



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL



**Efeitos da restrição alimentar e da
realimentação sobre o metabolismo lipídico e
de ácidos graxos em juvenis de garoupa-
verdadeira, *Epinephelus marginatus*
(Perciformes: Serranidae)**

Ethiene Fernandes de Oliveira

Jaboticabal, São Paulo
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeitos da restrição alimentar e da
realimentação sobre o metabolismo lipídico e
de ácidos graxos em juvenis de garoupa-
verdadeira, *Epinephelus marginatus*
(Perciformes: Serranidae)**

Ethiene Fernandes de Oliveira

Orientadora: Renata Guimarães Moreira Whitton

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

Jaboticabal, São Paulo
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeitos da restrição alimentar e da realimentação sobre o metabolismo lipídico e de ácidos graxos em juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Perciformes: Serranidae)

AUTORA: ETHIENE FERNANDES DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON (Participação Virtual)
Departamento de Fisiologia Geral / Universidade de São Paulo, IB/USP, São Paulo-SP

Pesquisadora Científica CAMILA FERNANDES CORRÊA (Participação Virtual).
APTA Regional de Pariquera-Açu (APTA, SAA, SP), Pariquera-Açu-SP

Profa. Dra. ALINE DAL OLIO GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Biodiversidade / IB/Unesp, Rio Claro-SP

Jaboticabal, 09 de novembro de 2023.

Oliveira, Ethiene Fernandes de
O48e Efeitos da restrição alimentar e da realimentação sobre o metabolismo
lipídico e de ácidos graxos em juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus
marginatus* (Perciformes:Serranidae) / Ethiene Fernandes de Oliveira. – –
Jaboticabal, 2024
xvi, 95 p. : il., tabs ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2024
Orientador: Renata Guimarães Moreira Whitton
Banca examinadora: Renata Guimarães Moreira Whitton, Aline Dal'Olio
Gomes, Camila Fernandes Corrêa
Bibliografia

1. Fisiologia. 2. Espécie marinha. 3. Beta oxidação. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043.13

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418

Sumário

<i>Índice de Figuras</i>	12
<i>Índice de Tabelas</i>	14
<i>Dedicatória</i>	17
<i>Agradecimentos</i>	19
<i>Apoio Financeiro</i>	21
<i>Resumo</i>	22
<i>Abstract</i>	23
1. Introdução	24
2. Material e métodos	31
2.1. Delineamento experimental	31
2.2. Desempenho de crescimento, parâmetros corporais e sobrevivência	34
2.3. Análises metabólicas	34
2.3.1. Lipídeos totais	34
2.3.2. Perfil de ácidos graxos	34
2.4. Análise molecular	35
2.5. Análise estatística	37
3. Resultados	37
3.1. Seção 1: Desempenho de crescimento, parâmetros corporais e sobrevivência para todos os dias, horários de coleta e tratamento	38
3.2. Seção 2: Lipídeos totais, ácidos graxos e expressão de genes do metabolismo lipídico nos tratamentos <i>alimentação, realimentação e restrição alimentar</i> aos 7, 15, 22 e 30 dias	41
3.2.1. Lipídeos totais dos tecidos hepático e muscular	41
3.2.2. Ácidos graxos totais do plasma	44
3.2.3. Ácidos graxos da fração de triglicerídeos (TG) dos tecidos hepático e muscular	47

3.2.4. Expressão gênica.....	53
3.3. Seção 3: Pós-prandial.....	56
3.3.1. Lipídeos totais dos tecidos hepático e muscular	56
3.3.2. Ácidos graxos totais do plasma.....	58
3.3.3. Ácidos graxos da fração de triglicerídeos (TG) dos tecidos hepático e muscular	60
4. Discussão	65
4.1. Seção 1: Desempenho de crescimento, parâmetros corporais e sobrevivência para todos os dias, horários de coleta e tratamentos	65
4.2. Seção 2: Lipídeos totais, ácidos graxos e expressão de genes do metabolismo lipídico nos tratamentos <i>alimentação, realimentação e restrição alimentar</i> aos 7, 15, 22 e 30 dias	67
4.2.1. Lipídeos totais dos tecidos hepático e muscular	67
4.2.2. Ácidos graxos totais do plasma.....	69
4.2.3. Ácidos graxos da fração de triglicerídeos (TG) dos tecidos hepático e muscular	72
4.2.4. Expressão gênica.....	74
4.3. Seção 3: Pós-prandial	76
5. Conclusões.....	79
6. Referências.....	80
Anexo I.....	89
Anexo II.....	115
Anexo III.....	119

Índice de Figuras

Figura 1: Desenho experimental com os diferentes dias e tempos de coleta para os 3 tratamentos experimentais: <i>tratamento alimentação</i> ; <i>tratamento realimentação</i> e <i>tratamento restrição alimentar</i>	32
Figura 2: Efeitos da realimentação e restrição alimentar sobre a porcentagem de sobrevivência de juvenis de garoupa-verdadeira, <i>Epinephelus marginatus</i>	38
Figura 3: Efeitos da realimentação e restrição alimentar no desempenho de crescimento e parâmetros corporais de juvenis de garoupa-verdadeira, <i>Epinephelus marginatus</i>	40
Figura 4: Lipídeos totais (mg g ⁻¹ de massa úmida) do A) músculo e do B) fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i> , submetidos a diferentes tratamentos alimentares (<i>alimentação</i> , <i>realimentação</i> e <i>restrição alimentar</i>) em diferentes dias.	43
Figura 5: Perfil de ácidos graxos totais do plasma de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i> , submetidos a diferentes tratamentos alimentares (<i>alimentação</i> , <i>realimentação</i> e <i>restrição alimentar</i>) em diferentes dias.	47
Figural 6: Perfil de ácidos graxos da fração TG do fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i> , submetidos a diferentes tratamentos alimentares (<i>alimentação</i> , <i>realimentação</i> e <i>restrição alimentar</i>) em diferentes dias.	51
Figura 7: Perfil de ácidos graxos da fração TG do músculo de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i> , submetidos a diferentes tratamentos alimentares (<i>alimentação</i> , <i>realimentação</i> e <i>restrição alimentar</i>) em diferentes dias.....	53
Figura 8: Expressão gênica dos genes <i>fas</i> (A e B), <i>cpt</i> (C e D), <i>acox</i> (E e F), <i>acadvl</i> (G e H) e <i>scd</i> (I e F) do fígado e músculo de garoupa-verdadeira, <i>Epinephelus marginatus</i>	56
Figura 9: Lipídeos totais (mg g ⁻¹ de massa úmida) do A) músculo e do B) fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i> , submetidos a diferentes tratamentos alimentares (<i>alimentação</i> , <i>realimentação</i> e <i>restrição alimentar</i>) durante o período pós-prandial.....	57
Figura 10: Perfil de ácidos graxos totais do plasma de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i> , submetidos a diferentes tratamentos alimentares (<i>alimentação</i> , <i>realimentação</i> e <i>restrição alimentar</i>) no período pós-prandial.....	60

Figura 11: Perfil de ácidos graxos da fração TG do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (*alimentação, realimentação e restrição alimentar*) durante o período pós-prandial.....63

Figura 12: Perfil de ácidos graxos da fração TG do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (*alimentação, realimentação e restrição alimentar*) durante o período pós-prandial.....65

Índice de Tabelas

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para amplificação quantitativa em tempo real (qPCR).	36
Tabela 2: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a massa corpórea (g) de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	89
Tabela 3: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre o ganho em massa corpórea (g) de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	90
Tabela 4: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre o comprimento (cm) de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	91
Tabela 5: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a taxa de crescimento específico (%) de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	92
Tabela 6: Lipídeos totais (mg g ⁻¹ de massa úmida) do fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i> , submetidos a diferentes tratamentos alimentares (alimentação, realimentação e restrição alimentar) em diferentes dias e horário de coleta.....	93
Tabela 7: Lipídeos totais (mg g ⁻¹ de massa úmida) do músculo de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i> , submetidos a diferentes tratamentos alimentares (alimentação, realimentação e restrição alimentar) em diferentes dias e horário de coleta.....	94
Tabela 8: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ SFA (em porcentagem – %) no plasma de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	95
Tabela 9: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ MUFA (em porcentagem – %) no plasma de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	96
Tabela 10: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ PUFA (%) no plasma de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	97
Tabela 11: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ LC-PUFA (%) no plasma de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	98
Tabela 12: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ n-3 (%) no plasma de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	99
Tabela 13: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ n-6 (%) no plasma de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	100
Tabela 14: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a razão n-3/n-6 no plasma de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	101

Tabela 15: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ SFA (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	102
Tabela 16: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ MUFA (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	103
Tabela 17: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ PUFA (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	104
Tabela 18: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ LC-PUFA (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	105
Tabela 19: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ n-3 (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	106
Tabela 20: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ n-6 (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	107
Tabela 21: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a razão n-3/n-6 sobre a fração TG do fígado de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	108
Tabela 22: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ SFA (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	109
Tabela 23: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ MUFA (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	109
Tabela 24: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ PUFA (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	111
Tabela 25: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ LC-PUFA (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	112
Tabela 26: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ n-3 (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	113
Tabela 27: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ n-6 (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	114
Tabela 28: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a razão n-3/n-6 sobre a fração TG do músculo de juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	115
Tabela 29: Percentuais de AG Bacterianos no plasma total das juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	116
Tabela 30: Percentuais de AG Bacterianos na fração TG do fígado das juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	117
Tabela 31: Percentuais de AG Bacterianos na fração TG do músculo das juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	118

Tabela 32: Perfil de ácidos graxos da dieta ofertada aos de juvenis de <i>E. marginatus</i> nos tratamentos que foram alimentados.....	119
--	-----

Dedicatória

Aos meus avós, Rita Maria e José Fernandes. Sei que mesmo de longe, continuam presentes em todas as minhas conquistas. Os amarei eternamente.

“[...] O tempo é irrealizável. Provisoriamente o tempo parou para mim. Provisoriamente.

Mas eu não ignoro as ameaças que o futuro encerra, como também não ignoro que é o meu passado que define a minha abertura para o futuro. O meu passado é a referência que me projeta e que eu devo ultrapassar. Portanto, ao meu passado, eu devo o meu saber e a minha ignorância, as minhas necessidades, as minhas relações, a minha cultura e o meu corpo.

Hoje, que espaço o meu passado deixa para a minha liberdade hoje?

Não sou escrava dele.

O que eu sempre quis foi comunicar unicamente da maneira mais direta o sabor da minha vida. Unicamente o sabor da minha vida.

Acredito que eu consegui fazê-lo. [...]”

- Simone de Beauvoir

Agradecimentos

Presto meus sinceros agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) e responsáveis, pelo suporte e disponibilidade em auxiliar-me. Aos professores e colaboradores do programa, pelas aulas e ensinamentos.

Agradeço ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP), ao Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA) e ao Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar/USP) pela estrutura cedida para o desenvolvimento deste estudo. Agradeço aos integrantes do LAMEROA, particularmente ao Vagner Alberto, por todo suporte e conversas enquanto trabalhávamos juntos no LAMEROA.

A partir daqui, quero agradecer de forma mais íntima a todos que estiveram comigo nesses últimos dois anos e três meses. Pensei em ser sucinta e direta, mas acredito que depois de tantas horas me dedicando a este trabalho, não seria justo não agradecer desta forma. Então, começo agradecendo a pessoa que esteve nos bastidores, administrando contratempos e indicando o melhor caminho a seguir: Professora Renata Guimarães. Você é a melhor profissional e um dos mais brilhantes seres humanos que tive a oportunidade de conhecer, você é fundamental na vida de todos os seus alunos. Obrigada por ter acreditado em mim todos esses anos. Você mudou minha vida.

As próximas pessoas a quem devo meus sinceros agradecimentos são minha família. Minha mãe, Claudia Aparecida, e meu pai, Erison Fernandes, que me permitiram seguir meus caminhos, mesmo sem conhecê-los. Agradeço a Bruna Fernandes, minha irmã do meio e, principalmente, a minha irmã mais velha, Thamiris Fernandes – a Thata, que me ouve, me acolhe e que me ajuda sem nem se questionar se estou certa ou errada. Obrigada por me enxergar e compreender. Amo vocês, e agradeço por terem me feito quem sou hoje.

Agradeço à Deus por ter colocado em meu caminho pessoas especiais, que tive a oportunidade de escolher viver ao lado. Malu Fernandes, Julia Schaefer, Lyon Soares e Rahvi Soares (nossos pais têm gostos peculiares para nomes), amigos que estão comigo desde sempre. Vocês são o meu mundo alternativo, sem

conversas sobre amostras, ácidos graxos e cromatógrafo, obrigada por isso e tudo mais que já vivemos e viveremos.

Além dos meus amigos, o Cara foi muito bacana comigo, e colocou no meu caminho alguém que tenho certeza de que passarei todos os próximos dias da minha vida. Com o Andrew Rosa, sei que estou segura para ser eu. Obrigada por me entender, acolher e me fazer alguém mais leve e feliz. Ao seu lado sou melhor e espero te retribuir isso todos os dias. Obrigada por sempre me dizer que sou suficiente e capaz de chegar nos lugares que desejo. Te amo.

Aos meus parceiros de trabalho e amigos que ganhei dentro desse mundo que é a academia, agradeço pelos ensinamentos e momentos de descontração. Fernanda de Mello, Micheli Zaminhan, Paulo de Mello e sua família, vocês são pessoas incríveis, que me ensinaram e ensinam coisas maravilhosas sobre o trabalho, e sobretudo, sobre a vida. Assim como o Daniel Alonso, a Marcella Verderame, o Guilherme Aguiar e a Jennifer Lima. Obrigada pelas colaborações, conversas, pelas risadas bem dadas e por me ensinarem muito.

Agradeço também a Luiza Grassi, que durante todo o período que eu estive em São Sebastião para realizar meu experimento, foi uma pessoa muito prestativa e amiga. Nesse período a Luiza foi uma das pessoas mais respeitosas e atenciosas que já conheci. Obrigada por estar comigo e me ajudar, mesmo com tão pouco tempo de amizade!

Ao Bruno Araújo, agradeço por ter me ensinado muito do que sei. Você foi fundamental em tudo que fiz até hoje. Obrigada pela paciência, amizade e por sempre estar disposto a ajudar e ensinar.

E ao final desse trabalho, agradeço a minha mente, que parece ser algo avulso de mim. Sou grata por finalizar algo que nunca imaginei conseguir começar. Que minha mente esteja comigo, de forma amigável, para iniciar novas etapas (e mesmo que ela diga que não, serei teimosa até conseguir muito mais vezes).

Apoio Financeiro

CNPq, Bolsa de Mestrado, Processo 131512/2021-8.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001., Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP).

Resumo

A garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*) é uma espécie com potencial para a aquicultura marinha brasileira, mas seus aspectos fisiológicos ainda são pouco estudados. Investigar os efeitos de diferentes períodos de restrição alimentar e a realimentação são informações importantes para entender a fisiologia desta espécie em cativeiro. Os animais foram divididos em 3 tratamentos: *tratamento alimentação* (30 dias de alimentação), *tratamento realimentação* (15 dias de restrição alimentar e 15 dias de realimentação) e *tratamento restrição alimentar* (30 dias sem alimentação). Foram coletados o total de 9 animais/tratamento e coleta, e os respectivos dias de coleta foram: 7d; 15d; 15d+12 horas; 22d e 30d. Obtivemos 100% de sobrevivência em todos os grupos. Após a análise estatística dos dados observou-se que no *tratamento realimentação*, os parâmetros corporais, perfil lipídico e de ácidos graxos (AG) do plasma, do tecido hepático e muscular mantiveram-se preservados durante jejum de 15 dias. Os animais apresentaram maiores concentrações lipídicas no músculo e no fígado após 7 dias da realimentação, enquanto no *tratamento alimentação* a maior deposição passou a ocorrer apenas 22 dias depois da alimentação. No *tratamento restrição alimentar* o gene *cpt* foi mais expresso nos tecidos hepático e muscular, os animais perderam massa corpórea e usaram AG fisiologicamente importantes, como ômega-3. Concluiu-se que a garoupa-verdadeira possui capacidade de reajustar o metabolismo lipídico, inclusive de AG durante 15 dias de restrição alimentar conciliado a 15 dias de realimentação, mas esta capacidade diminui após 30 dias de restrição alimentar, e que a alimentação constante deve ser repensada para a espécie.

Palavras-chave: Fisiologia, espécie marinha, metabolismo energético, β -oxidação, jejum.

Abstract

The dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) is a species with potential for Brazilian marine aquaculture, but physiological aspects of the species are still poorly studied. Investigating the effects of long periods of food restriction and refeeding periods are relevant information to understand physiology of this species in captivity and is the goal of this study. The juveniles were divided into 3 treatments: *feeding treatment* (30 days of constant feeding), *refeeding treatment* (15 days of fasting and 15 days of refeeding) and *fasting treatment* (30 days without food). A total of 9 animals/treatment and collection were sampled, in the respective days: 7d; 15d; 15d+12 hours; 22d and 30d. We obtained 100% survival in all groups. After statistical analysis of the data, we observed that in the *refeeding treatment*, body parameters, lipid profile and fatty acids (FA) in plasma, liver and muscle tissue remained preserved during the 15-day fasting. The animals showed higher lipid concentrations in muscle and liver after 7 days of refeeding, while in the *feeding treatment* the greatest deposition began to occur only 22 days after feeding. In *fasting treatment*, the *cpt* gene was more expressed in liver and muscle tissues, the animals lost body mass and used physiologically important FAs, such as omega 3. It was concluded that the dusky grouper has capacity to readjust lipid, including FA metabolism during 15 days of fasting combined with 15 days of refeeding, but this capacity decreased after 30 days of fasting, and that constant feeding should be rethought for this species.

Keywords: Physiology, marine species, energy metabolism, β -oxidation, fasting

1. Introdução

O metabolismo energético pode ser definido como um conjunto de reações anabólicas e catabólicas que atuam em diversas moléculas importantes para a manutenção da vida, como os carboidratos, as proteínas e os lipídeos (Nelson e Cox, 2019). Estes últimos, são substratos derivados de hidrocarbonetos, que possuem como principal característica a insolubilidade em água e são componentes estruturais importantes para as membranas celulares, possuem alto valor energético e realizam funções de sinalização intracelular (Tocher, 2003; Nelson e Cox, 2019).

Os lipídeos, em sua maioria, são compostos por moléculas de ácidos graxos (AG), que são ácidos carboxílicos com cadeias de 4 a 36 carbonos e que podem ser classificados em lipídeos de armazenamento ou estruturais, e são diferenciados por suas funções e estruturas moleculares. Os principais lipídeos de armazenamento são os triglicerídeos (TG, do inglês *triglycerides*), cujas principais funções são reserva de energia e isolamento térmico. Já dentre os lipídeos estruturais, os principais são os fosfolipídeos (PL, do inglês *phospholipids*) que possuem função de estruturação das membranas celulares e podem atuar como sinalizadores biológicos (Tocher, 2003; Moyes et al., 2009; Nelson e Cox, 2019).

Os AG podem ser divididos de acordo com características das cadeias de carbonos, por exemplo, os AG com cadeias saturadas (sem insaturações – duplas ligações) são denominados AG saturados (SFA, do inglês *saturated fatty acids*); AG com cadeias de carbono contendo apenas uma insaturação são denominados AG monoinsaturados (MUFA, do inglês *monounsaturated fatty acids*); e AG contendo duas ou três insaturações na cadeia são denominados AG polinsaturados (PUFA, do inglês *polyunsaturated fatty acids*). Os PUFA que possuem mais de três insaturações e cadeias longas são ainda denominados de PUFA de cadeia longa (LC-PUFA, do inglês *long chain polyunsaturated fatty acids*) (Nelson e Cox, 2019).

Os LC-PUFA fisiologicamente mais importantes são o ácido docosahexaenoico (22:6n3; DHA), o ácido eicosapentaenoico (20:5n3; EPA) e o ácido araquidônico (20:4n6; ARA) (Glencross, 2009, Turchini, 2009 Tocher, 2015; Sprague et al., 2016; Nelson e Cox, 2019). Estes AG participam de inúmeros processos importantes em um organismo, como reprodução, desenvolvimento e

crescimento. Além do mais, tais moléculas são fundamentais para a estruturação das membranas celulares, e de forma geral, os AG das diferentes classes de lipídeos fazem parte do processo de oxidação e geração de energia, que ocorre através da β -oxidação (Glencross 2009; Turchini et al., 2009; Tocher, 2008; Tocher, 2015; Nelson e Cox, 2019). Além disso, pode-se dizer que a composição de AG presente na dieta, influenciará no perfil de AG nos tecidos dos animais, incluindo as membranas biológicas (Calder, 2008), uma vez que alguns PUFA, como o ácido linoleico (18:2n6) e ácido linolênico (18:3n3), não podem ser sintetizados pelos animais devido à ausência de enzimas como a delta (Δ)-12 e a Δ -15-dessaturase, que bioconvertem o AG 18:1n9 em PUFA. Desta forma, estes AG são classificados como essenciais para a maioria dos animais e, portanto, precisam ser obtidos através da dieta (Sargent et al., 2002; Tocher, 2010).

No metabolismo de AG, diversas enzimas estão envolvidas na síntese, transporte e degradação destes AG (Nelson e Cox, 2019). O DNA destas enzimas é transcrito, sendo a expressão gênica o processo pelo qual a informação contida em um gene é utilizada para produzir uma proteína funcional (Alberts et al., 2017). Algumas enzimas, transcritas por esses genes, importantes nesse processo são:

- FAS (do inglês *fatty acid synthase*), enzima que catalisa a síntese de AG de cadeia longa a partir de acetil-CoA e malonil-CoA. O gene desta enzima é expresso principalmente no fígado e tecido adiposo, e é importante para a produção de triglicerídeos e armazenamento de gordura (Wakil, 1998);

- CPT (do inglês *carnitine palmitoyltransferase*), uma enzima que catalisa a entrada de AG de cadeia longa nas mitocôndrias para oxidação beta. O gene é expresso principalmente no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, e é importante para a utilização de gordura como fonte de energia (McGarry, 1997),

- ACOX (do inglês *Acyl-CoA Oxidase*), enzima que catalisa a oxidação de AG de cadeia longa no peroxissomo. O gene desta enzima é expresso principalmente no fígado, músculo esquelético e rins, e é importante para a oxidação de AG e produção de energia (Van e Mannaerts, 1999),

- ACADVL (do inglês *Acyl CoA dehydrogenase very long chain*), enzima que catalisa a oxidação de AG de cadeia muito longa na mitocôndria. O gene desta

enzima é expresso principalmente no fígado, músculo esquelético e coração, e é importante para a utilização de AG de cadeia muito longa como fonte de energia (Wanders et al 2001);

- SCD (do inglês *Stearoyl CoA desaturase – delta9*), catalisa a dessaturação de SFA em MUFA. O gene é expresso principalmente no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético, e é importante para a regulação da composição de AG nas membranas celulares e síntese de lipídeos (Ntambi e Miyazaki 2004).

Todo esse processo é controlado por fatores regulatórios, como hormônios e fatores de transcrição, que se ligam ao DNA e ativam ou reprimem a transcrição dos genes envolvidos no metabolismo de AG. A expressão gênica e o controle do metabolismo de AG são essenciais para manter o equilíbrio energético e a homeostase no organismo (Nelson e Cox, 2019).

As células podem obter energia dos AG através de três fontes conhecidas: a) lipídeos consumidos na dieta; b) lipídeos armazenados nas células; c) lipídeos sintetizados em um tecido e direcionados para outro (Nelson e Cox, 2019). Os vertebrados, geralmente, obtêm os lipídeos da dieta e ainda mobilizam os lipídeos armazenados a partir de tecidos especializados, como o tecido adiposo e fígado, convertendo o excesso, recebido através da dieta, em lipídeos a serem armazenados ou transformados (Nelson e Cox, 2019). Os AG são utilizados de acordo com a necessidade apresentada, por exemplo, no músculo os AG são oxidados para gerar energia, já no tecido adiposo, eles são re-esterificados e armazenados na forma de TG (Stubhaug et al., 2007, Tocher, 2010; Nelson e Cox, 2019). Quando há alta demanda energética (como entre os períodos de refeições ou por longo período de jejum), os triglicerídeos armazenados no tecido adiposo são catabolizados e mobilizados aos tecidos alvo para a produção de energia através da β -oxidação (Nelson e Cox, 2019).

Alguns animais utilizam os lipídeos armazenados para obter energia em períodos de hibernação, migração ou em situações que envolvam ajustes metabólicos extremos, como mudança de temperatura e restrição alimentar (Ali et al., 2003; Bar et al., 2012; Fávero et al., 2019). A restrição alimentar é um processo, natural ou induzido, no qual um organismo passa por um período curto ou até mesmo longo, sem alimentação (Moen et al., 2012; Nebo et al., 2017, 2018;

Cardona et al., 2019; Favero et al., 2019; Lin et al., 2019; Liu et al., 2019). McCue (2010) descreve que os períodos (frequência e duração) podem ser definidos de acordo com os eventos naturais que ocorrem: a) Breve e frequente (ciclos de marés); b) Breve e pouco frequente (condições meteorológicas agudas); c) Longo e pouco frequentes (ciclos sazonais); d) Longo e frequente (condições climáticas crônicas). Diferentes espécies se comportam de díspares maneiras durante o período de restrição alimentar, e os animais submetidos a este processo podem apresentar desde boa recuperação após a realimentação (Nebo et al., 2017; Cardona et al., 2019; Tamadoni et al, 2020) até problemas com o crescimento e desregulação metabólica durante o período (Moen et al., 2012; Lin et al., 2019; Liu et al., 2019; Tamadoni et al, 2020; Salgado-Ismodes et al., 2020).

O processo fisiológico da restrição alimentar é bem conhecido em aves e mamíferos e foi categorizado em 3 estágios/fases, que são caracterizados pelo tipo de substrato (como carboidratos, lipídeos ou proteínas) que está sendo catabolizado em um período de restrição alimentar. Eles são descritos da seguinte maneira nestes grupos de vertebrados: 1º) FASE I – é um estágio curto de transição, no qual as proteínas e reservas de lipídeos são mobilizadas; 2º) FASE II – é o estágio estacionário, considerado longo, no qual a mobilização de lipídeos é a principal fonte de energia, sendo permanente até o final destes estoques; 3º) FASE III – neste estágio a mobilização começa a ocorrer dos tecidos musculares, ou seja, é iniciado o consumo de proteínas, sendo esta a principal fonte de energia (Cherel et al., 1991; Groscolas e Robin, 2001, Bar e Volkoff, 2012).

Bar e Volkoff (2012), descrevem as fases da restrição alimentar em teleósteos da seguinte maneira: 1º) FASE I – Alterações hormonais e fisiológicas ocorrem neste período, sendo o catabolismo de glicogênio, proteínas e lipídeos as principais alterações fisiológicas; 2º) FASE II – Neste estágio a mobilização de proteínas é reduzida e os lipídeos são a principal fonte de energia; 3º) FASE III – A partir deste período, as reservas de lipídeos apresentam esgotamento e as proteínas começam a ser catabolizadas. Níveis plasmáticos de hormônios e amônia também são estudados. Entretanto, são escassos os trabalhos que investigam os estágios fisiológicos do catabolismo energético, sendo assim estes estágios são abordados de forma semelhante aos endotérmicos, com as fases descritas para estes organismos (Bar e Volkoff, 2012).

Em diferentes fases da vida, os peixes em ambiente natural passam pela restrição alimentar por diversos fatores, sejam eles naturais (cadeia alimentar e migração) ou devido às condições ambientais extremas e/ou antrópicas (mudanças climáticas, oscilação de temperatura, poluição ambiental, destruição de habitat, entre outras) (McCue, 2010). Os peixes ainda podem ser expostos à restrição alimentar no cativeiro, em cultivos que têm objetivos comerciais ou de conservação. E diante desse quadro, a fisiologia desempenha um papel central para entender como diferentes espécies de peixes respondem à restrição alimentar (Moen et al., 2012; Cardona et al., 2019; Lin et al., 2019; Tamadoni et al., 2020; Salgado-Ismodes et al., 2020), seja ela em ambiente natural ou em cativeiro.

Para viabilizar a produção comercial em cativeiro diversos são os fatores que devem ser levados em consideração: a espécie, o local de produção, o crescimento, a eficiência alimentar, a saúde do animal, o manejo adequado, o produto de qualidade, entre outros (Rombenso et al., 2016; Mata-Sotres et al., 2018; FAO, 2020). A composição nutricional do pescado é um dos fatores mais importantes para a criação e produção em cativeiro, uma vez que os peixes possuem como uma de suas características mais importantes sua composição lipídica rica em LC-PUFA, sendo os peixes marinhos, ricos em ômega 3, ácidos graxos importantes para a saúde dos seres humanos (Simopoulos et al., 2002; Saravanan et al., 2010; Tocher et al., 2015; Lauritzen et al., 2016). Entretanto, o custo para fornecer todas essas condições é elevado, uma vez que a alimentação envolve percentuais que podem atingir até 70% do valor produtivo total (FAO, 2020). Desta forma, um dos desafios para viabilizar a produção envolve reduzir os custos nutricionais, mas adequando as dietas às necessidades nutricionais das espécies. Essa prática, se bem-sucedida, proporciona o crescimento desejado dos peixes, assim como um produto de qualidade (ex. rico em ômega 3), podendo além disso, gerar menor impacto ambiental (Turchini et al., 2009; Rombenso et al., 2016; Mata-Sotres et al., 2018; Araújo et al., 2019).

Visando solucionar os desafios no cultivo, alguns estudos vêm abordando a restrição alimentar, que se baseia em *períodos de jejum e realimentação*, a fim de compreender a fisiologia da espécie-alvo estudada de maneira mais aprofundada, tornando esse tipo de estudo essencial para entender as necessidades metabólicas de diferentes espécies. Os estudos de restrição alimentar vêm sendo conduzidos

em diferentes espécies, com destaques para o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Favero et al., 2017 e 2020); tambaqui *Colossoma macropomum* (Assis et al., 2020); garoupa híbrida *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus* (Liu et al., 2020) e salmão rei *Oncorhynchus tshawytscha* (Araújo et al., 2022). Além disso, outros estudos demonstram que diferentes espécies, como o salmão do Atlântico *Salmo salar* (Moen et al., 2012); tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Nebo et al., 2017; 2018; Liu et al., 2019); truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Cardona et al., 2019); pacamã *Lophiosilurus alexandri* (Favero et al., 2019); esturjão verde *Acipenser medirostris* (Lin et al., 2019), podem ser submetidas a diferentes intervalos de restrição alimentar, possibilitando conhecer os limites dos indivíduos e adequar os protocolos de alimentação de acordo com as características apresentadas, sejam os resultados esperados ou não. Os dados obtidos vêm demonstrando que as respostas fisiológicas são espécie-específicas e demandam mais estudos, visando entender a estratégia de alimentação ideal para as espécies utilizadas na aquicultura.

A garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*) vem sendo considerada uma espécie com potencial para a aquicultura marinha, pois possui grande importância ecológica e comercial nas regiões onde ocorre, mas ainda assim, nos dias atuais é cultivada por apenas um produtor privado no Brasil. Em seu ambiente natural, é encontrada principalmente em costas rochosas rasas (até 300 metros de profundidade) (Andrade et al., 2003), possui hábito alimentar estritamente carnívoro, e apresenta crescimento e reprodução tardios (Reñones et al., 2010). Estas características inserem a espécie na condição vulnerável na lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) (Rodrigues-Filho et al., 2009; Pollard et al., 2018) aumentando a importância do cultivo, evitando a pressão da pesca predatória sobre os estoques naturais.

A garoupa-verdadeira possui diversas características que a tornam uma espécie potencial para a aquicultura, como a resistência ao manejo (Spandri et al., 2020), ciclo produtivo conhecido e produto (filé) de ótimo sabor, apesar de ainda apresentar alguns entraves nas fases iniciais de larvicultura (Mello et al., 2019) e nutrição (Araújo et al., 2018; Oliveira et al., 2023). Os estudos, principalmente, sobre a fisiologia da espécie são escassos, e mostram que a garoupa-verdadeira possui capacidade muito limitada em sintetizar DHA, AG essencial para peixes

marinhos e um dos principais quando se leva em consideração a qualidade do pescado (Araújo et al., 2018). Sabemos também que juvenis de garoupa aceitam dieta comercial e que a suplementação desta dieta com lipídeos aumenta o desempenho em cativeiro (Sanches et al., 2014). No entanto, mesmo com as características positivas da espécie para o cultivo em cativeiro, escassas são as informações sobre o metabolismo lipídico da espécie, principalmente durante a restrição alimentar.

Investigar os efeitos de longos períodos de restrição alimentar e o período de realimentação da garoupa-verdadeira trará respostas importantes sobre o metabolismo lipídico e de ácidos graxos e permitirá, futuramente, traçar os estágios/fases específicos do processo fisiológico da restrição alimentar. O conhecimento destas informações possibilitará investir em novos estudos que ampliem o conhecimento da fisiologia da espécie alvo. A associação do conhecimento do metabolismo lipídico e seu desempenho zootécnico em diferentes protocolos nutricionais adequados à fisiologia da espécie, certamente, será importante para avançar no cultivo desta espécie.

Tendo em vista todas as informações supracitadas sobre restrição alimentar e realimentação, este trabalho investigou as respostas do metabolismo lipídico e de ácidos graxos da garoupa-verdadeira, espécie marinha com alto potencial de cultivo e pouco estudada no Brasil (Andrade et al., 2003; Rodrigues-Filho et al., 2009, 2020, 2022; Reñones et al., 2010; Garcia et al., 2013; Sanches et al., 2014; Araújo et al., 2018; Mello et al., 2019; Oliveira et al., 2023). As hipóteses desta proposta são:

Hipótese 1: A restrição alimentar durante o período de 30 dias irá desencadear redução na concentração de lipídios hepáticos, pois espera-se que os lipídios do tecido muscular sejam preservados durante este período.

Hipótese 2: Os AG totais e da fração TG, principalmente os SFA e MUFA, serão mobilizados em maiores proporções pelo plasma e depositados no tecido hepático e muscular, nos peixes que passarão por restrição alimentar de 30 dias. Além disso, espera-se que o maior catabolismo (nos tecidos analisados) de AG totais ocorra nos peixes que passaram por restrição alimentar em algum momento do experimento. Entretanto, para juvenis da espécie que foram realimentadas,

espera-se ajustes do metabolismo lipídico (visualizados através da expressão de genes e maior deposição de AG nos tecidos hepático e muscular) e recuperação dos parâmetros corporais.

Hipótese 3: Os parâmetros corporais não serão afetados, apesar das reservas energéticas se modificarem nos peixes em período de restrição alimentar.

2. Material e métodos

2.1. Delineamento experimental

As práticas experimentais descritas estão de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP) (nº 391/2021) e foram conduzidas em estruturas já existentes e próprias para experimentação com peixes marinhos, instaladas no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar/USP).

Juvenis de garoupa-verdadeira (n= 192), fêmeas, com massa corpórea de $18,20 \pm 0,38$ g foram adquiridos junto à empresa Redemar Alevinos, situada na cidade de Ilhabela, Litoral Norte do Estado de São Paulo, e foram transportados para base experimental do CEBIMar/USP. Os animais foram mantidos pelo período de 15 dias em tanques de 2.000L, com temperatura controlada ($25,85 \pm 0,03$ °C), e foram alimentados duas vezes ao dia até aparente saciedade com dieta comercial contendo 45% de proteínas e 10% de lipídeos (Anexo III).

O presente estudo teve duração de 30 dias, e no momento da divisão dos grupos experimentais, doze animais do estoque inicial (número adequado para análises estatísticas) foram eutanasiados por overdose em benzocaína (0,1 g.L⁻¹, previamente solubilizada em 10 mL de etanol), e tiveram amostras dos tecidos muscular e hepático coletadas, além do plasma sanguíneo. Esta coleta foi nomeada como coleta 0 dias (Figura 1). Após coletadas, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) até a realização das análises no Laboratório de Metabolismo e Reprodução de

Organismos Aquáticos (LAMEROA), localizado no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP).

Após a coleta dos 0 dias, os animais restantes (n=180) foram anestesiados em benzocaína (0,1 g.L⁻¹, previamente solubilizada em 10 mL de etanol) e divididos em 9 tanques, com volume de 500L cada, em sistema de recirculação aquícola (RAS, do inglês *Recirculating Aquaculture Systems*) com temperatura controlada em $25,85 \pm 0,03$ °C, concentração de oxigênio de $6,38 \pm 0,05$ mg/L e amônia a $0,02 \pm 0,00$ mg/L. Os 9 tanques foram separados em diferentes grupos, que passaram por diferentes tratamentos: 1) *tratamento alimentação*, no qual os animais passaram pelo período de 30 dias sendo alimentados duas vezes ao dia até a aparente saciedade; 2) *tratamento realimentação*, no qual os animais passaram por 15 dias SEM alimentação e foram realimentados nos 15 dias finais, totalizando 30 dias de experimento e 3) *tratamento restrição alimentar*, no qual os animais não foram alimentados dentro do período de 30 dias (Figura 1).

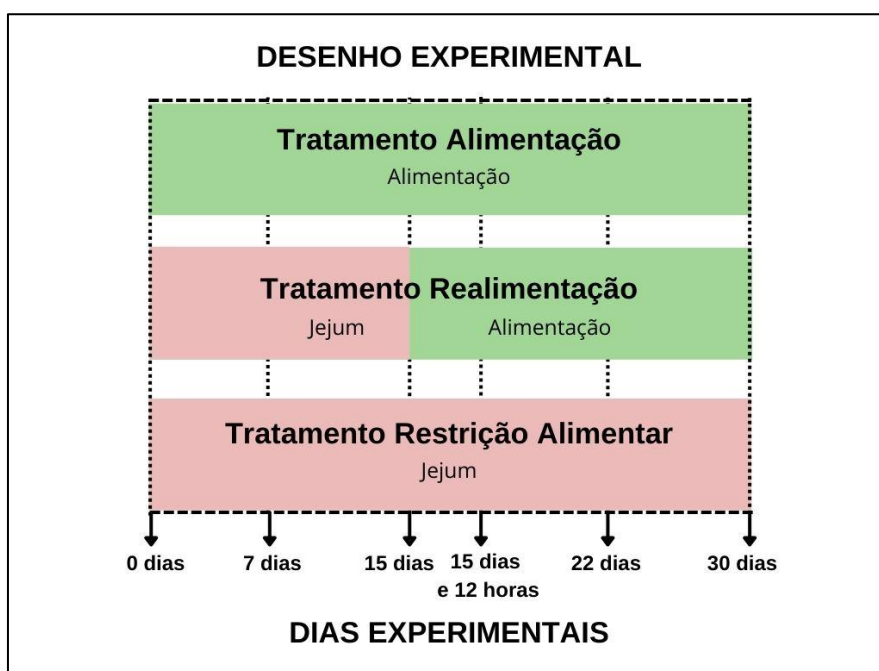


Figura 1: Desenho experimental com os diferentes dias e tempos de coleta para os 3 tratamentos experimentais: *tratamento alimentação*; *tratamento realimentação* e *tratamento restrição alimentar*. A cor verde representa a alimentação e a rosa representa o jejum. Os 15 dias e 15 dias e 12 horas representam o período pós-prandial.

Todos os tratamentos experimentais foram estabelecidos em triplicata, com 20 animais em cada tanque, totalizando 9 tanques, sendo 3 tanques e 60 animais por tratamento. As coletas foram realizadas para os 3 tratamentos experimentais, nos dias e horário identificados como: coleta 7 dias, coleta 15 dias, coleta 15 dias

e 12 horas (para avaliar o efeito pós-prandial, que será explicado abaixo), coleta 22 dias e coleta 30 dias (Figura 1), totalizando 5 coletas após a distribuição dos animais nos tanques e início do experimento.

O dia 0 ou coleta 0, foi realizado apenas para a divisão dos grupos e coleta prévia dos animais que estavam passando por aclimatação no tanque de 2000L. Nenhum dos tratamentos recebeu alimentação no dia 0, sendo a alimentação iniciada de acordo com os tratamentos, no dia 1 do experimento. Em cada uma das coletas, após o início do experimento (7 a 30 dias), foram coletados 3 animais por tanque, totalizando 9 animais por tratamento, em cada uma das coletas realizadas.

Primeiro foi coletado o plasma sanguíneo e em seguida, para a coleta do tecido muscular e hepático, 3 animais dos diferentes tratamentos nas diferentes coletas (7 a 30 dias), foram eutanasiados por overdose em benzocaína (0,1 g.L⁻¹, previamente solubilizada em 10 mL de etanol). Após coletadas, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer (-80°C), seguindo o mesmo padrão realizado na coleta 0 dias.

Em todos os dias de coleta, o procedimento foi iniciado entre às 8 e 9 horas da manhã, sendo que nos dias 15 e 22 os animais foram alimentados até aparente saciedade, 30 minutos antes de serem coletados. No dia 15, os animais foram alimentados, para que 12 horas depois fossem coletados, a fim de realizar a coleta 15 dias e 12 horas (coletados às 21 horas do dia 15 de experimento), e assim fosse possível avaliar os animais em estado pós-prandial, com foco principalmente naqueles que estavam 15 dias sem alimentação. Também é importante enfatizar que receberam alimento, apenas os tratamentos definidos que seriam alimentados no delineamento experimental descrito acima, como o *tratamento alimentação* e o *tratamento realimentação* (15 dias sem alimentação + 15 dias com alimentação). Desta forma o grupo com restrição de alimentação foi coletado neste mesmo momento, para que o tempo fosse padronizado em todos os grupos, mas sem nenhum efeito da alimentação nestas 12 horas.

2.2. Desempenho de crescimento, parâmetros corporais e sobrevivência

Em todos os tratamentos foram avaliados o desempenho de crescimento e produtivo, aferidos com base nos seguintes cálculos:

A) Massa (em gramas (g)) = média das médias de cada tanque e tratamento;

B) Ganho em Massa (GM – em gramas (g)) = massa final – massa inicial;

C) Comprimento (em centímetros (cm)) = média das médias de cada tanque e tratamento;

D) Taxa de Crescimento Específico (TCE – em porcentagem (% dia-1))
= $100 \times ((\text{massa final} - \text{massa inicial}) / \text{dias})$.

E) Sobrevivência = (SOB – em porcentagem (%)) = $100 \times (\text{número de peixes final/inicial})$

2.3. Análises metabólicas

2.3.1. Lipídeos totais

A extração dos lipídeos totais da dieta fornecida aos animais (45% de proteínas e 10% de lipídeos) e dos tecidos/órgãos coletados (hepático e muscular) foi realizada seguindo a metodologia de Folch et al. (1972), utilizando uma mistura de clorofórmio: metanol: água (2:1:0,5). Para quantificá-los, foi utilizado o método colorimétrico de Frings et al. (1972). Os lipídeos do plasma sanguíneo foram quantificados pelo mesmo método, sem extração prévia.

2.3.2. Perfil de ácidos graxos

Os extratos lipídicos dos tecidos hepático e muscular passaram por separação de frações neutras e polares (TG e PL, respectivamente), utilizando uma coluna de sílica ativada (Yang, 1995). Os extratos lipídicos da fração TG de ambos os tecidos foram metilados utilizando cloreto de acetila (5% de HCl em metanol)

(Christie, 2003) e a composição de AG foi analisada como metil ésteres utilizando cromatógrafo a gás Scion, modelo 436-GC equipado com um ionizador de chama (FID) e auto injetor. A coluna capilar utilizada para separar os AGs foi a CPWax 52 CB, 0.25 µm de espessura, 0.25 mm de diâmetro interno e 30 m de comprimento. Foi utilizado o seguinte programa de temperatura: 170°C durante 1 minuto, seguido de uma rampa de 2.5°C/ minuto até alcançar 240°C, e um tempo de espera final de 5 minutos, totalizando 31 minutos de corrida. A temperatura foi de 250°C no injetor e 260°C no detector de ionização de chama (FID). Foram utilizados os padrões de metil ésteres (FAME – Supelco, 37 comp.; Mixtures, Me95, Me100, BR3 e BR4, Larodan) para identificar os AGs com base no tempo de retenção.

2.4. Análise molecular

Os tecidos hepático e muscular foram lisados usando Precellys Evolution Homogenizer (Ozyme, Bertin Technologies) em TRI Reagent (TRI® Sigma-Aldrich, EUA) para extração de RNA total, de acordo com as recomendações do fabricante. Para análise de expressão dos genes *fas*, *cpt*, *acox*, *acadvl* e *scd* (Tabela 1), 1 µg de RNA total foi transcrito reverso (RT) utilizando o kit de High-Capacity cDNA Reverse Transcription (4368814, Applied Biosystems). O cDNA foi diluído (1:20) e a reação de qRT-PCR ocorreu utilizando 5 µl de cDNA diluído, 10 µl de Power SYBR Green Master Mix (ThermoFisher) e 100 nM de cada primer, atingindo um volume total de 20 µl. A qRT-PCR foi realizada no sistema Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, EUA) nas seguintes condições: 95 °C por 2 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 a 62 °C por 1 minuto. A curva padrão foram geradas usando cinco diluições seriadas de cDNA (de 1:1 a 1:256) de um pool de todas as amostras. A abundância relativa do cDNA alvo foi calculada a partir de uma curva padrão usando o software Applied Biosystem StepOne V.2.0. Todos os qRT-PCR foram conduzidos em duplicata, normalizados usando o gene *ef1α* como gene de referência.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para amplificação quantitativa em tempo real (qPCR).

Gene	Sequência do Prime 5' → 3'	Temperatura	Número de Acesso Genbank
Fatty acid synthase (<i>fas</i>)	CTCGCAACTTATTGATGGTG ATGTAAATAGCCTGAACCCT	60°C	KY623455
Carnitine palmitoyltransferase (<i>cpt</i>)	CAACAATGATCTGCCTTCGTCACAAATCACAAACATTCAGCC	60°C	KY623450
Acyl-CoA Oxidase (<i>acox</i>)	TTGTTTGTAGACCTCCACCAATTGTGTCCTATCTGAATGAAC	62°C	KY623453
Acyl CoA dehydrogenase very long chain (<i>acadvl</i>)	TTGCCATTCTTCAGTTACCATTTCACTCTTCAACATCTCCA	60°C	KY623449
Stearoyl CoA desaturase (delta9) (<i>scd</i>)	TCACCAACTATTAGCCACAGTATTGCCTGTAGAGAAACC	62°C	KY623452
Elongation factor 1 alpha (<i>ef1a</i>)	TGGTACCTCTCAGGCTGACACCAAGGGTGAAGGCCAG	60°C	-

R²: coeficiente de correlação.

2.5. Análise estatística

O delineamento experimental ocorreu inteiramente ao acaso – DIC, ou seja, as unidades experimentais foram selecionadas ao acaso e destinadas aos tanques e seus respectivos tratamentos, sem influência da parte dos autores. As análises citadas acima tiveram seus parâmetros analisados para os três grupos experimentais descritos. Após o período experimental e coletas, testes de normalidade e homogeneidade de variância foram aplicados aos animais analisados, e no caso de cumprirem os requerimentos de uma análise paramétrica, os resultados foram comparados utilizando teste de Análise de Variância (*two-way* ANOVA), seguido do teste de Tukey, considerando como fatores: tratamento e tempo. Nos dados que não cumpriram esses requerimentos, foi aplicado o teste Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% ($P < 0.05$), seguido de teste de Tukey. Todos os resultados foram analisados utilizando o programa RStudio (Versão: Edição de código aberto (AGPL v3), 2022.12.0+353, desenvolvida em 2022-12-15).

3. Resultados

Para melhor compreensão e desenvolvimento do texto, os resultados foram divididos em 3 sessões principais. Na primeira seção, estão descritos os resultados de desempenho de crescimento, parâmetros corporais e sobrevivência, para todos os tratamentos, em todos os dias de coleta, incluindo os dois horários na coleta 15 dias. Na segunda seção, estão descritas as diferenças ocorridas entre os diferentes dias de experimento (7; 15; 22 e 30 dias) e diferentes tratamentos (*tratamento alimentação, tratamento realimentação e tratamento restrição alimentar*). Enquanto na terceira seção estão descritas as diferenças ocorridas entre os grupos 15 dias (9h) e 15 dias e 12 horas (21h), abordado na metodologia como período *pós-prandial*, além das diferenças que ocorreram entre os tratamentos nesse mesmo período (*tratamento alimentação, tratamento realimentação e tratamento restrição alimentar*).

3.1. Seção 1: Desempenho de crescimento, parâmetros corporais e sobrevivência para todos os experimentais, incluindo pós-prandial

Os resultados de desempenho de crescimento, parâmetros corporais e sobrevivência estão apresentados nas Figuras 2 e 3. Tabelas de suporte, com as diferenças estatísticas e valores de p , foram confeccionadas para avaliação dos resultados de desempenho de crescimento, parâmetros corporais e sobrevivência, e estão apresentadas no anexo I (Tabelas 2 a 5).

Não houve mortes durante o período de 30 dias de experimento, resultando em 100% de sobrevivência em cada um dos dias (7; 15; 22 e 30) e diferentes intervalos de tempo analisados (15 dias e 15 dias e 12 horas) no presente estudo (Figura 2).

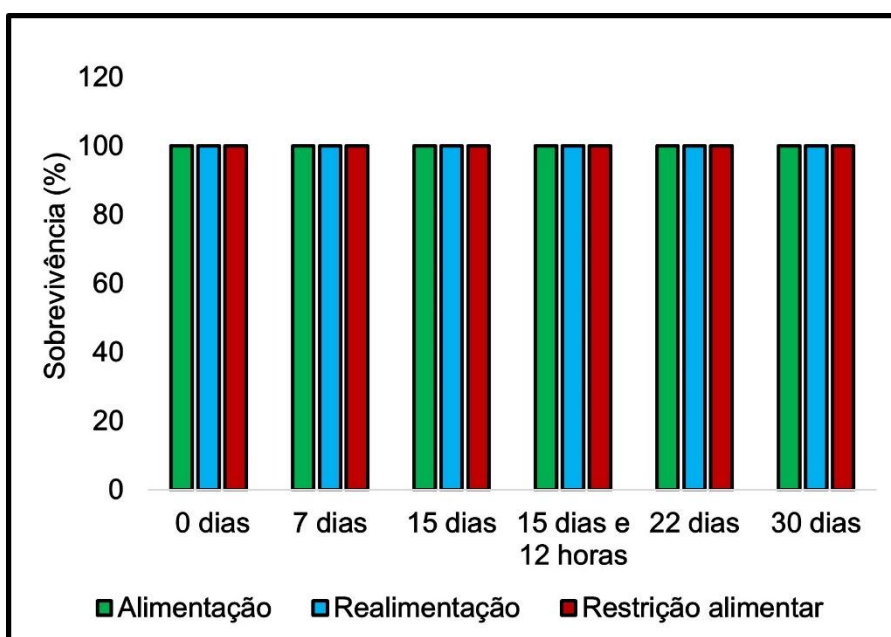


Figura 2: Efeitos da realimentação e restrição alimentar sobre a sobrevivência de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*. O gráfico representa médias $\pm$ erro padrão das médias. Para calcular a sobrevivência, foram usados o total de 9 peixes ($n=3/\text{tanque}$) divididos pelo número de tanques ($n=3/\text{tratamento}$). Não foi aplicada análise estatística, em razão dos valores serem todos iguais. O cálculo foi aferido com base na seguinte fórmula:

$$\text{Sobrevivência (SOB - em porcentagem (\%))} = 100 \times (\text{número de peixes final/inicial}).$$

A massa corpórea (Figura 3A – Tabela 2) dos peixes apresentou diferença estatística ($p = 0,003677$) entre os tratamentos. Os animais dos *tratamentos* *alimentação* ($20,01 \pm 2,29\text{g}$) e *realimentação* ($18,87 \pm 1,74\text{g}$) apresentaram a a

massa corpórea mais elevada quando comparados aos animais do *tratamento restrição alimentar* ($14,39 \pm 1,58\text{g}$) aos 22 dias de experimento. Por outro lado, em todas as outras coletas apenas os animais do *tratamento alimentação* tiveram a massa corpórea mais elevada que os animais do *tratamento restrição alimentar*. Adicionalmente, através da análise do ganho em massa (GM) (Figura 3B – Tabela 3) foi possível observar que os animais do tratamento alimentação ganharam mais massa em gramas (g) que os animais dos demais tratamentos ($p = 0,00432$), em todas as coletas.

Não houve diferença estatística ($p = 0,8967$) para o comprimento total (Figura 3C – Tabela 4) ao longo de todos os dias e horário de estudo. No entanto, a taxa de crescimento específico (TCE) (Figura 3D – Tabela 5), foi maior ($p = 0,02271$) nos primeiros 7 dias nos animais dos *tratamentos alimentação* ($23,59 \pm 30,45\%$) em relação aos animais do *tratamento restrição alimentar* ($-41,31 \pm 17,01\%$).

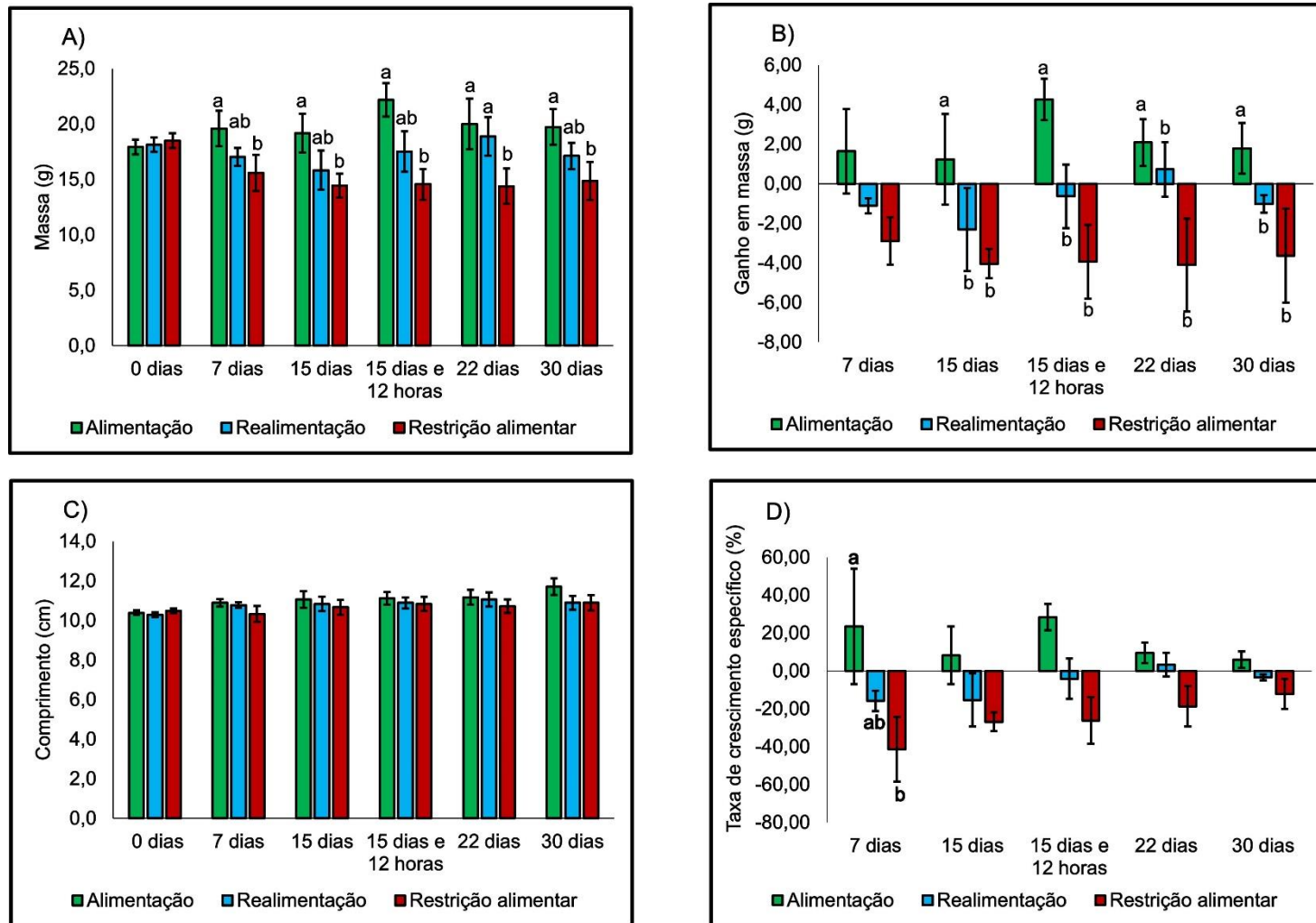


Figura 3: Efeitos da realimentação e restrição alimentar no desempenho de crescimento e parâmetros corporais de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*. Todas as figuras estão identificadas por letras (A, B, C, D) em ordem alfabética. Os gráficos representam médias e erro padrão das médias ($\pm$). Para calcular a massa corpórea (A), ganho em massa (B), comprimento (C) e a taxa de crescimento específico (D), foram usados o total de 9 peixes ($n=3/\text{tanque}$) divididos pelo número de tanques ($n=3/\text{tratamento}$). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way* ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta*. Não foram apresentadas diferenças estatísticas para o período pós-prandial. Os valores de p ($< 0,05$) estão especificados em tabelas no anexo I. Os cálculos foram aferidos com base nas seguintes fórmulas:

A) Massa (em gramas (g)) = média de cada tanque e tratamento;

B) Ganho em Massa (GM – em gramas (g)) = massa final – massa inicial;

C) Comprimento (em centímetros (cm)) = média de cada tanque e tratamento;

D) Taxa de Crescimento Específico (TCE – em porcentagem (% dia⁻¹)) = $100 \times ((\text{massa corpórea final} - \text{massa corpórea inicial}) / \text{dias})$.

3.2. Seção 2: Lipídeos totais, ácidos graxos e expressão de genes do metabolismo lipídico nos tratamentos *alimentação*, *realimentação* e *restrição alimentar* ao longo do experimento

3.2.1. Lipídeos totais dos tecidos hepático e muscular

Os resultados da concentração de lipídeos totais (em mg/g) nos tecidos hepático e muscular das juvenis de garoupa-verdadeira, estão apresentados em mg/g na Figura 4. Tabelas de suporte, com as diferenças estatísticas e valores de p , estão apresentadas em anexo – Tabelas 6 e 7.

No fígado da garoupa-verdadeira, a concentração de lipídeos totais (Figura 4A – Tabela 6A, $p < 0,05$) no *tratamento alimentação* foi maior aos 30 dias ($50,20 \pm 8,60\text{mg/g}$) de experimento, comparado a 7 e 15 dias, que apresentaram $18,23 \pm 1,56\text{mg/g}$ e $25,17 \pm 3,50\text{mg/g}$, respectivamente. As mesmas diferenças ocorreram para o *tratamento realimentação*, no qual em 30 dias ($46,82 \pm 4,97\text{mg/g}$) a concentração hepática de lipídeos foi quase 2x maior que as concentrações apresentadas nos outros dias experimentais, incluindo o dia 22 ($23,05 \pm 1,57\text{mg/g}$) do estudo. Já no *tratamento restrição alimentar* em 15 ($44,59 \pm 8,21\text{mg/g}$), 22 ($33,55 \pm 5,41\text{mg/g}$) e 30 dias ($30,47 \pm 3,45\text{mg/g}$) as concentrações lipídicas no fígado foram maiores que em 7 dias ($9,59 \pm 0,70\text{mg/g}$). Comparando-se os diferentes tratamentos em cada coleta, apenas no dia 15 de experimento, foram encontradas diferenças, com valores mais baixos nos animais do *tratamento realimentação* em relação à *restrição alimentar* ($10,30 \pm 1,30\text{mg/g}$ e $44,59 \pm 8,21\text{mg/g}$, respectivamente).

No músculo, os animais do *tratamento alimentação*, em 22 ($23,00 \pm 1,90\text{mg/g}$) e 30 dias ($22,38 \pm 2,35\text{mg/g}$) apresentaram a concentração de lipídeos totais maior ($p < 0,05$) que nas fêmeas do mesmo tratamento em 7 e 15 dias ($8,48 \pm 1,19\text{mg/g}$ e $6,07 \pm 1,17\text{mg/g}$, respectivamente). O mesmo ocorreu para os *tratamentos realimentação* e *restrição alimentar*. Em 22 e 30 dias a concentração encontrada no *tratamento realimentação* foi de $26,79 \pm 2,25\text{mg/g}$ e $20,12 \pm 2,14\text{mg/g}$, respectivamente. Enquanto as concentrações encontradas no

tratamento restrição alimentar em 22 dias foi de $21,92 \pm 1,47\text{mg/g}$ e em 30 dias foi de $18,42 \pm 1,24\text{mg/g}$ – As diferenças citadas estão indicadas na Figura 4B – Tabela 7A.

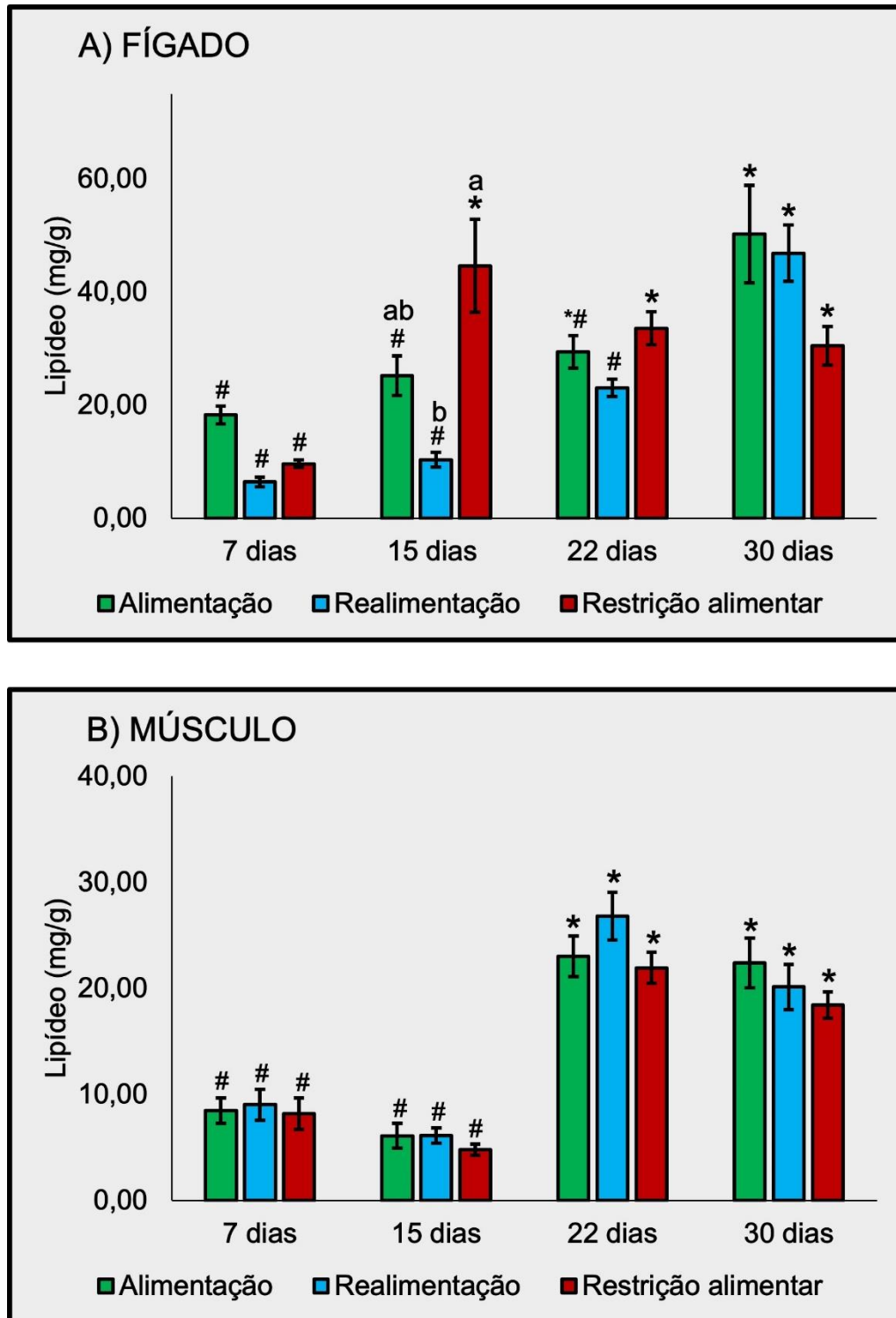


Figura 4: Lipídeos totais (mg g⁻¹ de massa úmida) do **A)** fígado e do **B)** músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (alimentação, realimentação e restrição alimentar) em diferentes dias. Para calcular os lipídeos totais, foram usados o total de 9 peixes (n=3/tanque) divididos pelo número de tanques (n=3/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado o teste de Análise de Variância (two way ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{*#^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de* (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Os valores de p ($< 0,05$) estão especificados em tabelas no anexo I.

3.2.2. Ácidos graxos totais do plasma

Os resultados do perfil de ácidos graxos totais no plasma de juvenis de garoupa-verdadeira, estão apresentados em porcentagem (%) na Figura 5. Tabelas de suporte, com as diferenças estatísticas e valores de p estão nas Tabelas 8 a 14.

O percentual de SFA totais (Figura 5A – Tabela 8A, $p < 0,05$), em 30 dias, foi maior nos animais do *tratamento restrição alimentar* ($46,01 \pm 2,06\%$) em relação ao *tratamento alimentação* ($33,55 \pm 1,64\%$). Enquanto nos MUFA totais (Figura 5B – Tabela 9A, $p < 0,05$) diferenças estatísticas entre os tratamentos foram encontradas em 7, 15 e 30 dias, nos quais o percentual nos animais do *tratamento restrição alimentar* ($14,14 \pm 1,11\%$ e $15,03 \pm 3,91\%$, respectivamente) foi menor comparado ao *tratamento alimentação* ($30,53 \pm 3,13\%$ e $29,59 \pm 2,55\%$, respectivamente). Em 22 dias de experimento, o *tratamento realimentação* ($29,70 \pm 1,50\%$) apresentou percentuais mais elevados que o *tratamento restrição alimentar* ($19,58 \pm 1,59\%$). Em 30 dias de experimento, os *tratamentos alimentação* ($37,82 \pm 1,73\%$) e *realimentação* ($36,86 \pm 4,22\%$) apresentaram percentuais mais elevados de MUFA no plasma que o *tratamento restrição alimentar* ($23,99 \pm 1,28\%$). Diferenças entre dias dentro do mesmo tratamento foram observadas no *tratamento realimentação*, nas quais nos dias 22 ($29,70 \pm 1,50\%$) e 30 ($36,86 \pm 4,22\%$) os percentuais de MUFA totais foram maiores que no dia 7 ($19,66 \pm 1,14\%$). Além disso, no mesmo tratamento, 15 dias ($21,05 \pm 1,36\%$) apresentou percentuais menores em relação a 30 dias ($36,86 \pm 4,22\%$).

Nos percentuais dos PUFA totais (Figura 5C – Tabela 10A, $p < 0,05$), o *tratamento realimentação* foi maior em 22 dias ($20,91 \pm 2,76\%$) quando comparado a 7 ($11,55 \pm 1,11\%$) e 30 dias ($17,19 \pm 3,60\%$). Além disso, em 15 dias, o *tratamento alimentação* ($21,75 \pm 2,02\%$) foi maior que o *tratamento realimentação* ($13,39 \pm 0,84\%$) e *restrição alimentar* ($11,25 \pm 2,95\%$). Nos LC-PUFA totais (Figura 5D – Tabela 11A, $p < 0,05$) as diferenças ocorreram entre o *tratamento restrição alimentar* ($12,08 \pm 2,36\%$), que apresentou maior porcentagem plasmática de LC-PUFA, em relação aos animais dos *tratamentos alimentação* ($5,56 \pm 1,00\%$) e *realimentação* ($3,23 \pm 0,88\%$), no dia 30 de experimento.

Na soma dos AGs da série n-3 (Figura 5E – Tabela 12A, $p < 0,05$) no dia 30 do experimento, os animais do *tratamento alimentação* e *realimentação* ($4,71 \pm$

1,02% e $2,63 \pm 0,66\%$, respectivamente) apresentaram percentuais inferiores de AGs n-3 comparados aos animais do *tratamento restrição alimentar* ($10,21 \pm 2,22\%$), refletindo os valores dos LC-PUFA totais. Enquanto na soma dos AGs n-6 (Figura 5F – Tabela 13A, $p < 0,05$) o *tratamento alimentação* ($22,45 \pm 2,02$) apresentou percentuais maiores que o *tratamento restrição alimentar* ($11,87 \pm 3,02\%$) no dia 15 de coleta. Além disso, o *tratamento realimentação* 22 dias ($21,85 \pm 2,95\%$) apresentou percentuais plasmáticos mais elevados que em 7 dias ($12,39 \pm 1,19\%$).

Na razão n-3/n-6 (Figura 5G – Tabela 14A, $p < 0,05$) o *tratamento alimentação* ($0,30 \pm 0,06$) apresentou valores inferiores ao *tratamento restrição alimentar* ($0,72 \pm 0,21$) aos 15 dias experimentais. Enquanto em 30 dias, os *tratamentos alimentação* ($0,24 \pm 0,05$) e *realimentação* ($0,20 \pm 0,11$) apresentaram razões plasmáticas menores que o *tratamento restrição alimentar* ($0,64 \pm 0,13$).

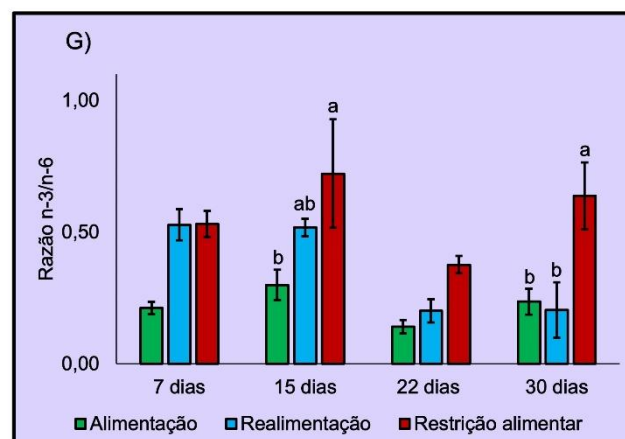
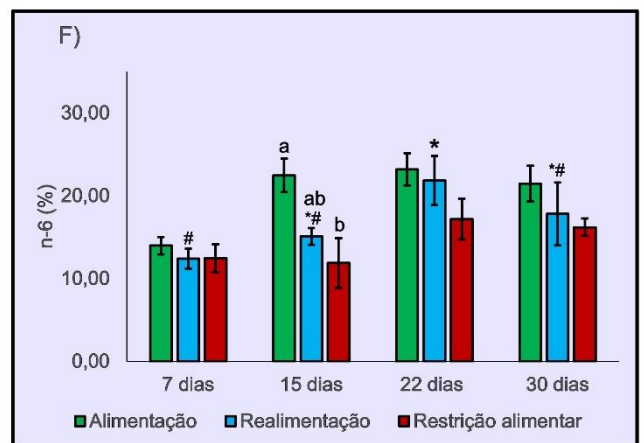
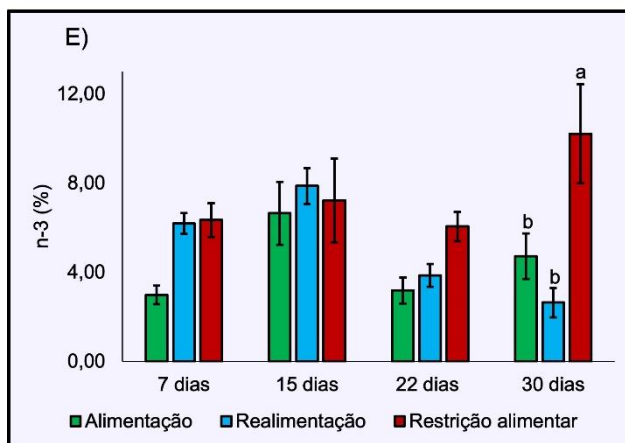
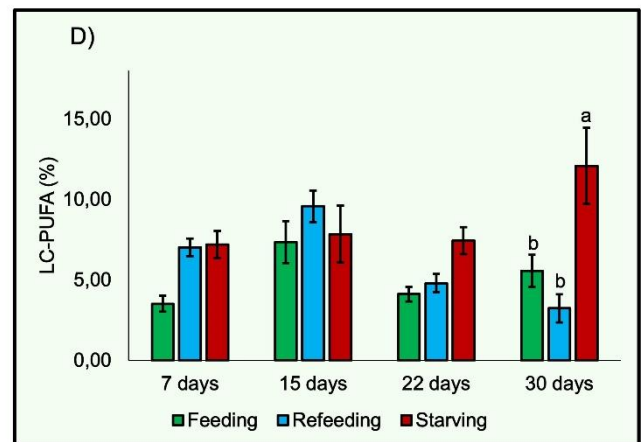
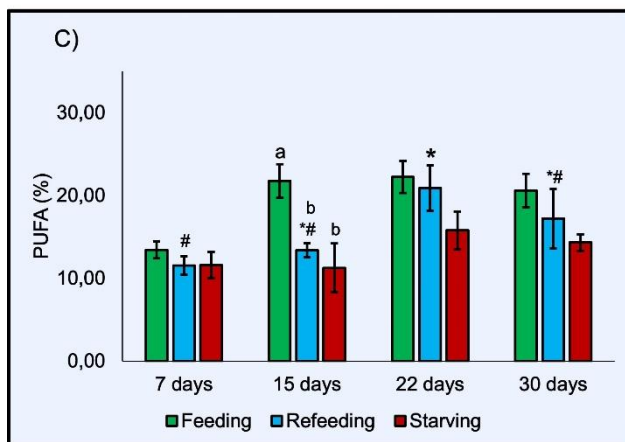
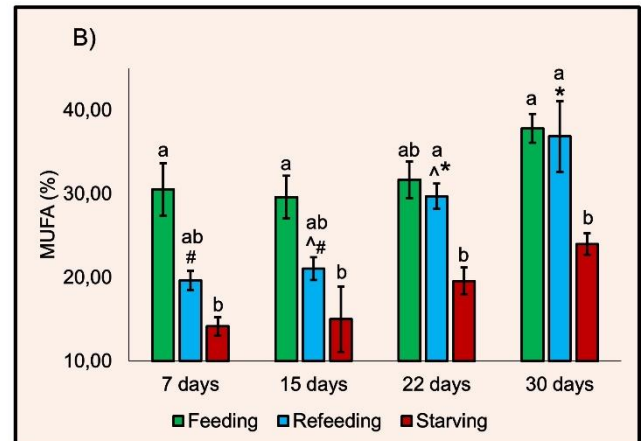
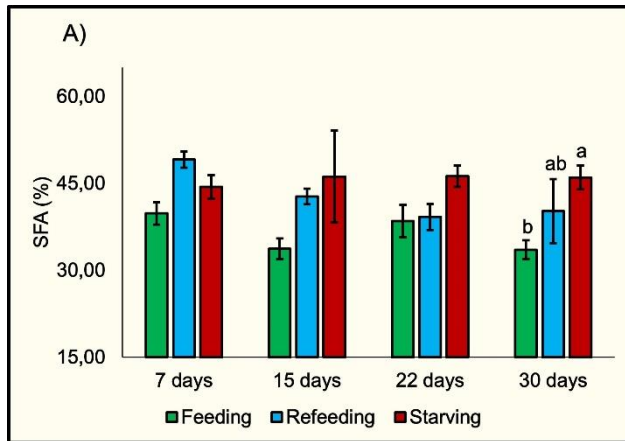


Figura 5: Perfil de ácidos graxos totais do plasma de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (*alimentação*, *realimentação* e *restrição alimentar*) em diferentes dias. O gráfico representa médias e erro padrão das médias ($\pm$) em porcentagem (%). **A)** SFA significa a soma de ácidos graxos saturados (do inglês *saturated fatty acids*). **B)** MUFA significa ácidos graxos monoinsaturados (do inglês *monosaturated fatty acids*). **C)** PUFA significa ácidos graxos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*). **D)** LC-PUFA significa ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (do inglês *long-chain polyunsaturated fatty acids*). **E)** n-3 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 3. **F)** n-6 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6. **G)** Razão n-3/n-6 significa a divisão dos ácidos graxos n-3 pelos ácidos graxos n-6. Para calcular todas as classes de AG, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{*#^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Os valores de p ($< 0,05$) estão especificados em tabelas no anexo I.

3.2.3. Ácidos graxos da fração de triglicerídeos (TG) dos tecidos hepático e muscular

Os resultados do perfil de ácidos graxos da fração TG dos tecidos hepático e muscular de juvenis de garoupa-verdadeira, estão apresentados em porcentagem (%) nas Figuras 6 e 7. Tabelas de suporte, com as diferenças estatísticas e valores estão nas Tabelas 15 a 28.

A porcentagem de SFA na fração TG do tecido hepático (Figura 6A – Tabela 15A, $p < 0,05$) foi maior nos dias 7 ($58,97 \pm 3,96\%$); 22 ($45,61 \pm 2,34\%$) e 30 ($52,86 \pm 2,85\%$) comparados ao dia 15 ($44,07 \pm 4,88\%$), no *tratamento restrição alimentar*. Ainda no tecido hepático, em 15 dias, os animais do *tratamento realimentação* ($56,25 \pm 4,50\%$) apresentaram níveis mais elevados de SFA na fração TG, comparados ao *tratamento restrição alimentar* ($44,07 \pm 4,88\%$) e o *tratamento alimentação* ($40,01 \pm 3,06\%$) apresentou percentuais menores que o *tratamento restrição alimentar*. No tecido muscular (Figura 7A – Tabela 22A, $p < 0,05$), nos mesmos dias (7, 22 e 30), os percentuais foram menores quando comparados ao dia 15 ($43,16 \pm 2,42\%$), no *tratamento alimentação*.

No tecido hepático das juvenis de garoupa-verdadeira os percentuais de MUFA da fração TG (Figura 6B – Tabela 16A, $p < 0,05$) apresentaram em 7 dias ($17,00 \pm 1,76\%$) experimentais menores níveis destes AGs quando comparados a todos os outros dias de estudo no *tratamento realimentação*. Enquanto 15 dias ($31,33 \pm 3,88\%$), apresentou percentuais inferiores aos dias 22 ($47,18 \pm 1,14\%$) e 30 ($50,65 \pm 0,95\%$) ainda no *tratamento realimentação*. Na coleta do dia 7, a porcentagem de MUFA foi maior no *tratamento alimentação* ($38,10 \pm 4,15\%$) em relação ao *tratamento realimentação* ($17,00 \pm 1,76\%$), mas aos 30 dias os

tratamentos alimentação ($49,50 \pm 0,86\%$) e *realimentação* ($50,65 \pm 0,95\%$) apresentaram percentuais mais elevados comparados ao *tratamento restrição alimentar* ($35,39 \pm 2,10\%$).

No músculo, a porcentagem de MUFA da fração TG (Figura 7B – Tabela 23A, $p < 0,05$) foi maior em 15 dias no *tratamento alimentação* ($47,90 \pm 0,85\%$) comparado aos 22 dias ($42,99 \pm 0,33\%$) de estudo. Além disso, no *tratamento realimentação*, animais coletados aos 7 ($47,99 \pm 1,25\%$) e 15 dias ($47,99 \pm 0,78\%$) exibiram maior deposição de MUFA na fração TG, comparados ao dia 22 ($43,32 \pm 0,92\%$). Enquanto no *tratamento restrição alimentar*, os dias 7 ($48,13 \pm 1,01\%$) e 15 ($48,18 \pm 0,71\%$) os percentuais mostraram-se maiores que nos dias 22 ($43,22 \pm 0,45\%$) e 30 ($44,66 \pm 0,17\%$).

No fígado das juvenis de garoupa-verdadeira, os percentuais de PUFA na fração TG (Figura 6C – Tabela 17A, $p < 0,05$), no *tratamento realimentação*, 22 ($19,94 \pm 1,41\%$) e 30 dias ($20,69 \pm 1,65\%$) apresentaram valores maiores que em 7 ($4,22 \pm 0,80\%$) e 15 dias ($8,94 \pm 1,71\%$). Enquanto no *tratamento restrição alimentar*, 15 dias ($13,49 \pm 1,09\%$) exibiu níveis maiores que em 30 dias ($6,23 \pm 1,85\%$). Em 7 dias, o *tratamento alimentação* ($14,40 \pm 1,82\%$) apresentou percentuais superiores de PUFA em relação ao *tratamento realimentação* ($4,22 \pm 0,80\%$). Em 22 dias, o *tratamento realimentação* ($19,94 \pm 1,41\%$) exibiu percentuais elevados comparado ao *tratamento restrição alimentar* ($11,54 \pm 2,04\%$), enquanto em 30 dias os *tratamentos alimentação* ($21,74 \pm 0,50\%$) e *realimentação* ($20,69 \pm 1,65\%$) apresentaram percentuais elevados em relação ao *tratamento restrição alimentar* ($6,23 \pm 1,85\%$). No tecido muscular, a fração TG de PUFA (Figura 7C – Tabela 24A, $p < 0,05$), apresentou valores maiores nos dias 22 ($18,01 \pm 0,38\%$) e 30 ($18,92 \pm 0,62\%$), comparados ao dia 15 ($8,94 \pm 2,42\%$) no *tratamento alimentação*.

Não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) na classe dos LC-PUFA hepáticos da fração TG (Figura 6D – Tabela 18A). Entretanto, no tecido muscular, os LC-PUFA (Figura 7D – Tabela 25A, $p < 0,05$) apresentaram maiores percentuais em 22 dias ($7,64 \pm 1,85\%$) comparados aos outros dias de experimento, no *tratamento realimentação*. Foram encontradas as mesmas diferenças no *tratamento restrição alimentar*. Além disso, ainda no *tratamento restrição alimentar*, 7 ($2,47 \pm 0,64\%$) e 30 dias ($5,02 \pm 0,38\%$) exibiram percentuais mais elevados que 15 dias

($1,94 \pm 0,44\%$). Desta forma, em 15 dias, os animais apresentaram percentuais mais baixos de LC-PUFA no músculo que todos os outros dias de estudo.

A soma dos AG da série n-3 do fígado (Figura 6E – Tabela 19A, $p < 0,05$), foi maior no *tratamento restrição alimentar* ($2,47 \pm 0,56\%$) comparado ao *tratamento alimentação* ($0,58 \pm 0,14\%$) em 15 dias. A série n-3 no tecido muscular (Figura 7E – Tabela 26A, $p < 0,05$), apresentou maior deposição no dia 22 ($7,61 \pm 1,58\%$) de experimento, comparado aos dias 7 ($3,41 \pm 0,72\%$) e 15 ($2,53 \pm 0,54\%$), no *tratamento realimentação*. As mesmas diferenças ocorreram no *tratamento restrição alimentar*, refletindo os percentuais do LC-PUFA.

A soma dos AG da série n-6 do fígado (Figura 6F – Tabela 20A, $p < 0,05$) no *tratamento alimentação*, 30 dias ($21,06 \pm 0,45\%$) apresentou maior percentual em relação aos 7 dias ($13,88 \pm 1,73\%$). No *tratamento realimentação*, os percentuais de 22 ($19,46 \pm 1,36\%$) e 30 dias ($20,16 \pm 1,58\%$) mostraram-se maiores que de 7 ($4,22 \pm 0,80\%$) e 15 dias ($8,94 \pm 1,71\%$). Em 7 dias, o *tratamento alimentação* ($13,88 \pm 1,73\%$) apresentou percentuais maiores que o *tratamento realimentação* ($4,22 \pm 0,80\%$). Já em 22 dias de estudo, foi possível observar que os animais do *tratamento realimentação* ($19,46 \pm 1,36\%$) exibiram maiores níveis de AG da série n-6, comparado ao *tratamento restrição alimentar* ($11,09 \pm 1,91\%$). Enquanto em 30 dias, os *tratamentos alimentação* ($21,06 \pm 0,45\%$) e *realimentação* ($20,16 \pm 1,58\%$) apresentaram percentuais superiores ao *tratamento restrição alimentar* ($6,23 \pm 1,85\%$). A soma dos AG da série n-6 no tecido muscular (Figura 7E – Tabela 27A, $p < 0,05$), apresentou diferenças apenas entre 15 dias ($8,94 \pm 2,42\%$), que quando comparados a 22 ($17,65 \pm 0,39\%$) e 30 dias ($18,29 \pm 0,61\%$) experimentais, exibiu menor porcentagem destes AG no *tratamento alimentação*.

A razão entre a série n-3 e n-6 foi maior no *tratamento restrição alimentar* em 15 dias ($0,17 \pm 0,03\%$), comparado aos 22 dias ($0,04 \pm 0,01\%$) de experimento, no tecido hepático (Figura 6G – Tabela 21A, $p < 0,05$). E na coleta de 15 dias, esta razão foi maior no fígado dos animais do *tratamento restrição* quando comparado ao *tratamento alimentação*. No tecido muscular, não houve diferenças estatísticas na razão n-3/n-6 (Figura 7G – Tabela 28A, $p > 0,05$).

FRAÇÃO TG DO FÍGADO

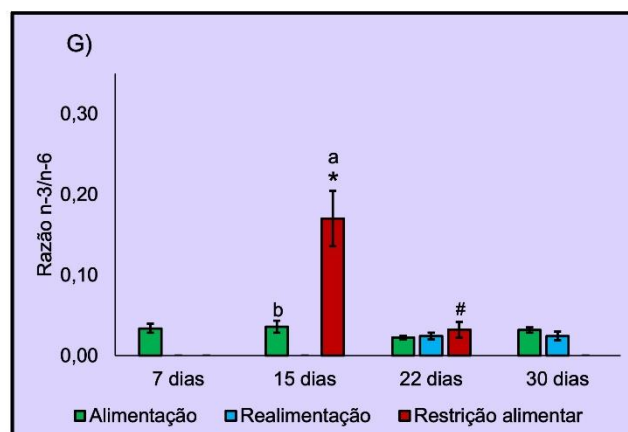
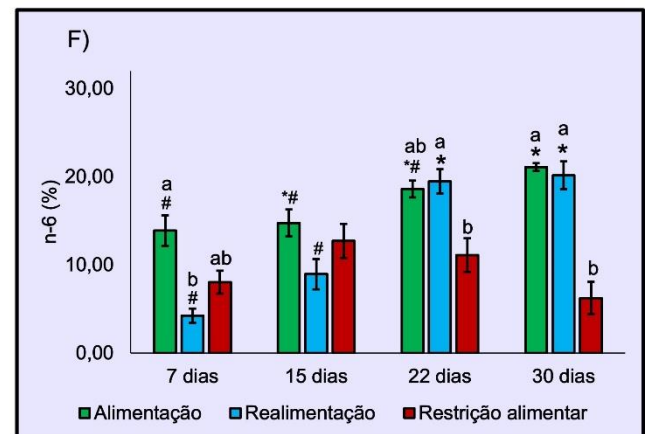
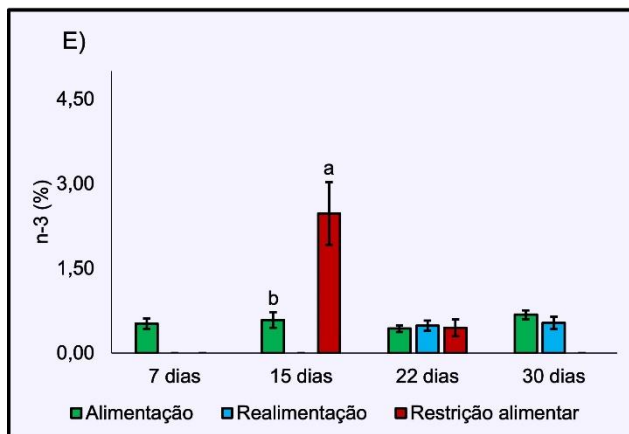
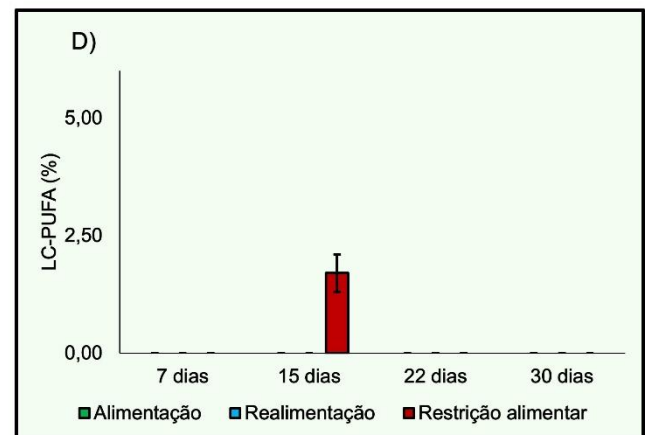
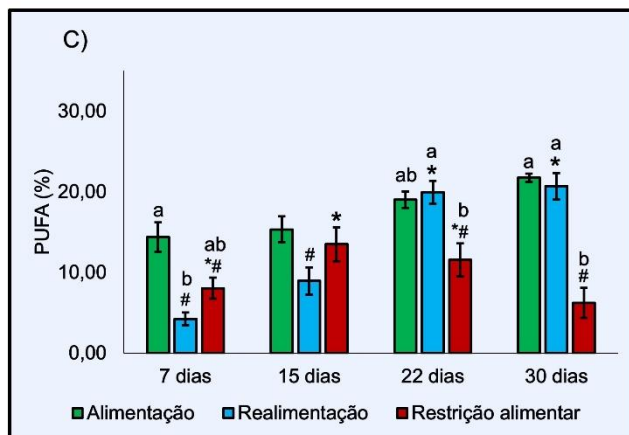
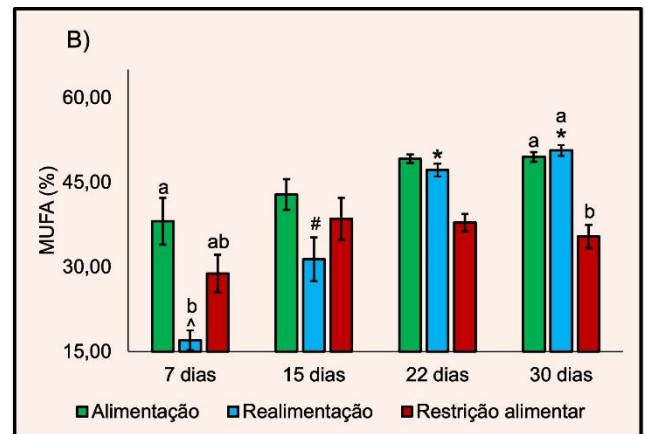
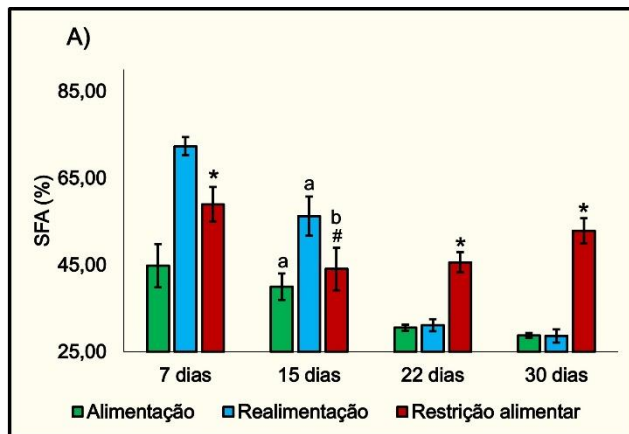


Figura 6: Perfil de ácidos graxos da fração TG do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (*alimentação, realimentação e restrição alimentar*) em diferentes dias. O gráfico representa médias e erro padrão das médias ($\pm$) em porcentagem (%). **A)** SFA significa a soma de ácidos graxos saturados (do inglês *saturated fatty acids*). **B)** MUFA significa ácidos graxos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acids*). **C)** PUFA significa ácidos graxos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*). **D)** LC-PUFA significa ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (do inglês *long-chain polyunsaturated fatty acids*). **E)** n-3 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 3. **F)** n-6 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6. **G)** Razão n-3/n-6 significa a divisão dos ácidos graxos n-3 pelos ácidos graxos n-6. Para calcular todas as classes de AG, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (two way ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{# ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Os valores de p ($< 0,05$) estão especificados em tabelas no anexo I.

FRAÇÃO TG DO MÚSCULO

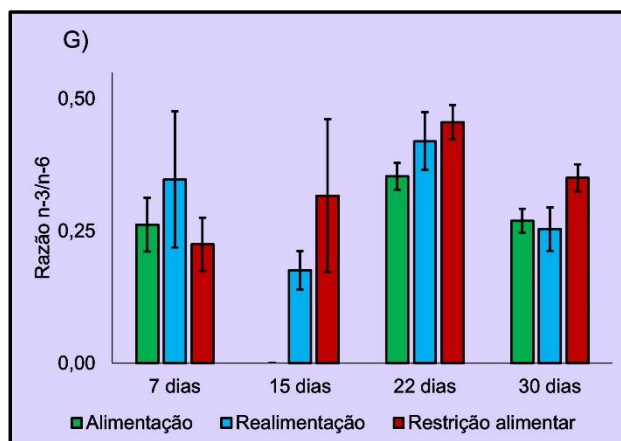
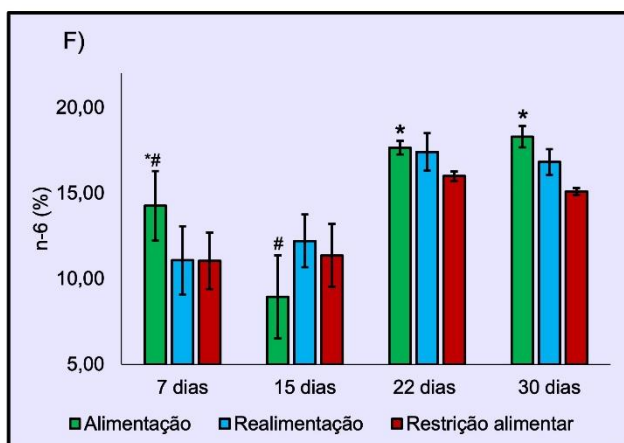
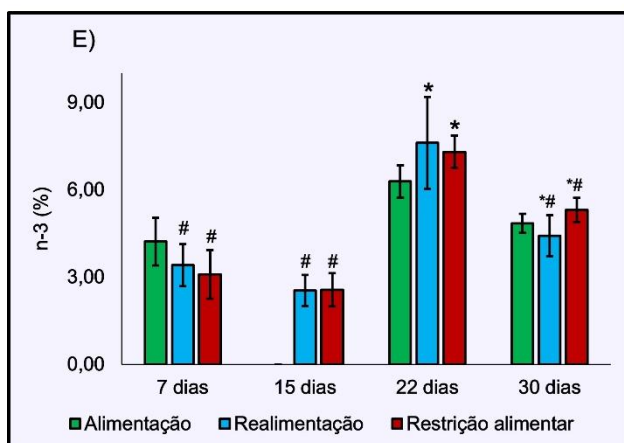
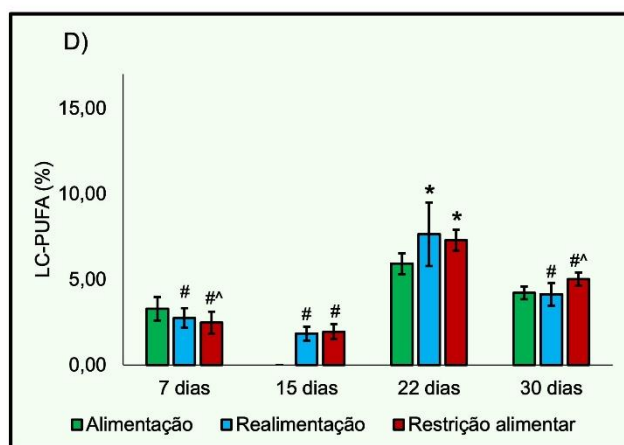
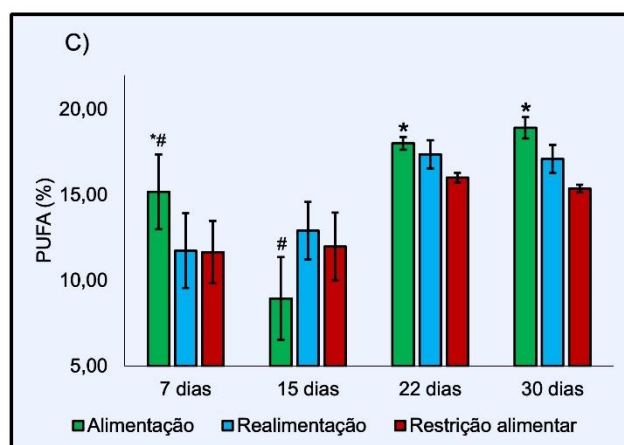
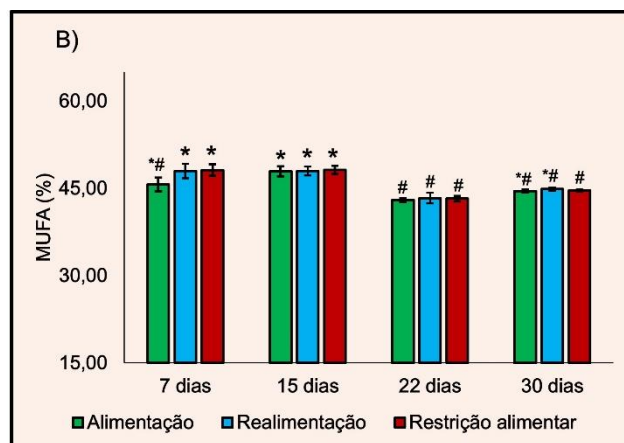
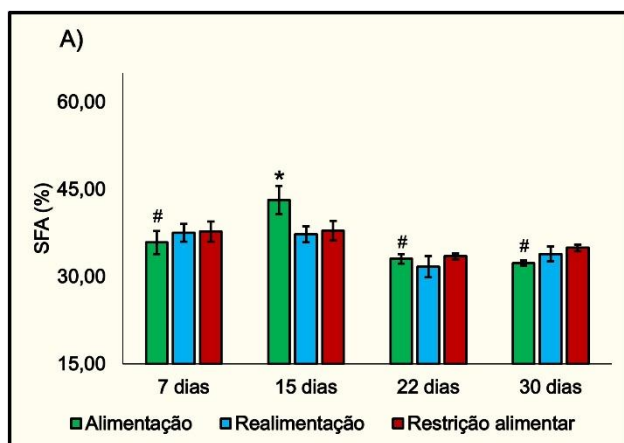


Figura 7: Perfil de ácidos graxos da fração TG do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (*alimentação*, *realimentação* e *restrição alimentar*) em diferentes dias. O gráfico representa médias e erro padrão das médias ($\pm$) em porcentagem (%). **A)** SFA significa a soma de ácidos graxos saturados (do inglês *saturated fatty acids*). **B)** MUFA significa ácidos graxos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acids*). **C)** PUFA significa ácidos graxos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*). **D)** LC-PUFA significa ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (do inglês *long-chain polyunsaturated fatty acids*). **E)** n-3 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 3. **F)** n-6 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6. **G)** Razão n-3/n-6 significa a divisão dos ácidos graxos n-3 pelos ácidos graxos n-6. Para calcular todas as classes de AG, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (two way ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$).^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). * # ^ Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Os valores de p ($<0,05$) estão especificados em tabelas no anexo I.

3.2.4. Expressão gênica

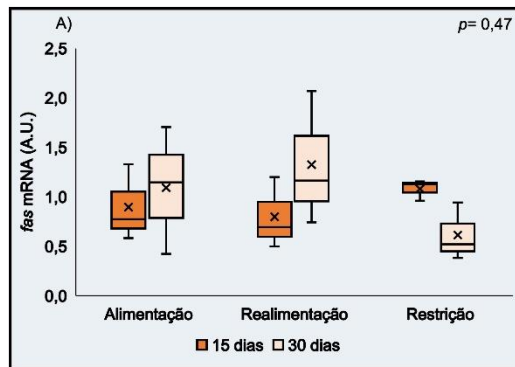
Os resultados de expressão dos genes *fas*, *cpt*, *acox*, *acadvl* e *scd*, nos tecidos muscular e hepático de juvenis de garoupa-verdadeira, estão apresentados na Figura 8. Foram escolhidos dois dias do estudo para a realização das análises de expressão gênica: o dia 15 e o dia 30. Estes dias foram escolhidos pela maior distância entre os períodos de realimentação e restrição alimentar, e desta forma, esperava-se encontrar mais resultados do que em períodos mais curtos de tempo, como em intervalos de 7 dias. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os diferentes tratamentos nos diferentes dias de coleta testados (15 e 30 dias) para os genes *fas* (Figura 8A e B), *acox* (Figura 8E e F), *acadvl* (Figura 8G e H) e *scd* (Figura 8I e J), em ambos os tecidos analisados. Por outro lado, o gene *cpt* (Figura 8C e D) apresentou diferença estatística significativa (fígado $p = 0,026$ e músculo $p = 0,042$) entre os diferentes tratamentos e dias experimentais analisados.

No fígado (Figura 8C) foram observadas diferenças estatísticas significativas em ambos os dias analisados, sendo a expressão de *cpt* hepática aproximadamente 2,5x e 1,5x mais elevada no *tratamento restrição alimentar* quando comparado aos *tratamentos alimentação* e *realimentação*, respectivamente, nos 15 dias experimentais. Em 30 dias o *tratamento restrição alimentar* é aproximadamente 5x mais expresso que o *tratamento realimentação*, enquanto o *tratamento alimentação* é apenas 3x menos expresso que o *tratamento restrição alimentar*.

Entretanto, no músculo (Figura 8D) das juvenis de *E. marginatus*, o resultado obtido no dia 15 do estudo, mostrou que o gene *cpt* no *tratamento restrição alimentar* é aproximadamente 9x mais expresso em relação ao *tratamento realimentação* e aproximadamente 31x mais expresso que o *tratamento alimentação*. Além disso, em 15 dias, o *tratamento restrição alimentar* foi 1.151x

mais expresso, quando comparado ao mesmo tratamento em 30 dias experimentais. E apesar deste resultado, em 30 dias, não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos deste dia de coleta.

FÍGADO



MÚSCULO

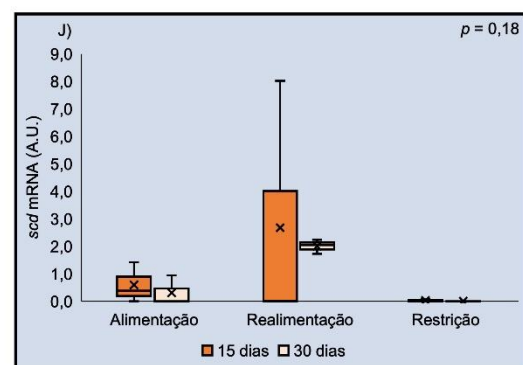
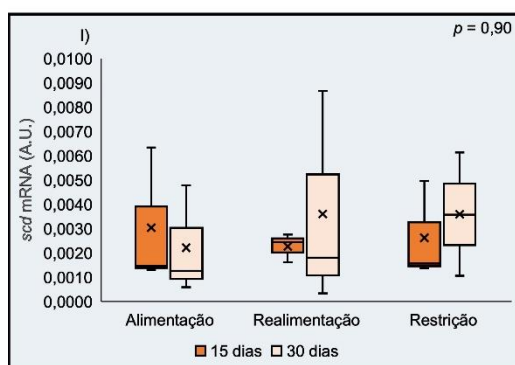
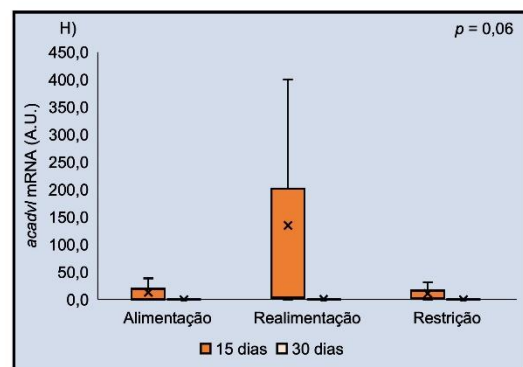
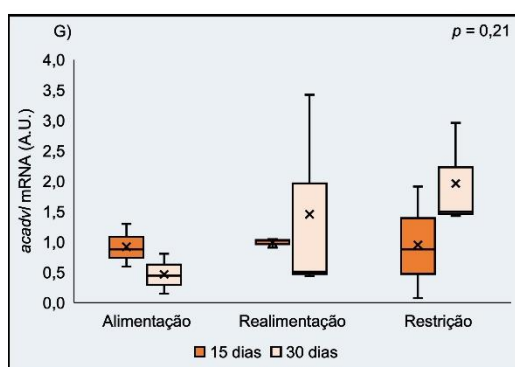
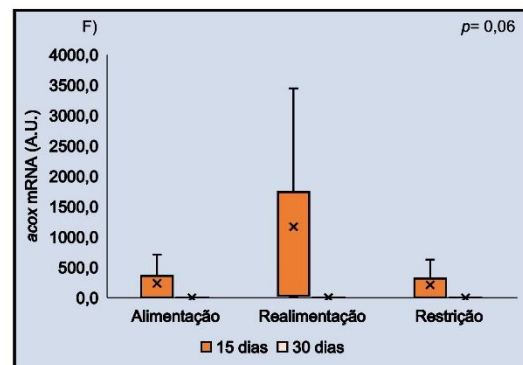
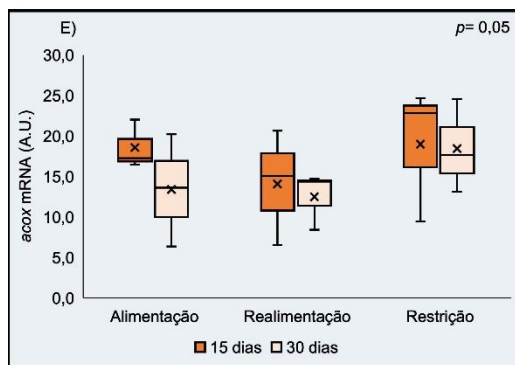
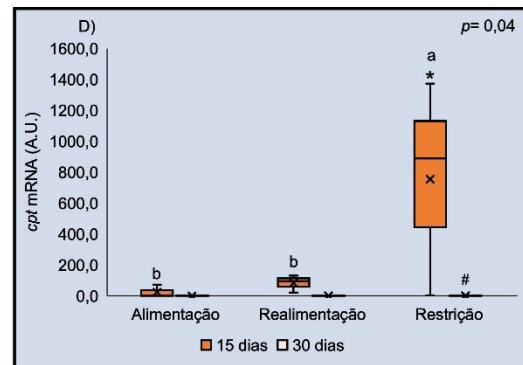
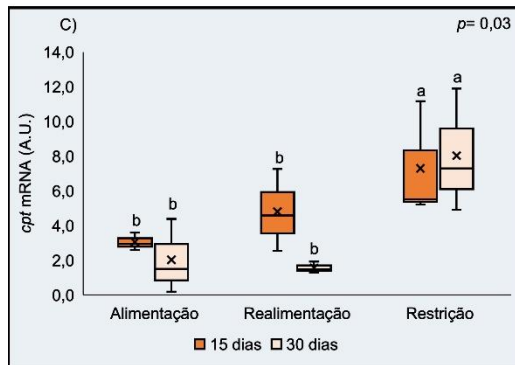
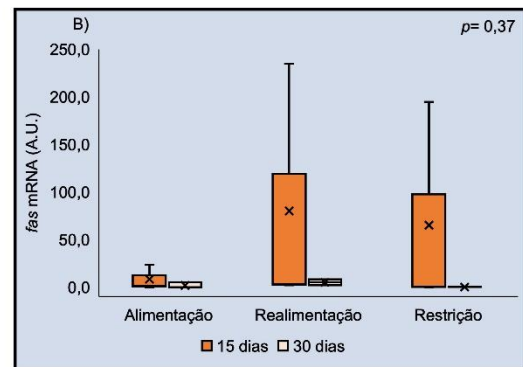


Figura 8: Expressão gênica dos genes *fas* (A e B), *cpt* (C e D), *acox* (E e F), *acadvl* (G e H) e *scd* (I e F) do fígado e músculo de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*. O RNA total foi extraído de três peixes por tratamento de diferentes tanques ($18,20 \pm 0,38$ g) dos dias 15 e 30. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão. Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* (ex.: *alimentação* diferente de *restrição* no dia 30). * # ^ Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* (ex.: *realimentação* no dia 15 é diferente de *realimentação* no dia 15).

3.3. Seção 3: Pós-prandial

3.3.1. Lipídeos totais dos tecidos hepático e muscular

Os resultados da concentração de lipídeos totais nos tecidos hepático e muscular no período pós-prandial medidos em juvenis de garoupa-verdadeira, estão apresentados na Figura 9. Tabelas de suporte, com as diferenças estatísticas e valores de p estão apresentadas em anexo – Tabelas 6 e 7.

No tecido hepático (Figura 9A – Tabela 6B) das juvenis de garoupa-verdadeira, as principais diferenças encontradas foram no *tratamento restrição alimentar*, em que o grupo pós-prandial ($16,68 \pm 4,75\text{mg/g}$) apresentou concentrações inferiores comparado ao dia 15 de estudo ($44,59 \pm 8,21\text{mg/g}$) ($p < 0,05$), enquanto no tecido muscular ($p < 0,05$), em todos os tratamentos, os animais do grupo pós-prandial exibiram valores maiores de lipídeos que 15 dias, como apresentado na Figura 9B – Tabela 7B.

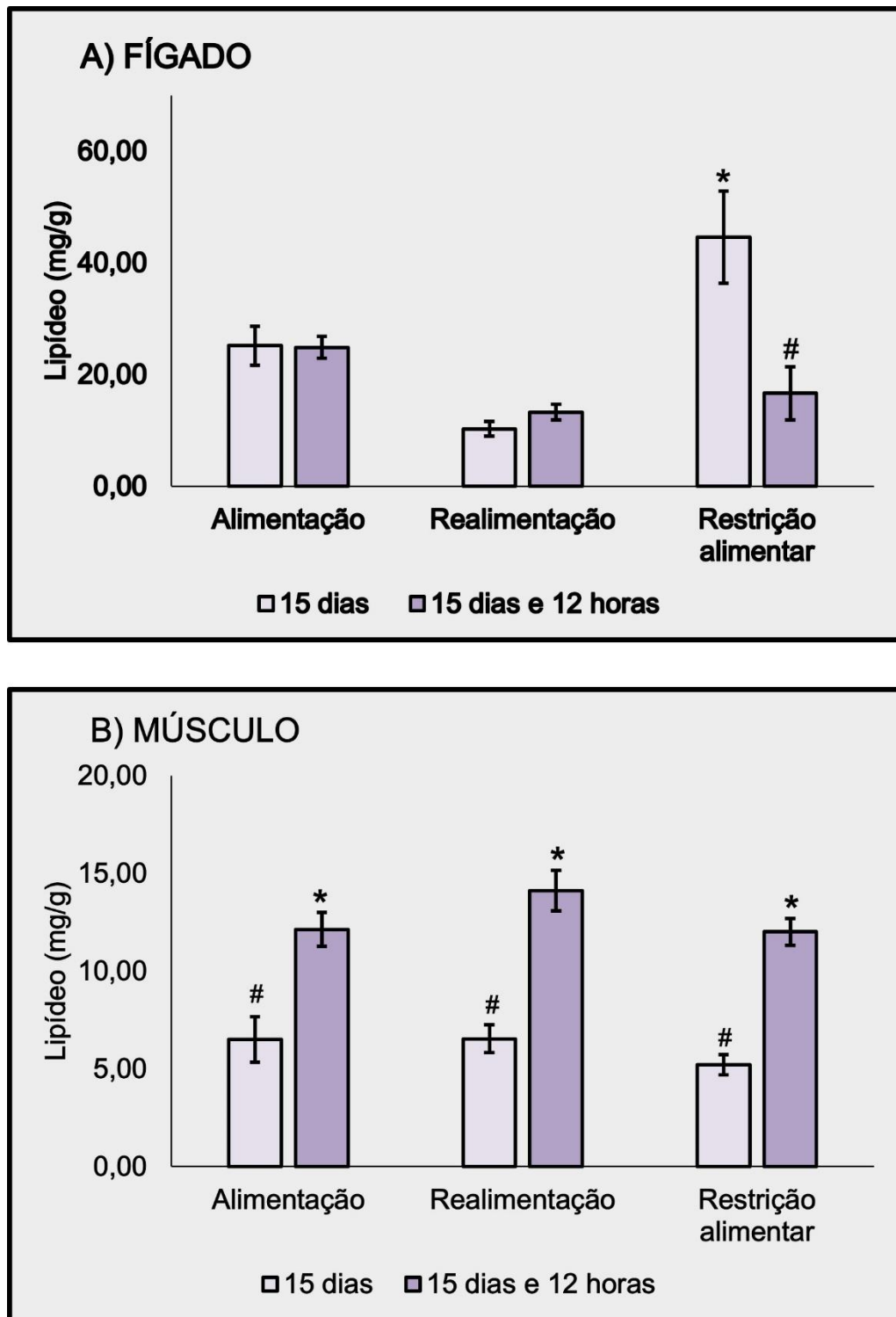


Figura 9: Lipídeos totais (mg g^{-1} de massa úmida) do **A)** fígado e do **B)** músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (*alimentação*, *realimentação* e *restrição alimentar*) durante o período pós-prandial. Para calcular os lipídeos totais, foram usados o total de 9 peixes ($n=3/\text{tanque}$) divididos pelo número de tanques ($n=3/\text{tratamento}$). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (two way ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* (ex.: *alimentação* diferente de *restrição* no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de* (ex.: *realimentação* no dia 7 é diferente de *realimentação* no dia 30). Os valores de p ($< 0,05$) estão especificados em tabelas no anexo I.

3.3.2. Ácidos graxos totais do plasma

Os resultados do perfil de ácidos graxos totais no plasma do período pós-prandial medidos em juvenis de garoupa-verdadeira, estão apresentados na Figura 10. Tabelas de suporte, com as diferenças estatísticas e valores de p , estão apresentadas em anexo – Tabela 8 a 14.

Não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) para classe de SFA do plasma total no período pós-prandial (Figura 10A – Tabela 8B). Já nos MUFA totais do plasma (Figura 10B – Tabela 9B, $p < 0,05$), em 15 dias e 12 horas o *tratamento alimentação* ($31,76 \pm 2,40\%$) apresentou percentuais mais elevados que os *tratamentos realimentação* ($18,18 \pm 2,27\%$) e *restrição alimentar* ($19,02 \pm 2,26\%$).

A porcentagem de PUFA plasmático (Figura 10C – Tabela 10B, $p < 0,05$) foi maior em 15 dias e 12 horas ($24,15 \pm 3,32\%$) comparado aos 15 dias ($11,25 \pm 2,95\%$), no *tratamento restrição alimentar*. Não houve diferenças estatísticas na classe de LC-PUFA (Figura 10D – Tabela 11B, $p > 0,05$) e na soma dos AG da série n-3 (Figura 10E – Tabela 12B, $p > 0,05$). Na soma dos AG da série n-6 plasmáticos (Figura 10F – Tabela 13B, $p < 0,05$), no *tratamento restrição alimentar*, 15 dias e 12 horas ($26,11 \pm 3,08\%$) apresentou percentuais mais elevados quando comparado aos 15 dias ($11,87 \pm 3,02\%$) de estudo. A razão n-3/n-6 durante o período pós-prandial (Figura 10G – Tabela 14B, $p < 0,05$) foi menor aos 15 dias e 12 horas ($0,38 \pm 0,04$) comparada com 15 dias ($0,72 \pm 0,21$).

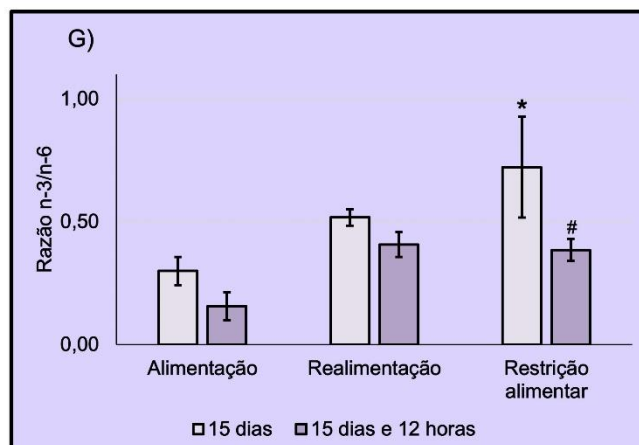
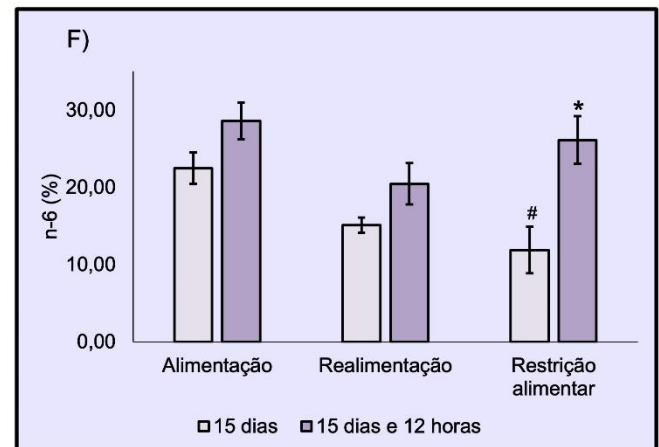
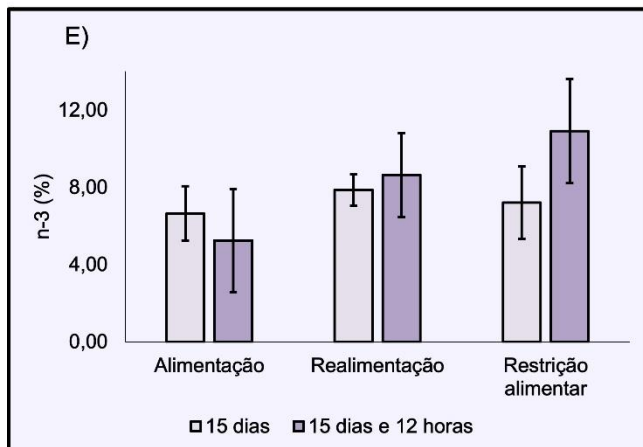
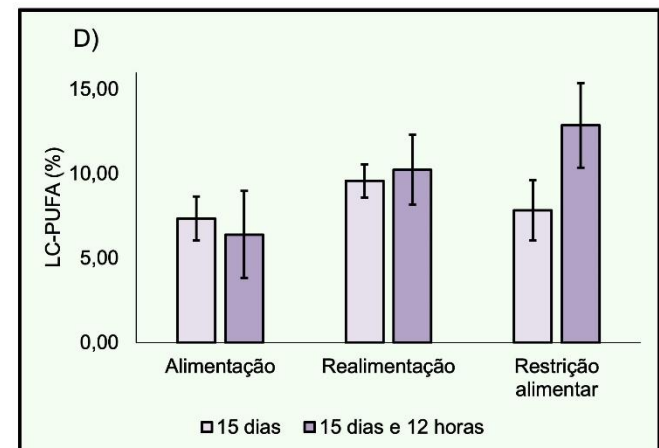
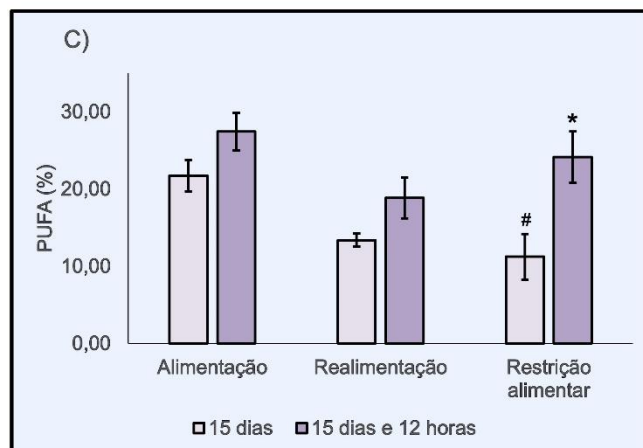
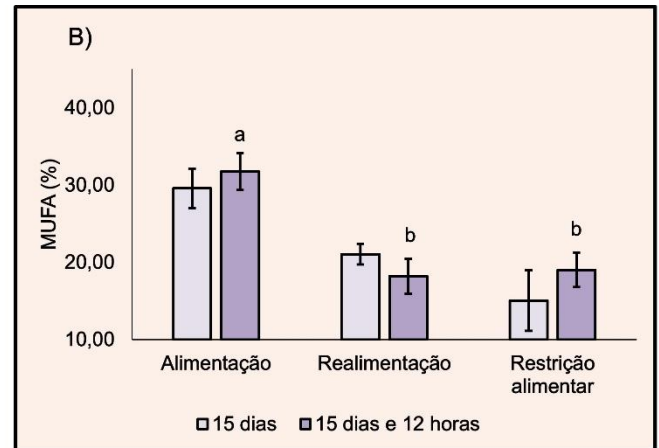
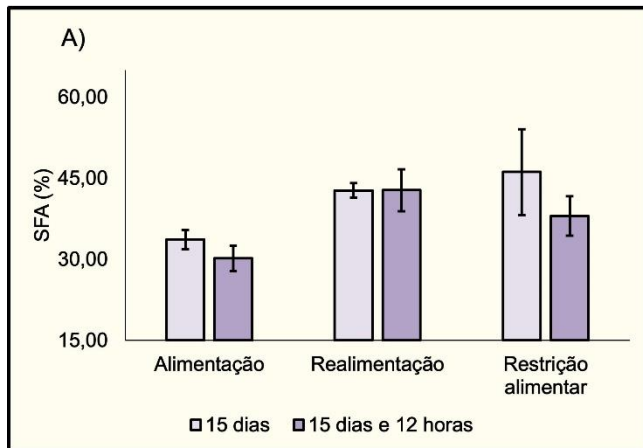


Figura 10: Perfil de ácidos graxos totais do plasma de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (*alimentação*, *realimentação* e *restrição alimentar*) no período pós-prandial. O gráfico representa médias e erro padrão das médias ($\pm$) em porcentagem (%). **A)** SFA significa a soma de ácidos graxos saturados (do inglês *saturated fatty acids*). **B)** MUFA significa ácidos graxos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acids*). **C)** PUFA significa ácidos graxos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*). **D)** LC-PUFA significa ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (do inglês *long-chain polyunsaturated fatty acids*). **E)** n-3 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 3. **F)** n-6 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6. **G)** Razão n-3/n-6 significa a divisão dos ácidos graxos n-3 pelos ácidos graxos n-6. Para calcular todas as classes de AG, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{# ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Os valores de p ($< 0,05$) estão especificados em tabelas no anexo I.

3.3.3. Ácidos graxos da fração de triglicerídeos (TG) dos tecidos hepático e muscular

Os resultados do perfil de ácidos graxos da fração TG dos tecidos hepático e muscular do período pós-prandial medidos em juvenis de garoupa-verdadeira, estão apresentados em porcentagem (%) nas Figuras 11 e 12. Tabelas de suporte, com as diferenças estatísticas e valores de p estão em anexo – Tabela 15 a 28.

No fígado das juvenis de garoupa-verdadeira, os percentuais de SFA da fração TG no período pós-prandial (Figura 11A – Tabela 15B, $p < 0,05$), foram maiores no *tratamento realimentação* em 15 dias ($56,25 \pm 4,50\%$) em relação a 15 dias e 12 horas ($40,66 \pm 1,30\%$). Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) para a classe de SFA da fração TG no período pós-prandial do tecido muscular (Figura 12A – Tabela 22B). O mesmo ocorreu nos MUFA do tecido hepático (Figura 11B – Tabela 16B, $p > 0,05$), enquanto no tecido muscular, os percentuais de MUFA no período pós-prandial (Figura 12B – Tabela 23B, $p < 0,05$) foram maiores em 15 dias ($47,90 \pm 0,85\%$) em relação aos 15 dias e 12 horas ($44,11 \pm 0,82\%$), no *tratamento alimentação*. Além disso, em 15 dias e 12 horas, o *tratamento alimentação* ($44,11 \pm 0,82\%$) apresentou percentuais inferiores ao *tratamento realimentação* ($47,43 \pm 0,75\%$).

Não houve diferenças significativas para os PUFA da fração TG no período pós-prandial dos tecidos hepático (Figura 11C – Tabela 17B, $p > 0,05$) e muscular (Figura 12C – Tabela 24B, $p > 0,05$), resultado que também foi observado nos LC-PUFA do tecido hepático (Figura 11D – Tabela 18B, $p > 0,05$). Já no tecido muscular, em 15 dias e 12 horas, os percentuais de LC-PUFA (Figura 12D – Tabela 25B, $p < 0,05$) foram maiores no *tratamento alimentação* ($4,53 \pm 0,66\%$) em relação ao *tratamento realimentação* ($2,25 \pm 0,58\%$).

A soma dos AG da série n-3 do fígado (Figura 11E – Tabela 19B, $p < 0,05$) foi maior no *tratamento restrição alimentar* ($2,23 \pm 0,42\%$) quando comparado ao *tratamento alimentação* ($0,57 \pm 0,14\%$), em 15 dias e 12 horas de estudo. No tecido muscular, não foram encontradas diferenças significativas para a soma dos AG da série n-3 (Figura 12E – Tabela 26B, $p > 0,05$), assim como no tecido hepático (Figura 11F – Tabela 20B, $p > 0,05$) e muscular (Figura 12F – Tabela 27B, $p > 0,05$) não foram observadas diferenças na somatória dos AG da série n-6. Enquanto a razão n-3/n-6 no tecido hepático (Figura 11G – Tabela 21B, $p < 0,05$) foi maior no *tratamento restrição alimentar* ($0,15 \pm 0,03$) em relação ao *tratamento alimentação* ($0,03 \pm 0,01$) em 15 dias e 12 horas. Não houve diferenças estatísticas para a razão n-3/n-6 no músculo (Figura 12G – Tabela 28B, $p > 0,05$).

FRAÇÃO TG DO FÍGADO

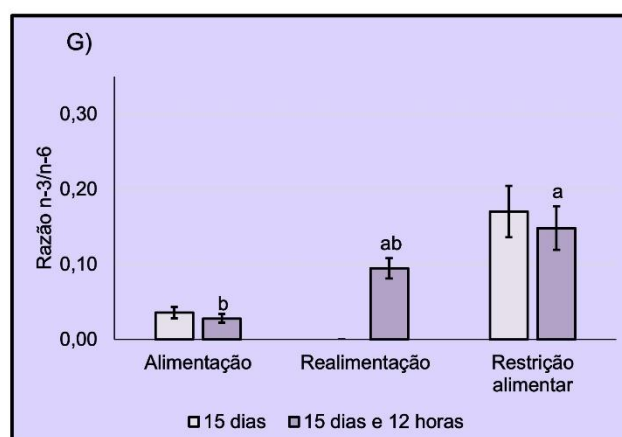
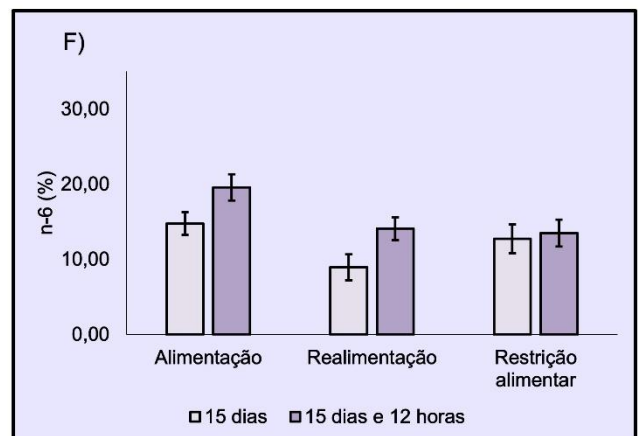
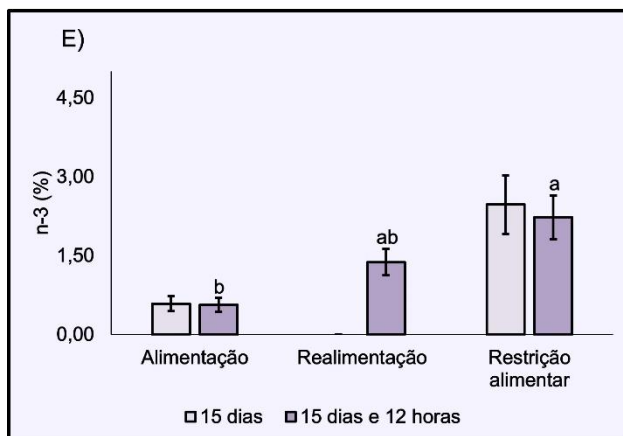
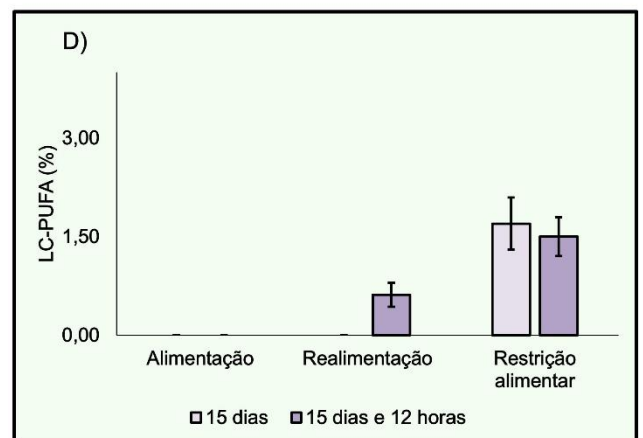
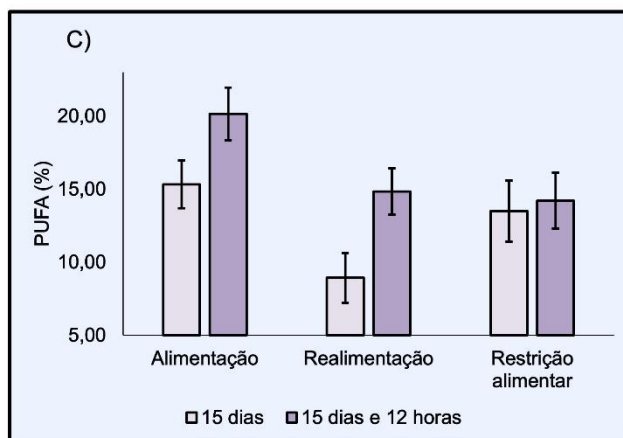
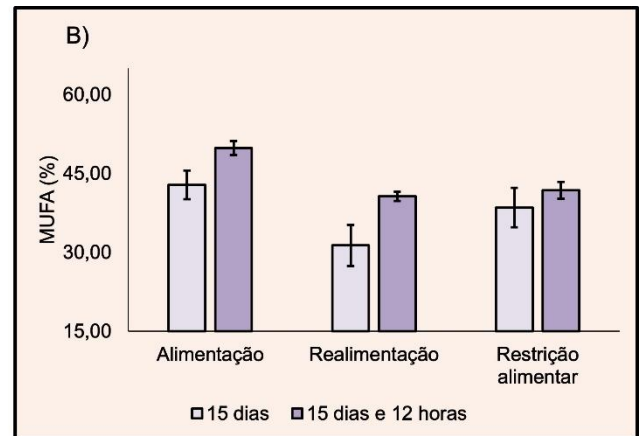
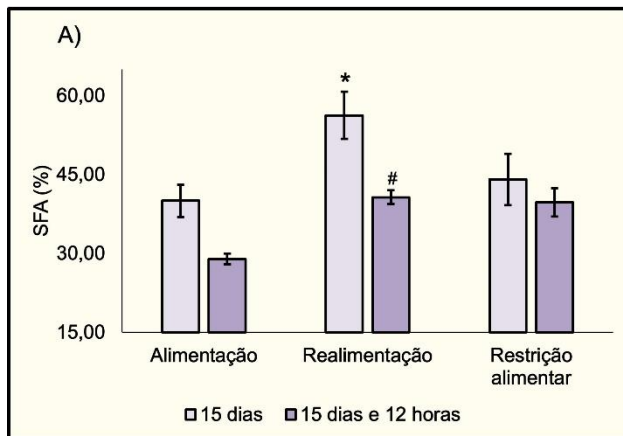


Figura 11: Perfil de ácidos graxos da fração TG do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (*alimentação, realimentação e restrição alimentar*) durante o período pós-prandial. O gráfico representa médias e erro padrão das médias ($\pm$) em porcentagem (%). **A)** SFA significa a soma de ácidos graxos saturados (do inglês *saturated fatty acids*). **B)** MUFA significa ácidos graxos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acids*). **C)** PUFA significa ácidos graxos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*). **D)** LC-PUFA significa ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (do inglês *long-chain polyunsaturated fatty acids*). **E)** n-3 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 3. **F)** n-6 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6. **G)** Razão n-3/n-6 significa a divisão dos ácidos graxos n-3 pelos ácidos graxos n-6. Para calcular todas as classes de AG, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (two way ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Os valores de p ($< 0,05$) estão especificados em tabelas no anexo I.

FRAÇÃO TG DO MÚSCULO

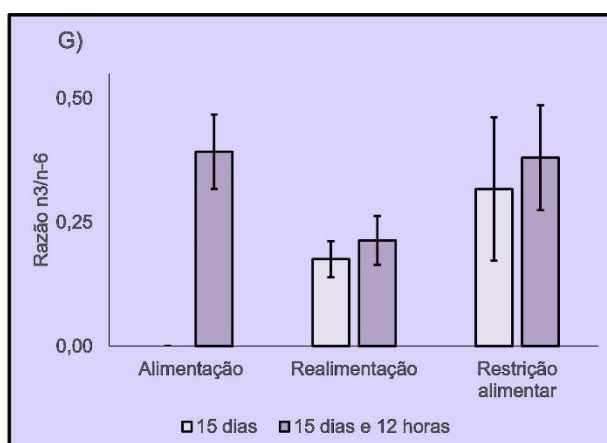
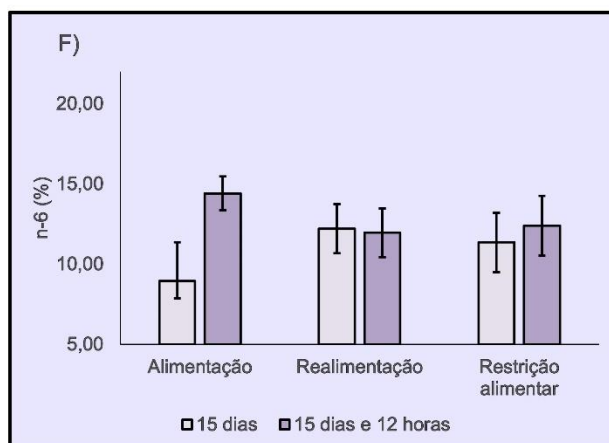
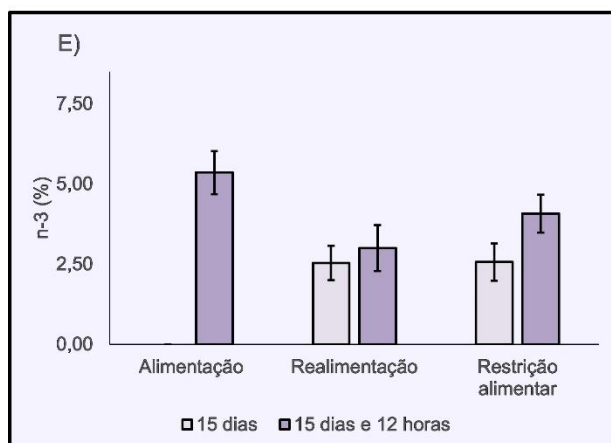
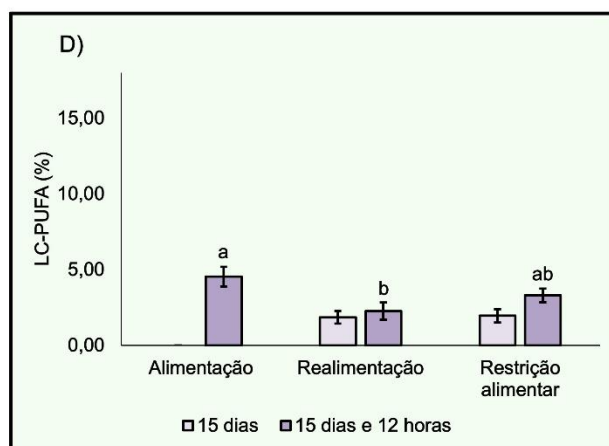
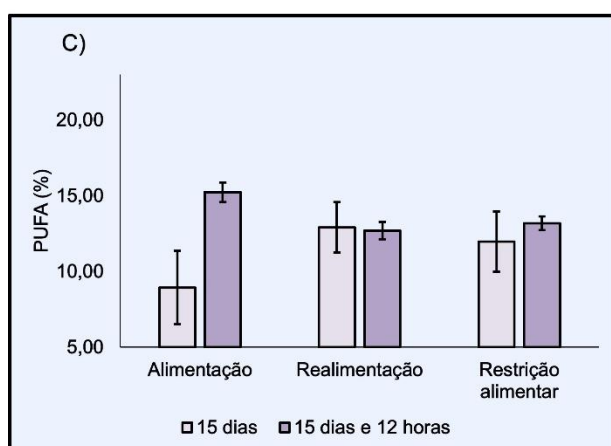
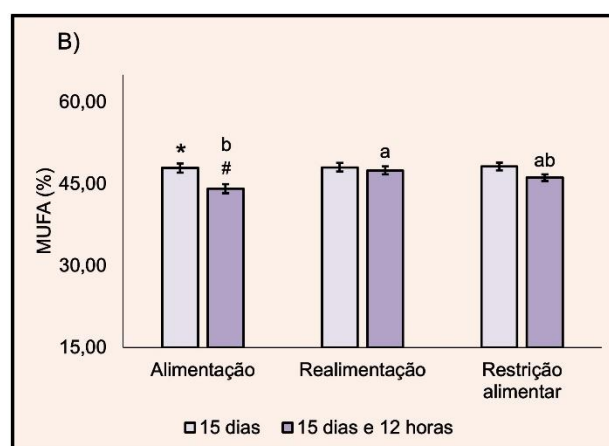
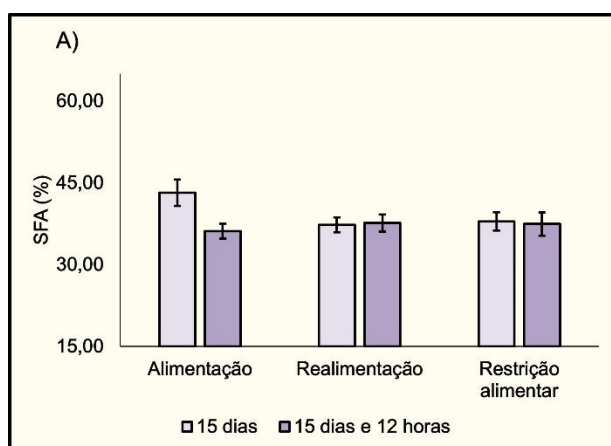


Figura 12: Perfil de ácidos graxos da fração TG do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (*alimentação, realimentação e restrição alimentar*) durante o período pós-prandial. O gráfico representa médias e erro padrão das médias ($\pm$) em porcentagem (%). **A)** SFA significa a soma de ácidos graxos saturados (do inglês *saturated fatty acids*). **B)** MUFA significa ácidos graxos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acids*). **C)** PUFA significa ácidos graxos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*). **D)** LC-PUFA significa ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (do inglês *long-chain polyunsaturated fatty acids*). **E)** n-3 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 3. **F)** n-6 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6. **G)** Razão n-3/n-6 significa a divisão dos ácidos graxos n-3 pelos ácidos graxos n-6. Para calcular todas as classes de AG, foram usados o total de 9 peixes ($n= 3$ animais/tanque, $n= 3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (two way ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{*#^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Os valores de p ($< 0,05$) estão especificados em tabelas no anexo I.

4. Discussão

Assim como nos resultados, a discussão foi dividida em sessões. Na primeira seção, são discutidos os resultados de desempenho de crescimento, parâmetros corporais e sobrevivência, para todos os dias (7; 15; 22 e 30 dias), horário de coleta (15 dias às 9h e 15 dias às 21h) e tratamentos (*tratamento alimentação, tratamento realimentação e tratamento alimentar*). Na segunda seção, são discutidos os resultados dos diferentes dias de experimento (7; 15; 22 e 30 dias) e diferentes tratamentos (*tratamento alimentação, tratamento realimentação e tratamento restrição alimentar*). Enquanto na terceira seção estão discutidos os resultados do experimento *pós-prandial* (15 dias às 9h e 15 dias às 21), nos *tratamentos alimentação, e restrição alimentar*).

4.1. Seção 1: Desempenho de crescimento, parâmetros corporais e sobrevivência para todos os dias, horários de coleta e tratamentos

Os peixes testados no presente estudo apresentaram 100% de sobrevivência em 30 dias de experimento, inclusive aqueles que passaram por restrição alimentar. Spandri et al., (2020) obtiveram aproximadamente 95% de sobrevivência com a mesma espécie, após testarem o manejo alimentar para analisar o crescimento compensatório. Em estudos com a mesma abordagem, com espécies de maior interesse e conhecimento produtivo, como a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Nebo et al., 2017) e o tambaqui *Colossoma macropomum* (Assis et al., 2020), os percentuais de sobrevivência foram acima de 84% a 100%, respectivamente. Os resultados de sobrevivência do presente

trabalho evidenciam que os animais estavam em condições satisfatórias de cultivo.

A disponibilidade e a qualidade do alimento são fatores importantes para a fisiologia dos peixes (Volkoff et al., 2010), e o equilíbrio na alimentação pode auxiliar no crescimento, uma vez que a dieta pode aumentar ou reduzir o apetite dos peixes (Lall et al., 2009, Assan et al., 2021) e consequentemente afetar suas reservas energéticas (Soengas, 2014). Além disso, o comportamento alimentar em peixes é variado e pode ser associado a abordagens alimentares, hábito alimentar, formulação da dieta, condições de cultivo, características da espécie e até mesmo regularidade alimentar (Lall et al., 2009; Volkoff et al., 2010; Soengas, 2014; Assan et al., 2021). E apesar da alta sobrevivência nos peixes do *tratamento restrição alimentar*, parâmetros como a massa, GM e TCE demonstraram que 15 e 30 dias de restrição alimentar podem afetar o desempenho produtivo da espécie, quando comparados aos animais do *tratamento alimentação*. Além disso, os animais deste tratamento (*restrição*) e do *tratamento realimentação* possivelmente tiveram sua massa corpórea diminuída pela falta de alimentação, assim como ocorreu no trabalho com a garoupa-híbrida, *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*, que mostrou que os peixes do grupo controle (alimentação constante de 60 dias) apresentaram ao final do experimento, massa, GM e TCE maior que os animais que passaram por 30 dias de restrição alimentar (Liu et al., 2020). Por outro lado, em juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Favero et al., 2020), a massa, GM e TCE foram inferiores apenas ao final do jejum de 30 dias, e após esse período, os peixes atingiram os mesmos valores que os animais alimentados por 60 dias – grupo controle.

No presente estudo, a restrição alimentar de 15 e 30 dias consecutivos, não afetou o comprimento final dos juvenis de garoupa-verdadeira. Além disso, a massa não apresentou diferenças entre os peixes do *tratamento alimentação* e *realimentação*, além do dia 22 do estudo. Estes resultados sugerem que a alimentação constante da garoupa-verdadeira, pode ser substituída por intervalos de restrição, como os 15 dias de restrição alimentar utilizados no presente estudo, e que pareceram mais eficientes que 30 dias de restrição alimentar, levando em consideração principalmente a massa corpórea.

Entretanto, apesar deste resultado, levando em consideração massa, GM, comprimento e TCE, é possível afirmar que não houve crescimento compensatório (CC), como colocado na hipótese 3, para a espécie, uma vez que os valores apresentados nos parâmetros produtivos do *tratamento realimentação* não foram maiores que os do *tratamento alimentação*. Este resultado (CC positivo) não era esperado para o presente trabalho, principalmente pelas características da espécie: demersal (Rodrigues-Filho et al., 2009) e sedentária (Condini et al., 2010), mas é importante levá-lo em consideração em futuros estudos que testem esse fator com a espécie, uma vez que outros estudos com matrinxã, *Brycon amazonicus* (Urbinati et al., 2014) e nos já citados juvenis de pacu (Favero et al., 2020) afirmam que o maior consumo de ração (parâmetro não aferido no presente estudo) pode levar ao CC em peixes.

Desta forma, é possível afirmar que a restrição alimentar, que tem por objetivo controlar o crescimento dos animais, melhorar a eficiência alimentar e reduzir os custos de produção (Liu et al., 2021), foi eficaz dentro do período de regularidade alimentar de 15 dias, uma vez que os parâmetros produtivos foram mantidos iguais aos animais alimentados constantemente. Além disso, é possível sugerir que esse período auxiliará no custo da alimentação durante cultivo de juvenis de garoupa-verdadeira, com a utilização de menores quantidades da dieta ofertada.

4.2. Seção 2: Lipídeos totais, ácidos graxos e expressão de genes do metabolismo lipídico nos tratamentos *alimentação*, *realimentação* e *restrição alimentar* aos 7, 15, 22 e 30 dias

4.2.1. Lipídeos totais dos tecidos hepático e muscular

A análise da concentração de lipídeos do fígado e do músculo demonstra um aumento da deposição deste substrato energético aos 30 dias nos *tratamentos alimentação* e *realimentação*, sendo que no tecido muscular, o maior acúmulo de lipídeos passou a ocorrer já no dia 22. Além disso, é

importante notar que a deposição de lipídeos pareceu ter acontecido de forma muito mais rápida para os animais do *tratamento realimentação*, já que os peixes deste tratamento passaram a receber alimentação apenas aos 15 dias de estudo, e 7 dias depois de quando retornaram a comer (ou seja, na coleta de 22 dias) apresentaram maior deposição de lipídeos no tecido muscular. Já no *tratamento alimentação*, essa maior deposição passou a ocorrer 22 dias após o início da alimentação constante, o que pode estar relacionado aos ajustes metabólicos em resposta à disponibilidade de alimentos (McCue, 2010, Bar e Volkof, 2012). Estes dados sugerem que no *tratamento realimentação*, os peixes foram capazes de reverter a menor deposição de lipídeos (decorrente dos 15 dias sem alimento), no tecido muscular (aos 22 e 30 dias) e hepático (aos 30 dias).

Além da disponibilidade de alimentos, animais submetidos à restrição alimentar, ao voltarem a se alimentar, podem passar pelo processo de hiperfagia e converterem mais eficientemente os alimentos consumidos, sendo essa uma das explicações para o crescimento compensatório em peixes, por exemplo (apesar de não ser o foco do nosso estudo). Esses processos são citados por Py et. al (2022), que também descrevem maior otimização no uso dos nutrientes para produzir energia através do aumento da eficiência alimentar durante o período de realimentação. Desta forma, seria possível explicar a deposição de lipídeos de maneira mais rápida no *tratamento realimentação*, mas sem a ocorrência de CC como já foi discutido.

No *tratamento restrição alimentar*, foi possível observar que a partir dos 15 dias de estudo, a deposição de lipídeos foi elevada no tecido hepático. Além disso, este tratamento apresentou concentrações mais elevadas de lipídeos totais comparado ao *tratamento realimentação* em 15 dias. O aumento sugere que o tecido hepático da espécie tem um papel importante na deposição de lipídeos que serão usados na β -oxidação, uma vez que, possivelmente, os lipídeos acumulados neste tecido, mais especificamente os AG, estão sendo utilizados para obtenção de energia, como foi possível observar através da expressão do gene *cpt* aos 15 e 30 dias do estudo. Este resultado era esperado, uma vez que durante um período de jejum, possivelmente um indivíduo utilize as

suas reservas de energia através da mobilização e oxidação dos AG, a partir de TG (Price e Valencak, 2012).

De forma geral, ainda é possível mencionar que os resultados indicaram que em nenhum dos tratamentos apresentou deposição excessiva de lipídeos nos tecidos analisados, principalmente no fígado, uma vez que, o *tratamento alimentação* não foi maior que os outros tratamentos que passaram por jejum, indicando que a alimentação ou o jejum constante não afetaram o tecido. Esses resultados são importantes porque a acumulação excessiva de lipídeos no fígado pode levar ao desenvolvimento de doenças hepáticas durante a o período sem alimento (Li et al., 2022), como a esteatose hepática, ou seja, retenção e/ou acúmulo incomum de gordura no fígado. Na ausência de ingestão dietética, os AG que se acumulam no fígado, na forma de TG, podem ser sintetizados *de novo* ou mobilizados de outros tecidos, especialmente nos adipócitos. (Price e Valencak, 2012), e a compreensão dos mecanismos que controlam a deposição de lipídeos nesse tecido pode ajudar no desenvolvimento de estratégias de manejo nutricional para minimizar esses efeitos negativos (McCue, 2010, Araújo et al., 2016).

Também é possível sugerir que não houve implicações quanto ao acúmulo de lipídeos no tecido muscular, uma vez que não houve diferença entre os diferentes tratamentos, sobretudo entre o *tratamento alimentação* e *restrição alimentar*. Esses achados não são consistentes com estudos anteriores que relataram que a restrição alimentar pode levar ao aumento da deposição de lipídeos em tecidos musculares em peixes, como com o salmão do Atlântico *Salmo salar* (Bower, et al., 2009) e o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Favero et al., 2021).

4.2.2. Ácidos graxos totais do plasma

Os peixes que foram submetidos ao *tratamento restrição alimentar*, apresentaram maior porcentagem plasmática de SFA, LC-PUFA, n-3 (ômega-3) e maior razão n-3/n-6, principalmente no dia 30 do estudo. Segundo Bar e Volkoff (2012), os peixes possuem capacidade de reduzir o metabolismo, mobilizar e oxidar moléculas importantes, como lipídeos e proteínas, durante o período de

restrição alimentar. Os resultados sugerem que as juvenis de garoupa-verdadeira, durante o período de restrição alimentar, entraram em uma das duas primeiras fases de mobilização de reservas energéticas apenas aos 30 dias, e que antes deste período, as reservas de AG, principalmente de SFA e LC-PUFA, se mantiveram preservadas. As possíveis fases de mobilização em que os animais entraram são: FASE I – estágio curto de transição de reservas lipídicas ou FASE II – estágio estacionário, período longo no qual os lipídeos são a principal fonte de energia (Cherel et al., 1991; Groscolas e Robin, 2001; Bar e Volkoff, 2012). Entretanto, não é possível confirmar com precisão os estágios, uma vez que no presente estudo foi analisado apenas o metabolismo lipídico e de ácidos graxos.

Price e Valencak (2012) descrevem que a oxidação de AG durante o período de jejum, é um processo “seletivo”, que ocorre em AG mais insaturados e mais curtos em decorrência de suas estruturas e propriedades de solubilidade em água (AG curtos e insaturados possuem maior afinidade com a água) e este processo também pode depender da composição inicial dos TG no início do período de jejum. Entretanto, quando essa teoria é aplicada à prática, SFA são mais abundantes e mais facilmente oxidados e LC-PUFA são mais preservados, como foi visto neste estudo de revisão para diversos animais. É conhecido, que em peixes, existe uma ordem preferencial de metabolização de AG durante a β -oxidação, sendo primariamente oxidados os SFA, seguidos por MUFA, PUFA e LC-PUFA (Kiessling e Kiessling, 1993; Tocher, 2003). Os AG presentes no plasma são chamados de AG livres (AGL), ou seja, não estão esterificados, que estão sendo mobilizados de um tecido para outro, para armazenamento ou geração de energia (Nelson e Cox, 2019). No presente estudo, é possível sugerir, que pela alta porcentagem de SFA no plasma, existe a alta mobilização para geração de energia.

Tocher (2003) aponta que apesar da oxidação de PUFA ocorrer, ela é mais complexa em termos energéticos, quando comparada a oxidação de MUFA e SFA. Entretanto, Araújo et al. (2022) descreveram que, apesar de existirem exceções, algumas espécies, quando passam por restrição alimentar, catabolizam preferencialmente n-3 LC-PUFA, para atingir as suas necessidades energéticas. No presente estudo, a porcentagem de n-3 e 6, respectivamente,

circulantes no plasma dos animais, principalmente nos *tratamentos alimentação e restrição alimentar*, nos 15 e 30 dias do estudo, refletem os valores de LC-PUFA e PUFA, respectivamente, e estão sendo mais mobilizados. Além disso, em 30 dias de experimento, houve maiores porcentagens plasmáticas de ácidos graxos n-3 nos peixes que passaram por restrição alimentar. Estes resultados indicam que durante esse período do jejum, a garoupa-verdadeira mobilizou mais das reservas que são consideradas de grande importância fisiológica (Glencross 2009; Turchini et al., 2009; Tocher, 2008; Tocher, 2015; Nelson e Cox, 2019), mesmo que a oxidação de ômega-3 seja mais complexa, possivelmente, para gerar energia. Algumas espécies carnívoras como a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Salem et al. 2007); esturjão *Acipenser naccarii* (Furne et al. 2012) e linguado verde-oliva *Paralichthys olivaceus* (Yang et al., 2019) mobilizaram reservas energéticas para manter os processos vitais ao passar pelo jejum.

Com relação aos MUFAs, foi observado que os animais do *tratamento alimentação* mobilizaram mais destes AG, em relação ao *tratamento restrição alimentar*, assim como observado nos PUFA e n-6. Possivelmente, a alimentação constante pode estar levando os animais à deposição de MUFA em outros tecidos (como tecido hepático), uma vez que o percentual de MUFA livres encontrado nos peixes neste tratamento é bastante elevada. Diversos autores sugerem que MUFA são comumente catabolizados quando há excesso na dieta fornecida aos peixes (Bell e Sargent, 2003; Tocher, 2003; Stubhaug et al., 2005; Glencross, 2009; Turchini et al., 2009; Glencross e Rutherford, 2010). Desta forma, os resultados sugerem que a alimentação constante pode não ser necessária para a espécie, como já discutido em relação à deposição lipídica.

No *tratamento realimentação* foram observadas diferenças nos MUFA, PUFA e n-6, com percentuais plasmáticos em geral, são menores em 7 dias quando comparado com 22 e 30 dias. Ou seja, após o período de realimentação os percentuais aumentaram no plasma, assim como foi apresentado nos lipídeos totais do fígado e do músculo. Observando os resultados de forma ampla, é possível sugerir que a mobilização de AG ocorreu e refletiu na maior deposição de lipídeos totais dos tecidos hepático e muscular. Em juvenis de pacu *Piaractus*

mesopotamicus houve redução dos níveis plasmáticos de TG durante jejum de 30 dias (Favero et al., 2020).

Durante o período sem ingestão de alimento, é comum que os animais apresentem alterações na composição dos AG. Essas alterações têm sido associadas a diversas explicações à plasticidade (Price e Valenkak, 2012). Além disso, os autores citam que, apesar das alterações que podem ocorrer em decorrência ao ajuste a restrição alimentar, é importante ressaltar que as mudanças na composição dos AG observadas durante este período sem ingestão de alimento podem ser resultado de processos fisiológicos em andamento e não necessariamente representar uma resposta à ausência de alimento. Entretanto, é possível que as alterações encontradas tenham sido moduladas em resposta à ausência de alimento, com foi possível observar em diversos estudos que demonstram que os resultados obtidos são espécie-específico para tratamentos com realimentação, em espécies como pacu *Piaractus mesopotamicus* (Favero et al., 2017, 2020); tambaqui *Colossoma macropomum* (Assis et al., 2020); garoupa híbrida *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus* (Liu et al., 2020) e salmão rei *Oncorhynchus tshawytscha* (Araújo et al., 2022).

4.2.3. Ácidos graxos da fração de triglicerídeos (TG) dos tecidos hepático e muscular

Os percentuais de MUFA encontrados na fração TG do fígado no *tratamento realimentação* refletiu a deposição encontrada nos lipídeos totais do mesmo tecido e refletiu os percentuais que foram apresentados nos MUFA plasmáticos, ou seja, um aumento ao longo do tempo. Os perfis de PUFA e ômega 6 no mesmo tratamento, também pareceram ter refletido as concentrações encontradas nos lipídeos do tecido hepático. Além disso, nos SFA o *tratamento realimentação* apresentou tendência de decaimento ao decorrer dos 30 dias experimentais, o que pode indicar que estes AG estavam sendo usados para geração de energia. Como citado anteriormente, as alterações que ocorrem no perfil de AG observadas durante o período sem ingestão de alimento podem ser resultados dos processos biológicos em curso,

e não significar uma resposta homeostática à ausência de ingestão de alimento (Price e Valencak, 2012).

Entretanto, os TG são moléculas energéticas (Nelson e Cox, 2019) que podem ser modificadas pela dieta (Oliveria et al, 2023) e estas modificações podem ocorrer no tecido hepático (alongamento ou dessaturação de AG, dentre as principais). Durante o período de restrição alimentar espera-se que os indivíduos utilizem suas reservas como fonte energética, através da mobilização e β -oxidação dos AG que compõe os TG (Price e Valencak, 2012). Em razão disso, a quantidade total de triacilglicerol armazenado pode diminuir durante o período sem ingestão de alimento. Embora seja possível esperar que os TG sejam utilizados mais rapidamente do que outras classes lipídicas, os componentes individuais, que são os AG, desses TG não necessariamente são utilizados de forma igualitárias, como foi visto na utilização de MUFA, PUFA e ômega-6 entre 7 e 15 dias de estudo no *tratamento realimentação*. Adicionalmente, os dados do perfil dos SFA sugerem que estes AG foram utilizados ao longo do período experimental como fonte de energia.

Além disso, quando há o retorno da disponibilidade do alimento, como citado anteriormente, os animais que passaram pelo período sem ingestão de alimento, podem converter o alimento recebido de forma mais eficiente, otimizando o uso dos substratos nutricionais para gerar energia (Py et al., 2022). E assim como nos lipídeos totais do fígado, foi observada uma maior deposição de MUFA, PUFA e ômega 6 aos 22 e 30 dias de estudo, de forma mais rápida que em outros dias de estudo e tratamentos. Considerando-se que neste período (22 e 30 dias) houve oferta de alimento, o maior consumo, causado possivelmente pela hiperfagia e maior eficiência em converter esses alimentos pelo excesso de consumo, justifica a deposição destes AG no *tratamento realimentação*, assim como ocorreu nos lipídeos totais do tecido hepático.

Enquanto no tecido hepático os MUFA parecem ter sido depositados no tecido muscular, em todos os tratamentos, principalmente aos 22 dias de estudo, as juvenis de garoupa-verdadeira pareceram ter oxidado mais MUFA da fração TG muscular. Assim como no *tratamento alimentação* foi observado menores percentuais de SFA e MUFA aos 7; 22 e 30 dias experimentais e menores percentuais de PUFA e n-6 em 7 e 15 dias. Como citado, a oxidação de AG é

um processo seletivo, e os músculos têm preferência por oxidar AG insaturados (Price e Valencak, 2012). O mecanismo exato desse efeito não é claro, mas pode estar relacionado à atividade da enzima CPT, que atua como um transportador de AG na membrana mitocondrial (Tocher, 2003; Nelson e Cox, 2018). Acredita-se que essa enzima desempenhe um papel importante no controle do fluxo de oxidação de ácidos graxos, sendo mais ativa em ácidos graxos com cadeias mais curtas e maior grau de insaturação. No entanto, é importante ressaltar que essa relação pode variar entre as diferentes espécies (Tocher, 2003; Nelson e Cox, 2018).

De forma geral, é importante destacar ainda que mesmo os animais que foram mantidos no *tratamento de restrição alimentar* apresentaram um aumento de LC-PUFA e n-3 aos 22 dias, ou seja, mesmo sem a oferta de alimento após 15 dias, o padrão de mobilização destes AG em outros tecidos, como fígado (já quem em 22 dias, o fígado dos animais deste grupo já não apresenta porcentagens detectáveis de LC-PUFA e n-3) permanece semelhante aos animais alimentados neste período. Este resultado sugere que após 15 dias sem alimentação os animais ativam vias metabólicas que são necessárias para manter o perfil destes AGs no tecido muscular.

4.2.4. Expressão gênica

Em dois momentos do experimento (15 e 30 dias) foram analisadas a expressão de genes lipolíticos (*cpt*, *acox*, *acadvl*) e lipogênicos (*fas*, *scd*) no músculo e no fígado, e dentre eles apenas o gene *cpt* apresentou diferenças significativas durante o experimento, nos dois tecidos. A restrição alimentar afetou a expressão do gene *cpt* em ambos os tecidos estudados (músculo e fígado) em juvenis de *E. marginatus*. No entanto, parece que a resposta à restrição alimentar foi diferente nos dois tecidos. No músculo, a expressão do gene *cpt* foi maior no *tratamento restrição alimentar* no dia 15. Isso sugere que o gene *cpt* pode ter sido transcrito para RNA e traduzido na carnitina palmitoil-transferase, responsável por transportar ácidos graxos de cadeia longa, com 14 ou mais carbonos para a mitocôndria, onde ocorre a β -oxidação desses substratos para a produção de energia (Tocher, 2003; Nelson e Cox, 2018). Já

nos 30 dias do experimento, principalmente os peixes submetidos ao *tratamento restrição alimentar*, apresentaram uma diminuição na expressão do gene *cpt* no tecido muscular, sugerindo que houve um ajuste do gasto energético do tecido, provavelmente em resposta à falta de alimento, uma vez que a expressão do gene *cpt* é regulada pela composição de ácidos graxos na dieta (Morash et al., 2009).

Por outro lado, os resultados mostraram que a expressão de *cpt* hepática nos juvenis de *E. marginatus* foi mais elevada no *tratamento restrição alimentar* em ambos os dias analisados (15 e 30 dias), sugerindo o envolvimento do fígado na β -oxidação de ácidos graxos em resposta à restrição alimentar (Tocher, 2003), mesmo após 30 dias. Ou seja, que os juvenis que passaram por maiores períodos sem alimentação expressaram mais *cpt* devido à necessidade de maior oxidação de ácidos graxos. O efeito de períodos sem alimentação, seguidos de alimentação na expressão ou atividade da *cpt* foram recentemente descritos no teleosteo *Onychostoma macrolepis* (Gou et al., 2023), que demonstraram resultados que corroboram os dados do presente estudo com *E. marginatus*. Os autores verificaram que a expressão do gene *cpt-1* aumentou no músculo e no fígado de *O. macrolepis* após 3 semanas de jejum, o que corrobora os dados encontrados no fígado de *E. marginatus*, mas que após a realimentação, o nível de expressão retornou aos valores dos animais que não tiveram a alimentação suspensa, tendência observada no fígado de juvenis de *E. marginatus* do *tratamento realimentação*, que mantiveram os mesmos níveis de expressão do *tratamento alimentação*.

Em um estudo anterior, Araújo et al. (2018) testaram a expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, inclusive a *cpt*, em juvenis de *E. marginatus* alimentadas com diferentes dietas suplementadas com diferentes fontes de AG. Os resultados apontaram que, apesar de não ter havido diferenças estatísticas no gene *cpt*, a suplementação com óleo de coco levou a um aumento na oxidação de SFA e MUFA no fígado da espécie, possivelmente contribuindo para a regulação do metabolismo lipídico nesses peixes. No presente estudo, os resultados sugerem que o aumento de *cpt* hepática pode ser uma estratégia fisiológica para a espécie enfrentar períodos de escassez de alimentos, assim como foi visto com a carpa capim *Ctenopharyngodon idella*

(Gong et al., 2017). Além disso, levando em consideração o estudo anterior (Araújo et al., 2018), é possível sugerir que a espécie possui boa capacidade de se ajustar à dieta ou ausência dela.

McCue (2012) descreve ajustes metabólicos e fisiológicos que ocorrem em peixes quando há uma restrição alimentar prolongada, incluindo a mobilização de energia do fígado por meio da oxidação de ácidos graxos. O fígado é descrito como um importante órgão para a regulação do metabolismo energético em peixes durante períodos de escassez de alimento. Os resultados do presente estudo também são consistentes com a teoria de que a restrição alimentar pode levar a ajustes no gasto energético dos tecidos em resposta à falta de alimento (Tocher, 2003, McCue, 2012). Esse ajuste pode ocorrer por meio de mecanismos que permitem uma melhor utilização de ácidos graxos como fonte de energia, como sugerido pela expressão aumentada do gene *cpt* no tecido muscular no dia 15. No entanto, esse ajuste pode ser limitado em períodos mais longos de restrição alimentar, como sugerido pela diminuição da expressão do gene *cpt* no tecido muscular no dia 30.

Em geral, esses resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos de plasticidades da espécie em resposta à restrição alimentar e podem ter implicações para a compreensão da sua fisiologia energética. No entanto, é importante notar que as respostas dos peixes à restrição alimentar podem variar dependendo de uma série de fatores, como genética (Morash et al., 2009, Gong et al., 2017); temperatura (Favero et al., 2019; Araújo et al., 2022) e metabolismo (Pérez-Jiménez et al., 2007; Favero et al., 2018), mas em geral o principal fator variante é a espécie (Tocher, 2003). Portanto, mais estudos são necessários para entender completamente estes resultados e como eles podem ser aplicados em diferentes contextos.

4.3. Seção 3: Pós-prandial

Os resultados desta seção foram discutidos de forma conjunta (lipídeos totais do fígado e do músculo, AG totais do plasma e AG da fração TG dos tecidos hepático e muscular). No presente estudo, os dados sugerem que as alterações observadas foram em decorrência ao próprio ritmo circadiano dos

animais e necessidades energéticas. O período pós-prandial é uma etapa envolvida no processamento da alimentação, mais estudada como a resposta fisiológica da ingestão de nutrientes (McCue, 2006; Secor, 2009). Durante o período da digestão, que é iniciado logo após o consumo do alimento, processos físicos, químicos e enzimáticos são combinados de forma coordenada para absorção dos nutrientes ingeridos (Gonçalves et al., 2016). No processo absorptivo, após entrarem nos enterócitos, células do epitélio intestinal, substratos como os lipídeos, são transportados por lipoproteínas de baixa densidade ou quilomícrons, através do plasma até o fígado, e no fígado, os lipídeos podem ser re-esterificados a TG (Rust, 2003).

Enquanto a razão n3/n6 a maior concentração foi aos 15 dias no mesmo tratamento. Na literatura, não foram encontrados estudos que avaliem e expliquem a mobilização das classes específicas de AG em peixes que passaram pelo período de restrição alimentar e em intervalos de 12h, dentro de um mesmo dia. Como citado anteriormente, durante o período sem ingestão de alimento, é comum que os animais apresentem alterações na composição dos AG, “ajustando-se” a esse período (Price e Valenkak, 2012). Em um estudo com a carpa capim, *Ctenopharyngodon idella* (Sun et al., 2021) foram investigados os efeitos da baixa temperatura e restrição alimentar no período de 0 a 16 semanas, e os resultados apontaram que a lipólise foi ativada no tecido adiposo influenciando a expressão do *gene adipose triglyceride lipase (atgl)* e de uma forma geral, os resultados que indicaram que os lipídeos foram continuamente utilizados como substratos energéticos.

Para melhor compreensão dos dados, análises como expressão gênica serão necessárias para explicar os resultados obtidos, uma vez que o tecido hepático está associado à modulação do metabolismo lipídico (Tocher, 2003) e compreender as vias metabólicas lipolíticas e lipogênicas é essencial para traçar estratégias nutricionais específicas com base nas necessidades fisiológicas da espécie selecionada (Tocher et al. 2003; Glencross 2009; Wade et al. 2014 ; Araújo et al. 2023).

Ainda no tecido hepático, através dos resultados apresentados, de forma geral, é possível sugerir que os animais do *tratamento restrição alimentar* estão depositando mais AG ômega-3 no fígado comparado aos animais que estão

sendo alimentados constantemente. Além disso, as reservas aparentemente depositadas (n-3) são AG de grande importância fisiológica, o que indica que no grupo pós-prandial, os animais que estavam restritos ao alimentam mobilizaram ao fígado reservas importantes. Entretanto assim como para os resultados anteriores, análises como expressão gênica, são importantes para evidenciar se os AG depositados foram utilizados na β -oxidação ou se estão sendo acumulados para re-estificação de TG. Na espécie de teleósteo marinho, cobia, *Rachycentron canadum*, foi possível observar que os percentuais de EPA e DHA (ômega 3) e outros n-3 LC-PUFA aumentaram entre 8 e 12 horas após a realimentação (Araújo et al., 2023). No ciprinídeo *Onychostoma macrolepis*, após o período de restrição alimentar, houve aumento da expressão de genes envolvidos na lipólise, como a *cpt*, no hepatopâncreas e músculo, indicando a mobilização de reservas de gordura nesses tecidos (Gou et al. 2023). Nesta espécie foram encontradas ainda maiores atividades de enzimas associadas ao sistema imune no hepatopâncreas e no intestino dos animais que passaram por restrição alimentar.

Na fração TG do tecido hepático, na coleta de 15 dias houve maior deposição no *tratamento realimentação* na classe de SFA comparado ao grupo pós-prandial. Existem duas explicações possíveis para os altos níveis de SFA logo após o período de realimentação: 1) os animais ainda estavam depositando SFA para gerar energia através da β -oxidação em consequência da restrição alimentar ou 2) logo após a realimentação, os animais mobilizaram e depositaram estes AG, para posteriormente serem re-esterificados, com já foi citado diversas vezes ao longo do estudo. Na carpa capim, a composição de AG analisada indicou a classe de SFA foi predominantemente usada durante o período de restrição alimentar (Sun et al., 2021). Enquanto no barramundi, *Lates calcarifer*, de 1h a 12h após a realimentação, os genes de síntese de AG do tecido hepático foram regulados de maneira positiva. Além disso, a espécie reteve mais DHA que EPA no tecido hepático, em todos os grupos apresentados (Araújo et al., 2016).

Inversamente ao tecido hepático, no músculo todos os tratamentos apresentaram maior deposição de lipídeos totais no grupo pós-prandial. Na fração TG muscular os resultados sugerem que ocorreu mobilização de MUFA

do músculo para o plasma no período de 12h. Além disso, o *tratamento realimentação* apresentou maiores percentuais de MUFA que o *tratamento alimentação* no grupo pós-prandial, sugerindo que os animais mobilizaram e depositaram mais destes AG no músculo após a alimentação. Diversos estudos apontam que a composição da dieta ofertada reflete na composição do tecido muscular (Bell et al., 2001; 2002; 2003; Marques et al., 2021; Mata-Sotres et al., 2021, Oliveira et al. 2023), e no presente estudo, principalmente os MUFA presentes na dieta, no grupo pós-prandial, foram refletidos no tecido muscular das juvenis de *E. marginatus* do *tratamento realimentação*.

5. Conclusões

Considerando os parâmetros analisados é possível de afirmar que o período de 30 dias de restrição alimentar não é viável para o cultivo de jovens da garoupa-verdadeira, uma vez que animais deste tratamento (*restrição alimentar*) tiveram sua massa corpórea diminuída possivelmente pela falta de alimentação e apresentaram mobilizações importantes de suas reservas energéticas, como de ômega-3 e 6, entre 22 e 30 dias do estudo. A alta porcentagem de SFA no plasma dos animais do *tratamento restrição alimentar* sugere elevada mobilização destes AG no período sem ingestão de alimento, corroborado pela expressão do gene *cpt* que também sugere uma adequação do metabolismo lipídico, principalmente no tecido muscular.

A restrição alimentar de 15 dias (*tratamento realimentação*) não apresentou alterações significativas nos parâmetros corporais dos animais, que quando realimentados, mostraram capacidade de se recuperar do jejum, considerando as reservas energéticas, como foi visto no perfil lipídico a partir do dia 22, principalmente no tecido muscular. É possível afirmar que os animais realimentados foram capazes de depositar maiores percentuais de AG, principalmente MUFA, PUFA e n-6 no tecido hepático, e que o período de 15 dias de restrição alimentar não afetou a espécie. Já nos animais no *tratamento alimentação* foi possível observar maior deposição de SFA e MUFA em dias específicos se comparado aos outros tratamentos. Considerando que os animais do *tratamento realimentação* obtiveram um

bom desempenho, se ajustaram e mantiveram suas reservas energéticas até 15 dias de jejum, e apresentaram resultados similares ao *tratamento alimentação*, sugere-se que a alimentação constante para as juvenis de *E. marginatus* não é necessária. O período pós-prandial, apesar de necessitar de mais investigações, mostrou um reflexo da dieta no tecido muscular das juvenis de *E. marginatus* realimentadas. Além disso, a espécie parece mobilizar diferentes classes de AG para o fornecimento de energia, como visto no *tratamento restrição alimentar*.

6. Referências

- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Hunt, T. 2017. *Biologia molecular da Célula*. Artmed Editora: Courier Corporation.
- Ali, M.; Nicieza, A.; Wootton, R. J. 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*, 4(2):147-190. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2979.2003.00120.x>
- Andrade, A. B.; Machado, L. F.; Hostim-Silva, M.; Barreiros, J. P. 2003. Reproductive biology of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46:373–381. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132003000300009>
- Araújo, B. A.; Wade, N. W.; Mello, P. H.; Rodrigues-Filho, J. A.; Garcia, C. E. O.; Campos, M. F.; Botwright, N. A.; Hashimoto, D. T.; Moreira, R. G. 2018. Characterization of lipid metabolism genes and the influence of fatty acid supplementation in the hepatic lipid metabolism of dusky grouper (*Epinephelus marginatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular e Integrative Physiology*, 219–220. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.01.018>
- Araújo, B. C.; Barbosa, D. A.; Honji, R. M.; Branco, G. S.; Menegidio, F. B.; Marques, V. H.; Moreira, R. G.; Kitahara, M. V.; Rombenso, A. N.; de Mello, P. H.; Hilsdorf, A. W. 2023. Post-feeding molecular responses of cobia (*Rachycentron canadum*): RNA-sequencing as a tool to evaluate postprandial effects in hepatic lipid metabolism. *Marine Biotechnology*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10126-023-10209-4>
- Araújo, B. C.; Symonds, J. E.; Walker, S. P.; Miller, M. R. 2022. Effects of fasting and temperature on the biological parameters, proximal composition, and fatty acid profile of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) at different life stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 264–111113. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111113>
- Araújo, B.; Honji, R. M.; Rombenso, A. N.; Souza, G. B.; Mello, P. H.; Hilsdorf, A. W. S.; Moreira, R. G. 2019. Influence of different arachidonic acid levels

- and temperature on the growth performance, fatty acid profile, liver morphology and expression of lipid genes in cobia (*Rachycentron canadum*) juveniles. *Aquaculture*, 511–734245. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734245>
- Araújo, B.; Salini, M.; Glencross, B.; Wade, N. 2017. The influence of dietary fatty acid and fasting on the hepatic lipid metabolism of barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Research*, 48(7):3879–3893. <https://doi.org/10.1111/are.13215>
- Assan, D.; Huang, Y.; Mustapha, U. F.; Addah, M. N.; Li, G.; Chen, H. 2021. Fish feed intake, feeding behavior, and the physiological response of apelin to fasting and refeeding. *Frontiers in Endocrinology*, 12–798903. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.798903>
- Assis, Y. P. A. S.; de Assis Porto, L.; de Melo, N. F. A. C.; Palheta, G. D. A.; Luz, R. K.; Favero, G. C. 2020. Feed restriction as a feeding management strategy in *Colossoma macropomum* juveniles under recirculating aquaculture system (RAS). *Aquaculture*, 529–735689. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735689>
- Bar, N.; Volkoff, H. 2012. Adaptation of the Physiological, Endocrine, and Digestive System Functions to Prolonged Food Deprivation in Fish. *Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation*, 69–89. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29056-5_6
- Behmer, O. A.; Tolosa, E. M. C.; Neto, A. G. F. 1976. Manual de técnicas para histologia 12 normal e patológica. EDART. São Paulo. Livraria Editora Ltda, 239.
- Bell, J. G.; Henderson, R. J.; Tocher, D. R.; McGhee, F.; Dick, J. R.; Porter, A.; Smullen, R. P.; Sargent, J. R. 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition*, 132(2):222–230. <https://doi.org/10.1093/jn/132.2.222>
- Bell, J. G.; McEvoy, J.; Tocher, D. R.; McGhee, F.; Campbell, P. J.; Sargent, J. R. 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition*, 131(5):1535–1543. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1535>
- Bell, J. G.; McGhee, F.; Campbell, P. J.; Sargent, J. R. 2003. Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil “wash out”. *Aquaculture*, 218(1 – 4):515–528. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00462-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00462-3)
- Bower, N. I.; Taylor, R. G.; Johnston, I. A. 2009. Phasing of muscle gene expression with fasting-induced recovery growth in Atlantic salmon. *Frontiers in Zoology*, 6–18. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-18>
- Calder, P.C. 2008. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79(3-5):101-108.

- Cardona, E.; Bugeon, J.; Guivarc'h, F.; Goardon, L.; Panserat, S.; Labbé, L.; Corraze, G.; Skiba-Cassy, S.; Bobe, J. 2019. Positive impact of moderate food restriction on reproductive success of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 502:280–288. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.057>
- Cherel, Y.; Le Maho, Y. 1991. Refeeding after the late increase in nitrogen excretion during prolonged fasting in the rat. *Physiology & Behavior*, 50(2):345–349. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90076-z](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90076-z)
- Christie W. W. Lipid Analysis. 3^a ed. Oily Press; 2003
- Condini, V. M.; Seyboth, J. P.; Garcia, A. M. 2010. Garoupa-verdadeira *Mycteroperca marginata* (Pisces, Serranidae) nos molhes da barra de rio grande. Universidade Federal de Rio Grande, Instituto de Oceanografia, Laboratório de Ictiologia, Campus Carreiros, Caixa Postal 474, Rio Grande, RS. Volume 5(2).
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome. 2020.
- Favero, G. C.; Boaventura, T. P.; Ferreira, A. L.; Silva, A. C. F.; Porto, L. A.; Luz, R. K. 2019. Fasting/re-feeding and water temperature promote the mobilization of body reserves in juvenile freshwater carnivorous catfish *Lophiosilurus alexandri*. *Aquaculture*, 734223. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734223>
- Favero, G. C.; dos Santos, F. A. C.; Costa Júlio, G. S.; Pedras, P. P. C.; Ferreira, A. L.; Silva, W. D. S.; Ferreira, N. S.; Neves, L. C.; Luz, R. K. 2021. Effects of short feed restriction cycles in *Piaractus brachipomus* juveniles. *Aquaculture*, 536–736465. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736465>
- Favero, G. C.; Gimbo, R. Y.; Franco Montoya, L. N.; Zanuzzo, F. S.; Urbinati, E. C. 2018. Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture Research*, 49(1):359–366. <https://doi.org/10.1111/are.13466>
- Favero, G.; Gimbo, R. Y.; Montoya, L. N. F.; Carneiro, D. J.; Urbinati, E. C. 2020. A fasting period during grow-out make juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) leaner but does not impair growth. *Aquaculture*, 524–735242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735242>
- Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226:497–509.
- Frings, C. S.; Fendley, T. W.; Dunn, R. T.; Queen, C. A. 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clinical Chemistry*, 18:673–674.
- Furné, M.; Morales, A. E.; Trenzado, C. E.; García-Gallego, M.; Hidalgo, M. C.; Domezain Rus, A. S. 2012. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B. Biochemical, Systems, and Environmental Physiology*, 182(1):63–76. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-328>

- Garaffo, M. A.; Vassallo-Agius, R.; Nengas, Y.; Lembo, E.; Rando, R.; Maisano, R.; Giuffrida, D. 2011. Fatty Acids Profile, Atherogenic (IA) and Thrombogenic (IT) Health Lipid Indices, of Raw Roe of Blue Fin Tuna (*Thunnus thynnus* L.) and Their Salted Product "Bottarga." Food and Nutrition Sciences, 02(07):736–743. <https://doi.org/doi:10.4236/fns.2011.27101>
- Garcia, C. E. O.; Mello, P. H.; Araújo, B. C.; Narcizo, A. M.; Rodrigues-Filho, J. A.; Medrado, A. T.; Zampieri, R. A.; Floeter-Winter, L. M.; Moreira, R. G. 2013. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex-change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. General Comparative Endocrinology, 192:170–180. <https://doi:10.1016/j.ygcen.2013.06.012>
- Glencross, D. B. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. Reviews in Aquaculture, 1:71–124. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x>
- Gonçalves, L. U.; Rodrigues, A. P. O.; Moro, G. V.; Cargnin-Ferreira, E.; Cyrino, J. E. P. 2016. Morfologia e fisiologia do sistema digestório de peixes. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: aquabio.
- Gong, Y.; Chen, W.; Han, D.; Zhu, X.; Yang, Y.; Jin, J.; Liu, H.; Xie, S. 2017. Effects of food restriction on growth, body composition and gene expression related in regulation of lipid metabolism and food intake in grass carp. Aquaculture, 469:28–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.003>
- Gou, N.; Wang, K.; Jin, T.; Yang, B. 2023. Effects of Starvation and Refeeding on Growth, Digestion, Nonspecific Immunity and Lipid-Metabolism-Related Genes in *Onychostoma macrolepis*. Animals, 13(7):1168. <https://doi.org/10.3390/ani13071168>
- Groscolas, R.; Robin, J. P. 2001. Long-term fasting and re-feeding in penguins. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular e Integrative Physiology, 128(3):645–655. [https://doi:10.1016/s1095-6433\(00\)00341-x](https://doi:10.1016/s1095-6433(00)00341-x)
- Kerber, C. E.; Azevedo Silva, H. K.; Santos, P. A.; Sanches, E. G. 2012. Reproduction and larviculture of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) in Brazil. Journal of Agricultural Sciences and Technology, 2:229–234.
- Lall, S. P.; Tibbetts, S. M. 2009. Nutrition, feeding, and behavior of fish. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, 12(2):361–372. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2009.01.005>
- Lauritzen, L.; Brambilla, P.; Mazzocchi, A.; Harsløf, L. B. S.; Ciappolino, V.; Agostoni, C. 2016. DHA Effects in Brain Development and Function. Nutrients, 8(1):6. <https://doi.org/10.3390/nu8010006>
- Lin, C-Y.; Huang, L-H.; Deng, D-F.; Lee, S-H.; Liang, H-J.; Hung, S. S. O. 2019. Metabolic adaptation to feed restriction on the green sturgeon (*Acipenser medirostris*) fingerlings. Science of The Total Environment, 684:78–88. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2019.05.044>

- Liu, W.; Lu, X.; Jiang, M.; Wu, F.; Tian, J.; Yang, C.; Yu, L.; Wen, H. 2019. Effects of dietary manipulation on compensatory growth of juvenile genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 45:1. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0531-z>
- Liu, X.; Shi, H.; He, Q.; Lin, F.; Wang, Q.; Xiao, S.; Dai, Y.; Zhangc, Y.; Yang, H.; Zhao, H. 2020. Effect of starvation and refeeding on growth, gut microbiota and non-specific immunity in hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀× *E. lanceolatus*♂). *Fish and shellfish immunology*, 97:182–193. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.055>
- Lowry O. H.; Rosebrough N. J.; Farr A. L.; Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent.1951. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1):265–75. PMID: 14907713.
- Marques, V. H.; Moreira, R. G.; Branco, G. S.; Honji, R. M.; Rombenso, A. N.; Viana, M. T.; de Mello, P. H.; Mata-Sotres, J. A.; Araujo, B. C. 2021. Different saturated and monounsaturated fatty acids levels in fish oil-free diets to cobia (*Rachycentron canadum*) juveniles: Effects in growth performance and lipid metabolism. *Aquaculture*, 541–736843. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736843>
- Mata-Sotres, J. A.; Marques, V. H.; Barba, D.; Braga, A.; Araujo, B.; Viana, M. T.; Rombenso, A. N. 2021. Increasing dietary SFA: MUFA ratio with low levels of LC-PUFA affected lipid metabolism, tissue fatty acid profile and growth of juvenile California Yellowtail (*Seriola dorsalis*). *Aquaculture*, 543–737011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737011>
- Mata-Sotres, J. A.; Tinajero-Chavez, A.; Barreto-Curiel, F.; Pares-Sierra, G.; Rio-Zaragozab, O. B. D.; Viana, M. T.; Rombenso, A. N. 2018. DHA (22:6n-3) supplementation is valuable in *Totoaba macdonaldi* fish oil-free feeds containing poultry by-product meal and beef tallow. *Aquaculture*, 497:440–451. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.015>
- McCue, M. D. 2006. Specific dynamic action: a century of investigation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 144(4):381–394. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.011>
- McCue, M. D. 2010. Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular e Integrative Physiology*, 156(1):1–18. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.002>
- McCue, M. D. 2012. *Comparative physiology of fasting, starvation, and food limitation*, 103-131. New York: Springer.
- McGarry, J. D.; Brown, N. F. 1997. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis, *European Journal of Biochemistry*, 244(1):1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00001.x>
- Mello, P. H.; Araújo, B. C.; Campos, M. F.; Rodrigues-Filho, J. A.; Garcia C. E. O.; Moreira, R. G. 2018. Embryonic and larval development and fatty acid profile of the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) reproduced in

- captivity: tools applied to captive rearing. *Journal of Fish Biology*, 92:1126–1148. <https://doi.org/10.1111/jfb.13577>
- Milligan, C. L.; Girard, S. S.; 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 180:175–193. <https://doi.org/10.1242/jeb.180.1.175>
- Moen, A-G. G.; Finn, R. N. 2012. Short-term, but not long-term feed restriction causes differential expression of leptins in Atlantic salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 183:83–88. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.09.027>
- Morash, A. J.; Bureau, D. P.; McClelland, G. B. 2009. Effects of dietary fatty acid composition on the regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 152(1):85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.10.005>
- Moyes, C. D.; Schulte, P. M. 2009. *Princípios de Fisiologia Animal*. Artmed Editora.
- National Research Council (NRC). 1993. *Nutrient requirements of fish*. National Academy Press, Washington.
- Nebo, C.; Gimbo, R. Y.; Kojima, J. T.; Overturf, K.; Dal-Pai-Silva, M.; Portella, M. C. 2018. Depletion of stored nutrients during fasting in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. *Journal of Applied Aquaculture*, 30(2):157–173. <https://doi.org/10.1080/10454438.2017.1420516>
- Nebo, C.; Overturf, K.; Brezas, A.; Dal-Pai-Silva, M.; Portella, M. C. 2017. Alteration in expression of atrogenes and IGF-1 induced by fasting in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles. *International Aquatic Research* 9:361–372. <https://doi.org/10.1007/s40071-017-0182-1>
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2019. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Freeman, New York, 1119.
- Ntambi, J. M.; Miyazaki, M. 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in Lipid Research*, 43(2):91–104. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00039-0)
- Oliveira, E. F. D.; Araújo, B. C.; Marques, V. H.; de Mello, P. H.; Moreira, R. G.; Honji, R. M. 2023. Influence of Docosaehaenoic and Eicosapentaenoic Acid Ratio and Temperature on the Growth Performance, Fatty Acid Profile, and Liver Morphology of Dusky Grouper (*Epinephelus marginatus*) (Teleostei: Serranidae) Juveniles. *Animals*, 13(20):3212. <https://doi.org/10.3390/ani13203212>
- Pérez-Jiménez, A.; Guedes, M. J.; Morales, A. E.; Oliva-Teles, A. 2007. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture*, 265(1-4):325–335. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.021>
- Pollard, D. A.; Afonso, P.; Bertoncini, A. A.; Fennessy, S.; Francour, P.; Barreiros, J. 2018. *Epinephelus marginatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T7859A100467602>

- Price, E. R.; Valencak, T. G. 2012. Changes in fatty acid composition during starvation in vertebrates: mechanisms and questions. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Comparative physiology of fasting, starvation, and food limitation, 237–255. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29056-5_15
- Py, C.; Elizondo-González, R.; Peña-Rodríguez, A. 2022. Compensatory growth: Fitness cost in farmed fish and crustaceans. *Reviews in Aquaculture*, 14(3): 1389–1417. <https://doi.org/10.1111/raq.12656>
- Reñones, O.; Grau, A.; Mas, X.; Riera, F.; Saborido-Rey, F. 2010. Reproductive pattern of an exploited dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) (Pisces: Serranidae) population in the western Mediterranean. *Scientia Marina*, 74:523–537. <https://doi.org/10.3989/scimar.2010.74n3523>
- Rodrigues-Filho, J. A.; Araújo, B. C.; Mello, P. H.; Garcia, C. E. O.; Silva, V. F. D.; Li, W.; Levavi-Sivan, B.; Moreira, R. G. 2023. Hormonal profile during the reproductive cycle and induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) in captivity. *Aquaculture*, 566, 739150. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739150>
- Rodrigues-Filho, J. A.; Sanches, E. G.; Garcia, C. E. O.; Sebastiani, E. F.; Pannuti, C. V.; Moreira, R. G. 2009. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) (Serranidae: Epinephelinae). *Environmental Biology of Fishes*, 85:301–302. <https://doi.org/10.1007/s10641-009-9502-7>
- Rodrigues-Filho, J. D. A.; Garcia, C. E. D. O.; Chehade, C. G.; Sanches, E. G.; Borella, M. I.; Nostro, F. L.; Araújo, B. C.; Branco, G. S.; Moreira, R. G. 2020. Gonadal remodeling and hormonal regulation during sex change of juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Teleostei, Serranidae), an endangered protogynous hermaphrodite fish. *Fish physiology and biochemistry*, 46, 1809-1824. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00830-8>
- Rombenso, A. N.; Trushenski, J. T.; Jirsa, D.; Drawbridge, M. 2016. Docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) are essential to meet LC-PUFA requirements of juvenile California Yellowtail (*Seriola dorsalis*). *Aquaculture*, 463:123–134. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.004>
- Rust, M. B. 2003. Nutritional physiology. Academic Press, Fish nutrition, 367–452. <https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50008-2>
- Salem, M.; Silverstein, J.; Rexroad, C. E.; Yao, J. 2007. Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics*, 8:328. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0596-9>
- Salgado-Ismodes, A.; Taipale, S.; Pirhonen, J. 2019. Effects of progressive decrease of feeding frequency and re-feeding on production parameters, stomach capacity and muscle nutritional value in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 734919. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734919>

- Sanches, E. G.; Silva, F. C.; Leite, J. R.; Silva, P. K. A.; Kerber, C. E.; Santos, P. A. 2014. Can fish oil incorporation in diet improve the growth performance of dusky grouper *Epinephelus marginatus*? Boletim do Instituto De Pesca, 40:147–155. <https://doi.org/10.1111/are.14259>
- Saravanan, P.; Davidson, N. C.; Schmidt, E. B.; Calder, P. C. 2010. Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. Lancet, 376(9740):540–550. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60445-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60445-X)
- Sargent, J.R.; Tocher, D.R.; Bell, J.G. 2002. In: Halver JE, Hardy RW (eds) Fish nutrition, 3rd ed. Academic Press, London
- Secor, S. M. 2009. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. Journal of Comparative Physiology B, 179:1–56. <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0283-7>
- Simopoulos, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed Pharmacother, 56(8):365–379. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6)
- Soengas, J. L. 2014. Contribution of glucose-and fatty acid sensing systems to the regulation of food intake in fish. A review. General and comparative endocrinology, 205:36–48. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.01.015>
- Spandri, V. C.; Takatsuka, V.; Mesquita de Sousa, O.; Kuhnen, V. V.; Sanches, E. G. 2021. Can compensatory growth be used as feed management for dusky grouper? Aquaculture Research, 52(6):2891–2895. <https://doi.org/10.1111/are.15088>
- Sprague, M.; Dick, J. R.; Tocher, D.R. 2016. Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon 2006-2015. Scientific Reports, 6:21892. <https://doi.org/10.1038/srep21892>
- Stubhaug, I.; Lie, O.; Torstensen, B. E. 2007. Fatty acid productive value and b-oxidation capacity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on different lipid sources along the whole growth period. Aquaculture Nutrition, 13:145–155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00462.x>
- Sun, J.; Wu, W.; Ji, H. 2021. Effect of overwintering on body composition, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, glucose and lipid-metabolic related gene expression of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture, 545–737125. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737125>
- Tamadoni, R.; Nafisi Bahabadi, M.; Morshedi, V.; Bagheri, D.; Torfi Mozanzadeh, M. 2020. Effect of short-term fasting and re-feeding on growth, digestive enzyme activities and antioxidant defense in yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn, 1782). Aquaculture Research, 51:1437–1445. <https://doi.org/10.1111/are.14489>
- Tocher, D. R. 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. Aquaculture, 449:94–107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.010>
- Tocher, D. R. (2003) Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish, Reviews in Fisheries Science, 11(2):107–184. <https://doi.org/10.1080/713610925>

- Tocher, D.R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41:717–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>
- Tocher, D.R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41: 717 -732. Turchini, G. M.; Torstensen, B. E.; Ng, W.K. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1:10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001>
- Ulbricht, T. L. V.; Southgate, D. A. T. 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, 338(8773):985–992. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-m](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-m)
- Urbinati, E. C.; Sarmiento, S. J.; Takahashi, L. S. 2014. Short-term cycles of feed deprivation and refeeding promote full compensatory growth in the Amazon fish matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Aquaculture*, 433:430–433. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.030>
- Van Veldhoven, P. P.; Mannaerts, G. P. 1999. Peroxisomal fatty acid oxidation: unraveling the enzymatic machinery and the diversity of functions. *FEBS Letters*, 452(3):61-65. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60204-8_5
- Volkoff, H.; Hoskins, L. J.; Tuziak, S. M. 2010. Influence of intrinsic signals and environmental cues on the endocrine control of feeding in fish: potential application in aquaculture. *General and Comparative Endocrinology*, 167(3):352–359. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.09.001>
- Wade, N. M.; Skiba-Cassy, S.; Dias, K.; Glencross, B. D. 2014. Postprandial molecular responses in the liver of the barramundi, *Lates calcarifer*. *Fish physiology and biochemistry*, 40:427–43. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9854-y>
- Wakil, S. J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*. 1989;28(11):4523–4530. <https://doi.org/10.1021/bi00437a001>
- Wanders, R. J.; Vreken, P.; Ferdinandusse, S.; Jansen, G. A.; Waterham, H. R.; Van Roermund, C. W. 2001. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochemical Society Transactions*, 29(2):250–267. <https://doi.org/10.1042/bst0290250>
- Yang, M.; Deng, K.; Pan, M.; Gu, Z.; Liu, D.; Zhang, Y.; Mai, K. 2019. Glucose and lipid metabolic adaptations during postprandial starvation of Japanese founder *Paralichthys olivaceus* previously fed different levels of dietary carbohydrates. *Aquaculture*, 501:416–429. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.003>
- Yang, Z. 1995. Development of a gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples. MSc Thesis, Memorial University of Newfoundland St. John's, Newfoundland.

Anexo I

Tabela 2: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a massa corpórea (g) de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Tukey Test
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Massa Corpórea	7 dias	19,58 ± 1,60 ^a	17,02 ± 0,80 ^{ab}	15,60 ± 1,62 ^b	Alimentação vs Restrição $p=0,00329$
	15 dias	19,17 ± 1,77 ^a	15,82 ± 1,77 ^{ab}	14,46 ± 1,09 ^b	Alimentação vs Restrição $p=0,00399$
	15 dias e 12 horas	22,19 ± 1,50 ^a	17,50 ± 1,82 ^{ab}	14,56 ± 1,40 ^b	Alimentação vs Restrição $p=0,00018$
	22 dias	20,01 ± 2,29 ^a	18,87 ± 1,74 ^a	14,39 ± 1,58 ^b	Alimentação vs Restrição $p=0,00311$ Realimentação vs Restrição $p=0,01435$
	30 dias	19,72 ± 1,61 ^a	17,1 ± 1,19 ^{ab}	14,86 ± 1,74 ^b	Alimentação vs Restrição 0,00572
Tukey Test	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias. Para calcular a massa, foram usados o total de 9 peixes ($n=3/\text{tanque}$) divididos pelo número de tanques ($n=3/\text{tratamento}$). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre **A) tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta**. Não foram apresentadas diferenças estatísticas para o período pós-prandial.

O cálculo foi aferido com base na seguinte fórmula: **Massa Corpórea (em gramas – g)** = média das médias de cada tanque e tratamento.

Tabela 3: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre o ganho em massa corpórea (g) de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Tukey Test
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Ganho em Massa	7 dias	1,65 ± 2,13	-1,11 ± 0,37	-2,89 ± 1,19	-
	15 dias	1,24 ± 2,29 ^a	-2,31 ± 2,10 ^b	-4,04 ± 0,74 ^b	Alimentação vs Realimentação $p= 2,8E-05$ Alimentação vs Restrição $p= 2,6E-06$
	15 dias e 12 horas	4,26 ± 1,04 ^a	-0,63 ± 1,60 ^b	-3,94 ± 1,86 ^b	Alimentação vs Realimentação $p= 0,00024$ Alimentação vs Restrição $p= 3,1E-06$
	22 dias	2,08 ± 1,19 ^a	0,74 ± 1,37 ^b	-4,10 ± 2,35 ^b	Alimentação vs Realimentação $p= 0,00135$ Alimentação vs Restrição $p= 2,3E-06$
	30 dias	1,80 ± 1,28 ^a	-1,02 ± 0,45 ^b	-3,64 ± 2,38 ^b	Alimentação vs Realimentação $p= 6,4E-05$ Alimentação vs Restrição $p= 2,1E-06$
Tukey Test	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias. Para calcular o ganho em massa, foram usados o total de 9 peixes (n=3/tanque) divididos pelo número de tanques (n=3/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre **A) tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta**. Não foram apresentadas diferenças estatísticas para o período pós-prandial.

O cálculo foi aferido com base na seguinte fórmula: **Ganho de Massa (em gramas (g))** = massa corpórea inicial final – inicial consumo de ração / ganho de massa corpórea.

Tabela 4: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre o comprimento (cm) de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Tukey Test
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Comprimento	7 dias	10,89 ± 0,18	10,78 ± 0,15	10,33 ± 0,40	-
	15 dias	11,06 ± 0,42	10,83 ± 0,37	10,67 ± 0,37	-
	15 dias e 12 horas	11,11 ± 0,32	10,89 ± 0,27	10,83 ± 0,35	-
	22 dias	11,17 ± 0,37	11,07 ± 0,36	10,72 ± 0,34	-
	30 dias	11,71 ± 0,42	10,89 ± 0,35	10,89 ± 0,39	-
Tukey Test	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias. Para calcular o comprimento, foram usados o total de 9 peixes (n=3/tanque) divididos pelo número de tanques (n=3/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal -Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre **A) tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta**. Não foram apresentadas diferenças estatísticas para o período pós-prandial.

O cálculo foi aferido com base na seguinte fórmula: **Comprimento (em centímetros – cm)** = média das médias de cada tanque e tratamento.

Tabela 5: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a taxa de crescimento específico (%) de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

Ácidos graxos	Dias de coleta	Tratamentos			Tukey Test
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Taxa de Crescimento Específico	7 dias	23,59 ± 30,45 ^a	-15,83 ± 5,26 ^{ab}	-41,31 ± 17,01 ^b	Alimentação vs Restrição $p = 0,0211$
	15 dias	8,27 ± 15,28	-15,39 ± 13,98	-26,91 ± 4,95	-
	15 dias e 12 horas	28,41 ± 6,96	-4,20 ± 10,67	-26,24 ± 12,38	-
	22 dias	9,47 ± 5,42	3,35 ± 6,24	-18,65 ± 10,70	-
	30 dias	5,99 ± 4,27	-3,40 ± 1,49	-12,12 ± 7,92	-
Tukey Test	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias. Para calcular a taxa de crescimento específico, foram usados o total de 9 peixes ($n=3/\text{tanque}$) divididos pelo número de tanques ($n=3/\text{tratamento}$). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre **A) tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta**. Não foram apresentadas diferenças estatísticas para o período pós-prandial.

O cálculo foi aferido com base na seguinte fórmula: **Taxa de Crescimento Específico (TCE – em porcentagem (% dia - 1))** = $100 \times ((\text{massa corpórea final} - \text{inicial}) / \text{dias})$

Tabela 6: Lipídeos totais (mg g⁻¹ de massa úmida) do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (alimentação, realimentação e restrição alimentar) em diferentes dias e horário de coleta.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Fígado	7 dias	18,23 ± 1,56 [#]	6,40 ± 0,86 [#]	9,59 ± 0,70 [#]	-
	15 dias	25,17 ± 3,50 ^{ab#}	10,30 ± 1,30 ^{b#}	44,59 ± 8,21 ^{a*}	Realimentação vs Restrição $p = 0,00069$
	22 dias	29,40 ± 2,86 ^{*#}	23,05 ± 1,57 [#]	33,55 ± 5,41 [*]	-
	30 dias	50,20 ± 8,60 [*]	46,82 ± 4,97 [*]	30,47 ± 3,45 [*]	-
Teste de Tukey	Dia	15 dias vs 30 dias $p = 0,02333$	7 dias vs 30 dias $p = 6,5E-08$	7 dias vs 15 dias $p = 0,00020$	
		7 dias vs 30 dias $p = 0,00020$	15 dias vs 30 dias $p = 3,6E-06$	7 dias vs 22 dias $p = 0,03423$	
		-	22 dias vs 30 dias $p = 0,00673$	7 dias vs 30 dias $p = 0,03552$	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Fígado	15 dias	25,17 ± 3,50	10,30 ± 1,30	44,59 ± 8,21 [*]	
	15 dias e 12 horas	24,89 ± 1,96	13,28 ± 1,39	16,68 ± 4,75 [#]	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	15 dias vs 15 dias e 12 horas $p = 0,01664$	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias e para calcular os lipídeos totais do tecido hepático, foram usados o total de 9 peixes ($n=3/\text{tanque}$) divididos pelo número de tanques ($n=3/\text{tratamento}$). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (two way ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 7: Lipídeos totais (mg g⁻¹ de massa úmida) do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*, submetidos a diferentes tratamentos alimentares (alimentação, realimentação e restrição alimentar) em diferentes dias e horário de coleta.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Músculo	7 dias	8,48 ± 1,19 [#]	9,01 ± 1,45 [#]	8,17 ± 1,47 [#]	-
	15 dias	6,07 ± 1,17 [#]	6,10 ± 0,71 [#]	4,76 ± 0,52 [#]	-
	22 dias	23,00 ± 1,90 [*]	26,79 ± 2,25 [*]	21,92 ± 1,47 [*]	-
	30 dias	22,38 ± 2,35 [*]	20,12 ± 2,14 [*]	18,42 ± 1,24 [*]	-
Teste de Tukey	Dia	7 dias vs 22 dias $p= 9,3E-08$	7 dias vs 22 dias $p= 4,8E-10$	7 dias vs 22 dias $p= 4,6E-07$	
		7 dias vs 30 dias $p= 3,4E-07$	7 dias vs 30 dias $p= 0,00019$	7 dias vs 30 dias $p= 0,00024$	
		15 dias vs 22 dias $p= 9,1E-10$	15 dias vs 22 dias $p= 4,0E-10$	15 dias vs 22 dias $p= 7,1E-10$	
		15 dias vs 30 dias $p= 2,4E-09$	15 dias vs 30 dias $p= 1,6E-06$	15 dias vs 30 dias $p= 2,4E-07$	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Músculo	15 dias	6,07 ± 1,17 [#]	6,10 ± 0,71 [#]	4,76 ± 0,52 [#]	
	15 dias e 12 horas	11,39 ± 0,88 [*]	13,39 ± 1,04 [*]	11,27 ± 0,69 [*]	-
Teste de Tukey	Dia	15 dias vs 15 dias 12 horas $p= 0,00013$	15 dias vs 15 dias 12 horas $p= 9,8E-07$	15 dias vs 15 dias 12 horas $p= 1,4E-06$	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias e para calcular os lipídeos totais do tecido muscular, foram usados o total de 9 peixes (n=3/tanque) divididos pelo número de tanques (n=3/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 8: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ SFA (em porcentagem – %) no plasma de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ SFA	7 dias	39,84 ± 1,94	49,10 ± 1,39	44,40 ± 2,03	-
	15 dias	33,68 ± 1,78	42,73 ± 1,35	46,16 ± 7,93	-
	22 dias	38,50 ± 2,76	39,21 ± 2,22	46,24 ± 1,83	-
	30 dias	33,55 ± 1,64 ^b	40,22 ± 5,54 ^{ab}	46,01 ± 2,06 ^a	Alimentação vs Restrição $p=0,01065$
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ SFA	15 dias	33,68 ± 1,78	42,73 ± 1,35	46,16 ± 7,93	
	15 dias e 12 horas	30,17 ± 2,36	42,79 ± 3,88	38,02 ± 3,61	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ SFA significa soma de ácidos graxos saturados (do inglês saturated fatty acids). Para calcular os SFA, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way* ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). * # ^ Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 9: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ MUFA (em porcentagem – %) no plasma de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ MUFA	7 dias	30,53 $\pm$ 3,13 ^a	19,66 $\pm$ 1,14 ^{ab#}	14,14 $\pm$ 1,11 ^b	Alimentação vs Restrição $p= 8,8E-06$
	15 dias	29,59 $\pm$ 2,55 ^a	21,05 $\pm$ 1,36 ^{ab*#^}	15,03 $\pm$ 3,91 ^b	Alimentação vs Restrição $p= 0,00070$
	22 dias	31,67 $\pm$ 2,20 ^{ab}	29,70 $\pm$ 1,50 ^{a*^}	19,58 $\pm$ 1,59 ^b	Realimentação vs Restrição $p= 0,02719$
	30 dias	37,82 $\pm$ 1,73 ^a	36,86 $\pm$ 4,22 ^{a*}	23,99 $\pm$ 1,28 ^b	Realimentação vs Restrição $p= 0,00953$ Alimentação vs Restrição $p= 4,9E-05$
Teste de Tukey	Dia	-	7 dias vs 22 dias $p= 0,02217$	-	
		-	7 dias vs 30 dias $p= 8,1E-05$	-	
		-	15 dias vs 30 dias $p= 0,00041$	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ MUFA	15 dias	29,59 $\pm$ 2,55	21,05 $\pm$ 1,36	15,03 $\pm$ 3,91	
	15 dias e 12 horas	31,76 $\pm$ 2,40 ^a	18,18 $\pm$ 2,27 ^b	19,02 $\pm$ 2,26 ^b	Alimentação vs Realimentação $p= 0,00234$ Alimentação vs Restrição $p= 0,00357$
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias $\pm$ erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ MUFA significa soma de ácidos graxos monoinsaturados (do inglês monounsaturated fatty acids). Para calcular os MUFA, foram usados o total de 9 peixes ($n= 3$ animais/tanque, $n= 3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 10: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ PUFA (%) no plasma de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ PUFA	7 dias	13,44 $\pm$ 1,02	11,55 $\pm$ 1,11 [#]	11,59 $\pm$ 1,60	-
	15 dias	21,75 $\pm$ 2,02 ^a	13,39 $\pm$ 0,84 ^{b*#}	11,25 $\pm$ 2,95 ^b	Alimentação vs Realimentação $p=0,0472$ Alimentação vs Restrição $p=0,0237$
	22 dias	22,25 $\pm$ 1,95	20,91 $\pm$ 2,76 [*]	15,78 $\pm$ 2,31	-
	30 dias	20,61 $\pm$ 2,03	17,19 $\pm$ 3,60 ^{*#}	14,32 $\pm$ 1,02	-
Teste de Tukey	Dia	-	7 dias vs 22 dias $p=0,0217$	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ PUFA	15 dias	21,75 $\pm$ 2,02	13,39 $\pm$ 0,84	11,25 $\pm$ 2,95 [#]	
	15 dias e 12 horas	27,45 $\pm$ 2,43	18,86 $\pm$ 2,65	24,15 $\pm$ 3,32 [*]	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	15 dias vs 15 dias e 12 horas $p=0,0210$	

Os valores representam médias $\pm$ erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ PUFA significa soma de ácidos graxos polinsaturados (do inglês polyunsaturated fatty acids). Para calcular os PUFA, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{*#^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 11: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ LC-PUFA (%) no plasma de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ LC-PUFA	7 dias	3,51 ± 0,50	7,02 ± 0,55	7,19 ± 0,84	-
	15 dias	7,34 ± 1,30	9,57 ± 0,98	7,83 ± 1,77	-
	22 dias	4,11 ± 0,46	4,79 ± 0,57	7,44 ± 0,84	-
	30 dias	5,56 ± 1,00 ^b	3,23 ± 0,88 ^b	12,08 ± 2,36 ^a	Alimentação vs Restrição $p = 0,00449$ Realimentação vs Restrição $p = 0,00175$
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ LC-PUFA	15 dias	7,34 ± 1,30	9,57 ± 0,98	7,83 ± 1,77	
	15 dias e 12 horas	6,39 ± 2,59	10,22 ± 2,07	12,86 ± 2,50	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ LC-PUFA significa soma ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (do inglês long-chain polyunsaturated fatty acids). Para calcular os LC-PUFA, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$).^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 12: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a $\Sigma n-3$ (%) no plasma de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-3$	7 dias	2,98 ± 0,42	6,18 ± 0,46	6,34 ± 0,76	-
	15 dias	6,64 ± 1,41	7,87 ± 0,80	7,21 ± 1,87	-
	22 dias	3,18 ± 0,58	3,85 ± 0,51	6,05 ± 0,66	-
	30 dias	4,71 ± 1,02 ^b	2,63 ± 0,66 ^b	10,21 ± 2,22 ^a	Alimentação vs Restrição $p=0,0202$ Realimentação vs Restrição $p=0,0079$
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-3$	15 dias	6,64 ± 1,41	7,87 ± 0,80	7,21 ± 1,87	
	15 dias e 12 horas	5,24 ± 2,67	8,64 ± 2,18	10,90 ± 2,70	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). $\Sigma n-3$ significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 3. Para calcular os $n-3$, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 13: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a $\Sigma n-6$ (%) no plasma de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-6$	7 dias	13,97 ± 1,06	12,39 ± 1,19 [#]	12,44 ± 1,68	-
	15 dias	22,45 ± 2,02 ^a	15,10 ± 1,00 ^{ab*#}	11,87 ± 3,02 ^b	Alimentação vs Restrição $p=0,0374$
	22 dias	23,18 ± 1,94	21,85 ± 2,95 [*]	17,17 ± 2,47	-
	30 dias	21,46 ± 2,16	17,79 ± 3,79 ^{*#}	16,19 ± 1,05	-
Teste de Tukey Dia		-	7 dias vs 22 dias $p=0,0332$	-	

B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-6$	15 dias	22,45 ± 2,02	15,10 ± 1,00	11,87 ± 3,02 [#]	
	15 dias e 12 horas	28,59 ± 2,34	20,44 ± 2,66	26,11 ± 3,08 [*]	Alimentação vs Restrição $p=0,0374$
Teste de Tukey Dia		-	-	15 dias vs 15 dias e 12 horas $p=0,0063$	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). $\Sigma n-6$ significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6. Para calcular os $n-6$, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 14: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a razão n-3/n-6 no plasma de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Razão n-3/n-6	7 dias	0,21 ± 0,02	0,53 ± 0,06	0,53 ± 0,05	-
	15 dias	0,30 ± 0,06 ^b	0,52 ± 0,03 ^{ab}	0,72 ± 0,21 ^a	Alimentação vs Restrição $p=0,0232$
	22 dias	0,14 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,38 ± 0,03	-
	30 dias	0,24 ± 0,05 ^b	0,20 ± 0,11 ^b	0,64 ± 0,13 ^a	Alimentação vs Restrição $p=0,0041$ Realimentação vs Restrição $p=0,0305$
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Razão n-3/n-6	15 dias	0,30 ± 0,06	0,52 ± 0,03	0,72 ± 0,21	
	15 dias e 12 horas	0,16 ± 0,06	0,41 ± 0,05	0,38 ± 0,04 [#]	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	15 dias vs 15 dias e 12 horas $p=0,04040$	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). Razão n-3/n-6 significa a divisão dos ácidos graxos n-3 pelos ácidos graxos n-6. Para calcular a Razão n-3/n-6, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). * # ^ Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 15: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ SFA (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ SFA	7 dias	44,85 ± 5,02	72,36 ± 2,12	58,97 ± 3,96*	-
	15 dias	40,01 ± 3,06 ^a	56,25 ± 4,50 ^a	44,07 ± 4,88 ^{b#}	Alimentação vs Restrição $p= 7,6E-09$ Realimentação vs Restrição $p= 4,4E-10$
	22 dias	30,52 ± 0,68	31,13 ± 1,39	45,61 ± 2,34*	-
	30 dias	28,76 ± 0,54	28,66 ± 1,51	52,86 ± 2,85*	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	15 dias vs 7 dias $p= 4,4E-10$	
		-	-	15 dias vs 22 dias $p= 7,0E-09$	
		-	-	15 dias vs 30 dias $p= 4,4E-10$	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ SFA	15 dias	40,01 ± 3,06	56,25 ± 4,50*	44,07 ± 4,88	
	15 dias e 12 horas	28,93 ± 1,04	40,66 ± 1,30 [#]	39,71 ± 2,70	-
Teste de Tukey	Dia	-	15 dias vs 15 dias e 12 horas $p= 0,0355$	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ SFA significa soma de ácidos graxos saturados (do inglês saturated fatty acids). Para calcular os SFA, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). *[#] Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 16: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ MUFA (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ MUFA	7 dias	38,10 $\pm$ 4,15 ^a	17,00 $\pm$ 1,76 ^{b^*}	28,82 $\pm$ 3,34 ^{ab}	Alimentação vs Realimentação $p= 1,2E-05$
	15 dias	42,84 $\pm$ 2,73	31,33 $\pm$ 3,88 [#]	38,53 $\pm$ 3,76	-
	22 dias	49,16 $\pm$ 0,75	47,18 $\pm$ 1,14 [*]	37,86 $\pm$ 1,49	-
	30 dias	49,50 $\pm$ 0,86 ^a	50,65 $\pm$ 0,95 ^{a*}	35,39 $\pm$ 2,10 ^b	Alimentação vs Restrição $p= 0,00682$ Realimentação vs Restrição $p= 0,00218$
Teste de Tukey	Dia	-	7 dias vs 15 dias $p= 0,00832$	-	
		-	7 dias vs 22 dias $p= 5,0E-10$	-	
		-	7 dias vs 30 dias $p= 4,4E-10$	-	
		-	15 dias vs 22 dias $p= 0,00118$	-	
		-	15 dias vs 30 dias $p= 2,4E-05$	-	
A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
	15 dias	42,84 $\pm$ 2,73	31,33 $\pm$ 3,88	38,53 $\pm$ 3,76	
Σ MUFA	15 dias e 12 horas	49,84 $\pm$ 1,37	40,65 $\pm$ 0,86	41,79 $\pm$ 1,62	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias $\pm$ erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ MUFA significa soma de ácidos graxos monoinsaturados (do inglês monounsaturated fatty acids). Para calcular os MUFA, foram usados o total de 9 peixes ($n= 3$ animais/tanque, $n= 3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{*#^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 17: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ PUFA (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ PUFA	7 dias	14,40 $\pm$ 1,82 ^a	4,22 $\pm$ 0,80 ^{b#}	8,04 $\pm$ 1,30 ^{ab*#}	Alimentação vs Realimentação $p=0,0114$
	15 dias	15,33 $\pm$ 1,63	8,94 $\pm$ 1,71 [#]	13,49 $\pm$ 1,09 [*]	-
	22 dias	19,04 $\pm$ 1,01 ^{ab}	19,94 $\pm$ 1,41 ^{a*}	11,54 $\pm$ 2,04 ^{b*#}	Realimentação vs Restrição $p=0,01862$
	30 dias	21,74 $\pm$ 0,50 ^a	20,69 $\pm$ 1,65 ^{a*}	6,23 $\pm$ 1,85 ^{b#}	Alimentação vs Restrição $p=8,3E-09$ Realimentação vs Restrição $p=7,7E-08$
Teste de Tukey	Dia	-	7 dias vs 22 dias $p=8,7E-05$	15 dias vs 30 dias $p=0,04292$	
		-	7 dias vs 30 dias $p=3,3E-09$	-	
		-	15 dias vs 22 dias $p=8,7E-05$	-	
		-	15 dias vs 30 dias $p=2,1E-05$	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ PUFA	15 dias	15,33 $\pm$ 1,63	8,94 $\pm$ 1,71	13,49 $\pm$ 1,09	
	15 dias e 12 horas	20,15 $\pm$ 1,81	14,84 $\pm$ 1,58	14,21 $\pm$ 1,93	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias $\pm$ erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ PUFA significa soma de ácidos graxos polinsaturados (do inglês polyunsaturated fatty acids). Para calcular os PUFA, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). * # ^ Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 18: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ LC-PUFA (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ LC-PUFA	7 dias	Nd	nd	nd	-
	15 dias	Nd	nd	1,70 ± 0,40	-
	22 dias	Nd	nd	nd	-
	30 dias	Nd	nd	nd	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ LC-PUFA	15 dias	Nd	nd	1,70 ± 0,40	
	15 dias e 12 horas	Nd	0,62 ± 0,18	1,50 ± 0,29	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ LC-PUFA significa soma ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (do inglês long-chain polyunsaturated fatty acids). Para calcular os LC-PUFA, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$).^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). *# ^ Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 19: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a $\Sigma n-3$ (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-3$	7 dias	0,52 ± 0,09	nd	nd	-
	15 dias	0,58 ± 0,14 ^b	nd	2,47 ± 0,56 ^a	Alimentação vs Restrição $p=5,9E-08$
	22 dias	0,43 ± 0,06	0,48 ± 0,09	0,45 ± 0,15	-
	30 dias	0,68 ± 0,08	0,53 ± 0,11	nd	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-3$	15 dias	0,58 ± 0,14	nd	2,47 ± 0,56	
	15 dias e 12 horas	0,57 ± 0,14 ^b	1,38 ± 0,25 ^{ab}	2,23 ± 0,42 ^a	Alimentação vs Restrição $p=0,0011$
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). $\Sigma n-3$ significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 3. Para calcular os $n-3$, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$).^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). *#^ Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 20: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a $\Sigma n-6$ (%) sobre a fração TG do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-6$	7 dias	13,88 ± 1,73 ^{a#}	4,22 ± 0,80 ^{b#}	8,04 ± 1,30 ^{ab}	Alimentação vs Realimentação $p= 0,00140$
	15 dias	14,75 ± 1,52 ^{*#}	8,94 ± 1,71 [#]	12,72 ± 1,94	-
	22 dias	18,60 ± 0,96 ^{ab*#}	19,46 ± 1,36 ^{a*}	11,09 ± 1,91 ^b	Realimentação vs Restrição $p= 0,01218$
	30 dias	21,06 ± 0,45 ^{a*}	20,16 ± 1,58 ^{a*}	6,23 ± 1,85 ^b	Alimentação vs Restrição $p= 9,6E-09$ Realimentação vs Restrição $7,1E-08$
Teste de Tukey	Dia	7 dias vs 30 dias $p= 0,4368$	7 dias vs 22 dias $p= 1,1E-08$	-	
		-	7 dias vs 30 dias $p= 2,6E-09$	-	
		-	15 dias vs 22 dias $p= 9,7E-05$	-	
		-	15 dias vs 30 dias $p= 2,4E-05$	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-6$	15 dias	14,75 ± 1,52	8,94 ± 1,71	12,72 ± 1,94	
	15 dias e 12 horas	19,59 ± 1,74	14,08 ± 1,53	13,48 ± 1,81	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). $\Sigma n-6$ significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6. Para calcular os n-6, foram usados o total de 9 peixes ($n= 3$ animais/tanque, $n= 3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (two way ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{*#^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 21: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a razão n-3/n-6 sobre a fração TG do fígado de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Razão n-3/n-6	7 dias	0,03 ± 0,01	nd	nd	-
	15 dias	0,04 ± 0,01 ^b	nd	0,17 ± 0,03 ^{a*}	Alimentação vs Restrição $p= 4,5E-10$
	22 dias	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01 [#]	-
	30 dias	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	nd	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	15 dias vs 30 dias $p= 5,1E-10$	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Razão n-3/n-6	15 dias	0,04 ± 0,01	nd	0,17 ± 0,03	
	15 dias e 12 horas	0,03 ± 0,01 ^b	0,09 ± 0,01 ^{ab}	0,15 ± 0,03 ^a	Alimentação vs Restrição $p= 0,00017$
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). Razão n-3/n-6 significa a divisão dos ácidos graxos n-3 pelos ácidos graxos n-6. Para calcular a Razão n-3/n-6, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way* ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 22: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ SFA (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ SFA	7 dias	36,26 $\pm$ 2,10 [#]	37,53 $\pm$ 1,51	37,34 $\pm$ 1,73	-
	15 dias	43,16 $\pm$ 2,42 [*]	37,27 $\pm$ 1,36	37,91 $\pm$ 1,69	-
	22 dias	33,08 $\pm$ 0,02 [#]	31,67 $\pm$ 1,82	33,49 $\pm$ 0,54	-
	30 dias	32,32 $\pm$ 0,45 [#]	33,91 $\pm$ 1,28	34,95 $\pm$ 0,57	-
Teste de Tukey	Dia	15 dias vs 7 dias $p=0,04088$	-	-	
		15 dias vs 22 dias $p=0,00024$	-	-	
		15 dias vs 30 dias $p=2,9E-05$	-	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ SFA	15 dias	43,16 $\pm$ 2,42	37,27 $\pm$ 1,36	37,91 $\pm$ 1,69	
	15 dias e 12 horas	36,13 $\pm$ 1,41	37,62 $\pm$ 1,57	37,42 $\pm$ 2,11	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias $\pm$ erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ SFA significa soma de ácidos graxos saturados (do inglês saturated fatty acids). Para calcular os SFA, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 23: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ MUFA (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ MUFA	7 dias	45,54 $\pm$ 1,29 ^{*#}	47,99 $\pm$ 1,25 [*]	48,13 $\pm$ 1,01 [*]	-
	15 dias	47,90 $\pm$ 0,85 [*]	47,99 $\pm$ 0,78 [*]	48,18 $\pm$ 0,71 [*]	-
	22 dias	42,99 $\pm$ 0,33 [#]	43,32 $\pm$ 0,92 [#]	43,22 $\pm$ 0,45 [#]	-
	30 dias	44,54 $\pm$ 0,24 ^{*#}	44,86 $\pm$ 0,29 ^{*#}	44,66 $\pm$ 0,17 [#]	-
Teste de Tukey	Dia	15 dias vs 22 dias $p=0,00058$	7 dias vs 22 dias $p=0,00354$	7 dias vs 22 dias $p=0,0058$	
		-	15 dias vs 22 dias $p=0,00237$	7 dias vs 30 dias $p=0,04189$	
		-	-	15 dias vs 22 dias $p=0,00048$	
		-	-	15 dias 30 dias $p=0,03656$	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ MUFA	15 dias	47,90 $\pm$ 0,85 [*]	47,99 $\pm$ 0,78	48,18 $\pm$ 0,71	
	15 dias e 12 horas	44,11 $\pm$ 0,82 ^{b#}	47,43 $\pm$ 0,75 ^a	46,11 $\pm$ 0,58 ^{ab}	Alimentação vs Realimentação $p=0,0475$
Teste de Tukey	Dia	15 dias vs 15 dias e 12 horas $p=0,012$	-	-	

Os valores representam médias $\pm$ erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ MUFA significa soma de ácidos graxos monoinsaturados (do inglês monounsaturated fatty acids). Para calcular os MUFA, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{*#} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 24: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ PUFA (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ PUFA	7 dias	14,84 $\pm$ 2,37 ^{*#}	11,74 $\pm$ 2,18	11,65 $\pm$ 1,84	-
	15 dias	8,94 $\pm$ 2,42 [#]	12,90 $\pm$ 1,67	11,98 $\pm$ 1,98	-
	22 dias	18,01 $\pm$ 0,38 [*]	17,37 $\pm$ 0,83	16,00 $\pm$ 0,29	-
	30 dias	18,92 $\pm$ 0,62 [*]	17,10 $\pm$ 0,81	15,37 $\pm$ 0,23	-
Teste de Tukey	Dia	15 dias vs 22 dias $p=0,00292$	-	-	
		15 dias vs 30 dias $p=0,00035$	-	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
PUFA	15 dias	8,94 $\pm$ 2,42	12,90 $\pm$ 1,67	11,98 $\pm$ 1,98	
	15 dias e 12 horas	15,23 $\pm$ 1,20	12,71 $\pm$ 1,67	13,18 $\pm$ 2,01	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias $\pm$ erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ PUFA significa soma de ácidos graxos polinsaturados (do inglês polyunsaturated fatty acids). Para calcular os PUFA, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way* ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{*#^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 25: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a Σ LC-PUFA (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ LC-PUFA	7 dias	3,36 $\pm$ 0,74	2,75 $\pm$ 0,58 [#]	2,47 $\pm$ 0,64 ^{#^}	-
	15 dias	nd	1,83 $\pm$ 0,41 [#]	1,94 $\pm$ 0,44 [#]	-
	22 dias	5,92 $\pm$ 0,61	7,64 $\pm$ 1,85 [*]	7,29 $\pm$ 0,62 [*]	-
	30 dias	4,21 $\pm$ 0,37	4,13 $\pm$ 0,67 [#]	5,02 $\pm$ 0,38 ^{^^}	-
Teste de Tukey	Dia	-	7 dias vs 22 dias $p=0,00022$	7 dias vs 22 dias $p=8,8E-05$	
		-	15 dias vs 22 dias $p=2,5E-06$	15 dias vs 22 dias $p=8,2E-06$	
		-	22 dias vs 30 dias $p=0,02954$	15 dias vs 30 dias $p=0,04292$	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Σ LC-PUFA	15 dias	nd	1,83 $\pm$ 0,41	1,94 $\pm$ 0,44	
	15 dias e 12 horas	4,53 $\pm$ 0,66 ^a	2,25 $\pm$ 0,58 ^b	3,29 $\pm$ 0,45 ^{ab}	Alimentação vs Realimentação $p=0,0170$
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias $\pm$ erro padrão das médias em porcentagem (%). Σ LC-PUFA significa soma ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (do inglês long-chain polyunsaturated fatty acids). Para calcular os LC-PUFA, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (two way ANOVA), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 26: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a $\Sigma n-3$ (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-3$	7 dias	4,26 ± 0,90	3,41 ± 0,72 [#]	3,09 ± 0,83 [#]	-
	15 dias	nd	2,53 ± 0,54 [#]	2,56 ± 0,57 [#]	-
	22 dias	6,28 ± 0,55	7,61 ± 1,58 [*]	7,30 ± 0,55 [*]	-
	30 dias	4,84 ± 0,33	4,42 ± 0,70 ^{*#}	5,30 ± 0,42 ^{*#}	-
Teste de Tukey	Dia	-	7 dias vs 22 dias $p=0,00383$	7 dias vs 22 dias $p=0,00142$	
		-	15 dias vs 22 dias $p=8,8E-05$	15 dias vs 22 dias $p=0,00017$	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-3$	15 dias	nd	2,53 ± 0,54	2,56 ± 0,57	
	15 dias e 12 horas	5,35 ± 0,67	3,00 ± 0,72	4,07 ± 0,58	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). $\Sigma n-3$ significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6. Para calcular os $n-3$, foram usados o total de 9 peixes ($n=3$ animais/tanque, $n=3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{*#} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 27: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a $\Sigma n-6$ (%) sobre a fração TG do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-6$	7 dias	13,95 ± 2,19 ^{*#}	11,08 ± 1,99	11,04 ± 1,65	-
	15 dias	8,94 ± 2,42 [#]	12,20 ± 1,54	11,36 ± 1,83	-
	22 dias	17,65 ± 0,39 [*]	17,40 ± 1,09	15,99 ± 0,28	-
	30 dias	18,29 ± 0,61 [*]	16,81 ± 0,76	15,09 ± 0,21	-
Teste de Tukey	Dia	15 dias vs 22 dias $p = 0,00242$	-	-	
		15 dias vs 30 dias $p = 0,00044$	-	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
$\Sigma n-6$	15 dias	8,94 ± 2,42	12,20 ± 1,54	11,36 ± 1,83	
	15 dias e 12 horas	14,40 ± 1,06	11,95 ± 1,53	12,40 ± 1,87	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). $\Sigma n-6$ significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6. Para calcular os $n-6$, foram usados o total de 9 peixes ($n = 3$ animais/tanque, $n = 3$ tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). ^{* # ^} Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Tabela 28: Efeito da restrição alimentar e realimentação sobre a razão n-3/n-6 sobre a fração TG do músculo de juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Razão n-3/n-6	7 dias	0,26 ± 0,06	0,35 ± 0,13	0,23 ± 0,05	-
	15 dias	nd	0,18 ± 0,04	0,32 ± 0,14	-
	22 dias	0,35 ± 0,03	0,42 ± 0,05	0,46 ± 0,03	-
	30 dias	0,27 ± 0,02	0,25 ± 0,04	0,35 ± 0,03	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	
B)	Dias de coleta	Tratamentos			Teste de Tukey
		Alimentação	Realimentação	Restrição	Tratamento
Razão n-3/n-6	15 dias	nd	0,18 ± 0,04	0,32 ± 0,14	
	15 dias e 12 horas	0,39 ± 0,08	0,21 ± 0,05	0,38 ± 0,11	-
Teste de Tukey	Dia	-	-	-	

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). Razão n-3/n-6 significa a divisão dos ácidos graxos n-3 pelos ácidos graxos n-6. Para calcular a Razão n-3/n-6, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Para os dados paramétricos foi aplicado teste de Análise de Variância (*two way ANOVA*), enquanto para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal – Wallis, após isso foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). ^{a,b} Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre *tratamentos experimentais no mesmo dia de coleta* - informação na horizontal (ex.: alimentação diferente de restrição no dia 30). * # ^ Diferentes símbolos indicam diferenças estatísticas no *mesmo tratamento em diferentes dias de coleta* - informação na vertical (ex.: realimentação no dia 7 é diferente de realimentação no dia 30). Em **A)** estão retratadas as diferenças entre os diferentes dias de coleta, enquanto em **B)** estão apresentadas as diferenças no período pós-prandial.

Anexo II

Tabela 29: Percentuais de AG Bacterianos no plasma total das juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos		
		Alimentação	Realimentação	Restrição
ΣSFA Bacteriano	7 dias	12,27 ± 4,64	11,45 ± 1,11	21,74 ± 3,25
	15 dias	4,88 ± 0,82	11,97 ± 1,60	18,31 ± 5,67
	15 dias e 12 horas	4,24 ± 0,66	7,03 ± 1,80	4,05 ± 0,49
	22 dias	3,46 ± 0,65	3,66 ± 0,73	6,68 ± 0,71
	30 dias	2,46 ± 0,41	2,49 ± 0,49	3,61 ± 0,44
B)	Dias de coleta	Tratamentos		
		Alimentação	Realimentação	Restrição
ΣMUFA Bacteriano	7 dias	0,41 ± 0,05	1,22 ± 0,46	0,93 ± 0,24
	15 dias	2,76 ± 1,47	1,30 ± 0,62	1,42 ± 0,79
	15 dias e 12 horas	nd	2,93 ± 1,38	1,89 ± 0,58
	22 dias	nd	1,73 ± 1,01	4,29 ± 3,76
	30 dias	nd	nd	3,64 ± 0,54

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). ΣSFA significa soma de ácidos graxos saturados (do inglês saturated fatty acids). ΣMUFA significa soma de ácidos graxos monoinsaturados (do inglês monounsaturated fatty acids). Para calcular os SFA e os MUFA, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Estão sendo considerados os AG 13:0; 15:0; 17:0; 17:0 anteiso e 21:0 para a soma de SFA e 17:1 para a soma de MUFA.

Tabela 30: Percentuais de AG Bacterianos na fração TG do fígado das juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos		
		Alimentação	Realimentação	Restrição
ΣSFA Bacteriano	7 dias	0,93 ± 0,27	2,23 ± 0,17	1,52 ± 0,22
	15 dias	0,78 ± 0,20	1,39 ± 0,22	0,94 ± 0,20
	15 dias e 12 horas	0,50 ± 0,08	1,09 ± 0,18	0,96 ± 0,19
	22 dias	0,56 ± 0,06	0,67 ± 0,12	1,83 ± 0,36
	30 dias	nd	nd	1,89 ± 0,26
B)	Dias de coleta	Tratamentos		
		Alimentação	Realimentação	Restrição
ΣMUFA Bacteriano	7 dias	1,72 ± 0,45	4,19 ± 0,18	2,65 ± 0,37
	15 dias	1,03 ± 0,30	2,10 ± 0,40	1,26 ± 0,38
	15 dias e 12 horas	0,58 ± 0,12	2,14 ± 0,35	1,83 ± 0,43
	22 dias	0,72 ± 0,10	1,07 ± 0,23	3,17 ± 0,63
	30 dias	nd	nd	3,64 ± 0,54

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). ΣSFA significa soma de ácidos graxos saturados (do inglês saturated fatty acids). ΣMUFA significa soma de ácidos graxos monoinsaturados (do inglês monounsaturated fatty acids). Para calcular os SFA e os MUFA, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento). Estão sendo considerados os AG 17:0 anteiso para a soma de SFA e 15:1 para a soma de MUFA.

Tabela 31: Percentuais de AG Bacterianos na fração TG do músculo das juvenis de *Epinephelus marginatus*.

A)	Dias de coleta	Tratamentos		
		Alimentação	Realimentação	Restrição
ΣSFA Bacteriano	7 dias	nd	nd	nd
	15 dias	nd	nd	nd
	15 dias e 12 horas	nd	nd	nd
	22 dias	nd	nd	nd
	30 dias	nd	nd	nd
B)	Dias de coleta	Tratamentos		
		Alimentação	Realimentação	Restrição
ΣMUFA Bacteriano	7 dias	nd	nd	nd
	15 dias	nd	nd	nd
	15 dias e 12 horas	nd	nd	nd
	22 dias	nd	nd	nd
	30 dias	nd	nd	nd

Os valores representam médias ± erro padrão das médias em porcentagem (%). ΣSFA significa soma de ácidos graxos saturados (do inglês saturated fatty acids). ΣMUFA significa soma de ácidos graxos monoinsaturados (do inglês monounsaturated fatty acids). Para calcular os SFA e os MUFA, foram usados o total de 9 peixes (n= 3 animais/tanque, n= 3 tanques/tratamento).

Anexo III

Tabela 32: Perfil de ácidos graxos da dieta ofertada aos de juvenis de *E. marginatus* nos tratamentos que foram alimentados

Ácidos graxos em %	
12:0	1,07 ± 0,17
16:0	21,11 ± 0,11
18:0	5,09 ± 0,02
16:1	2,19 ± 0,03
18:1n9	34,79 ± 0,10
18:1n7	1,99 ± 0,11
18:2n6	29,84 ± 0,16
SFA	28,93 ± 0,29
MUFA	39,45 ± 0,12
PUFA	31,00 ± 0,18
L-PUFA	0,62 ± 0,03
n-3	0,62 ± 0,03
n-6	30,33 ± 0,15

Os valores estão representados em médias e erro padrão das médias ($\pm$) em porcentagem (%). SFA significa a soma de ácidos graxos saturados (do inglês *saturated fatty acids*). MUFA significa ácidos graxos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acids*). PUFA significa ácidos graxos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acids*). LC-PUFA significa ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (do inglês *long-chain polyunsaturated fatty acids*). n-3 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 3. n-6 significa a soma de ácidos graxos polinsaturados e polinsaturados de cadeia longa com a primeira insaturação no carbono 6.