de 2 semanas, enquanto alguns exemplares foram avaliados no Laboratório de Patologia do CAUNESP para tomada de eventuais medidas preventivas.

Os peixes foram pesados e distribuídos em 22 tanques de concreto na proporção de 34 peixes por aquário, e submetidos às dietas tratamento por 57 dias. Durante o experimento os peixes foram alimentados três vezes ao dia (8:00, 12:00 e 16:00 horas) até a saciedade aparente.

Os peixes do tratamento Controle Positivo (CP) foram alimentados com uma dieta peletizada, baseada na relação às exigências nutricionais de acordo como citado por Furuya (2010) e conferida pela composição dos aminoácidos corporais da carcaça da tilápia na mesma fase de cultivo (Rollin *et al.*, 2003), (Tabela 2). As demais dietas foram formuladas pela técnica da deleção, no qual a dieta controle positivo foi diluída com amido de milho gerando deficiência de 45% em todos os nutrientes. Com exceção do aminoácido teste, os demais aminoácidos foram suplementados com aminoácidos cristalinos na mesma concentração da dieta controle positivo (100%), assim como os demais nutrientes (Tabela 3).

Para garantir que as dietas continuassem isotróficas, foram adicionados às dietas teste uma fonte sintética de alanina e ácido glutâmico. A formulação da dieta com base na técnica da deleção garantiu que todos os nutrientes das dietas ficassem na mesma concentração que a dieta controle positivo, com exceção do aminoácido a ser testado. Desta forma a técnica da diluição das dietas possibilitou

a redução dos aminoácidos na mesma proporção mantendo a relação ideal entre eles.

### **3.2. Desempenho e parâmetros de eficiência alimentar**

Os peixes tiveram pesos iniciais e finais aferidos com balança digital com duas casas decimais. Os dados de ganho de peso foram feitas diminuindo o peso final médio pela média do peso inicial.

Os valores de ingestão foram calculados com base na ingestão diária individual, porém os cálculos da conversão alimentar e da eficiência alimentar foram baseados na ingestão total em relação ao número de peixes em cada repetição. Todos esses valores foram corrigidos usando a quantidade de peixes sobreviventes em cada repetição.

Para análises estatísticas, a mortalidade foi calculada usando os valores da viabilidade, definida pelo arco seno da raiz da mortalidade por cem. Porém, os valores expressos nesse trabalho foram em porcentagem.

**Tabela 2.** Composição das dietas tratamento (%) em que um dos aminoácidos está deficiente.

<b>Ingredientes</b>	<b>CP</b>	<b>LYS</b>	<b>MET</b>	<b>THR</b>	<b>TRP</b>	<b>ARG</b>	<b>HIS</b>	<b>ILE</b>	<b>LEU</b>	<b>PHE</b>	<b>VAL</b>
<b>Ração Controle Positivo</b>	----	55,0000	55,0000	55,0000	55,0000	55,0000	55,0000	55,0000	55,0000	55,0000	55,0000
<b>Milho Grão</b>	35,0000	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>Amido</b>	8,9558	15,6419	15,5483	15,4844	15,4079	14,7777	15,2524	15,5066	15,5203	15,7344	15,4575
<b>Farinha de Peixe</b>	16,0000	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>L-Alanina</b>	10,2219	7,9949	7,6283	7,8103	7,4866	8,5884	7,7421	7,6749	7,6976	7,7751	7,6785
<b>Farelo de Soja</b>	5,5278	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>Óleo de Soja</b>	5,2394	3,4472	3,4474	3,4475	3,4476	3,4488	3,4479	3,4475	3,4474	3,4471	3,4476
<b>L-Glutâmico</b>	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000
<b>Gelatina</b>	3,0000	1,3500	1,3500	1,3500	1,3500	1,3500	1,3500	1,3500	1,3500	1,3500	1,3500
<b>Celulose</b>	4,3788	2,7692	2,7692	2,7692	2,7692	2,7692	2,7692	2,7692	2,7692	2,7692	2,7692
<b>Carboximetilcelulose</b>	2,0000	0,9000	0,9000	0,9000	0,9000	0,9000	0,9000	0,9000	0,9000	0,9000	0,9000
<b>Glucose</b>	2,0000	4,5000	4,5000	4,5000	4,5000	4,5000	4,5000	4,5000	4,5000	4,5000	4,5000
<b>Fosfato Bicálcico</b>	----	1,5671	1,5671	1,5671	1,5671	1,5671	1,5671	1,5671	1,5671	1,5671	1,5671
<b>L-Lisina</b>	0,9125	0,0000	0,8182	0,8182	0,8182	0,8182	0,8182	0,8182	0,8182	0,8182	0,8182
<b>L-Fenilalanina</b>	0,8243	0,7508	0,7508	0,7508	0,7508	0,7508	0,7508	0,7508	0,7508	0,0000	0,7508
<b>L-Arginina</b>	0,5097	0,6090	0,6090	0,6090	0,6090	0,0000	0,6090	0,6090	0,6090	0,6090	0,6090
<b>L-Treonina</b>	0,7371	0,5364	0,5364	0,0000	0,5364	0,5364	0,5364	0,5364	0,5364	0,5364	0,5364
<b>L-Leucina</b>	0,0191	0,4596	0,4596	0,4596	0,4596	0,4596	0,4596	0,4596	0,0000	0,4596	0,4596
<b>Premix</b>	1,0000	0,4500	0,4500	0,4500	0,4500	0,4500	0,4500	0,4500	0,4500	0,4500	0,4500
<b>L-Isoleucina</b>	0,4388	0,4232	0,4232	0,4232	0,4232	0,4232	0,4232	0,0000	0,4232	0,4232	0,4232
<b>DL-Metionina</b>	0,5072	0,4182	0,0000	0,4182	0,4182	0,4182	0,4182	0,4182	0,4182	0,4182	0,4182
<b>L-Valina</b>	0,2208	0,3777	0,3777	0,3777	0,3777	0,3777	0,3777	0,3777	0,3777	0,3777	0,0000
<b>L-Histidina</b>	0,2331	0,2366	0,2366	0,2366	0,2366	0,2366	0,0000	0,2366	0,2366	0,2366	0,2366
<b>L-Triptofano</b>	0,2238	0,1364	0,1364	0,1364	0,0000	0,1364	0,1364	0,1364	0,1364	0,1364	0,1364
<b>BHT</b>	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500
<b>Cloreto de Potássio</b>	----	0,2222	0,2222	0,2222	0,2222	0,2222	0,2222	0,2222	0,2222	0,2222	0,2222
<b>Calcário</b>	----	0,1598	0,1598	0,1598	0,1598	0,1598	0,1598	0,1598	0,1598	0,1598	0,1598

CP, Controle Positivo

**Tabela 3.** Atendimento das exigências nutricionais (%) nos tratamentos de acordo com a composição na tabela 2.

Nutrientes	CP	LYS	MET	THR	TRP	ARG	HIS	ILE	LEU	PHE	VAL
<b>Arginina total</b>	1,9100	1,9180	1,8550	1,6920	2,0420	1,2130	1,5570	1,3750	1,3550	1,4970	1,4950
<b>Fenilalanina total</b>	1,4430	1,5790	1,5140	1,3610	1,5920	1,4120	1,6400	1,4740	1,4730	0,9100	1,6010
<b>Histidina total</b>	0,5570	0,5210	0,5350	0,4630	0,5620	0,5540	0,3370	0,5470	0,4920	0,5450	0,5620
<b>Isoleucina total</b>	1,0070	0,9800	0,9310	0,8880	1,0440	0,9710	1,0280	0,5640	0,9490	1,0280	1,0150
<b>Leucina total</b>	1,2680	1,2210	1,1570	1,1030	1,2650	1,1780	1,2560	1,1180	0,7870	1,2540	1,2320
<b>Lisina total</b>	1,7500	1,0720	1,6710	1,5580	1,8020	1,6590	1,7230	1,5910	1,6300	1,7840	1,7770
<b>Metionina+Cistina total</b>	0,8360	0,8570	0,4720	0,6960	0,9170	0,8090	0,8210	0,7790	0,7540	0,8480	0,8410
<b>Treonina total</b>	1,1910	1,1460	1,1250	0,6620	1,2760	1,1690	1,2140	1,1050	1,1550	1,1740	1,1690
<b>Triptofano total</b>	0,3600	0,3100	0,3070	0,3100	0,1910	0,3070	0,3050	0,2960	0,3010	0,3000	0,3030
<b>Valina total</b>	0,9340	0,8970	0,8590	0,8190	0,9490	0,8860	0,9870	0,8350	0,8450	0,8980	0,5660
<b>Proteína bruta</b>	31,0691	31,7948	32,0207	32,1848	32,0129	32,3098	32,3345	32,2201	32,6472	33,0974	33,0328
<b>Proteína digestível<sup>1</sup></b>	26,8100	26,8100	26,8100	26,8100	26,8100	26,8100	26,8100	26,8100	26,8100	26,8100	26,8100
<b>Cálcio<sup>1</sup></b>	1,5000	1,5000	1,5000	1,5000	1,5000	1,5000	1,5000	1,5000	1,5000	1,5000	1,5000
<b>Energia digestível<sup>1</sup></b>	2,9511	2,7877	2,7886	2,7956	2,7919	2,7924	2,7934	2,7944	2,7947	2,7970	2,7941
<b>Fibra bruta<sup>1</sup></b>	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000
<b>Fósforo disponível<sup>1</sup></b>	0,5100	0,5100	0,5100	0,5100	0,5100	0,5100	0,5100	0,5100	0,5100	0,5100	0,5100
<b>Gordura<sup>1</sup></b>	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000	8,0000
<b>Potássio<sup>1</sup></b>	0,3586	0,1972	0,1972	0,1972	0,1972	0,1972	0,1972	0,1972	0,1972	0,1972	0,1972
<b>Premix<sup>1</sup></b>	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
<b>Sódio<sup>1</sup></b>	0,1008	0,0555	0,0555	0,0555	0,0555	0,0555	0,0555	0,0555	0,0555	0,0555	0,0555

<sup>1</sup> Valores calculados no Super Crac 5.7 Máster, com base na relação ideal de aminoácidos corporal e conforme citado por Furuya (2000).

CP, dieta controle positivo.

Valores mais claros referem-se à deleção dos aminoácidos no tratamento.

### 3.3. Monitoramento das condições ambientais

As águas de abastecimento dos aquários experimentais foram provenientes da nascente localizada no CAUNESP e mantidas em um sistema de recirculação dotada de filtro biológico e aquecedor (trocador de calor), sendo monitorado a qualidade da água. Para garantir que a qualidade físico-química da água estivesse dentro dos padrões adequados para a tilápia-do-Nilo, diariamente, antes da primeira e após a última alimentação, as variáveis pH, temperatura, condutividade e oxigênio foram aferidas: a temperatura e o pH foram mensuradas com o auxílio do potenciômetro YSI, modelo pH100. A concentração de oxigênio dissolvido e os sólidos totais dissolvidos (TDS) foram monitorados por meio do oxímetro YSI, modelo 55 e do condutivímetro YSI, modelo 300, respectivamente.

A temperatura apresentou valor médio de 28,22°C na primeira etapa. Na segunda de 26,07°C. A segunda etapa ocorreu em um período em que o clima era predominantemente frio, logo o trocador de calor não conseguiu manter a temperatura igual nos dois períodos. O oxigênio médio foi de 4,65% na primeira etapa e de 6,14% na segunda etapa. O pH e o TDS não apresentaram grande variações da primeira pra segunda etapa, tiveram valores médios de 6,11 e 0,61g/l, respectivamente.

A alcalinidade total foi monitorada semanalmente e determinada por titulação, segundo método de Golterman *et al.* (1978). No mesmo intervalo, a concentração de amônia, nitrato e nitrito foram determinados pelo método colorimétrico, com leitura no espectrofotômetro, de acordo com Koroleff (1976), Golterman *et al.* (1978) e Mackereth *et al.* (1978), respectivamente. Os valores médios de alcalinidade foi de 15,9 µg/l, nitrito 21,7 µg/l, nitrato 705,9 µg/l e amônia 262,5 µg/l, em ambas as etapas.

### 3.4. Determinação de nitrogênio corporal retido

Para as análises de composição corporal, os peixes foram submetidos ao processamento em autoclave por 30 minutos, com o objetivo de que o conteúdo corporal pudesse ser homogeneizado e triturado em moinho de bola sem perda parcial de escamas ou espinhas. Posteriormente, o nitrogênio corporal foi avaliado pelo Método de Kjeldahl.

Inicialmente 10 peixes foram coletados ao acaso e submetidos a solução com benzocaína e água, posteriormente etiquetados e congelados para futuras análises de composição de nitrogênio corporal. As biometrias quinzenais e final também seguiram o padrão da ética animal, onde inicialmente os peixes foram submetidos a anestesia com benzocaína diluída em água, posteriormente pesados e medidos, no qual três indivíduos de cada unidade experimental foram selecionados ao acaso, e igualmente congelados.

### 3.5. Análise de Dados

Os resultados obtidos foram submetidos à estatística descritiva onde foram verificadas a normalidade e a homocedasticidade dos dados e analisados com a ajuda do programa estatístico R3.0.1. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando houve diferença estatística, foi aplicado o teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ) para comparação entre médias.

A composição de nitrogênio corporal nos tratamentos, foi usada para determinar a deposição de nitrogênio por meio da equação proposta por Rollin *et al.* (2003):

$$N - \text{deposição} = \frac{(W_f \times N_f) - (W_i \times N_i)}{\frac{1}{2} \left( \left( \frac{W_f}{1000} \right)^{0,75} + \left( \frac{W_i}{1000} \right)^{0,75} \right) \times \Delta t}$$

Onde,  $W_f$  e  $W_i$  são as médias dos pesos finais e iniciais em gramas,  $\Delta t$  é a duração do período experimental em dias, e  $N_f$  e  $N_i$  são as composições finais e iniciais de nitrogênio corporal em percentagem. Os valores encontrados na

deposição de nitrogênio foram submetidos ao teste de Dunnet, para comparação dos tratamentos com o controle positivo com significância de 5%.

A partir do resultado obtido na deposição de nitrogênio, foi possível determinar a relação ideal nas dietas. Para determinar esse requerimento dos AAE, Rollin *et al.* (2003) sugere:

$$\text{Requerimento} = (\text{EAA})_{\text{BD}} \times \left( 2 - \text{DEL} - \left( \frac{\text{ND}_{\text{EAA}}}{\text{ND}_{\text{BD}}} \right) \right)$$

Onde,  $\text{EAA}_{\text{BD}}$  é a concentração de EAA na dieta (g/kg DM), DEL representa a taxa de diluição do EAA da dieta teste com a dieta CP,  $\text{ND}_{\text{EAA}}$  é o nitrogênio depositado (mg N/BW<sub>kg</sub><sup>0,75</sup>/d) correspondendo ao EAA na dieta e  $\text{ND}_{\text{BD}}$  é o nitrogênio depositado observado no BD (mg N/BW<sub>kg</sub><sup>0,75</sup>/d).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Desempenho

Inicialmente os peixes mostraram crescimento uniforme, apresentando peso médio de  $20,36 \pm 0,9$  gramas sem diferenças estatísticas entre grupos e blocos (Tabela 4). Após 57 dias de experimento, os peixes do grupo controle apresentaram maior peso final e ganho de peso, seguidos dos peixes dos grupos: lisina, isoleucina e fenilalanina. Os peixes do tratamento metionina, treonina, leucina e valina foram os que tiveram os menores ganho de peso e peso final.

**Tabela 4.** Efeito das dietas na performance de crescimento e ganho de peso

Dietas	Peso Inicial (g)		Peso Final (g)		Ganho de Peso (g)	
	Média	dp	Média	dp	Média	dp
CP	20,23	1,02	70,23 <sup>a</sup>	19,5	68,73 <sup>a</sup>	20,1
LYS	20,32	0,78	56,31 <sup>ab</sup>	19,3	54,81 <sup>ab</sup>	19,9
MET	20,21	0,63	34,70 <sup>d</sup>	4,45	33,20 <sup>d</sup>	4,91
THR	20,72	0,80	34,74 <sup>d</sup>	2,39	33,24 <sup>d</sup>	2,96
TRP	20,57	1,18	41,35 <sup>cd</sup>	8,74	39,85 <sup>cd</sup>	9,26
ARG	20,29	0,60	51,65 <sup>bc</sup>	17,2	50,15 <sup>bc</sup>	17,8
HIS	20,55	0,52	52,86 <sup>bc</sup>	19,4	51,36 <sup>bc</sup>	20,0
ILE	20,37	0,54	57,93 <sup>ab</sup>	16,7	56,43 <sup>ab</sup>	17,3
LEU	20,35	0,70	37,21 <sup>d</sup>	5,01	35,71 <sup>d</sup>	5,57
PHE	20,04	0,96	62,53 <sup>ab</sup>	14,5	61,03 <sup>ab</sup>	15,1
VAL	20,29	0,95	36,57 <sup>d</sup>	4,15	35,07 <sup>d</sup>	4,71

<sup>abcd</sup>valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes diferem significativamente ( $P > 0,05$ ), teste t-student.  
dp, desvio padrão.

Na tabela 5 são apresentados os valores de ingestão, conversão alimentar (CV), eficiência alimentar (EA) e mortalidade. A ingestão de ração foi maior nos peixes dos grupos controle, lisina, isoleucina e fenilalanina. Estes, juntamente com

a arginina e a histidina apresentaram melhor eficiência alimentar. Em contrapartida a conversão alimentar se mostrou ineficiente nesses grupos.

**Tabela 5.** Efeito das dietas na performance de ingestão, conversão alimentar, eficiência alimentar e mortalidade no final do período experimental.

Dietas	Ingestão (g/peixe)		Conversão Alimentar		Eficiência Alimentar		Mortalidade (%)	
	Média	dp	Média	dp	Média	dp	Média	dp
<b>CP</b>	57,47 <sup>a</sup>	2,04	1,19 <sup>b</sup>	0,19	0,85 <sup>a</sup>	0,13	1,25	0,09
<b>LYS</b>	51,79 <sup>ab</sup>	1,19	1,43 <sup>b</sup>	0,31	0,72 <sup>a</sup>	0,15	0,12	0,02
<b>MET</b>	46,82 <sup>b</sup>	2,30	2,10 <sup>a</sup>	0,36	0,48 <sup>b</sup>	0,07	0,15	0,06
<b>THR</b>	47,68 <sup>b</sup>	1,40	2,11 <sup>a</sup>	0,24	0,48 <sup>b</sup>	0,05	0,15	0,04
<b>TRP</b>	47,95 <sup>b</sup>	1,72	1,88 <sup>a</sup>	0,27	0,54 <sup>b</sup>	0,08	0,18	0,06
<b>ARG</b>	49,39 <sup>b</sup>	0,88	1,39 <sup>b</sup>	0,18	0,73 <sup>a</sup>	0,09	0,10	0,07
<b>HIS</b>	50,42 <sup>b</sup>	2,42	1,44 <sup>b</sup>	0,28	0,72 <sup>a</sup>	0,13	0,07	0,08
<b>ILE</b>	52,26 <sup>ab</sup>	2,24	1,36 <sup>b</sup>	0,11	0,74 <sup>a</sup>	0,06	0,12	0,09
<b>LEU</b>	47,26 <sup>b</sup>	1,81	1,88 <sup>a</sup>	0,58	0,48 <sup>b</sup>	0,11	0,18	0,14
<b>PHE</b>	56,79 <sup>a</sup>	2,81	1,29 <sup>b</sup>	0,17	0,78 <sup>a</sup>	0,10	0,06	0,07
<b>VAL</b>	47,77 <sup>b</sup>	1,61	1,91 <sup>a</sup>	0,28	0,53 <sup>b</sup>	0,07	0,10	0,08

<sup>ab</sup>valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes diferem significativamente ( $P>0,05$ ), teste t-student.  
dp, desvio padrão.

A mortalidade dos peixes não apresentou diferença significativa entre os grupos. Contudo, no decorrer do experimento, uma repetição do tratamento um obteve mortalidade mais acentuada na primeira etapa do experimento. Porém, todos os peixes mortos foram quantificados e considerados nos cálculos de ingestão (IG), conversão alimentar (CA) e eficiência alimentar (EA).

## 4.2. Composição corporal

As dietas com deficiência em 45% do aminoácido limitante responderam na deposição de nitrogênio corporal dos juvenis de tilápia-do-Nilo, quando comparado às aqueles das dietas testes com o grupo controle (tabela 6). Porém, o nitrogênio depositado nos peixes do tratamento da fenilalanina não diferiu do nitrogênio depositado nos peixes da dieta controle positivo, teste de Dunnet ( $P>0,05$ ). Logo, esse tratamento não se comportou como um AA limitante na dieta, sendo descartado na análise da relação ideal dos aminoácidos com a lisina.

**Tabela 6.** Efeito das dietas na deposição de nitrogênio corporal em juvenis de tilápia-do-Nilo.

ND	CP	LYS	MET	THR	TRP	ARG	HIS	ILE	LEU	PHE	VAL
<b>Média</b>	78,28 <sup>a</sup>	55,91 <sup>b</sup>	28,16 <sup>b</sup>	24,76 <sup>b</sup>	38,29 <sup>b</sup>	47,03 <sup>b</sup>	49,67 <sup>b</sup>	52,69 <sup>b</sup>	32,94 <sup>b</sup>	63,94 <sup>a</sup>	25,68 <sup>b</sup>
<b>dp</b>	19,09	23,42	8,30	4,04	11,26	20,64	23,83	20,52	8,45	14,77	4,74

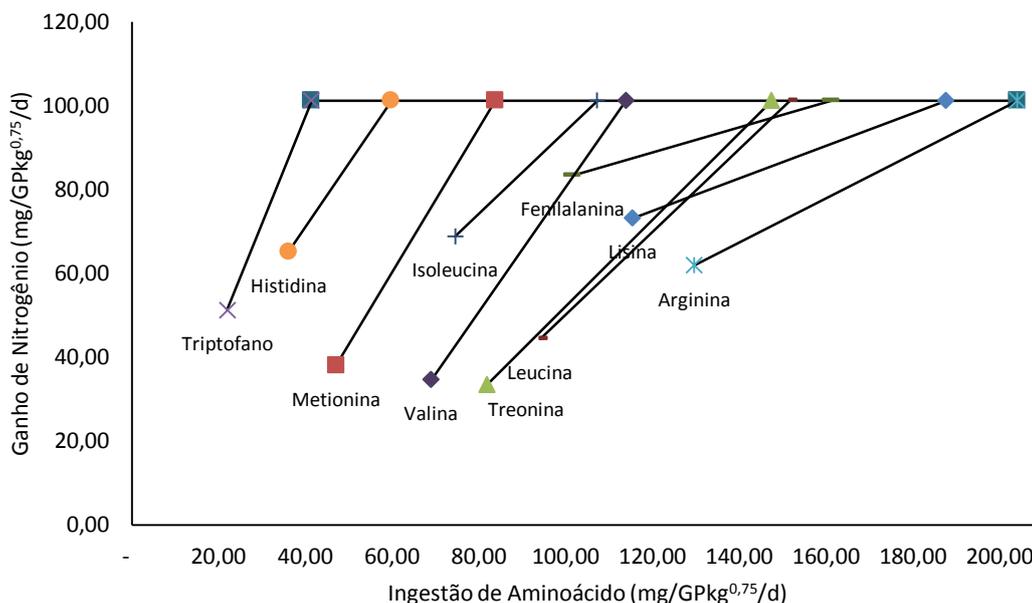
<sup>ab</sup>valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes diferem significativamente em relação ao grupo CP, teste de Dunnet ( $P>0,05$ ).

ND, Nitrogênio depositado; dp, desvio padrão; CP, controle positivo

Os valores do nitrogênio depositado (tabela 6) foram atribuídos ao gráfico da figura 2, juntamente com a ingestão diária por peixe do aminoácido da dieta. Conforme citado anteriormente, o tratamento da fenilalanina não diferiu do grupo controle, sendo perceptível, pela sua reta, que foi um aminoácido limitante, estando bastante próximo da reta da dieta controle positivo. Contudo, os demais aminoácidos que obtiveram a redução de aproximadamente 45%, apresentaram retas com angulações mais acentuadas, sendo possível a determinação da relação ideal entre eles (considerando a lisina igual a 100%).

As dietas que se mostraram mais limitantes com a deleção de 45% com relação a dieta controle foram a treonina, a valina e a metionina, sendo a lisina e a isoleucina as menos limitantes.

**Figura 2.** Efeito da dieta com deleção de aminoácidos essenciais em 45% no ganho de nitrogênio corporal em tilápia-do-Nilo.<sup>o</sup>



<sup>o</sup>GPkg<sup>0,75</sup>, Ganho de peso metabólico ((Peso do corpo inicial<sup>0,75</sup>+ peso do corpo final<sup>0,75</sup>)/2)

A relação dos aminoácidos foi calculada para todos os aminoácidos, com exceção da fenilalanina. A tabela 7 apresenta as respostas da relação ideal dos aminoácidos com a lisina (lisina=100%) (relação 1). A relação 2 representa a relação dos aminoácidos encontrados na composição corporal dos animais no primeiro dia do experimento.

**Tabela 7.** Comparação entre a relação de aminoácidos essenciais expressos em % da lisina com a relação ideal dos aminoácidos corporais obtidas nesse experimento.

Relação Ideal	MET	THR	TRP	ARG	HIS	ILE	LEU	PHE	VAL
<b>Relação 1</b>	64,00	94,00	24,00	126,00	34,00	57,00	96,00	100,00	76,00
<b>Relação 2</b>	71,62	58,35	14,79	100,16	30,33	56,19	94,40	52,16	63,31

1 Relação dos aminoácidos encontradas pelo método da deleção.

2 Relação dos aminoácidos na carcaça das tilápias no dia zero do experimento.

## 5. DISCUSSÃO

No desempenho, os peixes dos tratamentos metionina, treonina, leucina e valina não responderam positivamente às dietas em relação ao ganho de peso. Esses dados podem estar relacionados com a baixa ingestão das dietas, seguidas da pouca eficiência alimentar. Com isso, esses tratamentos podem ter influenciado na deposição de nitrogênio corporal, se tornando os aminoácidos limitantes nas dietas. Peres & Oliva-Teles (2009) encontraram pelo método da deleção a mesma resposta para juvenis de dourado (*Sparus aurata*), no qual a deleção de treonina levou a maior redução de crescimento e retenção de nitrogênio, seguido pela metionina. Entretanto Rollin *et al.* (2003) encontraram que a metionina é a mais limitante para bacalhau, seguido da fenilalanina, que foi desconsiderada nesse experimento.

A deleção de 37% da fenilalanina não foi suficiente para deixá-lo limitante na dieta ( $p > 0,05$ ). Porém, sua relação ideal em relação a lisina (igual a 100), foi de 100, resultado bastante semelhante ao encontrado por Rollin *et al.* (2003), para salmão (tabela 8). Em contrapartida, esse valor é quase duas vezes maior que a relação ideal dos aminoácidos encontrados na composição corporal (tabela 9). Contudo, os dados de ingestão e eficiência alimentar podem estar relacionados com esse resultado, tendo em vista que esses parâmetros foram semelhantes ao do tratamento controle positivo, podendo ter resultado na mesma deposição de nitrogênio. Logo, é sugerido que outro experimento com aumento da deleção da fenilalanina seja executado, para a constatação de valores.

**Tabela 8.** Comparação entre a relação de aminoácidos essenciais expressos em % da lisina obtidas nesse experimento com outro autor. Ambos encontrados pela mesma metodologia.

Relação Ideal	MET	THR	TRP	ARG	HIS	ILE	LEU	PHE	VAL
<b>Relação 1</b>	64,00	94,00	24,00	126,00	34,00	57,00	96,00	100,00	76,00
<b>Relação 2</b>	64,00	51,00	14,00	76,00	28,00	-	-	105,00	59,00

1 Nesse experimento.

2 Rollin *et al.* (2003).

**Tabela 9.** Comparação entre a relação de aminoácidos essenciais expressos em % da lisina obtidas nesse experimento com a composição de aminoácidos essenciais, como porcentagem da relação aminoácido/lisina corporal em tilápia-do-Nilo.

<b>Dieta</b>	<b>Relação<sup>1</sup></b>	<b>Relação<sup>2</sup></b>	<b>Relação<sup>3</sup></b>	<b>Relação<sup>4</sup></b>	<b>Relação<sup>5</sup></b>	<b>Relação<sup>6</sup></b>
<b>MET</b>	64,00	71,62	30,20	25,90	31,67	38,35
<b>THR</b>	94,00	58,35	55,15	65,20	55,78	69,03
<b>TRP</b>	24,00	14,79	11,91	11,60	11,44	-
<b>ARG</b>	126,00	100,16	71,72	79,50	88,67	89,67
<b>HIS</b>	34,00	30,33	26,72	29,50	27,44	35,69
<b>ILE</b>	57,00	56,19	55,72	51,80	58,44	62,24
<b>LEU</b>	96,00	94,40	94,08	84,80	99,89	66,67
<b>PHE</b>	100,00	52,16	46,73	63,40	47,00	80,53
<b>VAL</b>	76,00	63,31	59,32	58,90	57,00	67,55

<sup>1</sup> Relação ideal de aminoácidos desse experimento.

<sup>2</sup> Relação ideal dos aminoácidos na carcaça das tilápias no dia zero do experimento.

<sup>3</sup> Furuya, (2000).

<sup>4</sup> Fagbenro (2000).

<sup>5</sup> Portz (2001).

<sup>6</sup> Teixeira et al.(2008).

Os valores da relação ideal dos aminoácidos encontrado para a metionina foi igual ao encontrado para salmão por Rollin *et al.* (2003) (tabela 8), e bastante semelhante à relação ideal dos AAs da carcaça dos peixes no início do experimento (tabela 9). Em contrapartida, esse valor quase duplica quando comparado com outros autores (Furuya, 2000; Fagbenro, 2000; Portz, 2001 e Teixeira *et al.*, 2008) (tabela 9).

A relação ideal encontrada para a histidina, leucina, isoleucina e valina, foram bem semelhantes à relação ideal encontrada na composição corporal dos animais (tabela 9). A histidina e a valina tiveram suas relações semelhante ao citado

por Teixeira *et al.* (2008), enquanto a leucina e isoleucina tiveram respostas parecidas com Furuya (2000) e Portz (2001) (tabela 9).

Os valores da relação dos aminoácidos encontrados para treonina, triptofano e arginina foram elevados quando comparados com os resultados obtidos por Furuya (2000), Fagbenro (2000), Portz (2001) e Teixeira *et al.* (2008) (tabela 9). Porém, quando comparados, os valores da composição corporal de aminoácidos encontrados nesse trabalho para arginina em comparação com Furuya (2000) (tabela 9), percebemos que já de início eles se apresentavam bastante elevados, podendo isso interferir no valor final dessa relação. Outro fator que pode ter interferido nesse resultado foi a fração de arginina encontrada na ração analisada, que continha 50% a mais de arginina total, quando comparada a ração calculada.

Contudo, o método de deleção é geralmente aceito como rápida e eficiente ferramenta para estimar o perfil ideal dos aminoácidos essenciais de uma determinada espécie (Boisen, 2003; Baker, 2004). Esse experimento seguiu fielmente ao método geral descrito por Wang & Fuller (1989), no qual as dietas foram formuladas para conter dois níveis de cada aminoácido essencial com mesmo nível de nitrogênio e de energia, com deficiências entre 37 e 47%. Porém o uso desse método implica na formulação de dietas usando aminoácidos cristalinos para modificar com precisão a composição de aminoácidos essenciais nas dietas experimentais.

O valor nutricional dos aminoácidos cristalinos comparado ao dos aminoácidos ligados a proteína, ainda é controverso na nutrição de organismos aquáticos para muitas espécies (Dabrowski & Guderley, 2002), incluindo as tilápias do Nilo. Alguns autores afirmam que a eficiência de utilização dos aminoácidos essenciais cristalinos é inferior (Dabrowski & Guderley, 2002), podendo então influenciar a estimativa da relação dos aminoácidos essenciais. Contudo, o bom desempenho de crescimento observado para a dieta controle positivo confirmou a boa utilização da dieta com aminoácidos cristalinos. O mesmo foi observado por Rollin *et al.* (2003), que encontraram que para salmão do Atlântico não há diferenças no desempenho quando comparado com dietas formuladas somente com proteína de origem animal e aquelas dietas formuladas com “mixer” de proteína de origem animal e de proteína cristalina.

O uso de diferentes fontes de proteínas têm sido propostas como melhores indicadores da relação ideal dos aminoácidos essenciais nas dietas de peixes, e entre eles o padrão de aminoácido essencial na carcaça parece ser o que melhor se encaixa com a relação ideal (Wilson & Cowey, 1985; Mambrini & Kaushik, 1995; Rollin *et al.*, 2003). Uma boa correlação entre o perfil ideal de aminoácido essencial na dieta e do perfil ideal dos aminoácidos essenciais no corpo do animal é de ser esperado em animais de rápido crescimento, em que grande proporção de aminoácidos essenciais são utilizados para deposição de proteína, enquanto que apenas uma pequena proporção aminoácido é usado para manutenção (Peres & Oliva-Teles, 2008). Mesmo assim, algumas diferenças nas exigências de aminoácidos essenciais para o crescimento e para a manutenção são esperados, como já foi mostrado com arginina em *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Scophthalmus maximus* e *Oncorhynchus mykiss* (Fournier *et al.*, 2002).

Contudo, nesse método de estudo, assume-se que os aminoácidos essenciais são utilizados com eficiências semelhantes, assim como as exigências de aminoácidos essenciais para a manutenção. Apesar de que a exigência de aminoácidos essenciais para a manutenção possa diferir em peixes (Mambrini & Seudre, 1995; Mambrini & Kaushik, 1995; Rodehutscord *et al.*, 1997; Fournier *et al.* 2002). Assim, o padrão de exigências de aminoácidos essenciais para manutenção pode diferir do perfil de aminoácidos essenciais necessário para a deposição de proteína em peixes, de como é conhecido em mamíferos (Said & Hegsted, 1970; Fuller *et al.*, 1989). Os aminoácidos essenciais da manutenção são determinados de acordo com a idade do animal, mesmo que considerando que os peixes nunca param de crescer, mas sua taxa de crescimento se torna mais lenta com o tempo, necessitando, assim, mais estudos relacionados ao tema.

Essa metodologia favorece na oferta e ingestão de nitrogênio igual em todos os tratamentos. De acordo com Tacon & Cowey (1985), os valores das exigência dos aminoácidos essenciais relatados no presente estudo podem estar ligeiramente superestimados. Por outro lado, com uma relação, o padrão ideal dos aminoácidos essenciais é menos susceptível a sofrer influência pela ingestão de alimentos (Rodehutscord & Pack, 1999). Logo, pode-se considerar a relação ideal encontradas nesse estudo.

## 6. CONCLUSÃO

Os peixes do tratamento fenilalanina não responderam às dietas com deficiência de 37% no aminoácido testado. Logo, se faz necessário um estudo com maiores deficiências nesse aminoácido.

O método da deleção é eficiente na determinação da relação dos aminoácidos com juvenis de tilápia-do-Nilo, da linhagem GIFT.

A relação dos aminoácidos encontrado pelo método da deleção, expressos em relação a lisina é: metionina, 64; treonina, 94; triptofano, 24; arginina, 126; histidina, 34; isoleucina, 57; leucina, 96; e valina, 76.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANO, M.; IIGO, M.; IKUTA, K.; KITAMURA, S.; OKUZAWA, K.; YAMADA, H. & YAMAMORI, K. Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male masu salmon. *Zool Sci* 24:79–85, 2004.

ARAGÃO, C.; CORTE-REAL, J.; COSTAS, B., DINIS, M.T. & CONCEIÇÃO, L.E.C. Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Amino Acids* 34:143–158, 2008.

BAKER, D.H. Animal models of human amino acid responses. *J. Nutr.* 134, 1646S–1650S, 2004.

BAKER, D.H. Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids. *J. Nutr.* 136: 1670S-1675S, 2006.

BHATTACHARYA, S.; CHATTORAJ, A. & MAITRA, S.K. Melatonin in the regulation of annual testicular events in carp catla catla: evidence from the studies on the effects of exogenous melatonin, continuous light, and continuous darkness. *Chronobiol Int* 24:629–650, 2007.

BOISEN, S. Ideal dietary amino acid profiles for pigs. In: D'Mello, J.P.F.D. (Ed.), *Amino Acids in Animal Nutrition*. CABI Publishing, UK, pp. 157–168, 2003.

BRODY, T. Classification of biological structure. In *Nutritional Biochemistry*, Second Edition. San Diego, CA: Academic Press. 1-56, 1999.

BUENTELLO, J.A. & GATLIN, D.M. Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture media. *Aquaculture* 179:513–521, 1999.

BUXBAUM, E. *Fundamentals of Protein Structure and Function*. New York: Springer. 2007.

CHENG, Z.J.; HARDY, R.W. & USRY, J.L. Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* diets, and reduce ammonia nitrogen and phosphorus excretion. *Aquaculture* 218:553–565, 2003.

COWEY, C.B. & TACON, A.G.J. Fish nutrition – relevance to marine invertebrates. In *Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition*, [GD Pruder, CJ Langdon and DE Conklin, editors]. Baton Rouge, LA: Louisiana State University, Division of Continuing Education. 13-30, 1983.

COWEY, C.B. Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. *Aquaculture* 124, 1–11, 1994.

COWEY, C.B. The nutrition of fish: the developing scene. *Nutr Res Rev* 1, 255–280, 1988.

COWEY, C.B.; & LUQUET, P. Physiological basis of protein requirements of fishes. Critical analysis of allowances. In *Protein Metabolism and Nutrition* 1, [M Arnal, R Pion and D Borin, editors]. Paris: INRA. 364–384, 1983.

DABROWSKI, K. & GUDERLEY, H. Intermediary metabolism, In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*, 3rd Edition. Academic press, San Diego, pp. 309–365, 2002.

DABROWSKI, K. & GUDERLEY, H. Intermediary metabolism. In *Fish Nutrition*, 3rd ed., [JE Halver, editor]. San Diego, CA: Academic Press. 309–365, 2002.

EDDY, F.B. & FRASERT, J.E. Sialic acid and mucus production in rainbow trout (*Salmo gairdnei* Richardson) in response to zinc and seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* 73C: 357-359, 1982.

FAGBENRO, O. A. Validation of the essential amino acid requirements of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758), assessed by the ideal protein concept. In: *Symposium on Tilapia Aquaculture*, 5., 2000, Rio de Janeiro. Proceedings... Rio de Janeiro: SRG, v.1. 154-156, 2000.

FANG, Y.Z.; YANG, S. & WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 8:872–879, 2002.

FOURNIER, V.; GOUILLOU-COUSTANS, M.F. & ME´TAILLER, R. Protein and arginine requirements for maintenance and nitrogen gain in four teleosts. *Br J Nutr* 87, 459–469, 2002.

FOURNIER, V.; GOUILLOU-COUSTANS, M.F.; ME´TAILLER, R., ET AL. Protein and arginine requirements for maintenance and nitrogen gain in four teleosts. *Br J Nutr* 87, 459–469, 2002.

FOURNIER, V.; GOUILLOU-COUSTANS, M.F.; METAILLER, R.; VACHOT, C.; GUEDES, M.J.; TULLI, F.; OLIVA-TELES, A.; TIBALDI, E. & KAUSHIK, S.J. Protein and arginine requirements for maintenance and nitrogen gain in four teleosts. *Br. J. Nutr.* 87, 459–469, 2002.

FULLER, M.F.; McWILLIAM, R., WANG, T.C. & GILES, L.R. The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs. 2. Requirements for maintenance and for tissue protein accretion. *Br J Nutr* 62, 255–267, 1989.

FURUYA, W. M. Tabelas Brasileiras para a Nutrição de Tilápias. Toledo: GFM. 2010.

FURUYA, W.M.; HAYASHI, C.; FURUYA, V.R.B. & SOARES, C.M. Exigências de proteína para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 29, 1912-1917, 2000.

GOLTERMAN, H.L. CLYMO, R.S. & OHNSTAD, M.A.M. Methods for physical and Chemical Analysis of Freshwaters. Blackweel Sci. Publ., London, IBP Handbook, v.8, p.214, 1978.

GOUS, R. M. An improved method for measuring the response of broiler chickens to increasing dietary concentrations of an amino acid. In: Proceedings of 6th European Poultry Conference. World's Poultry Science Association. Hamburg, Vol. III , p.32-309, 1980.

GUILLAUME, J.; KAUSHIK, S.; BERGOT, P. & MÉTAILLER, R. Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustacés. Paris: INRA Edition. 1999.

HÖGLUND E.; SORENSEN, C.; BAKKE, M.J.; NILSSON, G.E. & ØVERLI, Ø. Attenuation of stress-induced anorexia in brown trout (*Salmo trutta*) by pre-treatment with dietary L-tryptophan. *Br J Nutr* 97:786–789, 2007.

HSEU, J.R.; LU, F.I.; SU, H.M.; WANG, L.S.; TSAI, C.L. & HWANG, P.P. Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 218:251–263, 2003.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. *Eur. J. Biochem.* 138: 9-37, 1984.

JAUNCEY, K.; TACON, A.G.J. & JACKSON, A.J. The quantitative essential amino acid requirements of *Oreochromis (Sarotherodon) mossambicus*. In *Proceedings of the First International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, [L Fishelson and Z Yaron, editors]. Nazareth: University of Tel Aviv. P. 328, 1983.

KAUSHIK, S.J. Nutrient requirements supply and utilisation in the context of carp culture. *Aquaculture* 129, 225–241, 1995.

KAUSHIK, S.J. & COWEY C.B. Dietary factors affecting nitrogen excretion by fish. *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste*, C.B. Cowey and Cho, C.Y. eds. Guelph, Ontario: University of Guelph. 3-20, 1991.

KAUSHIK, S.J.; BRECQUE, J. & BLANC, D. Requirements for protein and essential amino acids and their utilization by Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). In *Proceedings of the First International Symposium on Sturgeon*, [P Williot, editor]. Antony: CEMAGREF-DICOVA. 25–39, 1991.

KETOLA, H.C. Requirement for dietary lysine and arginine by fry of rainbow trout. *J Anim. Sci.* 56: 101-107, 1983.

KIM, K.-I.; KAYES, T.B. & AMUNDSON, C.H. Requirements for sulfur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 101: 95-103, 1992.

KIM, S.K.; TAKEUCHI, T.; YOKOYAMA, M. & MURATA, Y. Effect of dietary supplementation with taurine, b-alanine, and GABA on the growth of juvenile and fingerling Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Sci* 69:242–248, 2003.

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

LEPAGE, O.; TOTTMAR, O. & WINBERG, S. Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 205:3679–3687, 2003.

LI, P.; YIN, Y.; LI, D.; KIM, W.K. & WU, G. Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 98:237–252, 2007.

LI, P.; KANGSEN, M.; TRUSHENSKI, J. & WU, G. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. Review Article. *Amino Acids*, Wien, v. 37, n.1, p. 43-53, 2008.

LIN, Y. & ZHOU, X. Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture* 256:389–394, 2006.

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.; WAN, J. & LIUFU, Z. Dietary lysine requirement of juvenile seabass (*Lateolabrax japonicas*). *Aquaculture* 258:535–542, 2006.

MAMBRINI, M. & KAUSHIK, S. Effect of temperature on sulfur amino acid requirements for maintenance and growth of juvenile rainbow trout. In: Nunes, A.F.,

Portugal, J.P., Costa, J.P., Ribeiro, J.R. (Eds.), Proc. 7 Int. Symp. on Protein Metabolism and Nutrition. EAAP Publ., nº81, pp. 117–122, 1995.

MAMBRINI, M. & KAUSHIK, S.J. Effect of temperature on sulfur amino acid requirements for maintenance and growth of juvenile rainbow trout. In Protein Metabolism and Nutrition, [AF Nunes, AV Portugal, JP Costa and JR Ribeiro, editors]. Portugal: INIA. pp. 117–122, 1995.

MAMBRINI, M. & SEUDRE, L. Sulfur amino acid requirements for maintenance and growth of juvenile rainbow trout. *Reprod Nutr Dev* 35, 603–604, 1995.

MOMMSEN, T.P.; FRENCH, C.J. & HOCHACHKA, P.W. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon. *Can J Zool* 58:1785–1799, 1980.

NG, W.K. & HUNG, S.S.O. Estimating the ideal dietary indispensable amino acid pattern for growth of white sturgeon, *Acipenser transmontanus* (Richardson). *Aquac Nutr* 1, 85–94, 1995.

NRC (National Research Council). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. Washington. 2011.

OGINO, C. Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. *Bull Jap Soc Sci Fish* 46, 171–175, 1980.

OWENS, F.N. & PETTIGREW, J.E. Subdividing amino acid requirements into portions for maintenance and growth. In: FRIEDMAN, M. *Absorption and utilization of amino acids*. Boca Raton: CRC Press. v.1, p.15-30, 1989.

PERES, H. & OLIVA-TELES, A. The optimum dietary amino acid profile for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 296. 81-86, 2009.

PORTZ, L. Recentes avanços na determinação das exigências e digestibilidade da proteína e aminoácidos em peixes. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38. Piracicaba. Anais... Ribeirão Preto: SBZ, 2001. p.528-542, 2001.

POWELL, E.N.; KASSCHAU, M.; CHEN, E.; KOENIG, M. & PECON, J. Changes in free amino acid pool during environmental stress in the gill of the oyster *Crassostrea Virginica*. *Comp Biochem Physiol* 71A:591–598, 1982.

RODEHUTSCORD, M. & PACK, M. Estimates of essential amino acid requirements from dose–response studies with rainbow trout and broiler chicken: effect of mathematical model. *Arch Anim Nutr* 52, 223–244, 1999.

RODEHUTSCORD, M.; BECKER, A.; PACK, M. & PFEFFER, E. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement for essential amino acids. *J Nutr* 126, 1166–1175, 1997.

ROLLIN, X.; PENG, J.; PHAM, D.; ACKMAN, R.G. & LARONDELLE, Y. The effects of dietary lipid and strain difference on polyunsaturated fatty acid composition and conversion in anadromous and landlocked salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Comp Biochem Physiol* 134B, 349–366, 2003.

RUBIO, V.C.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; MADRID, J.A. Oral serotonin administration affects the quantity and the quality of macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Physiol Behav* 87:7–15, 2006.

SAID, A.K. & HEGSTED, D.M. Response of adult rats to low dietary levels of essential amino acids. *J Nutr* 100, 1363–1375, 1970.

SHAMUSHAKI, V.A.J.; KASUMYAN, A.O.; ABEDIAN, A. & ABTAHI, B. Behavioural responses of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) juveniles to free amino acid solutions. *Mar Fresh Behav Physiol* 40:219–224, 2007.

SNYDER, G.S.; GAYLORD, T.G.; BARROWS, F.T. & HARDY, R.W. Carnosine supplementation on an all-plant protein diet for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Abstract of Aquaculture America* 08, p 369, 2008.

SPIRIDAKIS, P. Utilisation des protéines alimentaires chez le bar (*Dicentrarchus labrax*). Aspects digestifs et métaboliques (Utilisation of dietary proteins by the

seabass (*Dicentrarchus labrax*). Digestive and metabolic aspects). PhD thesis, Université de Bretagne occidentale. 1989.

TACON, A.G.J. & COWEY, C.B. Protein and amino acid requirements. In *Fish Energetics: New Perspectives*, [P Tytler and P Calow, editors]. London: Croom Helm. 155–183, 1985.

TEIXEIRA, E.A.; CREPALDI, D.V.; FARIA, P.M.C.; RIBEIRO, L.P.; MELO, D.C. & CASTRO, A.C. Composição corporal e exigências nutricionais de aminoácidos para alevinos de tilápia (*Oreochromis sp.*). *Revista Bras. Saúde Prod. An.*, v.9, n.2, p. 239-246, 2008.

VIJAYAN, M.M.; MOMMSEN, T.P.; GLÉMET, H.C. & MOON, T.W. Metabolic effects of cortisol treatment in marine teleost, the sea raven. *J Exp Biol* 199:1509–1514, 1996.

WANG, T.C. & FULLER, M.F. The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs. 1. Experiments by amino acid deletion. *Br J Nutr* 62, 77–89, 1989.

WILSON, R.P. & COWEY, C.B. Amino acid composition of whole body tissue of rainbow trout and Atlantic salmon. *Aquaculture* 48, 373–376, 1985.

WILSON, R.P. Amino acid requirements of finfish and crustaceans. In *Amino Acids in Animal Nutrition*, 2<sup>nd</sup> ed., (JPF D'Mello, editor). Wallingford, Oxon: CAB International, pp. 427-447, 2003.

WILSON, R.P. Amino acids and proteins. In *Fish Nutrition*, 2<sup>nd</sup> ed., [JE Halver, editor]. San Diego, CA: Academic Press. 111–159, 1989.

WILSON, R.P. Protein and amino acids. In: Halver JE, Hardy RW (eds) *Fish Nutrition*, 3<sup>rd</sup> version. Elsevier Science, San Diego, USA, pp 144-179, 2002.

WU, G.; BAZER, F.W.; DAVIS, T.A.; JAEGER, L.A.; JOHNSON, G.A.; KIM; S.W.; KNABE, D.A.; MEININGER, C.J.; SPENCER, T.E. & YIN, Y.L. Important roles of the arginine family amino acids in swine nutrition and production. *Livest Sci* 112:8–22, 2007.

ZHOU, X. Use of synthetic lysine in fish feeds: a review on research and application. *Feed Ind* 27:1–7, 2005.