

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXIGÊNCIA EM PROTEÍNA BRUTA PARA LARVAS E
JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E O
USO DE MISTURA DE AMINOÁCIDOS CRISTALINOS COMO
SUBSTITUTO PARCIAL DA PROTEÍNA**

Juliana Tomomi Kojima

Zootecnista

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXIGÊNCIA EM PROTEÍNA BRUTA PARA LARVAS E
JUVENIS DE TAMBACUI (*Colossoma macropomum*) E O
USO DE MISTURA DE AMINOÁCIDOS CRISTALINOS COMO
SUBSTITUTO PARCIAL DA PROTEÍNA**

Juliana Tomomi Kojima

Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Portella

Co-orientador: Dr. Rodrigo Takata

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Doutor em Zootecnia**

2016

K79e Kojima, Juliana Tomomi
Exigência em proteína bruta para larvas e juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o uso de mistura de aminoácidos cristalinos como substituto parcial da proteína / Juliana Tomomi Kojima. -- Jaboticabal, 2016
viii, 101 p. : il ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Maria Célia Portella

Banca examinadora: Rosangela Kiyoko Jomori Bonichelli, Natalia de Jesus Leitão, Débora Machado Fracalossi, Wilson Massamitu Furuya

Bibliografia

1. Aminoácidos indispensáveis. 2. Aminoácidos dispensáveis. 3. Crescimento inicial. 4. Crescimento muscular. 5. Dieta semipurificada. 6. Níveis de proteína bruta. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3.0341

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EXIGÊNCIA EM PROTEÍNA BRUTA PARA LARVAS E JUVENIS DE TAMBACUI (*Colossoma macropomum*) E O USO DE MISTURA DE AMINOÁCIDOS CRISTALINOS COMO SUBSTITUTO PARCIAL DA PROTEÍNA.

AUTORA: JULIANA TOMOMI KOJIMA
ORIENTADORA: MARIA CÉLIA PORTELLA
COORIENTADOR: RODRIGO TAKATA

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



Profa. Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



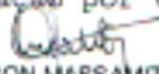
Profa. Dra. ROSÂNGELA KIYOKO JOMORI BONICHELLI
Laboratório de Aquicultura / FAFRAM - Ituverava/SP



Profa. Dra. NATÁLIA DE JESUS LEITÃO
Centro de Aquicultura - CAUNESP / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. DEBORA MACHADO FRACALOSSO
Departamento de Aquicultura / UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
Participação por Videoconferência



Prof. Dr. WILSON MASSAMITU FURUYA
Departamento de Zootecnia / UFPG - Ponta Grossa/PR
Participação por Videoconferência

Jaboticabal, 04 de fevereiro de 2016

DADOS CURRICULARES

JULIANA TOMOMI KOJIMA – nasceu na cidade de Kooriyama-shi, Japão, no dia 18 de maio de 1985. Em agosto de 2004 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista, Unesp, Câmpus de Dracena, concluindo o curso em julho de 2009. Durante a graduação, participou de diversos congressos, realizou estágios na área de produção animal e iniciação científica sob orientação dos Professores Dr. Fábio Erminio Mingatto e Dr. Leonardo Susumu Takahashi. Em março de 2010, iniciou o curso de mestrado em Aquicultura pelo CAUNESP, Centro de Aquicultura da Unesp, sob orientação da Profa. Dra. Maria Célia Portella. Após conclusão do mestrado em 2012, ingressou no curso de doutorado em Zootecnia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal sob mesma orientação. Em fevereiro de 2015, submeteu o presente estudo para avaliação pela banca examinadora.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Célia Portella, pelos ensinamentos, orientação, apoio, carinho, confiança e muita paciência por todos os seis anos desde o mestrado. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Takata, pela co-orientação, ensinamentos, apoio, por toda colaboração e confiança depositada.

Aos membros participantes do exame geral de qualificação, Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes, Profa. Dra. Marta Verardino de Stéfani, Profa. Dra. Mônica Serra e Dra. Natalia de Jesus Leitão, pela atenção e sugestões.

Aos membros participantes da defesa, Profa. Dra. Débora Machado Fracalossi, Dra. Natalia de Jesus Leitão, Profa. Dra. Rosângela Kiyoko Jomori Bonichelli e Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya por toda atenção, análise crítica e sugestões dadas ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro, por todos os ensinamentos e apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessões da Bolsa de Estudos e Auxílio à Pesquisa (Processo 406311/2012-9).

Ao Sr. Adilson e Sra. Elziane da Piscicultura São Geraldo, por fornecer as larvas de tambaqui para realização da presente pesquisa. Sem esta ajuda o projeto não poderia ser realizado.

À empresa Cargill, pela doação de ingrediente utilizado neste projeto.

Aos funcionários e pesquisadores do Caunesp, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial, a família do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos: Thyssia Bomfim, Ivã Guidini, Amanda Halum, Natália Leitão, Thiago

Freitas, Caroline Nebo, Hellen Buzollo, Thiago Nascimento, Lidiane de Sandre, Lígia Neira, Rudney Weiber, Juliano Coutinho, Frederico Werneck, Andressa Inocente e Thalys Cruz pelo auxílio na implantação do experimento, biometrias, rotina de manejo, aprendizado e momentos de descontração, principalmente nos momentos das refeições. Este trabalho foi realizado com a ajuda de todos vocês. Muito Obrigada.

À família Kojima, por todo o apoio e compreensão desde a graduação. Foram dez anos de distância. “Dôomo-Arigatou”.

Ao meu companheiro Rodrigo Yukihiro Gimbo pelo apoio, cumplicidade e muita paciência nos momentos mais difíceis desde a graduação. Obrigada por me incentivar desde sempre.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| EXIGÊNCIA EM PROTEÍNA BRUTA PARA LARVAS E JUVENIS DE TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>) E O USO DE MISTURA DE AMINOÁCIDOS CRISTALINOS COMO SUBSTITUTO PARCIAL DA PROTEÍNA..... | 1 |
| Resumo..... | 1 |
| PROTEIN REQUIREMENT OF TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>) LARVAE AND JUVENILE AND PARCIAL REPLACEMENT OF PROTEIN BY CRYSTALLINE AMINO ACIDS MISTURE | 2 |
| Abstract..... | 2 |
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 3 |
| Introdução | 3 |
| Revisão de literatura | 5 |
| Objetivos gerais..... | 13 |
| Objetivos específicos | 13 |
| Referências bibliográficas | 14 |
| CAPÍTULO 2 – EXIGÊNCIA PROTEICA DE LARVAS E JUVENIS DE TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>)..... | 28 |
| Resumo..... | 28 |
| CHAPTER 2 - PROTEIN REQUIREMENT OF TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>) LARVAE AND JUVENILES | 29 |
| Abstract..... | 29 |
| Introdução | 30 |
| Material e métodos..... | 32 |
| Resultados | 40 |
| Discussão..... | 53 |

| | |
|--|-----|
| Conclusão | 58 |
| Referências bibliográficas | 59 |
| CAPÍTULO 3 – SUBSTITUIÇÃO DA PROTEÍNA POR MISTURA DE AMINOÁCIDOS CRISTALINOS PARA JUVENIS DE TAMBAQUI <i>Colossoma macropomum</i> | 66 |
| Resumo..... | 66 |
| CHAPTER 3 – SUBSTITUTION OF PROTEIN BY CRYSTALLINE AMINOACIDS TO TAMBAQUI JUVENILES <i>Colossoma macropomum</i> | 67 |
| Abstract..... | 67 |
| Introdução | 68 |
| Material e métodos..... | 70 |
| Resultados | 78 |
| Discussão..... | 89 |
| Conclusão | 94 |
| Referências bibliográficas | 95 |
| Considerações finais..... | 101 |

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 2 – EXIGÊNCIA PROTEICA DE LARVAS E JUVENIS DE TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>) | 28 |
| Tabela 1. Formulação e composição das dietas experimentais para estudo da exigência proteica de larvas juvenis de tambaqui. | 34 |
| Tabela 2. Médias (\pm desvio padrão) de comprimento total (CT), peso (P), ganho em peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), fator de condição (K), sobrevivência (S), taxa de eficiência proteica (TEP) e valor produtivo da proteína (VPP) de larvas de tambaqui (fase 1), após 30 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de proteína. | 42 |
| Tabela 3. Médias (\pm desvio padrão) de comprimento total (CT), peso (P), ganho em peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), fator de condição (K), sobrevivência (S), taxa de eficiência proteica (TEP) e valor produtivo da proteína (VPP) de juvenis pós-metamorfose (fase 2), após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de proteína. | 43 |
| Tabela 4. Porcentagens de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e energia bruta (EB) na composição corporal de larvas de tambaqui (fase 1), ao início do período experimental e após 30 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de inclusão de proteína. | 46 |
| Tabela 5. Porcentagens de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e energia bruta (EB) na composição corporal de juvenis de tambaqui (fase 2), ao início do período experimental e após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de inclusão de proteína. | 47 |
| Tabela 6. Diâmetro médio das cinco fibras menores e maiores da musculatura esquelética de larvas de tambaqui após 30 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com níveis crescentes de proteína bruta. | 51 |
| Tabela 7. Porcentagens de umidade (UM), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e energia bruta (EB) na composição corporal de larvas de tambaqui (fase 1), após 30 dias de alimentação e de juvenis pós-metamorfose (fase 2) após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de inclusão de proteína. | 52 |
| Figura 1. Modelo de regressão polinomial de segundo grau para ganho em peso (GP) de larvas de tambaqui com peso médio inicial de ca. 70 mg (fase 1), alimentados com dietas experimentais semi-purificadas com níveis crescentes de inclusão de proteína, por 30 dias. | 44 |

Figura 2. Modelo *broken-line* para ganho em peso (GP) de juvenis pós-metamorfose de tambaqui com peso médio inicial de ca. 250 mg (fase 2), alimentados com dietas experimentais semi-purificadas com níveis crescentes de inclusão de proteína, por 60 dias. 44

Figura 3. Distribuição da frequência de fibras musculares em diferentes classes de diâmetro (classe 10: $d \leq 10 \mu\text{m}$; classe 20: $10 < d \leq 20 \mu\text{m}$; classe 30: $20 < d \leq 30 \mu\text{m}$; classe 40: $30 < d \leq 40 \mu\text{m}$; classe 50: $d > 40 \mu\text{m}$) em larvas (ca. 70 mg, A) e juvenis (ca. 250 mg, B) de tambaqui ao início do período experimental. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). 48

Figura 4. Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas (ca. 70 mg, A) e juvenis (ca. 250 mg, B) de tambaqui ao início dos experimentos, cortes transversais. Zona de proliferação celular (ZPC); Região do nervo da linha lateral (NL); região intermediária (I); fibras musculares com núcleo periférico (\uparrow); fibras musculares rodeadas por fibras menores (*). Hematoxilina e Floxina B 49

Figura 5. Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de tambaqui (ca. 70 mg), alimentadas por 30 dias com dietas com níveis crescentes de proteína (19,9 a 68,5 % de PB). Observar presença de fibras musculares com núcleo periférico (\uparrow), padrão de crescimento muscular por hiperplasia em mosaico nos peixes de todos os tratamentos pela presença de fibras de maior diâmetro rodeadas por fibras de menor diâmetro (*), e aumento da hipertrofia das fibras musculares com os níveis crescentes de proteína nas dietas. Hematoxilina e Floxina B.....50

Figura 6. Distribuição da frequência de fibras musculares em diferentes classes de diâmetro (classe 10: $d \leq 10 \mu\text{m}$; classe 20: $10 < d \leq 20 \mu\text{m}$; classe 30: $20 < d \leq 30 \mu\text{m}$; classe 40: $30 < d \leq 40 \mu\text{m}$; classe 50: $d > 40 \mu\text{m}$) em larvas de tambaqui (ca. 70 mg), após 30 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com níveis crescentes de proteína bruta (36,4 a 68,5 % de PB). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)...50

Figura 7. Fotomicrografias da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui (ca. 250 mg) alimentados por 60 dias com dietas com níveis crescentes de proteína (19,9 a 68,5 % de PB). Observar fibras musculares com núcleo periférico (\uparrow); padrão de crescimento muscular por hiperplasia em mosaico nos juvenis de todos os tratamentos pela presença de fibras com maior diâmetro rodeadas por fibras de menor diâmetro (*). Hematoxilina e Floxina B.....51

Figura 8. Distribuição da frequência de fibras musculares em diferentes classes de diâmetro (classe 10: $d \leq 10 \mu\text{m}$; classe 20: $10 < d \leq 20 \mu\text{m}$; classe 30: $20 < d \leq 30 \mu\text{m}$; classe 40: $30 < d \leq 40 \mu\text{m}$; classe 50: $d > 40 \mu\text{m}$) em juvenis de tambaqui (ca. 250 mg), após 60 dias de alimentação com dietas semipurificadas com níveis crescentes de proteína bruta (19,9 a 53,2 % de PB). A ausência de letras indica que não houve diferença entre tratamentos pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).....52

CAPÍTULO 3 – SUBSTITUIÇÃO DA PROTEÍNA POR MISTURA DE AMINOÁCIDOS CRISTALINOS PARA JUVENIS DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*..... 67

Tabela 1. Perfil de aminoácidos (%) presentes na caseína e gelatina..... 71

Tabela 2. Formulação e composição das dietas experimentais com substituição do perfil de aminoácidos da mistura proteica (caseína e gelatina) por mistura de aminoácidos cristalinos ou farinha de peixe..... 72

Tabela 3. Perfil de aminoácidos (%) presentes nas dietas experimentais. 73

Tabela 4. Desempenho dos juvenis de tambaqui alimentados com dietas semipurificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP). Peso e comprimento total iniciais de 200 ± 50 mg e 21 ± 2 mm, respectivamente 79

Tabela 5. Composição corporal de juvenis de tambaqui alimentados com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP)..... 81

Tabela 6. Médias e desvio padrão das porcentagens de aminoácidos livres presentes na musculatura dorsal de juvenis de tambaqui, alimentados com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP)..... 83

Tabela 7. Diâmetro médio das cinco fibras menores e maiores da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com níveis crescentes de substituição da fração proteica por mistura de aminoácidos cristalinos nos níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90) e substituição da fração proteica (caseína e gelatina) por farinha de peixe (DFP) 89

Figura 1. Modelo de regressão linear do ganho em peso (GP) dos juvenis de tambaqui após alimentação por 60 dias com dietas com níveis crescentes de substituição da fração proteica por mistura de aminoácidos cristalinos (0, 25, 50, 75 e 90 %) 80

Figura 2. Concentrações (mMol.kg⁻¹) de aminoácidos livres total (Total), aminoácidos indispensáveis (AAI) e aminoácidos dispensáveis (AAD) na musculatura esquelética de juvenis de tambaqui após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP) (não incluído na análise estatística). Médias seguidas da mesma letra em cada conjunto de resultados não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)..... 84

Figura 3. Distribuição da frequência de fibras musculares em diferentes classes de diâmetro em juvenis de tambaqui ao início do período experimental. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05) 85

Figura 4. Fotomicrografia da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui ao início do experimento. Corte transversal, Hematoxilina e Floxina B. Fibras musculares com núcleo periférico (↑); fibras musculares rodeadas por fibras menores (*)..... 85

Figura 5. Fotomicrografias da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui alimentados por 60 dias com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP). Fibras maiores rodeadas por fibras menores (*); núcleo periférico (↑). Notar a presença de fibras musculares com diâmetro maior nos juvenis do tratamento DFP e maior proporção de fibras com diâmetro menor nos juvenis dos tratamentos D75 e D90. Hematoxilina e Floxina B..... 87

Figura 6. Distribuição da frequência de fibras musculares em diferentes classes de diâmetro (classe 10: d≤10µm; classe 20: 10<d≤20 µm; classe 30: 20<d≤ 30 µm; classe 40: 30<d≤40 µm; classe 50: d>40 µm) em juvenis de tambaqui, após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP) (não incluído na análise estatística). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)..... 88

LISTA DE ABREVIações

AAD – Aminoácidos Dispensáveis
AAI – Aminoácidos Indispensáveis
Ala – Alanina
Arg – Arginina
Asp – Ácido Aspártico
ca – *circa* (cerca em latim)
CAA – Conversão Alimentar Aparente
CT – Comprimento Total
Cys - Cisteína
EB – Energia Bruta
ED – Energia Digestível
EE – Extrato Etéreo
Glu – Ácido Glutâmico
Gly – Glicina
GP – Ganho em Peso
His – Histidina
Hyp – Hidroxiprolina
Ile – Isoleucina
K – Fator de Condição
Leu – Leucina
Lys – Lisina
Met – Metionina
MM – Matéria Mineral
MS – Matéria Seca
P – Peso
PB – Proteína Bruta
PD – Proteína Digestível
Phe – Fenilalanina
Pro – Prolina
S – Sobrevivência
Ser – Serina
Tau – Taurina
TCE – Taxa de Crescimento Específico
TEP – Taxa de Eficiência Proteica
Thr – Treonina
Val – Valina
VPP – Valor Produtivo da Proteína

EXIGÊNCIA EM PROTEÍNA BRUTA PARA LARVAS E JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E O USO DE MISTURA DE AMINOÁCIDOS CRISTALINOS COMO SUBSTITUTO PARCIAL DA PROTEÍNA

RESUMO - Esta tese está dividida em três capítulos, sendo o primeiro uma revisão sobre os temas estudados e, os seguintes, os resultados da pesquisa, descritos na forma de artigos para publicação. Foram realizados dois experimentos para determinar a exigência proteica de larvas (ca. 70 mg de peso inicial) e juvenis pós-metamórficos (ca. 250 mg de peso inicial) de tambaqui *Colossoma macropomum*, e um experimento para determinar o nível máximo de substituição da fração proteica das dietas semi-purificadas por uma mistura de aminoácidos cristalinos. Para o primeiro estudo de exigência proteica de tambaquis na primeira fase de desenvolvimento, seis dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de proteína foram ofertadas (D36,4; D42,1; D47,5; D53,2; D62,0; D68,5), e para a segunda fase de desenvolvimento foram ofertadas sete dietas com quantidades crescentes de proteína (D19,9; D26,2; D31,9; D36,4; D42,1; D47,5; D53,2). Os níveis de 49,46 % e 31,9 % de proteína foram suficientes para atender às exigências em proteína bruta de larvas de tambaqui e juvenis pós-metamorfose, respectivamente. Os níveis de proteína afetaram o desenvolvimento das fibras musculares das larvas ($P < 0,05$), enquanto os juvenis demonstraram diferenças de crescimento muscular entre os tratamentos somente para uma classe de diâmetro de fibra ($P > 0,05$). No segundo estudo, foram utilizados juvenis de tambaqui com peso médio inicial de 200 mg e testadas cinco dietas com níveis crescentes de substituição do perfil de aminoácidos da fração proteica das dietas (caseína e gelatina) por uma mistura de aminoácidos cristalinos nos níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 %. O desempenho e o perfil de aminoácidos livres na musculatura esquelética dos juvenis foram afetados com o aumento dos níveis de substituição. No entanto, o desenvolvimento das fibras musculares dos juvenis que receberam dietas com substituição (0 a 90 %) foi semelhante entre os tratamentos ($P > 0,05$), diferindo somente para as fibras menores que 10 μm ($P < 0,05$). Os juvenis que receberam as dietas com 25 e 50 % de substituição foram capazes de demonstrar crescimento semelhante aos juvenis do tratamento sem substituição. Desta forma, os resultados encontrados neste estudo poderão contribuir com estudos futuros relacionados à exigência nutricional específica para a fase inicial de desenvolvimento do tambaqui.

Palavras-chave: aminoácidos indispensáveis, aminoácidos dispensáveis, crescimento inicial, crescimento muscular, dieta semipurificada, níveis de proteína bruta

**PROTEIN REQUIREMENT OF TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)
LARVAE AND JUVENILE AND PARCIAL REPLACEMENT OF PROTEIN BY
CRYSTALLINE AMINO ACIDS MISTURE**

ABSTRACT – This thesis is divided into three chapters, the first one presents an overview of the state-of-art of the subject, and the others describe the results, written as articles for publication. Two experiments were conducted to determine the protein requirement of larvae (ca. 70 mg initial weight) and post-metamorphosis juveniles (ca. 250 mg initial weight) of tambaqui *Colossoma macropomum*, and another experiment was carried out to determine the maximum level of the protein fraction that could be replaced by a mixture of synthetic amino acids in semi purified diets. For the study of protein requirement of tambaqui in first stage of development, six semi purified diets with increasing levels of protein were offered (D36.4; D42.1; D47.5; D53.2; D62.0; D68.5). In second stage of development, seven semi purified diets with increasing levels of protein were offered to tambaqui juveniles (D19.9; D26.2; D31.9; D36.4; D42.1; D47.5; D53.2). The levels of 46.89 % and 30.65 % of crude protein were enough to meet the protein requirement of tambaqui larvae and post-metamorphic juveniles, respectively. Protein levels affect the development of muscle fibers in tambaqui larvae ($P < 0.05$), and only one diameter muscle fiber class in the juveniles ($P > 0.05$). In the second study, tambaqui juveniles with initial weight of 0.2 g were fed with five semi purified diets with increasing levels of protein (casein and gelatin) replacement by crystalline amino acids mixture at levels of 0, 25, 50, 75 and 90 %. The performance of juveniles and free amino acids profile in muscle were affected with increasing replacement levels ($P < 0.05$). However, muscle fibers development of juveniles fed diets with protein replacement (0 to 90 %) was similar among treatments ($P > 0.05$), differing only for smaller fibers than 10 μm ($P < 0.05$). The juveniles fed diets with 25 and 50 % of replacement showed similar results than the juveniles of treatment without replacement. Thus, the findings of this study can contribute to future research of specific nutritional requirement for the initial development of tambaqui.

Key-words: indispensable amino acids, dispensable amino acids, initial growth, muscle growth, semi-purified diets, crude protein levels

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é apontado como uma espécie importante para a piscicultura nacional por apresentar características zootécnicas favoráveis à criação e comercialização. Os dados mais recentes indicam que o tambaqui é a espécie nativa mais produzida no país, alcançando 88,718 mil toneladas em 2013 (IBGE, 2013), sendo responsável por 22,6% de toda a produção nacional de peixes. Por esses motivos, muitos estudos já foram realizados com a espécie com relação à sua fisiologia (VAN DER MEER, 1995; VIEIRA et al., 1999; FRACALOSSO et al., 2001; ALMEIDA et al., 2006a; CHAGAS et al., 2006; ARIDE et al., 2007; CORRÊA et al., 2007; ARIDE et al., 2010) e ao manejo de criação e produção (HANCZ, 1993; GOMES et al., 2001, 2003; BRANDÃO et al., 2004; ALMEIDA et al., 2006b; ARIDE et al., 2006; , GOMES et al., 2006; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2007 GOMES; SILVA, 2009). Ainda, vários outros estudos foram realizados relacionados à alimentação (MEROLA e CANTELMO, 1987; SEVILLA; GUNTHER, 2000; VIDAL JUNIOR et al., 2004; NWANNA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; BRANDÃO et al., 2009; LOCHMANN et al., 2009) e exigências em proteína e energia (HERNÁNDEZ et al., 1995; VAN DER MEER et al., 1997; CAMARGO et al., 1998; VIDAL JUNIOR et al., 1998; OISHI et al., 2010; SANTOS et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011). Porém, informações sobre as exigências qualitativas e quantitativas de nutrientes para as formas jovens de tambaqui ainda não são definidas devido às divergências observadas entre os resultados obtidos (RODRIGUES, 2014). Uma possível razão está no fato que alguns autores desconsideram as interações entre os nutrientes presentes nos ingredientes que compõem as dietas práticas utilizadas na maioria dos estudos (FRACALOSSO et al., 2013).

A nutrição é um dos pontos críticos da fase de desenvolvimento inicial dos peixes (VALENTE et al., 2013), devido ao crescimento elevado que os animais apresentam nesta fase. Embora sejam necessárias altos níveis de

proteína nas dietas para larvas e juvenis, o excesso de proteína não garante crescimento adequado dos animais (ARARIPE et al., 2011), pois parte da proteína ingerida é direcionada para síntese de novas proteínas, enquanto que o excesso poderá ser convertido em energia (WILSON, 2002). Além disso, o excesso de proteína dietética aumenta a excreção de compostos nitrogenados (YANG et al., 2002) no ambiente de criação, o que prejudica a ingestão de alimento, a saúde e o crescimento dos peixes (McGOOGAN; GATLIN III, 1999; TIBBETTS et al., 2000; ZHANG et al., 2010).

A farinha de peixe é a fonte proteica mais utilizada no preparo de dietas para organismos aquáticos, devido à sua alta palatabilidade e ao balanço de aminoácidos essenciais que se aproxima das exigências dos peixes (NUNES et al., 2014; KHAOIAN et al., 2014). Porém, esse ingrediente possui custo elevado, tornando a busca por fontes alternativas o objetivo perseguido por muitos autores (GATLIN et al., 2007; KAUSHIK; HEMRE, 2008; TACON; METIAN, 2009a,b; 2010). Porém, as fontes alternativas de proteína geralmente são deficientes em alguns aminoácidos indispensáveis (PERES; OLIVA-TELES, 2005; JOBLING, 2015).

A suplementação com aminoácidos cristalinos é uma das medidas para a redução de custos da formulação de dietas sem prejudicar o balanço de aminoácidos cristalinos. Estudos com larvas e juvenis de peixes demonstraram que a substituição parcial ou total da proteína dietética por aminoácidos cristalinos (MARCOULI et al., 2004; PERES; OLIVA-TELES, 2005; LI et al., 2013) ou peptídeos (ZAMBONINO INFANTE et al., 1997; DABROWSKI et al., 2003; TERJESEN et al., 2006), além da suplementação de dietas com estes nutrientes (ARAGÃO, et al., 2004; PINTO et al., 2010) podem ser utilizadas adicionalmente ao uso de ingredientes alternativos à farinha de peixe.

Apesar da existência de estudos sobre alimentação e nutrição do tambaqui (HERNÁNDEZ et al., 1995; VAN DER MEER et al., 1997; VIDAL JUNIOR et al., 1998; OISHI et al., 2010; SANTOS et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011), praticamente não há informações sobre as exigências em proteína e possibilidade de substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos nas fases iniciais de desenvolvimento da espécie. Assim, o presente estudo

visa suprir essa lacuna por meio da avaliação do desempenho produtivo, composição corporal e crescimento da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui alimentados com dietas com quantidades crescentes de proteína e dietas com níveis crescentes de substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos.

Os resultados obtidos neste estudo não apenas poderão ser úteis para futuros experimentos para determinação do perfil de aminoácidos adequados nas fases iniciais de peixes nativos, como também beneficiarão diretamente o setor produtivo, pela possibilidade de proporcionar o aumento da produtividade por meio do uso de dietas ideais para esta espécie.

REVISÃO DE LITERATURA

Fontes proteicas

O principal ingrediente proteico das formulações de dietas utilizadas na aquicultura é a farinha de peixe, devido ao alto valor biológico e balanço de aminoácidos indispensáveis (NRC, 2011). Porém, o uso de produtos derivados de peixe, como a farinha e óleo de peixe, nas formulações de dietas para animais representa um dilema, uma vez que os peixes poderiam ser utilizados diretamente para alimentação humana (FAO, 2015). Desta forma, além da redução de custos, há necessidade da indústria aquícola em diminuir a inclusão de farinha de peixe por meio da utilização de fontes alternativas de proteína para o desenvolvimento de uma aquicultura sustentável (KHAOIAN et al., 2014).

Ingredientes como farelo de soja, glúten de milho, farinha de carne e ossos, concentrado proteico de soja, farinha de penas, farinha de sangue, subprodutos da pesca, resíduos de processamento de farinha (NUNES et al., 2014) ou mistura de farinhas de origem animal (FREITAS, 2015) são algumas opções de substitutos à farinha de peixe. Alguns fatores devem ser levados em consideração quanto ao uso de proteínas de origem vegetal em substituição à farinha de peixe além do custo, como limitações nutricionais relacionadas ao

perfil de aminoácidos dispensáveis e indispensáveis como a lisina e metionina, níveis de cálcio e fósforo, vitaminas hidro e lipossolúveis (CONTRERAS, 1999) digestibilidade destes ingredientes, fatores anti nutricionais, impactos ambientais (HARDY, 2010) e aceitabilidade das dietas (BRINKER; REITER, 2011).

Proteína e aminoácidos

Um dos principais nutrientes das formulações de dietas é a proteína, pois interfere diretamente no ganho em peso, na conversão alimentar e na composição corporal (NRC, 2011), pois a proteína corporal está em contínuo processo de síntese e degradação (DABROWSKI; GUDERLEY, 2002). Após a ingestão da proteína, os processos de digestão ou hidrólise liberam os aminoácidos livres que são absorvidos pelo trato gastrointestinal e distribuídos pelo sangue para todos os órgãos e tecidos para síntese proteica e reposição de proteínas degradadas dos tecidos e órgãos (PORTZ; FURUYA, 2013). As proteínas são os principais constituintes dos tecidos estruturais e de proteção como ossos, ligamentos, escamas e pele; dos tecidos moles como órgãos e músculos, além dos fluidos corporais (LALL; ANDERSON, 2005). As funções das proteínas podem ser classificadas em metabólicas e estruturais. As funções metabólicas incluem transporte (hemoglobina, albumina e transferrina), controle metabólico (hormônios), contração muscular (miosina e actina), catálise de transformações químicas (enzimas) e de proteção contra infecções (imunoglobulinas e interferon). Enquanto as funções estruturais incluem sustentação estrutural das células e tecidos como o colágeno e queratina (BUXBAUM, 2007).

Diversas dietas para peixes são formuladas com altos teores proteicos, porém a utilização de altos níveis não garante melhor desempenho dos animais (ARARIPE et al., 2011). Em estudo com juvenis de *Labeo fimbriatus* alimentados com níveis crescentes de proteína (200, 250, 300, 350 e 400 g.kg⁻¹), o desempenho em crescimento foi superior e a conversão alimentar foi melhor nos juvenis que receberam as dietas com a quantidade de proteína de 250 a 350 g.kg⁻¹ (JENA et al., 2012). Mesma tendência foi observada em

juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentados com níveis crescentes de proteína (220, 260, 300, 340 or 380 g.kg⁻¹), em que a quantidade mínima de proteína para atender a exigência foi de 270 g.kg⁻¹ (BICUDO et al., 2010). Enquanto que para juvenis de tambaqui na faixa de peso de 6,5 a 175 g alimentados com níveis crescentes de proteína digestível (14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32 %), a exigência em proteína foi atendida pela dieta contendo 29 % de proteína digestível (32,6 % de proteína bruta) (BUZOLLO, 2014). Quando em excesso, parte da proteína ingerida é utilizada para síntese de outras proteínas e a restante é convertida em energia (WILSON, 2002), aumentando o teor de lipídios na carcaça (ABIMORAD; CARNEIRO, 2007) e a excreção de compostos nitrogenados como a amônia (KIM et al., 2004), que diminuem a ingestão alimentar e afetam o crescimento (SCHRAM et al., 2014). Por outro lado, a deficiência proteica também causa redução no crescimento mobilizando a proteína de alguns tecidos para a manutenção de funções vitais (WILSON, 2002; KIM et al., 2004).

A exigência em proteína, e conseqüentemente de aminoácidos, varia de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento, temperatura, salinidade e fatores de estresse associados à criação dos peixes (ABDEL-TAWAB et al., 2010; PIROZZI et al., 2010). Nos peixes, a exigência em proteína diminui com o aumento do tamanho e idade (WILSON, 2002). Na fase de crescimento inicial, a síntese de proteínas excede a degradação, e o balanço entre estes dois processos resulta na deposição ou acréscimo de proteína (MILLWARD, 1989).

A necessidade dos peixes, como a de outros animais, não está apenas na quantidade de proteína, mas, principalmente, no balanço adequado em aminoácidos (WILSON, 2002; PEZZATO et al., 2004; ZHOU et al., 2010). A maioria dos microorganismos e das plantas é capaz de sintetizar os 20 aminoácidos, enquanto os animais obtêm alguns aminoácidos somente por meio da alimentação. Os aminoácidos são classificados tradicionalmente em dispensáveis e indispensáveis (WU, 2009). Os aminoácidos arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina não são sintetizados pelo organismo animal, ou são sintetizados em

quantidades insuficientes e, por isso, são denominados aminoácidos indispensáveis. Os aminoácidos condicionalmente indispensáveis, como cisteína, glutamina, prolina e taurina normalmente são sintetizados em quantidades suficientes pelo organismo, porém devem ser fornecidos nas dietas em condições em que as taxas de utilização são maiores que as taxas de síntese (LI et al., 2009). Enquanto os aminoácidos dispensáveis podem ser sintetizados pelo organismo por meio de precursores (ZUBAY, 1993; LI et al., 2009), como alanina, asparagina, aspartato, glicina, glutamato, serina e tirosina (WU, 2013).

Os aminoácidos presentes nas dietas podem ter origem em diferentes fontes, como proteínas, peptídeos ou aminoácidos cristalinos (ZHANG et al., 2006). Após a digestão destas fontes, os aminoácidos livres são utilizados para síntese proteica e energia para o catabolismo aeróbico (PORTELLA et al., 2013). Além das fontes exógenas, os aminoácidos livres nos tecidos podem ter origem em fontes endógenas, pela quebra de proteína dos tecidos (KAUSHIK; SEILIEZ, 2010). Os aminoácidos do “pool” corporal são utilizados para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares e são removidos por processos oxidativos (WILSON, 2002). Assim, o balanço dos nutrientes (YAMAMOTO et al., 2000), o nível e a forma de inclusão de aminoácidos na dieta (ROJAS-GARCÍA; RØNNESTAD, 2003; DABROWSKI et al., 2005, 2010) podem afetar o perfil de aminoácidos livres corporal (KWASEK et al., 2009) e o perfil de aminoácidos livres da musculatura dos peixes (DABROWSKI et al., 2010).

A utilização de aminoácidos cristalinos e peptídeos em substituição total à proteína intacta em dietas para peixes pode fornecer uma quantidade excessiva de aminoácidos livres que são excretados diretamente pelas brânquias e/ou urina, diminuindo o potencial de crescimento dos animais (DABROWSKI et al., 2010). Larvas de *Vimba vimba* (KWASEK et al., 2009) e juvenis de *Cyprinus carpio* (KWASEK et al., 2010) alimentados com dietas contendo aminoácidos na forma cristalina ou peptídeo apresentaram desempenho de crescimento superior quando receberam dieta com caseína e

gelatina do que os peixes alimentados com as dietas baseadas em peptídeos e aminoácidos.

Entretanto, a substituição parcial da farinha de peixe por aminoácidos cristalinos e peptídeos não afeta o desempenho em crescimento de larvas e juvenis de peixes. A substituição de até 20% da proteína por aminoácidos na forma de di- e tripeptídeos proporcionou efeito positivo no crescimento e sobrevivência de larvas de *Dicentrarchus labrax*, enquanto as substituições acima de 40% resultaram na redução do desempenho (ZAMBONINO INFANTE et al., 1997).

O uso de mistura de aminoácidos cristalinos na substituição de 45% da proteína da farinha de peixe em dietas para juvenis de *Sparus aurata* L. (MARCOULI et al., 2004) e 50% em dietas para juvenis de *Solea senegalensis* (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2014) proporcionou crescimento semelhante ao observado com o uso exclusivo da proteína da farinha de peixe. Crescimento semelhante também foi observado entre juvenis de *Scophthalmus maximus* que receberam dieta controle com farinha de peixe e dieta com substituição de 25 % da farinha de peixe por aminoácidos livres (PERES; OLIVA-TELES, 2005). Em uma espécie filogeneticamente próxima e da mesma família que o tambaqui, Tesser et al. (2005) demonstraram que a suplementação de arginina em 5,0 e 10,0 g.kg⁻¹ na forma de dipeptídeos ou aminoácido livre em dietas para juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* proporcionou crescimento semelhante aos juvenis que receberam dieta com arginina na base de proteína íntegra como caseína-glúten de trigo e caseína-gelatina.

Musculatura esquelética

O produto de maior valor comercial nos peixes é a musculatura esquelética que pode variar de 60 a 70% do peso corporal total (AYALA et al., 2010). A proteína é o principal constituinte do tecido muscular com porcentagens de 60 a 75% da composição centesimal da matéria seca em peixes juvenis e adultos (WILSON, 2002), e acima de 50% em larvas (CONCEIÇÃO et al., 2003).

Diferentes tipos de fibras formam a musculatura esquelética nos peixes, e esta é dividida em três compartimentos: superficial, intermediário e profundo (LOVE, 1970). No compartimento superficial ou vermelho estão presentes fibras com diâmetro de 25 a 45 μm (JOHNSTON, 1999), de contração lenta, metabolismo oxidativo, com muitas mitocôndrias, mioglobinas e lipídios (BANKS, 1992; DAL PAI-SILVA et al., 1995; BOSCO et al., 2000, CARVALHO et al., 2000). Estas fibras realizam movimentos lentos necessários para a sustentação e migração a longas distâncias (JOHNSTON, 1980), e encontram-se distribuídas em uma fina camada na região subdermal ao longo do corpo do animal e também mais concentradas na região do nervo da linha lateral (JOHNSTON, 1999; AGUIAR et al., 2005). Enquanto o compartimento profundo ou branco é formado por um mosaico de fibras de menor diâmetro entre fibras maiores (acima de 50 μm), apresenta contração rápida, metabolismo glicolítico (JOHNSTON; HORNE, 1994; ROWLERSON; VEGGETTI, 2001), e baixa concentração de mioglobina (BOSCO et al., 2000; NEVES et al., 2000). Essas fibras realizam movimentos bruscos de natação para a captura de alimento e fuga de predadores (JOHNSTON, 1980). O compartimento intermediário apresenta fibras de contração rápida e metabolismo oxidativo/glicolítico e se localiza entre os compartimentos vermelho e branco (WEATHERLEY; GILL, 1987).

O início da formação do tecido muscular em peixes ocorre durante a fase de embriogênese, pela migração e alongamento de células adaxiais que formarão as fibras vermelhas e o septo transversal (JOHNSTON, 1980; CURRIE; INGHAM, 2001; JOHNSTON; HALL, 2004). Logo após a eclosão, os mioblastos se proliferam e se diferenciam para dar origem a novas fibras ou se incorporam em fibras já formadas durante a embriogênese (JOHNSTON et al., 2011). O crescimento muscular da maioria dos vertebrados ocorre principalmente por hipertrofia de fibras formadas durante a embriogênese, porém, em peixes, o crescimento muscular pós larval ocorre por meio da hiperplasia e hipertrofia (CARPENE; VEGGETTI, 1981; EGGINTON; JOHNSTON, 1982). A hipertrofia é o aumento do volume das fibras já existentes, enquanto a hiperplasia é o aumento no número de fibras de forma

estratificada e em mosaico (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001; DALPAI-SILVA et al., 2007).

A proliferação celular nas zonas germinais das regiões dorsal e ventral dos miômeros aumentam a espessura das camadas musculares, características de hiperplasia estratificada que ocorre na fase larval dos peixes (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001; JOHNSTON, 2006). Durante a fase juvenil dos peixes, a aparência de mosaico formada por fibras de diferentes tamanhos e estágios de diferenciação caracterizam a hiperplasia em mosaico (JOHNSTON, 1999). Na hipertrofia, mioblastos indiferenciados do tecido muscular adulto (células satélites) aumentam o diâmetro das fibras por meio da fusão com fibras existentes contribuindo com o acréscimo de núcleos para a síntese de miofibrilas (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001).

A taxa de crescimento dos peixes depende do balanço entre os mecanismos hipertrófico e hiperplásico que são influenciados por vários fatores bióticos e abióticos, como temperatura (ASSIS et al., 2004), fotoperíodo, alimentação (FAUCONNEAU; PABOEUF, 2001) e composição da dieta (JOHNSTON, 2006) que podem interferir no número, tamanho e proliferação das fibras musculares nas fases larval e juvenil. Em peixes que atingem grande porte na fase adulta, o crescimento muscular ocorre pela hiperplasia em mosaico e hipertrofia durante todas as fases de desenvolvimento. Nos peixes de menor tamanho, o crescimento muscular ocorre principalmente por hipertrofia das fibras musculares formadas durante a embriogênese (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001).

Na fase inicial de desenvolvimento, os peixes necessitam de nutrientes em quantidade e qualidade para proporcionar o crescimento adequado (DOU et al., 2005; PORTELLA; DABROWSKI, 2008; SHAN et al., 2009). A nutrição deficiente durante a fase inicial de desenvolvimento pode ocasionar mudanças no desenvolvimento e celularidade da musculatura dos peixes (LEITÃO et al., 2011) e prejuízo no desempenho em fases posteriores (KOJIMA et al., 2015). Em juvenis de tambaqui na faixa de peso de 6,5 a 174,6 g alimentados com níveis proteicos de 14 a 32 % de proteína digestível (PD) foi observado aumento na frequência de fibras de maior diâmetro (50 μm) nos juvenis que

receberam as dietas de 29 e 32 % de PD (BUZZOLO, 2014), enquanto larvas de *Argyrosomus regius* apresentaram menor diâmetro médio de fibras musculares quando alimentados com a dieta com maior teor proteico (SAAVEDRA et al., 2016).

A Espécie: Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Os produtos do setor de pesca e aquicultura são fontes importantes de proteínas e subsistência para muitas famílias (OECD-FAO, 2015). O tambaqui é uma das principais espécies nativas criadas no Brasil; no ano de 2013 a produção de tambaqui foi responsável por mais de 20% da produção total de peixes (IBGE, 2013). Fatores como facilidade para obtenção de juvenis, elevado valor comercial e potencial produtivo do tambaqui possibilitaram esta expansão (GOMES et al., 2010). A criação desta espécie ocorre principalmente em três fases: a larvicultura, em que os peixes são criados desde a eclosão até o peso médio de 0,5 a 1g, em 30 a 45 dias; produção de juvenis em que o peso médio individual dos peixes atinge de 40 a 50 g, em aproximadamente 60 dias; e engorda em que o peso de abate desejado influencia o tempo de criação (DAIRIKI; SILVA, 2011), sendo geralmente o peso comercial de abate acima de 1,0 kg (OLIVEIRA et al., 2013).

Muitas pesquisas relacionadas à nutrição da espécie já foram realizadas sobre o hábito alimentar (SILVA et al., 2000; 2003 a,b); vitaminas e minerais (CHAGAS; VAL, 2003; ARIDE et al., 2010); enzimas do trato gastrointestinal e adição de enzimas exógenas nas dietas (NUNES et al., 2006; SILVA et al., 2007; MENDONÇA et al., 2012); alimentos alternativos (TERAZAS et al., 2002; SILVA et al., 2003b; GUIMARÃES; STORTI FILHO, 2004; CORRÊA et al., 2007; OISHI, 2007; PEREIRA JUNIOR et al 2013); digestibilidade de ingredientes (VIDAL JUNIOR et al., 2004; SILVA et al., 2003a; 2007); exigência proteica (VAN DER MEER et al., 1997; VIDAL JUNIOR et al., 1998; OISHI et al., 2010; SANTOS et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011; BUZZOLO, 2014), além da suplementação e exigência em aminoácidos (BRANDÃO et al., 2009; COSTA, 2014; NASCIMENTO, 2015). Porém, estudos relacionados à exigência

em proteína e aminoácidos específicos para o tambaqui na fase inicial de crescimento ainda são escassos e controversos (OLIVEIRA et al., 2013; RODRIGUES, 2014). Desta forma, pesquisas direcionadas à exigência em proteína e efeitos da substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos são necessárias para futuros experimentos que determinarão o perfil de aminoácidos adequados, além de proporcionar o aumento da produtividade por meio do uso de dietas ideais para esta espécie em fase inicial do crescimento.

OBJETIVOS GERAIS

Determinar a exigência em proteína para juvenis de tambaqui e obter informações sobre a substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos nas fases iniciais de desenvolvimento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a exigência em proteína bruta em larvas e juvenis de tambaqui;
- Determinar a proporção máxima de substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos em dietas semi-purificadas para juvenis de tambaqui;
- Verificar as alterações no crescimento, taxas de sobrevivência e composição corporal de juvenis de tambaqui alimentados com dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de proteína e dietas com níveis crescentes de substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos;
- Verificar o desenvolvimento da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui alimentados com dietas com quantidades crescentes de proteína e dietas com níveis crescentes de substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-TAWWAB, M.; AHMAD, M. H.; KHATTAB, Y. A. E.; SHALABY, A. M. E. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 298, p. 267–274, 2010.

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles-fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, p.1–9, 2007.

AGUIAR, D.H.; BARROS, M. M.; PADOVANI, C. R.; PEZATTO, L. E.; DAL PAI-SILVA, M. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Journal of Fish Biology**, v. 67, p. 1-12, 2005.

ALMEIDA, L. C.; LUNDSTEDT, L. M.; MORAES, G. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, p. 443 – 450, 2006a.

ALMEIDA, N. M.; BATISTA, G. M.; KADAIIRA, M.; LESSI, E. Alterações *post-mortem* em tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservados em gelo. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1288 – 1293, 2006b.

ALMEIDA, L. C.; AVILEZ, I. M.; HONORATO, C. A.; HORI, T. S. F.; MORAES, G. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v.17, p. 253 – 262, 2011.

ARAGÃO, C.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; DINIS, M. T.; FYHN, H. J. Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. **Aquaculture**, v. 234, p.429-445, 2004.

ARARIPE, M. N. B. A.; ARARIPE, H. G. A.; LOPES, J. B.; BRAGA, P. L. C.; BRAGA, T. E. A.; HOSMYLTON, A. Redução da proteína bruta com suplementação de aminoácidos em rações para alevinos de tambatinga. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 9, p. 1845 - 1850, 2011.

ARIDE, P. H. R.; ROUBACH, R.; NOZAWA, S. R.; VAL, A. L.; Tambaqui growth and survival when exposed to different photoperiods, **Acta Amazonica**, v. 36, p. 381-384, 2006.

ARIDE, P. H. R.; ROUBACH, R.; VAL, A. L. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 588 - 594, 2007.

ARIDE, P. H. R.; FERREIRA, M. S.; DUARTE, R. M.; OLIVEIRA, A. M.; FREITAS, D. V.; SANTOS, A. L. W.; NOZAWA, S. R.; VAL, A. L. Ascorbic acid (Vitamin C) and iron concentration in Tambaqui, *Colossoma macropomum*, iron absorption. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 2; p. 291 – 297, 2010.

ASSIS, J. M. F. de; CARVALHO, R. F.; BARBOSA, L.; AGOSTINHO, C. A.; DAL PAI SILVA, M. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, v. 237, p. 251-267, 2004.

AYALA, I.; SANTAELLA, M.; MARTINEZ, C.; PERIAGO, M. J.; GIL, F.; BLANCO, A.; ALBORS, O. L. Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. **Food Science and Technology**, v.43, p. 465-45, 2010.

BANKS, W.J. Tecido muscular. In: **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. p.215-236.

BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; CYRINO, J. E. P. Growth performance and body composition of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) in response to dietary protein and energy levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, p.213-222, 2010.

BOSCO, N. B.; DAL PAI, V.; DAL PAI-SILVA, M. Estudo morfológico e histoquímico do tecido muscular esquelético da Piraputanga (*Brycon hilarii*): Osteocytes, Pisces. In: IX Congresso Luso Brasileiro de Anatomia. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 17, p.107-107, 2000.

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; ARAÚJO, L. D. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 357 – 362, 2004.

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

BRINKER, A.; REITER, R. Fish meal replacement by plant protein substitution and guar gum addition in trout feed, Part I: Effects on feed utilization and fish quality. **Aquaculture**, v. 310, p. 350 – 360, 2011.

BUXBAUM, E. Fundamentals of protein structure and function. New York: Springer. 2007.

BUZOLLO, H. **Exigência de proteína digestível em dietas para juvenis de tambaqui e a dinâmica do crescimento muscular por aspectos morfológicos e turnover isotópico do carbono-13 e do nitrogênio-15**. 109 f. (Tese de Doutorado em Zootecnia.) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

CAMARGO, A. C. S.; VIDAL JR., M. V.; DONZELE, J. L.; ANDRADE, D. R.; SANTOS, L. C. Níveis de energia metabolizável para tambaqui (*Colossoma macropomum*) dos 30 aos 180 gramas de peso vivo. 1. Composição das carcaças. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, p. 409 – 415, 1998.

CARPENÈ, E.; VEGGETTI, A. Increase in muscle fibers in the lateralis muscle (white portion) of Mugilidae (Pisces, Teleostei). **Experientia**, v. 37, p.191-193, 1981.

CARVALHO, R. F.; SILVA, M. D. P.; DELÍCIO, H. C.; ASSIS, J. M. F. Análise morfológica da musculatura miotomal de *Brycon cephalus*. **Brazilian Journal of Morphological Sciences** v. 17, p.181-181, 2000.

CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 397 – 402, 2003.

CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. Ascorbic acid reduces the effects of hypoxia on the Amazon fish tambaqui. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p.608 – 612, 2006.

CONCEIÇÃO, L.E.C.; GRASDALEN, H.; RØNNESTAD, I. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. **Aquaculture**, v.227, p.221-232, 2003.

CONTRERAS, G. E. A new approach to the evaluation of fishmeal quality by reaction with 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid. In: Y. K. Chang and S. S. Wang. **Advances in extrusion Technology**. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PE, USA, p. 179-189, 1999.

CORRÊA, C. F.; AGUIAR, L. H.; LUNDSTEDT, L.; MORAES, G. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 147, p. 857 - 862, 2007.

COSTA, E. L. **Exigência de lisina e estimativa dos aminoácidos essenciais para tambaqui, *Colossoma macropomum* (cuvier, 1818)**. 60f. Dissertação (Mestre em Biologia de Água Doce e Pesca Interior). Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, Manaus, 2014.

CURRIE, P. D.; INGHAN, P. W. Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. In: Johnston IA, **Muscle Development and Growth**, Academic Press, p.1-17, 2001.

DABROWSKI, K.; GUDERLEY, H. Intermediary metabolism. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.) Fish nutrition. 3.ed. Washington: Academic Press, p.309-365, 2002.

DABROWSKI, K.; TERJESEN, B.,F.; ZHANG, Y.; PHANG, J.; LEE K. J. A concept of dietary dipeptides: a step to resolve the problem of amino acid availability in early life of vertebrates. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 2885 – 2894, 2005.

DABROWSKI, K.; ZHANG, Y.; KWASEK, K.; HLIWA, P.; OSTASZEWSKA, T. Effects of protein-, peptide- and free amino acid-based diets in fish nutrition. **Aquaculture Research**, v. 41, p.668 - 683, 2010.

DAIRIKI, J. K.; SILVA, T. B. A. Revisão de literatura: exigências nutricionais do tambaqui - compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. Série Documentos (Embrapa Amazônia Ocidental), v. 91, p. 1-44, 2011.

DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R.F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.21-31, 2007.

DAL PAI-SILVA, M.; DAL PAI, V.; MOTA, D. L.; RODRIGUES, A. C. Histochemical study of muscle fiber types in *Synbranchus marmoratus* Boch, 1795. **Annal of Anatomy**, v. 177, p. 65-70, 1995.

DOU, S.; MASUDA, R.; TANAKA, M.; TSUKAMOTO, K. Effects of temperature and delayed first feeding on survival and growth of Japanese flounder larvae. **Journal of Fish Biology**, v.66, p.362–377, 2005.

EGGINTON, S.; JOHNSTON, I. A. A morphometric analysis of regional differences in myotomal muscle ultrastructure in the juvenile eel. **Cell Tissue Research**, v. 222, p.579-596, 1982.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The state of world fisheries and aquaculture. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>

FAUCONNEAU, B.; PABOEUF, G. Muscle fiber diversity and plasticity. In: **Muscle Development and Growth**, JOHNSTON, I. A. (Ed) London: Academic Press, 318 p., 2001.

FRACALOSSO, D. M.; ALLEN, M. E.; YUYAMA, L. K.; OFTEDAL, O. T. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. **Aquaculture**, v.192, p. 321 – 332, 2001.

FRACALOSSO, D. M.; RODRIGUES, A. P. O.; SILVA, T. S. C.; CYRINO, J. E. P. Técnicas experimentais em nutrição de peixes. In: FRACALOSSO, D.M. e CYRINO, J.E.P. NUTRIAQUA: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1ª ed. Ampliada Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. p.37-63, 2013.

FREITAS, T. M. **Capacidade digestiva durante a ontogenia de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus***.(Tese de Doutorado em Aquicultura). Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

GATLIN III, D.; BARROWS, F.; BELLIS, D.; BROWN, P.; CAMPEN, J.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, T. G.; HARDY, R. W.; HERMAN, E. M.; HU, G.; KROGDAHL, A.; NELSON, R.; OVERTURF, K. E.; RUST, M.; SEALEY, W.; SKONBERG, D.; SOUZA, E. J.; STONE, D.; WILSON, R. F. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 551 – 579, 2007.

GOMES, L. C.; CHIPARI-GOMES, A.; LOPES, N. P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, p. 426-431, 2001.

GOMES, L. C.; CHIPARI-GOMES, A.; LOPES, N. P.; ROUBACH, R. ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, n. 2, p. 470 – 476, 2008.

GOMES, L. C. ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; ROUBACH, R.; CHIPARI-GOMES, A.; LOPES, N. P.; URBINATTI, E. C. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 34, n. 1, p. 76 – 84, 2003.

GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; MARTINS-JUNIOR, H.; ROUBACH, R.; ONO, E. A.; LOURENÇO, J. N. P. Cage culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a central Amazon floodplain lake. **Aquaculture**,v. 253, p. 374 - 384, 2006.

GOMES, L. C.; SILVA, C. R. Impact of pond management on tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier), production during growth-out phase. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 825 – 832, 2009.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L.C. 2ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM. p.175-204, 2010.

GUIMARÃES, S. F.; STORTI FILHO, A. Produtos agrícolas e florestais como alimento suplementar de tabaqui em policultivo com jaraqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 293 - 296, 2004.

HANCZ, C. Performance of the Amazonian tabaqui, *Colossoma macropomum*, in pond polyculture. **Aquacultural Engineering**, v. 12, p. 245 – 254, 1993.

HARDY, R. W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 770 – 776, 2010.

HERNÁNDEZ, M.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Effect of dietary energy sources on the utilization of protein by *Colossoma macropomum* fingerlings. **Fisheries Science**, v. 61, n. 3, p. 507 - 511, 1995.

JENA, J. K.; MITRA, G.; BISWAL, S. Effect of dietary protein levels on growth and nutrient utilization of fringe-lipped carp, *Labeo fimbriatus* (Boch) fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, p. 628 – 639, 2012.

JOBLING, M. Fish nutrition research: past, present and future. **Aquaculture International**, p.1-20, First on line: 14 de janeiro de 2015.

JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. **Aquaculture**, v. 177, p.99-115, 1999.

JOHNSTON, I. A. Specialization of fish muscle. In: **Development and specializations of muscle**. GOLDSPINK, D. F. (Ed.) Cambridge: Cambridge University Press, p.123-148, 1980.

JOHNSTON, I. A.; HALL, T. Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. **American Fisheries Society Symposium**, v.40, p.85-116, 2004.

JOHNSTON, I. A.; HORNE, Z. Immunocytochemical investigations of muscle differentiation in the Atlantic herring (*Clupea harengus*, Teleostei). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 74, p. 79-91, 1994.

JOHNSTON, I. A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2249-2264, 2006.

JOHNSTON, I. A.; BOWER, N. I.; MACQUEEN, D. J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 214, p. 1617-28, 2011.

KAUSHIK, S. J.; HEMRE, G. I. Plant proteins as alternative sources for fish feed and farmed fish quality. In: **Improving Farmed Fish Quality and Safety** (ed. by O. Lie), pp. 300 - 327. Woodhead publishing Limited, Cambridge, UK, 2008.

KAUSHIK, S. J.; SEILIEZ, I. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish. **Aquaculture Research**.v. 41, p.322-332, 2010.

KHAOIAN, P.; NGUYEN, H. P.; OGITA, Y., FUKADA, H.; MATSUMOTO, T. Taurine supplementation and palm oil substitution in low-fish meal diets for young yellowtail *Seriola quinqueradiata*. **Aquaculture**, v. 420 – 421, p. 219 – 224, 2014.

KIM, K. W.; WANG, X.; CHOI, S. M.; PARK, G. J.; BAI, S. C. Evaluation of optimum dietary protein-to-energy ratio in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). **Aquaculture Research**. v.35, p. 250–255, 2004.

KOJIMA, J. T.; LEITÃO, N. J.; MENOSSI, O. C. C.; FREITAS, T. M.; DAL-PAI SILVA, M.; PORTELLA, M. C. Short periods of food restriction do not affect growth, survival or muscle development on pacu larvae. **Aquaculture**, v. 436, p. 137 – 142, 2015.

KWASEK, K.; ZHANG, Y.; HLIWA, P.; GOMULKA, P.; OSTASZEWSKA, T.; DABROWSKI, K. Free amino acids as indicators of nutritional status of silver bream (*Vimba vimba*), when using commercial and purified diets. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A. v.153, p.113–119, 2009.

KWASEK, K.; ZHANG, Y.; DABROWSKI, K. Utilization of protein, dipeptide-protein and amino acid based diets by juvenile koi carps and effect on body free amino acid concentrations. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, p. 35 – 43, 2010.

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

LEITÃO, N. J.; DAL PAI-SILVA, M.; ALVES, F. L. DE A.; PORTELLA, M. C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, v. 315, p. 78-85, 2011.

LI, W.; AI, Q.; MAI, K.; XU, W.; LUO, W.; ZHANG, Y. Effects of dietary amino acid patterns on growth and protein metabolism of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae. **Aquaculture**, v. 406–407, p.1–8, 2013.

LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 43 – 53, 2009.

LOCHMANN, R.; CHEN, R.; CHU-KOO, F. W.; CAMARGO, W. N.; KOHLER, C. C.; KASPER, C. Effects of carbohydrate-rich alternative feedstuffs on growth, survival, body composition, hematology, and nonspecific immune response of black pacu, *Colossoma macropomum*, and red pacu, *Piaractus brachypomus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, p. 33 - 43, 2009.

LOVE, R. M. The chemical Biology of Fishes, p.29. Academic Press, London, 1970.

MARCOULI, P. A.; ALEXIS, M. N.; ANDRIOPOULOU, A.; ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, J. Development of a reference diet for use in indispensable amino acid requirement studies of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. **Aquaculture Nutrition**, v. 10, pp. 335 – 344, 2004.

MENDONÇA, P. P.; COSTA, P.C.; POLESE, M. F.; VIDAL JR, M. V.; ANDRADE, D. R. Efeito da suplementação de fitase na alimentação de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 235, p. 437 – 448, 2012.

MEROLA, N.; CANTELMO, O. A. Growth, feed conversion and mortality of cage-reared tambaqui, *Colossoma macropomum*, fed various dietary feeding regimes and protein levels. **Aquaculture**, v.66, p.223 - 233, 1987.

MILLWARD, D. J. The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover. **Aquaculture**, v. 79, p. 1 – 28, 1989.

MCGOOGAN, B.B.; GATLIN III, D.M. Dietary manipulation affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*: II. Effect of energy levels and nutrient density at various feeding rates. **Aquaculture**, v.182, p.271-285, 1999.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura, 2013. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília 60p.: Disponível em : http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL4.doc.

NASCIMENTO, T. M. T. **Níveis de aminoácidos para juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* e turnover isotópico do carbono – 13 e do nitrogênio -15 no tecido muscular**. 90 f.(Tese de Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

NEVES, C. D. T. T.; DAL PAI, V.; DAL PAI-SILVA, M. Características morfológicas e histoquímicas do tecido muscular do piavuçu (*Leporinus macrocephalus*): Teleostei, Pisces. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 17, p.108-108, 2000.

NRC (National Research Council). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington, DC: National Academy Press. 2011.

NUNES, E.S.S.; CAVERO, B.A.S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.139-143, 2006.

NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; BROWDY, C. L.; VAZQUEZ-ANON, M. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. **Aquaculture**, v. 431, p. 20 – 27, 2014.

NWANNA, L. C.; OISHI, C. A.; PEREIRA-FILHO, M. Use of phytase to improve the digestibility of alternative feed ingredients by Amazon tambaqui, *Colossoma macropomum*. **ScientiaAsia**, v. 34, p. 353 – 360, 2008.

OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015), OECD-FAO Agricultural Outlook 2015, OECD Publishing, Paris. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en

OISHI, C. A. **Resísuo da castanha da Amazônia (*Bertholletia excelsa*) como ingrediente em rações para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2007. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

OISHI, C.A.; NWANNA, L.C.; PEREIRA-FILHO, M. Optimum dietary protein requirement for amazonian tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, fed fish meal free diets. **Acta Amazonica**, v. 40(4), p. 757-762, 2010.

OLIVEIRA, A. C. B.; MARTINELLI, L. A.; MOREIRA, M. Z.; CYRINO, J. E. P. Determination of apparent digestibility coefficient in fish by stable carbon isotopes. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, p. 10 – 13, 2008.

OLIVEIRA, A. C. B. ; MIRANDA, E. C. ; CORREA, R. . Exigências Nutricionais e Alimentação do Tambaqui. In: Débora Machado Fracalossi, José Eurico Possebon Cyrino. (Org.). **Nutriaqua, Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. 1ed.Ampliada Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, , v. 1, p. 231-240, 2013.

PERES, H.; OLIVA-TELES, A. The effect of dietary protein replacement by crystalline amino acid on growth and nitrogen utilization of turbot *Scophthalmus maximus* juveniles. **Aquaculture**, v. 250, p. 755 – 764, 2005.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; PERES, H.; OLIVA-TELES, A. Effective replacement of protein-bound amino acids by crystalline amino acids in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, p. 60 – 68, 2014.

PEREIRA JUNIOR, G.; PEREIRA FILHO, M.; ROUBACH, R.; BARBOSA, P.S.; SHIMODA, E. Farinha de folha de leucena (*Leucaena leucocephala* Lam. de wit) como fonte de proteína para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818). **Acta Amazonica**, v. 43; p. 227 - 234, 2013.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. Nutrição de peixes. In: **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N (Eds.). São Paulo: EditoraTecArt. p.75-170, 2004.

PINTO, W.; FIGUEIRA, L.; RIBEIRO, L.; YÚFERA, M.; DINIS, M. T.; ARAGÃO, C. Dietary taurine supplementation enhances metamorphosis and growth potential of *Solea senegalensis* larvae. **Aquaculture**, v.309, p.159–164, 2010.

PIROZZI, I.; BOOTH, M. A.; ALLAN, G. L. The interactive effects of dietary protein and energy on feed intake, growth and protein utilization of juvenile mullet (*Argyrosomus japonicus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 16, p. 61 – 71, 2010.

PORTELLA, M. C., DABROWSKI, K. Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae In: **Feeding and Digestive Functions of Fishes**.1 ed. Enfield, Science Publishers, Inc., p. 227-275, 2008.

PORTELLA, M. C.; TAKATA, R.; LEITÃO, N. J.; MENOSSE, O. C. C.; KWASEK, K., DABROWSKI, K. Free amino acids in Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, eggs and larvae. **Journal of World Aquaculture Society**, v.44, p. 425–434, 2013.

PORTZ, L.; FURUYA, W. M. Energia, proteína e aminoácidos. In: FRACALOSSO, D.M. e CYRINO, J.E.P. NUTRIAQUA: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1ª ed. Ampliada. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. p.65-78, 2013.

RODRIGUES, A. P. Nutrição e alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.40, n. 1, p. 135 – 145, 2014.

ROJAS-GARCÍA, C. R.; RONNESTAD, I. Assimilation of dietary free amino acids, peptides and protein in post-larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Marine Biology**, v. 142, p. 801 – 808, 2003.

RONNESTAD, I.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; ARAGÃO, C.; DINIS, M. T. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*). **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2809–2812, 2000.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: JOHNSTON, I.A. (Ed.). **Muscle development and growth**. San Diego: Academic Press, p. 103-140, 2001.

SÁ, M. V. C.; FRACALOSSO, D. M. Exigência proteica e relação energia/proteína para alevinos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 1 – 10, 2002.

SAAVEDRA, M.; GRADE, A.; CANDEIAS-MENDES, A.; PEREIRA, T. G.; TEIXEIRA, B.; YÚFERA, M.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; MENDES, R.; POUSÃO-FERREIRA, P. Different dietary protein levels affect meagre (*Argyrosomus regius*) larval survival and muscle cellularity. **Aquaculture**, v. 450, p. 89-94, 2016.

SÄNGER, A. M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: JOHNSTON, I.A. (Ed.). **Muscle development and growth**. San Diego: Academic Press, p. 187-250, 2001.

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v. 71, Supplement A, p. 33 – 44, 2007.

SANTOS, L.; PEREIRA FILHO, M.; SOBREIRA, C.; ITUASSÚ, D.; FONSECA, F. A. L. Exigência proteica de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após privação alimentar. **Acta Amazônica**, v. 40, n.3, p.597-604, 2010.

SEVILLA, A.; GUNTHER, J. Growth and feeding level in pre-weaning tambaqui *Colossoma macropomum* larvae. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 31, n. 2, p. 218 – 224, 2000.

SCHRAM, E.; ROQUES, J. A. C.; VAN KUIJK, T.; ABBINK, W.; VAN DE HEUL, J.; VRIES, P.; BIERMAN, S.; VAN DE VIS, H.; FLIK, G. The impact of elevated water ammonia and nitrate concentrations on physiology, growth and feed intake of pikeperch (*Sander lucioperca*). **Aquaculture** v. 420–421, p.95–104, 2014.

SHAN, X. J.; CAO, L.; HUANG, W.; DOU, S. Z. Feeding, morphological changes and allometric growth during starvation in miuiy croaker larvae. **Environmental Biology of Fishes**, v.86, p.121–130, 2009.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Seasonal variation of nutrients and energy in tambaquis (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) natural food. **Revista Brasileira de Biologia**, v.4, n.60, p.599-605, 2000.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) incorporados em rações. Digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, Supl. 2, p. 1815 - 1824, 2003a.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Valor nutricional e energético de espécies vegetais importantes na alimentação do tambaqui. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 4, p. 687 – 700, 2003b.

SILVA, A. M. D.; GOMES, L. C.; ROUBACH, R. Growth, yield, water and effluent quality in ponds with different management during tambaqui juvenile production. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.5, p.733-740, 2007.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Fishing for aquaculture: non-food use of small pelagic forage fish – a global perspective. **Reviews in Fisheries Science**, v. 17, n. 3, p. 305 – 317, 2009a.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Fishing for feed or fishing for food: increasing global competition for small pelagic forage fish. **Ambio**, v. 38, n. 6, p. 294 – 302, 2009b.

TACON, A. G. J.; METIAN, M.; TURCHINI, G. M.; DE SILVA, S. S. Responsible aquaculture and trophic level implications to global fish supply. **Reviews in Fisheries Science**, v. 18, p. 1 – 12, 2010.

TERRAZAS, W. D.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Efeito da farinha de resíduo de peixe e de frango no desempenho e na composição corporal de juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, v.32, p.155-162, 2002.

TERJESEN, B. F.; LEE, K. J.; ZHANG, Y.; FAILLA.; DABROWSKI, K. Optimization of dipeptide–protein mixtures in experimental diet formulations for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alevins. **Aquaculture**, v. 254, p.517–525, 2006.

TESSER, M. B; TERJESEN, B. F; ZHANG, Y.; PORTELLA, M. C.; DABROWSKI, K. Free- and peptide-based dietary arginine supplementation for the South American fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 443 – 453, 2005.

TIBBETTS, S. M.; CALL, S. P.; ANDERSON, D.M. Dietary protein requirement of juvenile American eel (*Anguilla rostrata*) fed practical diets. **Aquaculture**, v.186, n.1/2, p.145-155, 2000.

VALENTE, L. M. P.; MOUTOU, K. A.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; ENGROLA, S.; FERNANDES, J. M. O.; JOHNSTON, I. A. What determines growth potential and juvenile quality of farmed fish species? **Reviews in Aquaculture**. V. 5, S168–S193, 2013.

VALENTE, L. M. P.; ROCHA, E.; GOMES, E. F. S.; SILVA, M. W.; OLIVEIRA, M. H.; MONTEIRO, R. A. F.; FAUCONNEAU, B. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 55, p. 675–69, 1999.

VAN DER MEER, M. B.; MACHIELS, M. A. M.; VERDEGEM, M. C. J. The effect of dietary protein level on growth, protein utilization and body composition of *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 26, p. 901 – 909, 1995.

VAN DER MEER, M. B.; ZAMORA, J. E.; VERDEGEM, M. C. J. Effect of dietary lipid level on protein utilization and the size and proximate composition of body compartments of *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 26, p. 405 - 417, 1997.

VIDAL JUNIOR, M. R.; DONZELE, J. L.; CAMARGO, A. C. S.; ANDRADE, D. R.; SANTOS, L. C. Níveis de proteína bruta para tambaqui (*Colossoma macropomum*), na fase de 30 a 250 gramas. 1. Desempenho dos tambaquis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 3, p. 421 – 426, 1998.

VIDAL JUNIOR, M. V.; DONZELE, J. L.; ANDRADE, D. R.; SANTOS, L. C. Determinação da digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta do fubá de milho e do farelo de soja para tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizando-se técnicas com uso de indicadores internos e externos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 2193 - 2200, 2004.

VIEIRA, E. F.; ISAAC, J.; FABRÉ, N. N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 (Teleostei, Serrasalmidae), no baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 29, n. 4, p. 625 – 638, 1999.

YAMAMOTO, T.; UNUMA, T.; AKIYAMA, T. The influence of dietary protein and fat levels on tissue free amino acid levels of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 182, p. 353–372, 2000.

YANG, S.; LIOU, C.; LIU, F. Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 213, pp. 363–372, 2002.

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S. **The biology of fish growth**. Academic Press, 1987.

WILSON, R. P. Protein and amino acids. In: Halver J. E., Hardy R.W. (Eds.) **Fish Nutrition**. 3rd version. Elsevier Science, San Diego, USA. p. 144–179, 2002.

ZAMBONINO INFANTE, J. L.; CAHU, C. L.; PERES, A. Partial substitution of native protein by di- and tripeptides in diet improves sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. **Journal of Nutrition**, v.127, p. 608 - 614, 1997.

ZHANG, Y.; DABROWSKI, K.; HLLIWA, P.; GOMULKA, P. Indispensable amino acid concentrations decrease in tissues of stomachless fish, common carp in response to free amino acid- or peptide-based diets. **Amino Acids**, v. 31, p. 165-172, 2006.

ZHANG, L. M.; OFFRE, P. R.; HE, J.Z.; VERHAMME, D.T.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, p.17240–17245, 2010.

ZHOU, F.; XIONG, W.; XIAO, J. X.; SHAO, Q. J.; BERGO, O. N.; HUA, Y.; CHAI, X. Optimum arginine requirement of juvenile Black sea bream, *Sparus macrocephalus*. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 418-430, 2010.

ZUBAY, G. L. **Biochemistry**. William C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 1993.

CAPÍTULO 2 – EXIGÊNCIA PROTEICA DE LARVAS E JUVENIS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

RESUMO – Na fase inicial de vida os peixes necessitam de nutrientes em quantidade e qualidade para o crescimento adequado e desenvolvimento de novas estruturas. O objetivo deste estudo foi determinar a exigência proteica de juvenis de tambaqui nas fases iniciais de crescimento (fase larval, peso médio ca. 70 mg, e fase juvenil pós-metamorfose, peso médio ca. 250 mg), e verificar os efeitos no desempenho em crescimento, desenvolvimento da musculatura esquelética e retenção de nutrientes. Foram conduzidos dois experimentos com peixes em diferentes estágios de desenvolvimento: larvas ($17,2 \pm 2,8$ mm e $68,2 \pm 31,4$ mg) e juvenis pós-metamórficos ($24,0 \pm 1,4$ mm e $245,4 \pm 45,1$ mg) de tambaqui, em delineamento inteiramente casualizado com seis e sete tratamentos, respectivamente, e quatro réplicas. Os tratamentos foram nomeados de acordo com os níveis de proteína bruta analisados das dietas semipurificadas compostas por caseína e gelatina (4:1): D36,4; D42,1; D47,5; D53,2; D62,0 e D68,5 para a fase larval; e D19,9; D26,2; D31,9; D36,4; D42,1; D47,5 e D53,2 para a fase juvenil. As variáveis de desempenho zootécnico e a morfometria das fibras musculares foram analisadas ao início e ao final dos períodos experimentais. As larvas dos tratamentos que receberam níveis proteicos acima de 42,1 % (relação energia:proteína de $10,96 \text{ kcal.kg}^{-1}$) apresentaram resultados estatisticamente superiores para taxa de crescimento específico (TCE), enquanto os juvenis demonstraram valores superiores da mesma variável com nível de 31,9 % (relação energia:proteína de $14,31 \text{ kcal.kg}^{-1}$). As análises morfométricas das fibras musculares demonstraram que os níveis proteicos alteram o desenvolvimento muscular em peixes na fase larval (ca. 70 mg) devido a diminuição da frequência de fibras das menores classes de diâmetro com o aumento do nível proteico das dietas, enquanto os juvenis (ca. 250 mg) não demonstraram diferenças estatísticas para frequências de fibras de diferentes classes de diâmetro. Os resultados da análise de regressão do ganho em peso (GP) indicaram que os níveis de 49,46 % de proteína bruta para larvas de tambaqui na faixa de peso de 70 a 430 mg e 31,90 % de proteína bruta para juvenis pós-metamorfose na faixa de peso médio de 250 a 5500 mg, foram suficientes para atender às exigências em proteína bruta para o máximo desempenho de tambaqui nas fases iniciais de desenvolvimento.

Palavras-chave: crescimento inicial, dieta semipurificada, níveis de proteína bruta, nutrição, crescimento muscular.

CHAPTER 2 - PROTEIN REQUIREMENT OF TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) LARVAE AND JUVENILES

ABSTRACT – At the early stages of development, fish need nutrients in quality and quantity for appropriate growth and development of new structures. The aim of this study was to determine the protein requirement and to investigate its effect on the development of skeletal muscle in tambaqui juveniles fed with semi-purified diets with increased protein levels. This study was conducted with tambaqui juveniles in two stages of development (larval phase, ca. 70 mg and post-metamorphosis juvenile, ca. 250 mg). Two experiments were carried in completely randomized design with six and seven treatments, respectively, and four replicates. The treatments were named according to the inclusion of protein levels composed by mixture of casein and gelatin (4:1): D36.4; D42.1; D47.5; D53.2; D62.0 and D68.5 to the larvae; and D19.9; D26.2; D31.9; D36.4; D42.1; D47.5; D53.2 to the juveniles. Growth performance and skeletal muscle morphometry were analyzed at the beginning and at the end of the experimental periods. The performance parameters were submitted to one-way ANOVA, and differences between means were compared by Tukey test ($P < 0.05$). The second-degree polynomial regression (phase 1, larval) and broken-line model (phase 2, post-metarmophosis juvenile) were applied for weight gain (GP) to estimate the required levels of protein. Fish performance increased according to the increasing of protein levels until a certain point and then decreased. Larvae fed protein level above 42.1 % (relation energy:protein of $10.96 \text{ kcal.kg}^{-1}$) showed higher specific growth rate (SGR), while in juveniles the higher results were from 31.9% ($14.31 \text{ kcal.kg}^{-1}$). The morphometric analysis of muscle fibers indicated that the different levels of crude protein affected muscle development of larvae (70 to 430 mg) decreasing frequency of smaller diameter fibers with increase protein levels, while protein levels do not affect muscle growyh in juveniles (250 to 5500 mg). The regression analysis of GP indicated that the crude protein requirement of tambaqui larvae with ca. 70 mg level is 49.46 % and for post-metamorphosis juveniles with ca. 250 mg level is 31.90 % of protein.

Keywords: initial growth, nutrition, protein levels, semi purified diet, muscle growth,

INTRODUÇÃO

Os peixes exigem de duas a quatro vezes mais proteína que outros vertebrados e geralmente a exigência diminui com o aumento do tamanho e idade (WILSON, 2002; PORTZ; FURUYA, 2013). Muitas formulações de dietas para peixes possuem altos teores de proteína, no entanto, estes níveis não garantem melhor desempenho dos animais (ARARIPE et al., 2011). Parte do excesso de proteína ingerida é utilizada para síntese de outras proteínas, favorecendo o desempenho, mas outra parte é catabolizada e utilizada como fonte de energia, podendo aumentar a deposição de lipídios na carcaça (ABIMORAD; CARNEIRO 2007) e a excreção de compostos nitrogenados, como a amônia (KIM et al., 2004). Porém, a deficiência deste nutriente também pode causar prejuízo para o crescimento (KIM et al., 2004).

A porção de maior valor comercial dos peixes é sua musculatura esquelética, que pode variar de 60 a 70% de seu peso corporal total (AYALA et al., 2010). A proteína é o principal constituinte da composição centesimal da matéria seca em peixes, chegando a 60-75% em juvenis e adultos (WILSON, 2002), e acima de 50% em larvas (CONCEIÇÃO et al., 2003). Na fase inicial de crescimento, a síntese de proteínas excede a degradação, e o balanço entre estes dois processos resulta na deposição ou acréscimo de proteína (MILLWARD, 1989). As quantidades de proteína dietética podem alterar a celularidade muscular em peixes, favorecendo o crescimento por meio da formação de novas fibras musculares (SILVA et al., 2009; SAAVEDRA et al., 2016). Por outro lado, a má nutrição durante a fase inicial de crescimento dos peixes causa atraso no desenvolvimento muscular (LEITÃO et al., 2011) e afeta o desempenho durante as fases posteriores de crescimento (KOJIMA et al., 2015).

Devido às características favoráveis do tambaqui (*Colossoma macropomum*) para a criação intensiva e comercialização, a espécie é considerada estratégica para o fortalecimento da piscicultura brasileira de espécies nativas. No ano de 2013 foi responsável por mais de 22 % da produção de peixes da aquicultura nacional e há anos é a espécie nativa mais produzida no país, alcançando mais de 88 mil toneladas em 2013 (IBGE,

2013). Estudos relacionados à exigência em proteína e energia do tambaqui já foram realizados em diferentes fases de desenvolvimento (HERNÁNDEZ et al., 1995; VAN DER MEER et al., 1997; VIDAL JUNIOR et al., 1998; GUTIÉRREZ et al., 2009, 2010; OISHI et al., 2010; SANTOS et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011; BUZZOLO, 2014). As informações sobre as exigências em proteína bruta encontradas para o tambaqui até o momento são díspares e variam de acordo com a fase de desenvolvimento e condições experimentais. Por exemplo, a exigência em proteína bruta para juvenis na faixa de 30 a 250 g foi de 25 % de PB (VIDAL JUNIOR et al., 1998), e 50 % de PB para juvenis na faixa de peso de 1,4 a 29,1 g (VAN DER MEER et al., 1995). Em outra faixa de peso, 112,2 a 272,6 g, níveis de 30 a 35 % de PB resultaram no máximo desempenho (ALMEIDA et al., 2011). Dessa forma, informações sobre as exigências qualitativas e quantitativas de nutrientes para as espécies nativas ainda são controversas devido à divergências entre os resultados obtidos (RODRIGUES, 2014). Uma possível razão está no fato que alguns autores desconsideram as interações entre os nutrientes presentes nos ingredientes que compõe as dietas práticas utilizadas na maioria dos estudos (FRACALOSSO et al., 2013), além das diferenças no delineamento, formulações das dietas, condições experimentais, qualidade da proteína e idade dos peixes (VIDAL JUNIOR et al., 1998). De acordo com Fracalossi et al. (2013), para estudos iniciais relacionados à exigência de nutrientes, as dietas devem ser formuladas com ingredientes semipurificados, pois estes permitem o controle total dos efeitos dos nutrientes a serem testados, possuem alta digestibilidade e ausência de fatores antinutricionais.

Apesar das pesquisas relacionadas a exigência proteica do tambaqui citadas anteriormente, estudos direcionados às necessidades quantitativas dos nutrientes durante a fase larval da espécie ainda são escassos. Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi determinar, pela primeira vez, as exigências quantitativas de proteína nas fases iniciais de desenvolvimento do tambaqui (fase larval e fase juvenil pós-metamorfose), e avaliar seus efeitos no desenvolvimento da musculatura esquelética e na deposição de nutrientes e energia na carcaça.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – Campus de Jaboticabal, Protocolo nº 018504/12, ligada ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Larvas de tambaqui com três dias pós-eclosão, oriundas de criador comercial, foram estocadas em 25 tanques de 100 L com aeração e fluxo de água contínuos. Náuplios de artêmia recém eclodidos foram ofertados como alimento inicial cinco vezes ao dia (8:00, 11:00, 14:00, 17:00 e 20:00 horas), em quantidades crescentes de acordo com o protocolo de Jomori (1999) adotado como rotina no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA). Os peixes foram mantidos nestas condições até atingirem o tamanho desejado para a condução dos experimentos, isso é, cerca de 70 mg para a fase 1 (total de 20 dias de alimentação) e de 250 mg para a fase 2 (total de 30 dias de alimentação). Diariamente, os peixes mortos e os resíduos acumulados no fundo dos tanques foram removidos por sifonamento.

Este estudo foi realizado em duas fases, a primeira com os peixes na fase larval pós-flexão, com o estômago já diferenciado, e a segunda com juvenis de tambaqui logo após a metamorfose. A terminologia e caracterização das fases de desenvolvimento seguem Kendall et al. (1984) e Portella et al. (2014). Foram testadas nove dietas baseadas em Zehra e Khan (2012), em que a fração proteica foi composta pela mistura de caseína e gelatina (4:1) (FRACALOSSI et al., 2013), porém para a adequação no balanço dos nutrientes foram realizadas modificações nas quantidades dos ingredientes e inclusão de novos ingredientes (Tabela 1). As dietas foram peletizadas, secas em estufa a 55°C, moídas, e os peletes foram separados em peneira granulométrica em seis tamanhos de acordo com o diâmetro (0,25 a 0,49 mm; 0,50 a 0,70 mm; 0,71 a 0,99 mm; 1,00 a 1,40 mm; 1,41 a 1,99 mm e acima de 2,0 mm) e armazenadas a -20°C até sua utilização.

A composição das dietas experimentais foi analisada em duplicata segundo metodologias propostas pela AOAC (2000). O equipamento LECO FP

528 (LECO Instruments, St Joseph, Michigan, USA) foi utilizado para determinar a quantidade de nitrogênio que foi multiplicada pelo fator de conversão 6,25 para o cálculo de proteína bruta (PB). O extrator Soxleth com éter de petróleo foi utilizado para determinar o extrato etéreo (EE). Por meio da incineração da amostra em mufla à temperatura de 600°C durante 4 horas foi determinada a matéria mineral (MM). Para determinar a energia bruta (EB) foi utilizada a bomba calorimétrica de Parr. A fibra bruta (FB) foi determinada pelo método Filter Bag Technique da Ankon. A umidade (UM) foi determinada pela pesagem da matéria úmida, pré-secagem por meio de liofilização das amostras, e a determinação da matéria seca a partir da diferença do peso da amostra após secagem final em estufa a 105 °C.

Tabela 1. Formulação e composição das dietas experimentais para estudo da exigência proteica de larvas e juvenis de tambaqui.

| Ingredientes (% inclusão) | Dietas | | | | | | | | |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | D19,9 | D26,2 | D31,9 | D36,4 | D42,1 | D47,5 | D53,2 | D62,0 | D68,5 |
| Caseína | 14,4 | 19,2 | 24,0 | 28,8 | 33,6 | 38,4 | 43,2 | 48,0 | 52,8 |
| Gelatina | 3,6 | 4,8 | 6,0 | 7,2 | 8,4 | 9,6 | 10,8 | 12,0 | 13,2 |
| Dextrina | 19,2 | 17,2 | 15,2 | 13,2 | 11,2 | 9,2 | 7,2 | 5,2 | 4,2 |
| Hidrolisado proteico¹ | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 |
| Óleo de peixe | 5,0 | 4,5 | 4,0 | 3,5 | 3,0 | 2,5 | 2,0 | 1,5 | 1,0 |
| Óleo de Soja | 4,8 | 3,9 | 3,1 | 2,3 | 1,8 | 2,3 | 2,8 | 3,3 | 0,8 |
| Lecitina | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| CMC² | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 |
| Mistura mineral e vitamínica³ | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Amido | 38,5 | 34,5 | 30,5 | 26,5 | 22,5 | 18,5 | 14,5 | 10,5 | 8,5 |
| Celulose | 0,0 | 1,4 | 2,7 | 4,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 |
| Composição analisada⁴ | | | | | | | | | |
| UM (%) | 5,3 | 6,1 | 5,9 | 5,21 | 5,8 | 5,4 | 7,2 | 5,0 | 5,2 |
| MM (%) | 2,4 | 2,6 | 2,6 | 2,8 | 2,8 | 3,0 | 3,1 | 3,3 | 3,5 |
| PB (%) | 19,9 | 26,2 | 31,9 | 36,4 | 42,1 | 47,5 | 53,2 | 62,0 | 68,5 |
| FB (%) | 1,22 | 2,26 | 1,72 | 2,35 | 2,77 | 2,29 | 2,52 | 2,84 | 2,04 |
| EE (%) | 11,1 | 10,1 | 8,2 | 7,3 | 6,0 | 4,7 | 4,1 | 3,1 | 2,0 |
| EB (kcal.kg⁻¹) | 4533,5 | 4543,5 | 4572,0 | 4615,0 | 4614,0 | 4667,5 | 4516,0 | 4737,5 | 4788,5 |
| E:P (kcal.g⁻¹) | 22,78 | 17,34 | 14,31 | 12,68 | 10,96 | 9,83 | 8,49 | 7,64 | 6,99 |

¹ Hidrolisado proteico comercial-ACTIPAL Fish FL 50 – Aquativ.

² Carboximetilcelulose - Synth

³ Mistura mineral e vitamínica – Guabi (ingrediente.kg⁻¹mistura): vitamina A=2.500ui; vitamina D3=600.000ui; vitamina E=37.500ui; vitamina K3=3.750mg; vitamina C=50.000mg; tiamina=4.000mg; riboflavina=4.000mg; piridoxina=4.000mg; vitamina B12=4.000mg; niacina= 122.500mg; biotina=15mg; ácido fólico=1.250mg; pantotenato de cálcio=1.200mg; cobre=2.500mg; cobalto=125mg; ferro=15g; iodo=375mg; manganês=12,5g; selênio=87,5mg; zinco=12,5g.

Umidade (UM); matéria mineral (MM); proteína bruta (PB); fibra bruta (FB); extrato etéreo (EE); energia bruta (EB); relação energia:proteína (E:P)

⁴ Valores com base na matéria seca

Na fase 1, foram utilizadas 12.000 larvas de tambaqui ($17,2 \pm 2,8$ mm e $68,2 \pm 31,4$ mg, referido como ca. 70 mg) distribuídas aleatoriamente em 24 tanques de polietileno com 100 L de água, na densidade de $500 \text{ larvas.L}^{-1}$, em sistema de circulação aberto. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro réplicas. As dietas utilizadas para esta fase possuíam níveis de proteína de 36,4 a 68,5 % de proteína bruta (D36,4, D42,1, D47,5, D53,2, D62,0, D68,5). Após a distribuição e aclimatação, as larvas foram submetidas à transição alimentar gradual do alimento vivo para as dietas formuladas experimentais, por alimentação mista (*co-feeding*), em que o alimento vivo foi fornecido em quantidades decrescentes, até sua supressão total e as dietas formuladas foram fornecidas em quantidades crescentes, por seis dias até a troca total. As dietas foram fornecidas à vontade até saciedade aparente em quatro arraçoamentos diários (8, 11, 14 e 17 horas) por 30 dias. O tamanho dos peletes das dietas foram de 0,25 a 0,49 mm na primeira semana; 0,50 a 0,70 na segunda e terceira semanas, e 0,50 a 0,70 junto com 0,71 a 0,99 mm na quarta semana experimental.

A qualidade da água foi monitorada diariamente para oxigênio dissolvido e temperatura, enquanto a condutividade e o pH monitorados três vezes por semana, além da amônia monitorada quinzenalmente; as variáveis monitoradas apresentaram os seguintes valores médios: $6,3 \pm 0,2$ mg/L de oxigênio dissolvido; $30,5 \pm 0,4$ °C de temperatura; $261,7 \pm 52,4$ $\mu\text{S/cm}^{-1}$ de condutividade; $8,2 \pm 0,1$ de pH e $0,03 \pm 0,02$ mg.L⁻¹ de amônia total.

Para a fase 2, 1.960 juvenis pós-metamórficos de tambaqui ($24,0 \pm 1,4$ mm e $245,4 \pm 45,1$ mg, referido como ca. 250 mg) distribuídos na densidade de $70 \text{ juvenis.L}^{-1}$, foram submetidos à transição alimentar gradual pelo mesmo método utilizado na fase 1. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e quatro réplicas, por 60 dias. As dietas utilizadas possuíam quantidades crescentes de proteína de 19,9 a 53,2 % (D19,9, 26,2, 31,9, 36,4, 42,12, 47,5, 53,2), Estes peixes foram alimentados até a saciedade aparente, ao longo de 30 minutos em cada arraçoamento, cuidando para que não houvesse sobra, com acompanhamento

semanal do peso de 10 % dos peixes de cada tanque para as correções das quantidades de dietas fornecidas. As dietas foram pesadas diariamente para cada réplica e fornecidas em quatro arraçoamentos diários (8, 11, 14 e 17 horas). Os tamanhos dos peletes das dietas foram de 0,50 a 0,70 na primeira e segunda semanas; 0,71 a 0,99 mm na terceira, quarta e quinta semanas; 1,00 a 1,40 mm na sexta e sétima semanas e 1,41 a 1,99 mm da oitava até o fim do período experimental. As avaliações biométricas e coleta de amostras foram realizadas no início e no final do experimento, e a sobrevivência foi aferida apenas no final. As variáveis de qualidade da água observadas na segunda fase foram $6,1 \pm 0,4$ mg/L de oxigênio dissolvido; $207,6 \pm 20,8$ $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ de condutividade; $8,0 \pm 0,1$ de pH; $29,9 \pm 0,8$ °C de temperatura; e $0,04 \pm 0,02$ mg.L⁻¹ de amônia total.

Desempenho produtivo

No início do experimento da fase 1, 200 larvas foram amostradas, eutanasiadas por aprofundamento do plano anestésico (benzocaína 0,2 g.L⁻¹), fixadas em solução de formaldeído 10 % por 24 horas e preservadas em solução alcoólica 70 % para posterior mensuração do peso (P, mg) e comprimento total (CT, mm). Outras 400 larvas foram eutanasiadas, congeladas a - 20°C, liofilizadas e moídas para posterior determinação da composição corporal. Ao final do experimento, após 12 horas de jejum, os peixes de cada tanque foram contabilizados para cálculo da taxa de sobrevivência. Deste total, metade dos animais foram utilizados para avaliação do P e do CT e a outra metade para análise de composição corporal. Além disso, cinco larvas de cada tanque foram amostradas no início e no final do experimento para avaliação da morfologia do músculo esquelético.

A partir dos dados biométricos foram calculados o ganho em peso (GP); taxa de crescimento específico (TCE) e fator de condição (K) de acordo com as expressões:

$$GP = \text{Peso médio final} - \text{Peso médio inicial}$$

$$TCE = \frac{(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) \times 100}{\text{tempo (dias)}}$$

$$k = \frac{\text{peso}}{\text{comprimento total}^b}$$

O valor de **b** foi obtido por meio da logaritimização dos dados de peso e de comprimento total de todos os peixes amostrados para biometria. Esses dados foram plotados em gráfico e o valor de **b** obtido pela equação linear: $y = a + bx$, para a fase 1, foi de 3,31.

Ao início do experimento da fase 2, foram coletados 100 juvenis que foram eutanasiados e preservados para posterior avaliação do P e CT, pelos mesmos métodos descritos para a fase 1. Outros 100 juvenis foram eutanasiados, congelados a - 20 °C, liofilizados e moídos para posterior análise de composição corporal e cinco exemplares de cada réplica foram coletados para análise morfométrica das fibras musculares. No final do período experimental, após 12 horas de jejum, os peixes de cada tanque foram contabilizados para cálculo da taxa de sobrevivência, e metade dos animais foram utilizados para avaliação do P e do CT e a outra metade para análise de composição corporal. Paralelamente, cinco larvas de cada tanque foram coletadas para avaliação morfométrica das fibras musculares.

Da mesma forma como já descrito, calcularam-se para esses peixes os indicadores de crescimento GP, TCE e K (usando o valor de **b** = 3,05, calculado com os dados dos peixes da segunda fase).

O consumo das dietas foi calculado diariamente pela diferença entre a pesagem das dietas antes do primeiro e após o último arraçoamento do dia. Os peixes mortos foram contabilizados para o ajuste das quantidades das dietas a serem fornecidas para cada réplica de cada tratamento ao longo do período experimental. Desta forma, foram calculados o consumo total aparente das dietas nas duas fases. Com os dados biométricos e dados de consumo, foram calculados as variáveis de conversão alimentar aparente (CAA); taxa de eficiência proteica (TEP) e valor produtivo da proteína (VPP) de acordo com as expressões:

$$CAA = \frac{\text{consumo de dieta}}{\text{ganho em peso}}$$

$$TEP = \frac{\text{ganho em peso}}{\text{consumo de proteína}}$$

$$VPP = \frac{(\text{peso final} \times \text{proteína corporal final}) - (\text{peso inicial} \times \text{proteína corporal inicial})}{\text{consumo de proteína}} \times 100$$

As amostras de peixes coletadas no início e no final de cada fase experimental foram analisadas em duplicata segundo metodologias propostas pela AOAC (2000). A proteína bruta (PB) foi determinada em equipamento LECO FP 528 (LECO Instruments, St Joseph, Michigan, USA), multiplicado pelo fator de conversão 6,25. O extrato etéreo (EE) foi determinado por meio do extrator Soxhlet com éter de petróleo. A matéria mineral (MM) foi obtida por meio da incineração da amostra em mufla à temperatura de 600°C durante 4 horas. A energia bruta (EB) foi determinada em bomba calorimétrica de Parr. A matéria seca (MS) foi determinada pela pesagem da matéria úmida, pré-secagem por meio de liofilização das amostras, e a determinação da matéria seca a partir da diferença do peso da amostra após secagem final em estufa a 105 °C.

Histologia do músculo esquelético

Os exemplares coletados para análise morfométrica das fibras musculares foram pesados e medidos individualmente. Após, foram retiradas amostras da região da musculatura epaxial dos peixes, fixadas em solução de Karnovsky em tampão fosfato de Sorensen (pH 7,2 e 0,2 M) por 24 horas, lavadas em tampão fosfato (pH 7,2 e 0,2M) e preservadas em solução alcoólica 70 %. Das amostras coletadas ao início e final dos experimentos (n=5/réplica), dois exemplares de cada repetição (n=8/tratamento) foram selecionados de acordo com a média de peso dos respectivos tratamentos e destinados ao

processamento histológico para análise da musculatura esquelética. Após o processo de fixação, as amostras foram submetidas ao processo de desidratação em concentrações alcoólicas crescentes (70 – 95 %) para posterior inclusão em Historesina[®] (Leica, Germany), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante.

Os cortes histológicos foram realizados transversalmente na musculatura epaxial, com 3 µm de espessura. Os cortes foram afixados em lâminas, corados com Hematoxilina e Floxina B (HF) e recobertos por lamínula. A análise microscópica foi realizada em microscópio de luz (Olympus BX43) adaptado a um sistema de análise de imagens (CelSens 1.8 Standard). Foram mensuradas as áreas (A) de 600 fibras musculares por amostra para o cálculo do diâmetro das mesmas, por meio da expressão $d=2(A^{0.5} \times \pi^{-0.5})$ (VALENTE et al., 1999). Posteriormente, as fibras musculares foram divididas em classes de tamanho, baseado no seu diâmetro (µm), seguindo a metodologia proposta por Assis et al. (2004); *classe 10* = $d \leq 10$ µm; *classe 20* = $10 < d \leq 20$ µm; *classe 30*: $20 < d \leq 30$ µm; *classe 40* = $30 < d \leq 40$ µm e *classe 50* = $d > 40$ µm. Após a classificação, foram analisadas cinco fibras menores e cinco fibras maiores de cada tratamento.

Análises estatísticas e interpretação dos dados

Todos os dados foram analisados para normalidade (Cramer-von Mises) e homoscedasticidade (Levene), os resultados percentuais de sobrevivência e frequência das classes de diâmetro das fibras foram submetidos a transformação arcoseno, assim como as transformações de outras variáveis quando necessárias, porém os resultados foram apresentados em dados não transformados. Os dados de crescimento, sobrevivência e frequência das classes de diâmetro das fibras musculares foram avaliados por *one-way ANOVA*, e as médias foram analisadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises e transformações das variáveis biométricas foram realizadas no programa SAS n. 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). A exigência em proteína bruta para o máximo crescimento foi

estimada pelo método da análise de regressão polinomial de segundo grau (fase 1) e regressão linear segmentada modelo *broken-line* (fase 2), com base no GP.

RESULTADOS

Desempenho zootécnico

Os resultados de desempenho dos peixes na fase 1 de desenvolvimento estão apresentados na Tabela 2 e os da fase 2 estão apresentados na Tabela 3. Na primeira fase, não foram observadas diferenças de CT e K entre os tratamentos. No entanto, as quantidades crescentes de proteína dietética afetaram negativamente as respostas de sobrevivência, TEP e VPP. O peso final e ganho em peso, por sua vez, foram maiores ($P < 0,05$) nos peixes dos tratamentos com 42,1, 47,5 e 53,2 % de PB, e reduzidos ($P < 0,05$) nos peixes dos demais tratamentos. Os resultados de consumo das larvas na fase 1 diferiram somente entre as larvas dos tratamentos D53,2 e D68,5 ($P < 0,05$), e os resultados de CAA diferiram entre as larvas dos tratamentos D47,5 e D68,5 ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Na fase 2, os juvenis do tratamento D19,9 % de PB apresentaram os menores valores ($P < 0,05$) de CT, P, GP e TCE. As respostas de S e TEP não diferiram ($P > 0,05$) entre os juvenis dos tratamentos alimentados com dietas até o nível de 31,9, enquanto os resultados de VPP não diferiram para os juvenis alimentados com as dietas até 42,1 % de PB. Após estes níveis, os resultados das variáveis foram decrescentes ($P < 0,05$). Não foi observada diferença de consumo das dietas entre os juvenis ($P > 0,05$) e a pior CAA foi observada nos juvenis alimentados com a dieta D19,9 ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Após análise por regressão polinomial do segundo grau dos dados de GP das larvas da primeira fase (faixa de peso de 70 a 430 mg), o nível de proteína calculado para a máxima resposta de GP foi de 49,46 % de PB (Figura 1). E a análise por regressão modelo *broken-line* dos dados de GP dos juvenis

da segunda fase (faixa de peso de 250 a 5500 mg) demonstrou que 31,9 % de PB foi o nível calculado para a máxima resposta de GP (Figura 2).

Tabela 2. Médias (\pm desvio padrão) de comprimento total (CT), peso (P), ganho em peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), fator de condição (K), sobrevivência (S), taxa de eficiência proteica (TEP) e valor produtivo da proteína (VPP) de larvas de tambaqui (fase 1), após 30 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de proteína.

| Variáveis | Valor de P | Proteína bruta das dietas (%) | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 36,4 | 42,1 | 47,5 | 53,2 | 62,0 | 68,5 | |
| Fase 1 – 30 dias de alimentação | CT (mm) | 0,3922 | 26,1 \pm 0,5 | 28,1 \pm 0,9 | 27,2 \pm 0,9 | 27,8 \pm 0,9 | 27,2 \pm 0,2 | 27,5 \pm 1,6 |
| | P (mg) | 0,0006 | 348,0 \pm 7,8 ^b | 430,9 \pm 31,43 ^a | 424,0 \pm 3,91 ^a | 381,4 \pm 20,1 ^{ab} | 364,1 \pm 18,2 ^b | 348,2 \pm 20,4 ^b |
| | GP (mg) | 0,0006 | 279,8 \pm 7,8 ^b | 362,7 \pm 31,4 ^a | 355,9 \pm 3,9 ^a | 313,3 \pm 20,2 ^{ab} | 295,9 \pm 18,2 ^b | 280,1 \pm 20,4 ^b |
| | TCE (%.dia ⁻¹) | <0,0001 | 5,4 \pm 0,1 ^a | 6,1 \pm 0,4 ^{ab} | 6,1 \pm 0,1 ^{ab} | 5,7 \pm 0,2 ^{bc} | 5,6 \pm 0,2 ^c | 5,4 \pm 0,2 ^d |
| | K | 0,2168 | 0,007 \pm 0,001 | 0,007 \pm 0,001 | 0,008 \pm 0,001 | 0,006 \pm 0,001 | 0,006 \pm 0,001 | 0,006 \pm 0,001 |
| | S (%) | 0,0003 | 64,1 \pm 3,0 ^a | 51,1 \pm 5,1 ^{bc} | 55,9 \pm 2,9 ^{ab} | 47,2 \pm 2,0 ^{bc} | 50,5 \pm 4,5 ^{bc} | 45,3 \pm 1,5 ^c |
| | TEP | <0,0001 | 1,7 \pm 0,1 ^a | 1,5 \pm 0,2 ^{ab} | 1,6 \pm 0,2 ^{ab} | 1,2 \pm 0,1 ^{bc} | 1,0 \pm 0,1 ^c | 0,8 \pm 0,1 ^d |
| | VPP (%) | <0,0001 | 19,3 \pm 1,6 ^a | 18,6 \pm 3,0 ^a | 20,4 \pm 3,3 ^a | 15,6 \pm 1,9 ^a | 11,4 \pm 0,7 ^b | 9,0 \pm 0,9 ^b |
| | Consumo (%P.dia ⁻¹) | 0,0137 | 7,4 \pm 0,5 ^{ab} | 7,5 \pm 0,2 ^{ab} | 7,4 \pm 0,1 ^{ab} | 6,9 \pm 0,2 ^b | 7,5 \pm 0,3 ^{ab} | 8,3 \pm 0,5 ^a |
| | CAA | 0,0271 | 1,6 \pm 0,1 ^{ab} | 1,55 \pm 0,1 ^{ab} | 1,4 \pm 0,2 ^a | 1,6 \pm 0,2 ^{ab} | 1,6 \pm 0,1 ^{ab} | 1,9 \pm 0,2 ^b |

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Peso médio inicial da fase 1: 70 mg.

Tabela 3. Médias (\pm desvio padrão) de comprimento total (CT), peso (P), ganho em peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), fator de condição (K), sobrevivência (S), taxa de eficiência proteica (TEP) e valor produtivo da proteína (VPP) de juvenis pós-metamorfose (fase 2), após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de proteína.

| Variáveis | Valor de P | Proteína bruta das dietas (%) | | | | | | |
|--------------------------------------|------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | | 19,9 | 26,2 | 31,9 | 36,4 | 42,1 | 47,5 | 53,2 |
| CT (mm) | <0,0001 | 57,1 \pm 1,7 ^b | 63,7 \pm 1,3 ^a | 66,3 \pm 1,2 ^a | 66,4 \pm 2,4 ^a | 65,1 \pm 1,3 ^a | 64,9 \pm 0,5 ^a | 64,5 \pm 2,9 ^a |
| P (mg) | <0,0001 | 3232,0 \pm 90,1 ^c | 4436,7 \pm 271,3 ^b | 5470,4 \pm 343,9 ^a | 5501,7 \pm 94,8 ^a | 4990,9 \pm 387,5 ^{ab} | 5477,9 \pm 486,1 ^a | 5315,4 \pm 619,4 ^{ab} |
| GP (mg) | <0,0001 | 2986,5 \pm 90,1 ^c | 4191,1 \pm 271,3 ^b | 5224,8 \pm 343,9 ^a | 5256,1 \pm 94,7 ^a | 4745,3 \pm 387,5 ^{ab} | 5232,3 \pm 486,1 ^a | 5069,8 \pm 619,4 ^{ab} |
| TCE (%.dia⁻¹) | <0,0001 | 4,3 \pm 0,05 ^c | 4,8 \pm 0,1 ^b | 5,2 \pm 0,1 ^a | 5,2 \pm 0,03 ^a | 5,0 \pm 0,1 ^{ab} | 5,2 \pm 0,1 ^a | 5,1 \pm 0,2 ^{ab} |
| K | 0,2116 | 0,014 \pm 0,001 | 0,014 \pm 0,001 | 0,015 \pm 0,001 | 0,015 \pm 0,002 | 0,015 \pm 0,001 | 0,016 \pm 0,002 | 0,016 \pm 0,001 |
| S (%) | <0,0001 | 98,9 \pm 1,2 ^a | 99,6 \pm 0,6 ^a | 97,1 \pm 1,0 ^{ab} | 80,7 \pm 13,3 ^b | 57,9 \pm 18,9 ^{bc} | 56,1 \pm 10,2 ^c | 45,4 \pm 8,5 ^c |
| TEP | <0,0001 | 3,5 \pm 0,1 ^a | 3,2 \pm 0,2 ^{ab} | 2,9 \pm 0,2 ^{ab} | 2,5 \pm 0,3 ^b | 2,1 \pm 0,4 ^{bc} | 1,8 \pm 0,3 ^{cd} | 1,4 \pm 0,2 ^d |
| VPP (%) | <0,0001 | 36,1 \pm 0,9 ^a | 37,0 \pm 2,7 ^a | 32,9 \pm 2,2 ^a | 29,0 \pm 4,6 ^{ab} | 31,7 \pm 6,7 ^a | 20,6 \pm 3,0 ^{bc} | 19,9 \pm 3,0 ^c |
| Consumo (%P.dia⁻¹) | 0,1082 | 4,1 \pm 0,1 | 3,6 \pm 0,2 | 3,3 \pm 0,2 | 3,4 \pm 0,4 | 3,2 \pm 0,7 | 3,7 \pm 0,6 | 4,0 \pm 0,6 |
| CAA | 0,0112 | 1,4 \pm 0,1 ^a | 1,2 \pm 0,10,1 ^{ab} | 1,1 \pm 0,1 ^b | 1,1 \pm 0,2 ^{ab} | 1,0 \pm 0,2 ^b | 1,2 \pm 0,2 ^{ab} | 1,3 \pm 0,2 ^{ab} |

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Peso médio inicial da fase 2: 250 mg.

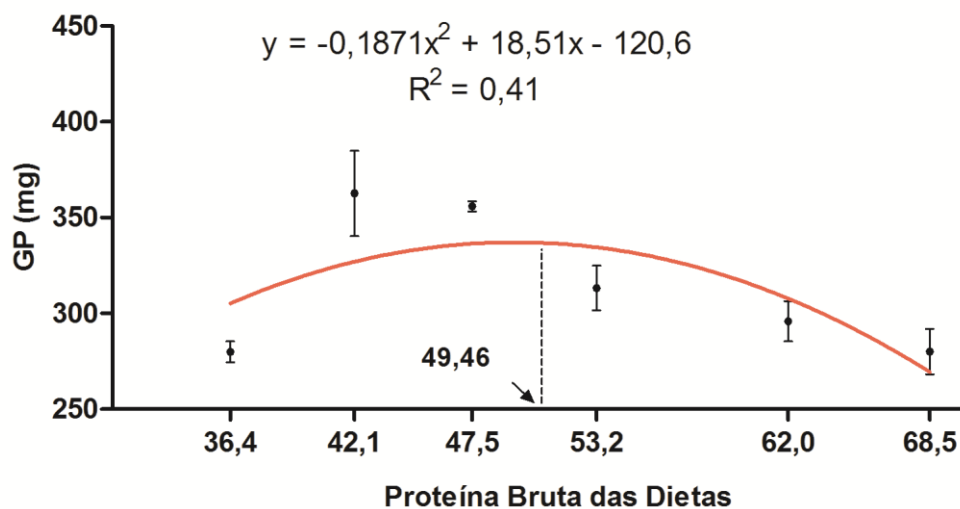


Figura 1. Modelo de regressão polinomial de segundo grau para ganho em peso (GP) de larvas de tambaqui com peso médio inicial de ca. 70 mg (fase 1), alimentados com dietas experimentais semi-purificadas com níveis crescentes de inclusão de proteína, por 30 dias.

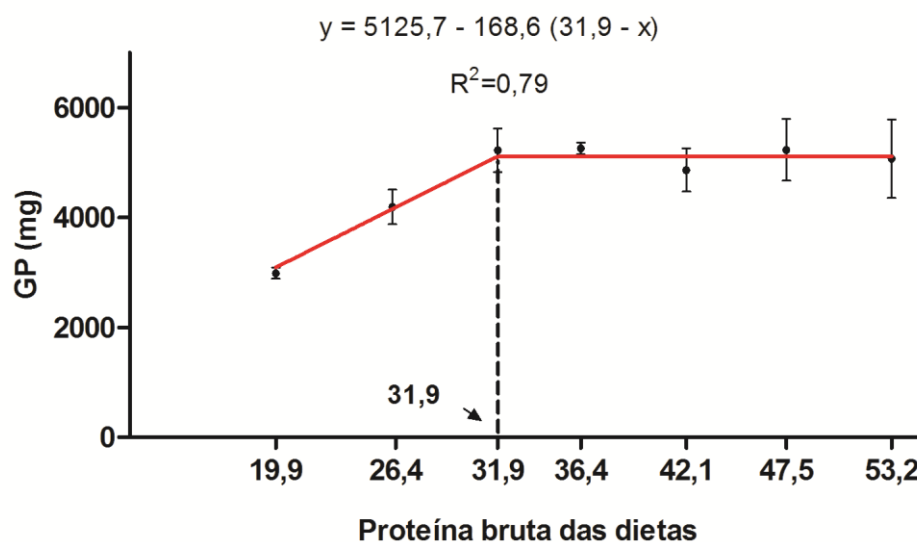


Figura 2. Modelo *broken-line* para ganho em peso (GP) de juvenis pós-metamorfose de tambaqui com peso médio inicial de ca. 250 mg (fase 2), alimentados com dietas experimentais semi-purificadas com níveis crescentes de inclusão de proteína, por 60 dias.

Composição corporal

Na fase 1, o aumento da quantidade de proteína nas dietas alterou significativamente ($P < 0,05$) as porcentagens de extrato etéreo e energia corporal dos peixes. As porcentagens de MS, MM e PB corporal não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos com os níveis proteicos avaliados (Tabela 4).

Os resultados observados de MM e PB aumentaram com os níveis crescentes de proteína nas dietas. A MS foi superior nos animais dos tratamentos D36,4 e D47,5 e os resultados de EE e EB demonstraram queda com o aumento dos níveis proteicos. ($P < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 4. Porcentagens de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e energia bruta (EB) na composição corporal de larvas de tambaqui (fase 1), ao início do período experimental e após 30 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de inclusão de proteína.

| | Composição corporal (Matéria Natural) | Dietas | | | | | | |
|----------|--|----------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
| | | D36,4 | D42,1 | D47,5 | D53,2 | D62,0 | D68,5 | |
| | | Inicial | Final | | | | | |
| Fase 1 * | MS (%) | 79,1±0,1 | 80,1±1,2 | 80,4±0,6 | 81,2±1,0 | 81,7±1,1 | 82,6±0,4 | 83,6±2,7 |
| | MM (%) | 3,1±0,1 | 2,16±0,1 | 2,0±0,1 | 2,0±0,2 | 2,2±0,2 | 2,2±0,1 | 2,3±0,1 |
| | PB (%) | 16,1±0,2 | 12,4±0,8 | 12,9±1,0 | 13,0±0,8 | 12,9±1,0 | 12,5±0,4 | 12,6±0,7 |
| | EE (%) | 1,7±0,1 | 3,9±0,4 ^a | 3,9±0,6 ^a | 3,2±0,2 ^{ab} | 2,9±0,3 ^{abc} | 2,4±0,2 ^{bc} | 1,6±0,4 ^c |
| | EB (kcal.kg ⁻¹) | 989±4 | 1048±78 ^a | 1079±50 ^a | 1009±62 ^{ab} | 968±53 ^{ab} | 898±14 ^b | 849±92 ^b |

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

*Fase experimental: fase 1 – larvas de tambaqui na faixa de peso médio de 70 mg (inicial) a 430 mg (final) após 30 dias de alimentação.

Tabela 5. Porcentagens de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e energia bruta (EB) na composição corporal de juvenis de tambaqui (fase 2), ao início do período experimental e após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com quantidades crescentes de inclusão de proteína.

| Composição corporal (Matéria Natural) | Dietas | | | | | | | |
|--|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | D19,9 | D26,2 | D31,9 | D36,4 | D42,1 | D47,5 | D53,2 |
| | Inicial | Final | | | | | | |
| MS (%) | 84,9±0,1 | 76,9±0,1 ^e | 76,1±0,1 ^f | 77,6±0,1 ^d | 78,7±0,1 ^a | 78,2±0,1 ^b | 78,7±0,1 ^a | 77,8±0,1 ^c |
| MM (%) | 2,9±0,1 | 1,8±0,1 ^b | 1,9±0,1 ^{ab} | 1,8±0,1 ^b | 1,9±0,1 ^{ab} | 1,8±0,1 ^{ab} | 1,9±0,1 ^{ab} | 2,0±0,1 ^a |
| PB (%) | 11,1±0,1 | 10,4±0,1 ^d | 11,6±0,1 ^c | 11,4±0,1 ^c | 11,5±0,1 ^c | 12,6±0,1 ^b | 12,4±0,1 ^b | 13,6±0,1 ^a |
| EE (%) | 1,0±0,1 | 10,3±0,1 ^a | 9,2±0,4 ^b | 8,2±0,1 ^b | 7,7±0,0 ^c | 7,2±0,1 ^{cd} | 6,7±0,1 ^{de} | 6,1±0,1 ^e |
| EB (kcal.kg⁻¹) | 666±1 | 1540±1 ^b | 1601±3 ^a | 1459±2 ^c | 1330±7 ^e | 1362±2 ^d | 1293±4 ^f | 1325±3 ^e |

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

*Fase experimental: fase 2 – juvenis de tambaqui na faixa de peso médio de 250 mg (inicial) a 5500 mg (final) após 60 dias de alimentação.

Morfometria das fibras musculares

Ao início do experimento, larvas de tambaqui na fase 1 (ca. 70 mg) apresentaram frequência de 80,9 % de fibras com até 30 μm (classes 10, 20 e 30) e 19,1 % de fibras maiores (classes 40 e 50) (Figura 3A). Enquanto os juvenis da fase 2 (ca. 250 mg) apresentaram frequência de 73,5 % de fibras menores que 30 μm (classes 10, 20 e 30) e 26,5 % de fibras com diâmetro maior que 30 μm (classes 40 e 50) (Figura 3B). Foi observada presença de fibras musculares maiores rodeadas por fibras de menor diâmetro, fibras de menor diâmetro em regiões específicas e fibras com núcleos periféricos nos peixes ao início dos experimentos (Figura 4)

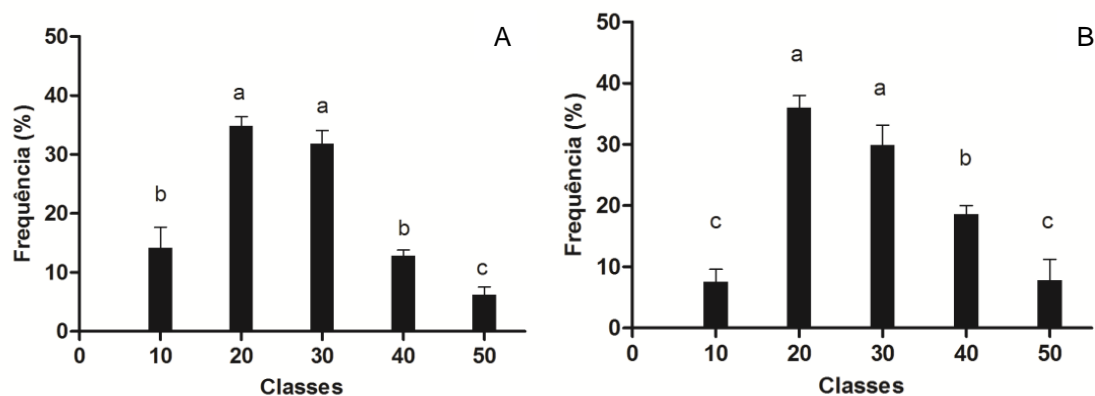


Figura 3. Distribuição da frequência de fibras musculares em diferentes classes de diâmetro (classe 10: $d \leq 10 \mu\text{m}$; classe 20: $10 < d \leq 20 \mu\text{m}$; classe 30: $20 < d \leq 30 \mu\text{m}$; classe 40: $30 < d \leq 40 \mu\text{m}$; classe 50: $d > 40 \mu\text{m}$) em larvas (ca. 70 mg, A) e juvenis (ca. 250 mg, B) de tambaqui ao início do período experimental. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

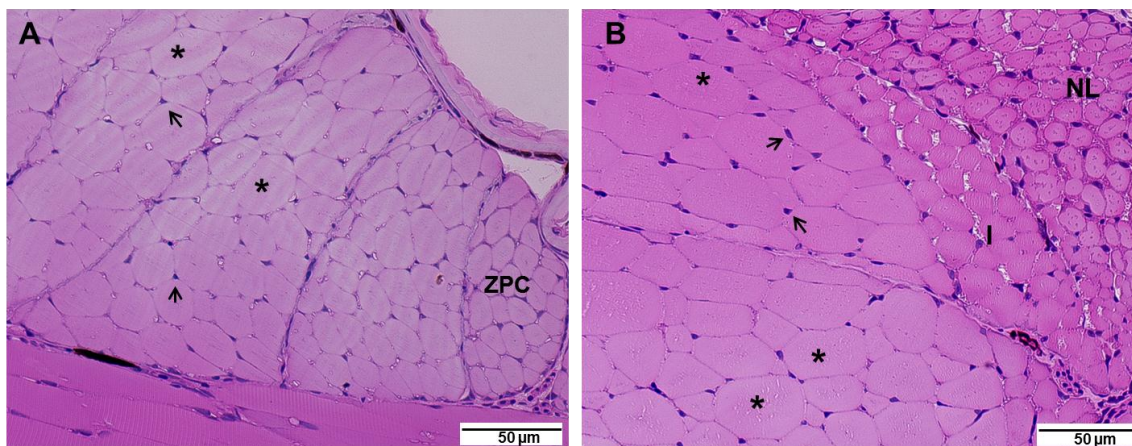


Figura 4. Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas (ca. 70 mg, A) e juvenis (ca. 250 mg, B) de tambaqui ao início dos experimentos, cortes transversais. Zona de proliferação celular (ZPC); Região do nervo da linha lateral (NL); região intermediária (I); fibras musculares com núcleo periférico (↑); fibras musculares rodeadas por fibras menores (*). Hematoxilina e Floxina B.

Ao final das duas fases experimentais foi observada presença de fibras musculares de maior diâmetro rodeadas por fibras de menor diâmetro, assim como a presença de fibras musculares com núcleos periféricos (Figuras 5 e 7). Após 30 dias de alimentação na fase 1, não foram observadas diferenças estatísticas entre os resultados de frequência de fibras das classes 30 e 40 dos peixes de todos os tratamentos ($P > 0,05$). As frequências de fibras das classes 10 e 20 demonstraram queda com o aumento de proteína. Porém, a frequência das fibras musculares da classe 50 apresentaram comportamento inverso (Figura 6). Por outro lado, ao final da fase 2, após 60 dias de alimentação, os juvenis demonstraram crescimento muscular semelhante em todos os tratamentos, exceto na classe 40 em que houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre os juvenis dos tratamentos D42,5 e D48,6 (Figura 8).

A análise das cinco fibras musculares menores e maiores das larvas após 30 dias de alimentação demonstrou que as larvas do tratamento D47,5 possuíam o maior diâmetro entre as menores fibras, enquanto as fibras com maior diâmetro foram observadas para as larvas dos tratamentos D42,1 e D47,5 (Tabela 6). Na fase 2, os juvenis dos tratamento D36,4 demonstraram o maior diâmetro entre as fibras menores e os juvenis dos tratamentos D19,9 e D26,2 apresentaram o menor diâmetro entre as fibras maiores (Tabela 7).

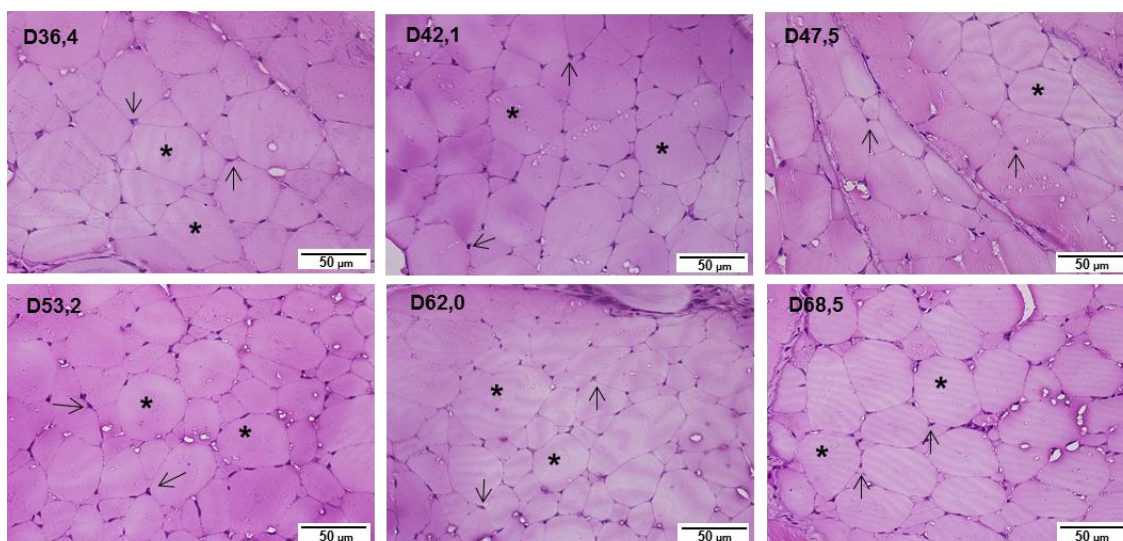


Figura 5. Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de tambaqui (ca. 70 mg), alimentadas por 30 dias com dietas com níveis crescentes de proteína (19,9 a 68,5 % de PB). Observar presença de fibras musculares com núcleo periférico (\uparrow), padrão de crescimento muscular por hiperplasia em mosaico nos peixes de todos os tratamentos pela presença de fibras de maior diâmetro rodeadas por fibras de menor diâmetro (*), e aumento da hipertrofia das fibras musculares com os níveis crescentes de proteína nas dietas. Hematoxilina e Floxina B.

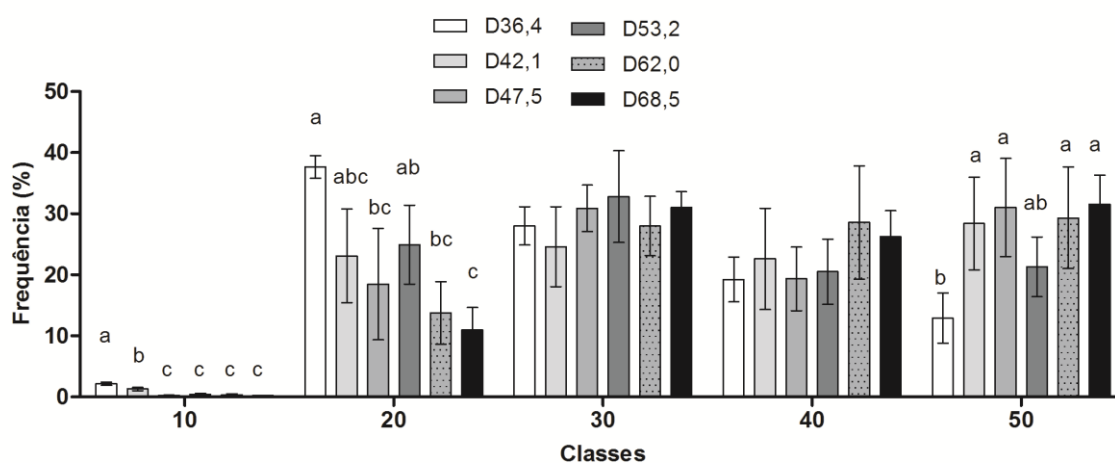


Figura 6. Distribuição da frequência de fibras musculares em diferentes classes de diâmetro (classe 10: $d \leq 10 \mu\text{m}$; classe 20: $10 < d \leq 20 \mu\text{m}$; classe 30: $20 < d \leq 30 \mu\text{m}$; classe 40: $30 < d \leq 40 \mu\text{m}$; classe 50: $d > 40 \mu\text{m}$) em larvas de tambaqui (ca. 70 mg), após 30 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com níveis crescentes de proteína bruta (36,4 a 68,5 % de PB). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Tabela 6. Diâmetro médio das cinco fibras menores e maiores da musculatura esquelética de larvas de tambaqui após 30 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com níveis crescentes de proteína bruta.

| Diâmetro das cinco fibras (μm) | Proteína bruta das dietas | | | | | |
|---|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| | D36,4 | D42,1 | D47,5 | D53,2 | D62,0 | D68,5 |
| Menores | $8,8\pm 0,2^c$ | $9,3\pm 1,5^c$ | $11,2\pm 1,1^a$ | $9,5\pm 1,1^c$ | $10,7\pm 0,9^{ab}$ | $9,8\pm 1,3^{bc}$ |
| Maiores | $52,6\pm 2,6^c$ | $69,0\pm 2,4^a$ | $68,7\pm 3,6^a$ | $64,7\pm 2,5^b$ | $64,6\pm 3,4^b$ | $67,3\pm 2,1^{ab}$ |

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

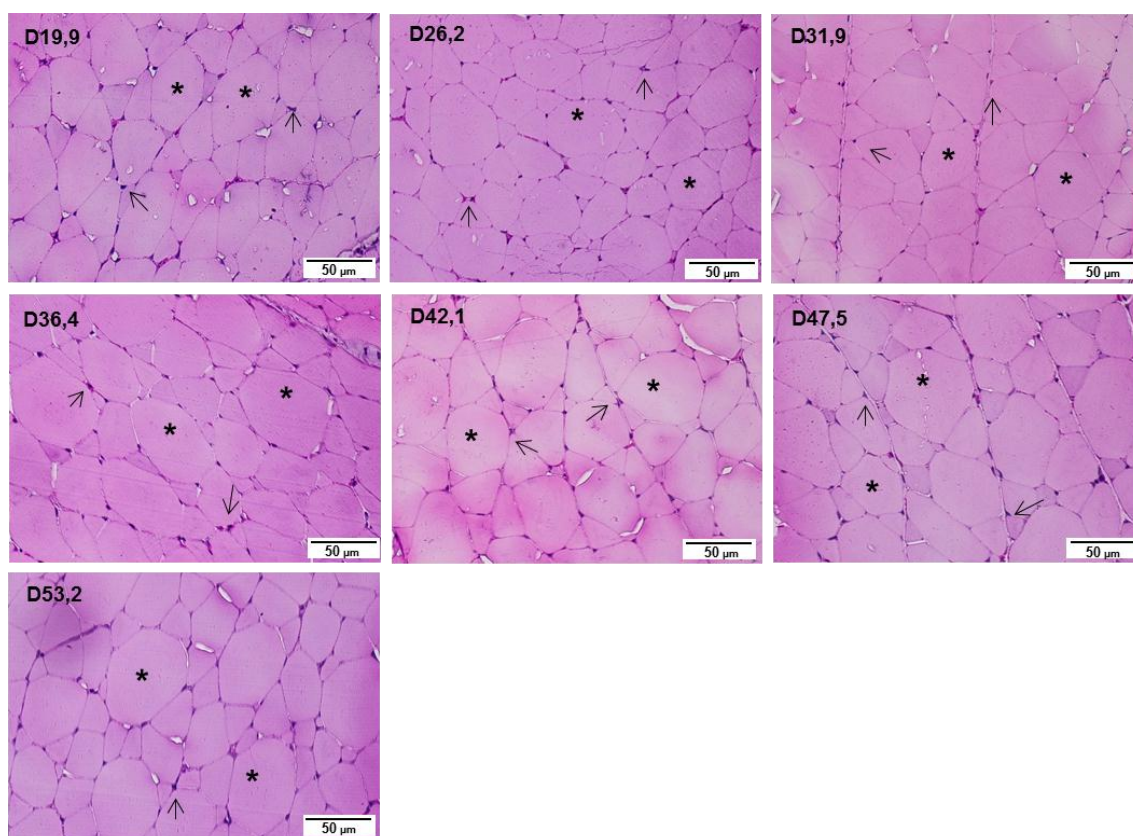


Figura 7. Fotomicrografias da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui (ca. 250 mg) alimentados por 60 dias com dietas com níveis crescentes de proteína (19,9 a 68,5 % de PB). Observar fibras musculares com núcleo periférico (\uparrow); padrão de crescimento muscular por hiperplasia em mosaico nos juvenis de todos os tratamentos pela presença de fibras com maior diâmetro rodeadas por fibras de menor diâmetro (*). Hematoxilina e Floxina B.

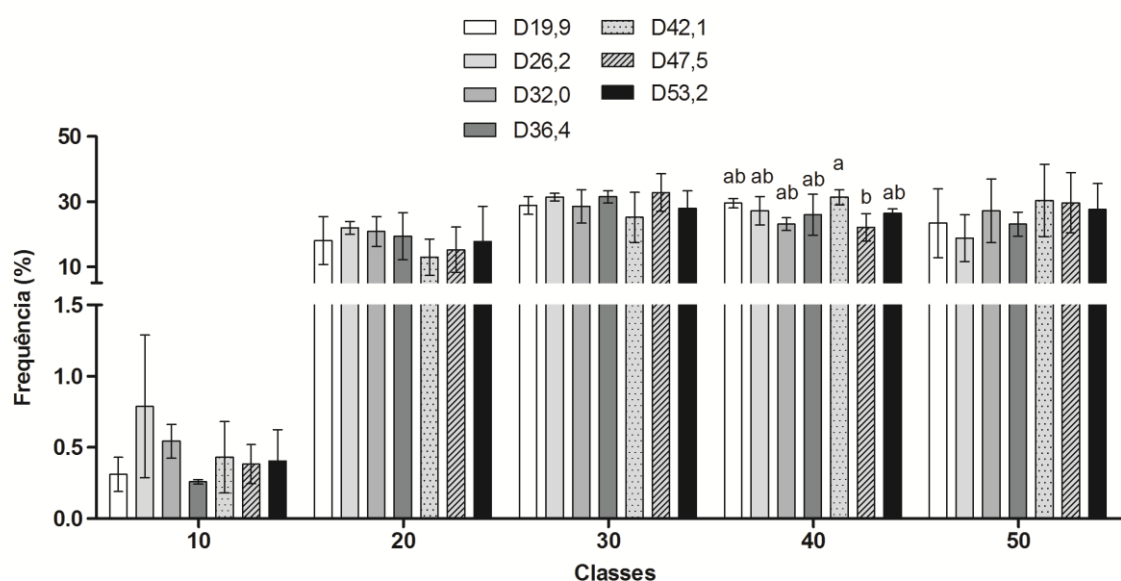


Figura 8. Distribuição da frequência de fibras musculares em diferentes classes de diâmetro (classe 10: $d \leq 10 \mu\text{m}$; classe 20: $10 < d \leq 20 \mu\text{m}$; classe 30: $20 < d \leq 30 \mu\text{m}$; classe 40: $30 < d \leq 40 \mu\text{m}$; classe 50: $d > 40 \mu\text{m}$) em juvenis de tambaqui (ca. 250 mg), após 60 dias de alimentação com dietas semipurificadas com níveis crescentes de proteína bruta (19,9 a 53,2 % de PB). A ausência de letras indica que não houve diferença entre tratamentos pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Tabela 7. Diâmetro médio das cinco fibras menores e maiores da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com níveis crescentes de proteína bruta.

| Diâmetro das cinco fibras (μm) | Proteína bruta das dietas | | | | | | |
|---|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | D19,9 | D26,2 | D31,9 | D36,4 | D42,1 | D47,5 | D53,2 |
| Menores | 10,6 \pm 0,5 ^{bc} | 10,1 \pm 0,6 ^c | 10,6 \pm 0,9 ^{bc} | 12,0 \pm 1,1 ^a | 10,7 \pm 0,9 ^{bc} | 10,9 \pm 0,9 ^{bc} | 11,4 \pm 1,3 ^b |
| Maiores | 56,7 \pm 5,6 ^d | 57,8 \pm 4,6 ^d | 63,0 \pm 5,7 ^c | 63,6 \pm 3,7 ^{bc} | 66,3 \pm 2,8 ^{abc} | 67,9 \pm 4,8 ^{ab} | 69,0 \pm 3,7 ^a |

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

No presente estudo, a exigência em proteína bruta para a máxima resposta em GP de larvas de tambaqui na faixa de peso de cerca de 70 a 430 mg foi de 49,46 %, enquanto para juvenis na faixa de peso de cerca de 250 a 5500 mg o nível de 31,90 % resultou no máximo GP dos peixes. Os valores encontrados são ligeiramente superiores aos observados para juvenis de tambaqui com peso inicial de 1,4 g (VAN DER MEER et al., 1995) e 8,4 g (HERNANDEZ et al., 1995), em que as exigências determinadas foram de 48,1 e 31 % de PB, respectivamente. Diferenças entre resultados de exigência nutricional para uma determinada espécie podem ocorrer devido a diversos fatores, como variações das condições experimentais, relação energia:proteína da dieta, valor biológico da fonte proteica, digestibilidade das fontes de energia não proteicas, genética e idade dos exemplares, além dos diferentes delineamentos experimentais e formulação das dietas (VIDAL JUNIOR et al., 1998; RODRIGUES et al., 2014; XU et al., 2015).

A redução da exigência em proteína observada em larvas e juvenis de tambaqui no presente estudo é coerente com o que é amplamente relatado na literatura. De acordo com Wilson (2002), nos peixes, a exigência em proteína diminui com o aumento do tamanho corporal e idade. Na fase inicial de desenvolvimento, os peixes necessitam de nutrientes em quantidade e qualidade que proporcionem crescimento adequado (PORTELLA; DABROWSKI, 2008), pois a síntese de proteínas deve exceder a degradação, para que o balanço entre estes dois processos resulte na deposição ou acréscimo de proteína (MILLWARD, 1989) e, conseqüentemente, em crescimento. Porém, quando em excesso, uma parte da proteína ingerida pelos peixes é direcionada para síntese de novas proteínas e o restante pode ser convertido em energia (WILSON 2002), aumentando produção de amônia e sua excreção na água, e, conseqüentemente, afetando negativamente o ambiente de criação, a ingestão de alimento e o crescimento dos peixes (McGOOGAN; GATLIN III, 1999; TIBBETTS et al., 2000; ZHANG et al., 2010).

Os resultados das análises de composição corporal e desempenho demonstraram que as quantidades de proteína nas dietas influenciam a

utilização das diferentes fontes energéticas para manutenção do metabolismo. As larvas ou juvenis de tambaqui alimentados com níveis proteicos acima dos observados para o máximo GP apresentaram decréscimo (fase 1, larvas com peso inicial de ca. 70 mg) ou não demonstraram aumento do desempenho de crescimento (fase 2, juvenis de peso inicial de ca. 250 mg). Este comportamento também foi observado em estudos com exigência proteica de tambaqui em outros estágios de crescimento (MEROLA; CANTELMO, 1987; VAN DER MEER et al., 1995; OISHI et al., 2010) e também em outras espécies de água doce como *Clarias gariepinus* (FARHAT; KHAN, 2011) e *Channa punctatus* (ZHERA; KHAN, 2012). Segundo Ozório et al. (2009) e Mohseni et al. (2014), a diminuição de desempenho de crescimento de peixes alimentados com níveis de proteína acima dos ideais pode ser atribuída a duas possíveis explicações: a primeira atribuída à baixa quantidade de energia de fontes não proteicas das dietas com maiores inclusões de proteína, causando, desta forma, o catabolismo da proteína ingerida para produção de energia, além de aumento dos custos energéticos para a excreção de nitrogênio (WILSON, 2002; OZÓRIO et al., 2009). A segunda, em casos de peixes onívoros, a digestão e a utilização de dietas sem ou com baixo teor de carboidrato é comprometida causando diminuição do crescimento (STONE 2003; OZÓRIO et al., 2009).

Os resultados de TCE na fase 1 variaram de 5,4 a 6,1 % por dia, enquanto na fase 2 os resultados observados foram de 4,3 a 5,2 % por dia. Em outros estudos com a mesma espécie foram observados resultados de 0,80 a 0,90 % por dia em juvenis na faixa de peso de 46,4 g a 78,6 g (OISHI et al., 2010), e de 1,76 a 2,74 % por dia em juvenis na faixa de peso entre 6 e 175 g (BUZOLLO, 2014). Estas variações de TCE entre os estudos podem ser resultado de diferenças entre as dietas utilizadas e, principalmente, do peso e fase de desenvolvimento. Os peixes em estágio inicial apresentam crescimento acelerado, o qual tende a reduzir conforme o desenvolvimento avança (FRACALOSSO et al., 2013). Por exemplo, durante os primeiros 30 dias de alimentação exógena, larvas de curimatá *Prochilodus scrofa* (syn. *P. linneatus*) na faixa de peso de 0,95 mg (inicial) a 16,08 - 30,52 mg (final),

apresentaram TCE variando de 9,40 a 11,51% por dia. Posteriormente, entre 31 e 75 dias de alimentação (peso final de 248,6 a 198,6 mg), as TCEs reduziram para 6,06 e 4,02% por dia (PORTELLA et al., 2000). Taxas de crescimento específico ainda mais altas foram observadas em larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* nos dois primeiros dias de alimentação exógena (7 dias de vida pós eclosão), 30,63 % por dia (KOJIMA et al., 2015).

Os níveis de proteína na dieta alteraram a composição corporal dos peixes nas duas fases de desenvolvimento. O lipídio corporal dos peixes na fase 1 (ca. 70 mg) apresentou diminuição superior a 58 % nos peixes do tratamento D68,5, quando comparado aos resultados dos peixes do tratamento D36,4. O mesmo comportamento de queda no conteúdo de gordura corporal conforme aumento do nível de proteína foi observado em estudo com juvenis de tambaqui na faixa de 6,50 a 175 g alimentados com dietas com 14 a 32 % de proteína digestível (BUZOLLO, 2014). Resultados mais elevados de lipídio corporal em peixes alimentados com dietas com menores níveis proteicos são atribuídos à alta relação E:P das dietas que contém maiores proporções de fontes de energia não proteica, como os carboidratos, que aumentam a lipogênese *de novo* (OZÓRIO et al., 2009).

O aumento da proteína dietética não afetou o conteúdo de proteína corporal dos peixes da fase 1, enquanto na fase 2 houve aumento dos níveis proteicos com o aumento da proteína na dieta. Esta variação na proteína corporal pode estar relacionado à baixa síntese de proteínas musculares pois as dietas apresentaram menores quantidades de fontes de energia não proteica. Segundo Xu et al. (2002) ingredientes fontes de energia não proteica nas dietas para peixes aumentam a eficiência na utilização da proteína através da maior contribuição destas fontes no gasto energético dos peixes, disponibilizando a proteína para o crescimento. Os peixes onívoros utilizam com eficiência fontes de energia não proteica, como observado em estudos com juvenis de *P. mesopotamicus* (MUÑOZ-RAMÍREZ, 2005; ABIMORAD; CARNEIRO 2007; ABIMORAD et al., 2007; BICUDO et al., 2009). O efeito poupador da proteína geralmente é observado em peixes alimentados com níveis baixos de proteína comparados aos alimentados com altos níveis desse

nutriente (TIBBETTS et al., 2005). O decréscimo nos resultados de TEP e VPP observados neste estudo pode estar relacionado à utilização da proteína das dietas como fonte de energia (YANG et al., 2002; KIM et al., 2004; MOHANTA et al., 2008), pois as dietas experimentais com altas porcentagens de proteína possuíam baixas inclusões de carboidratos.

Na fase 1, foi observado nos juvenis do tratamento D68,5 maior consumo e pior CAA. De maneira semelhante, foi observado que os juvenis do tratamento D47,5 também apresentaram consumo elevado, porém, com melhor resposta de CAA. Tal resultado pode ser atribuído a tentativa das larvas em ingerir a quantidade de proteína necessária para suprir a exigência proteica (PIROZZI et al., 2010). Esta mesma tendência de maior consumo de dietas mais pobres em proteína foi observado em juvenis de peixes onívoros como *Pagellus bogaraveo* (SILVA et al., 2006), carnívoros como *Umbrina cirrosa* L. (AKPINAR et al., 2012) e herbívoros como *Ctenopharyngodon idella* (JIN et al., 2015). A maior quantidade de EE e relação E:P da dieta D47,5 em relação à D68,5 pode ter favorecido o efeito poupador da proteína, resultando em melhor utilização da proteína a favor do crescimento. Esta afirmação pode ser comprovada pelas maiores respostas de TEP e VPP.

As análises das fibras musculares das larvas e dos juvenis no início dos experimentos demonstraram características de crescimento muscular por hiperplasia estratificada em que são observadas fibras pequenas (25 μ m) concentradas em regiões de proliferação celular (região apical e margens laterais do miótomo), e por hiperplasia em mosaico, em que fibras de menor diâmetro estão presentes ao redor de fibras de maior diâmetro (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001; JOHNSTON, 2006). Em peixes que atingem pequeno porte quando adultos, o crescimento muscular ocorre principalmente por hipertrofia das fibras musculares formadas durante as fases iniciais de vida, enquanto em peixes que atingem maior porte (como o tambaqui), os processos de crescimento muscular por hiperplasia e hipertrofia ocorrem durante todo o desenvolvimento dos peixes (ROWLERSON E VEGGETTI, 2001), sendo o período de desenvolvimento muscular por hiperplasia em mosaico o mais

importante para o crescimento muscular das espécies de interesse para a aquicultura (JOHNSTON, 2006; VALENTE et al., 2013).

Muitos fatores podem afetar o crescimento muscular dos peixes como as condições ambientais (JOHNSTON et al., 2003; ASSIS et al., 2004; JOHNSTON, 2006; LÓPEZ-ALBORS et al., 2008; PAULA et al., 2014), a nutrição (JOHNSTON et al., 2002; BJORNEVIK et al., 2003; SILVA et al., 2009; ALAMI-DURANTE et al., 2010; LEITÃO et al., 2011; KOJIMA et al., 2015), e o estágio de desenvolvimento (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001; CARANI et al., 2008). Ao final do período de 30 dias de alimentação com as dietas na primeira fase experimental, as fibras indicativas de crescimento hiperplásico (classes 10 e 20) das larvas alimentadas com quantidades acima de 47,5 % de PB demonstraram menores frequências com o aumento da quantidade de proteína nas dietas, ou seja, menor crescimento muscular pelo processo de hiperplasia. Esta queda nas frequências de fibras das classes 10 e 20 pode ter ocorrido devido ao menor aproveitamento da proteína ingerida para o desenvolvimento muscular, evidenciado pela queda nos resultados de TEP e VPP nas larvas destes tratamentos. Por outro lado, o crescimento muscular por hipertrofia foi favorecido pelas maiores quantidades de proteína dietética, evidenciado pelas maiores frequências de fibras da classe 50.

O crescimento muscular dos juvenis de tambaqui (ca. 250 a 5500 mg) não foi afetado pela quantidade de proteína dietética. Em todos os tratamentos foram observados crescimento tanto por hiperplasia, evidenciado pela frequência acima de 38,0 % a 54,0 % de fibras de até 30 μ m nos juvenis dos tratamentos D42,1 e D26,2, como, principalmente, por hipertrofia, caracterizado pela presença acima de 45,0 % a 53,0 % de fibras das classes 40 e 50 nos peixes dos tratamentos D26,2 e D53,2, respectivamente. Em outro estudo com juvenis de tambaqui (6 a 175 g) foram observados maior crescimento muscular por hipertrofia nos juvenis alimentados com as dietas de 29 % e 32 % de PD (BUZOLLO, 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo apontam pela primeira vez as exigências em proteína bruta para uma espécie nativa nas fases iniciais de desenvolvimento e poderão contribuir para a proposição de dietas específicas

para a fase de crescimento inicial. Ainda, esses achados poderão orientar futuros estudos relacionados às exigências de aminoácidos específicos para a fase inicial de desenvolvimento de juvenis de tambaqui.

CONCLUSÃO

A exigência proteica encontrada neste estudo para o máximo desempenho de ganho em peso de tambaquis na faixa de 70 a 430 mg foi de 49,46 % de proteína bruta em dieta semipurificada, enquanto para juvenis na faixa de peso de 250 a 5500 mg foi de 31,90 % de proteína bruta em dieta semipurificada.

O crescimento hiperplásico da musculatura esquelética em peixes no início de desenvolvimento, como na fase 1 (peso de 70 a 430 mg) foi afetado negativamente pelo excesso de proteína das dietas. Para os juvenis na faixa de peso de 250 a 5500 mg o crescimento muscular não foi alterado pelos níveis crescentes de proteína.

Os níveis proteicos crescentes e os níveis decrescentes de energia não proteica das dietas semipurificadas alteram a composição corporal de larvas e juvenis de tambaqui, principalmente a variável de extrato etéreo. Os resultados obtidos neste estudo poderão auxiliar em pesquisas futuras voltadas a formulação de dietas ideais para cada estágio de crescimento dos peixes, visando o desenvolvimento muscular para o melhor desempenho e qualidade de produtos, como o filé do peixe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles-fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, p.1–9, 2007.
- ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 36 – 44, 2007.
- AKPINAR, Z.; SEVGILI, H.; ÖZGEN, T.; DEMIR, A.; EMRE, Y. Dietary protein requirement of juvenile shi drum, *Umbrina cirrosa* (L.). **Aquaculture Research**, v. 43, n. 3, p. 421 - 429, 2012.
- ALAMI-DURANTE, H.; MÉDALE, F.; CLUZEAUD, M.; KAUSHIK, S. J. Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 303, p. 50–58, 2010.
- ALMEIDA, L. C.; AVILEZ, I. M.; HONORATO, C. A.; HORI, T. S. F.; MORAES, G. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v.17, p. 253 – 262, 2011.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- ARARIPE, M. N. B. A.; ARARIPE, H. G. A.; LOPES, J. B.; BRAGA, P. L. C.; BRAGA, T. E. A.; HOSMYLTON, A. Redução da proteína bruta com suplementação de aminoácidos em rações para alevinos de tambatinga. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 9, p. 1845 - 1850, 2011.
- ASSIS, J. M. F. de; CARVALHO, R. F.; BARBOSA, L.; AGOSTINHO, C. A.; DAL PAI SILVA, M. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, v. 237, p. 251-267, 2004.
- AYALA, I.; SANTAELLA, M.; MARTINEZ, C.; PERIAGO, M. J.; GIL, F.; BLANCO, A.; ALBORS, O. L. Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. **Food Science and Technology**, v.43, p. 465-45, 2010.
- BICUDO, J. A.; SADO, R. Y.; CYRINO, J. E. P. Dietary lysine requirement of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Aquaculture**, v. 297, p. 151 – 156, 2009.

BJORNEVIK, M.; BEATTIE, C.; HANSEN, T.; KIESSLING, A. Muscle growth in juvenile Atlantic salmon as influenced by temperature in the egg and yolk sac stages and diet protein level. **Journal of Fish Biology**, London, v. 62, p. 1159–1175, 2003.

BUZOLLO, H. **Exigência de proteína digestível em dietas para juvenis de tambaqui e a dinâmica do crescimento muscular por aspectos morfológicos e turnover isotópico do carbono-13 e do nitrogênio-15**. 109 f. (Tese de Doutorado em Zootecnia.) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

CARANI, F. R.; AGUIAR, D. H.; ALMEIDA, F. L. A.; GONÇALVES, H. S.; PADOVANI, C. R.; DAL PAI-SILVA, M. Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 205-211, 2008.

CONCEIÇÃO, L.E.C.; GRASDALEN, H.; RØNNESTAD, I. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. **Aquaculture**, v.227, p.221-232, 2003.

FARHAT, K. M. A; KHAN, M. A. Growth, feed conversion and nutrient retention efficiency of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) fingerling fed diets with varying levels of protein. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 23, p. 304 - 316, 2011.

FRACALOSSO, D. M.; RODRIGUES, A. P. O.; SILVA, T. S. C.; CYRINO, J. E. P. Técnicas experimentais em nutrição de peixes. In: FRACALOSSO, D.M. e CYRINO, J.E.P. **NUTRIAQUA: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. 1ª ed. Ampliada. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. p.37-63, 2013.

GUTIÉRREZ, F. W. A.; ZALDÍVAR, J. R.; CONTRERAS, G. S. Efecto de varios niveles de energía digestible y proteína em la dieta sobre el crecimiento de gamitana (*Colossoma macropomum*) Cuvier 1818. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 29, p. 178 - 186, 2009.

GUTIÉRREZ, F. W.; QUISPE, M.; VALENZUELA, L.; CONTRERAS, G.; ZALDÍVAR, J. Utilización de la proteína dietaria por alevinos de la gamitana, *Colossoma macropomum*, alimentados com dietas isocalóricas. **Revista Peruana de Biología**, v. 17, p. 219 - 223, 2010.

HERNÁNDEZ, M.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Effect of dietary energy sources on the utilization of protein by *Colossoma macropomum* fingerlings. **Fisheries Science**, v. 61, n. 3, p. 507 - 511, 1995.

JIN, Y.; TIAN, L. X.; XIE, S. W.; GUO, D. Q.; YANG, H. J.; LIANG, G. Y.; LIU, Y. J. Interactions between dietary protein levels, growth performance, feed utilization, gene expression and metabolic products in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquaculture**, v. 437, p. 75 – 83, 2015.

JOHNSTON, I. A.; MANTHRI, S.; ALDERSON, R.; CAMPBELL, P.; MITCHELL, D.; WHYTE, D.; DINGWALL, A; NICKELL, D.; SELKIRK, C.; ROBERTSON, B. Effects of dietary protein level on muscle cellularity and flesh quality in Atlantic salmon with particular reference to gaping. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 210, p. 259–283, 2002.

JOHNSTON, I. A.; MANTHRI, S.; SMART, A.; CAMPBELL, P.; NICKELL, D.; ALDERSON, R. Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 206, p. 3425–3435, 2003.

JOHNSTON, I. A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2249-2264, 2006.

JOMORI, R. K. **Estudos sobre a alimentação de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) com náuplios de *Artemia* e a sua substituição por dieta artificial**. 70 f. (Trabalho de graduação em Zootecnia.) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

KENDALL JR., A. W.; AHLSTROM, E. H.; MOSER, H. G. Early life history of fishes and their characters. In: Moser, H.G., Richards, W.J., Cohen, D.M., Fahay, M.P., Kendall Jr., A.W., Richardson, S.L. (Eds.), *Ontogeny and Systematics of Fishes*. Proceedings of the International Symposium Dedicated to the Memory of Elbert Halvor Ahlstrom, August 15–18, 1983, La Jolla, California, **American Society of Ichthyologists and Herpetologists**, Special Publication, pp. 11–22, 1984.

KIM, K. W.; WANG, X.; CHOI, S. M.; PARK, G. J.; BAI, S. C. Evaluation of optimum dietary protein-to-energy ratio in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). **Aquaculture Research**. v.35, p. 250–255, 2004.

KOJIMA, J. T.; LEITÃO, N. J.; MENOSSI, O. C. C.; FREITAS, T. M.; DAL-PAI SILVA, M.; PORTELLA, M. C. Short periods of food restriction do not affect growth, survival or muscle development on pacu larvae. **Aquaculture**, v. 436, p. 137 – 142, 2015.

LEITÃO, N. J.; DAL PAI-SILVA, M.; ALVES, F. L. DE A.; PORTELLA, M. C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, v. 315, p. 78-85, 2011.

LÓPEZ-ALBORS, O.; ABDEL, I.; PERIAGO, M. J.; AYALA, M. D.; ALCÁZAR, A. G.; GRACIÁ, C. M.; NATHANAILIDES, C.; VÁZQUEZ, J. M. A. Temperature influence on the white muscle growth dynamics of the sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. Flesh quality implications at commercial size. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 277, p. 39–51, 2008.

MILLWARD, D. J. The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover. **Aquaculture**, v. 79, p. 1 – 28, 1989.

MCGOOGAN, B.B.; GATLIN III, D.M. Dietary manipulation affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*: II. Effect of energy levels and nutrient density at various feeding rates. **Aquaculture**, v.182, p.271-285, 1999.

MEROLA, N.; CANTELMO, O. A. Growth, feed conversion and mortality of cage-reared Tambaqui, *Colossoma macropomum*, fed various dietary feeding regimes and protein levels. **Aquaculture**, v. 66, p. 223 – 233, 1987.

MOHANTA, K.N., MOHANTY, S.N., JENA, J.K., SAHU, N.P. Protein requirement of silver barb, *Puntius gonionotus* fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, p. 1 – 10, 2008.

MOHSENI, M.; POURALI, H. R.; KAZEMI, R.; BAI, S. Evaluation of the optimum dietary protein level for the maximum growth of juvenile beluga (*Huso huso* L. 1758). **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1832 – 1841, 2014

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura, 2013. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Brasília 60p.: Disponível em : http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL4.doc.

MUÑOZ RAMIREZ, A. P. **Utilização de carboidratos digestíveis em dietas para pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)**. 138 f. (Tese de doutorado em Aquicultura). Centro de Aquicultura – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

OISHI, C. A.; NWANNA, L. C.; PEREIRA-FILHO, M. Optimum dietary protein requirement for Amazonian tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, fed fishmeal free diets. **Acta Amazonica**,v. 40, p. 757 - 762, 2010.

OZÓRIO, R. O. A.; VALENTE, L. M. P.; CORREIA, S.; POUSÃO-FERREIRA, P.; DAMASCENO-OLIVEIRA, A.; ECORCIO, C.; OLIVA-TELES, A. Protein requirement for maintenance and maximum growth of two-banded seabream, *Diplodus vulgaris*, juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v. 15, p. 85 – 93, 2009.

PAULA, T. G.; ALMEIDA, F. L. A.; CARANI, F. R.; VECHETTI-JÚNIOR, I. J.; PADOVANI, C. R.; SALOMÃO, R. A. S.; MARECO, E. A.; SANTOS, V. B.; DAL-PAI-SILVA, M. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, Oxford, v.169, p. 31–37, 2014.

PIROZZI, I.; BOOTH, M. A.; ALLAN, G. L. The interactive effect of dietary protein and energy on feed intake, growth and protein utilization of juvenile mulloway (*Argyrosomus japonicus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 16, p. 61 – 71, 2010.

PORTELLA, M. C.; DABROWSKI, K. Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae. In: Cyrino, J.E.P., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), **Feeding and Digestive Functions in Fishes**. Science Publisher, New Hampshire, pp. 227–279, 2008.

PORTELLA, M. C.; VERANI, J. R.; CESTAROLLI, M. A. Use of live and artificial diets enriched with several fatty acid sources to feed *Prochilodus scrofa* larvae and fingerlings. 1. Effects on survival and growth. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 15, p. 45 - 58, 2000.

PORTELLA, M. C.; JOMORI, R. K.; LEITÃO, N. J.; MENOSSI, O. C. C.; FREITAS, T. M.; KOJIMA, J. T.; LOPES, T. S.; CLAVIJO-AYALA, J. A.; CARNEIRO, D. J. Larval development of indigenous South American freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A review. **Aquaculture**, v. 432, p. 402 – 417, 2014.

PORTZ, L.; FURUYA, W. M. Energia, Proteína e Aminoácidos. In: FRACALLOSSI, D. M.; CYRINO, J. E. P. (Ed). **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. 1ª ed. Ampliada. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p. 37-64, 2013.

RODRIGUES, A. P. Nutrição e alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.40, n. 1, p. 135 – 145, 2014.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: JOHNSTON, I.A. (Ed.). **Muscle development and growth**. San Diego: Academic Press, p. 103-140, 2001

SAAVEDRA, M.; GRADE, A.; CANDEIAS-MENDES, A.; PEREIRA, T. G.; TEIXEIRA, B.; YÚFERA, M.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; MENDES, R.; POUSÃO-FERREIRA, P. Different dietary protein levels affect meafre (*Argyrosomus regius*) larval survival and muscle cellularity. **Aquaculture**, v. 450, p. 89 – 94, 2016.

SANTOS, L.; PEREIRA FILHO, M.; SOBREIRA, C.; ITUASSÚ, D.; FONSECA, F. A. L. Exigência protéica de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após privação alimentar. **Acta Amazônica**, v. 40, n.3, p.597-604, 2010.

SILVA, A. L. F.; CHAGAS, E. C.; GOMES, L. C.; ARAÚJO, L. D.; SILVA, C. R.; BRANDÃO, F. R. Toxicity and sublethal effects of potassium permanganate in Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 3, p. 318 – 321, 2006.

SILVA, P.; VALENTE, L. M. P.; GALANTE, M. H.; ANDRADE, C. A. P.; MONTEIRO, R. A. F.; ROCHA, E. Dietary protein content influences both growth and size distribution of anterior and posterior muscle fibres in juveniles of *Pagellus bogaraveo* (Brunnich). **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 30, p. 29 – 39, 2009.

STONE, D. A. J. Dietary carbohydrate utilization by fish. **Reviews in Fisheries Science**, v. 11, p. 337 – 369, 2003.

TIBBETTS, S. M.; CALL, S. P.; ANDERSON, D. M. Dietary protein requirement of juvenile American eel (*Anguilla rostrata*) fed practical diets. **Aquaculture**, v.186, n.1/2, p.145 - 155, 2000.

TIBBETTS, S. M.; LALL, S. P.; MILLEY, J. E. Effects of dietary protein and lipid levels and DP DE₁ ratio on growth, feed utilization and hepatosomatic index of juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 67 – 75, 2005.

VALENTE, L.M.P.,MOUTOU, K.A., CONCEIÇÃO, L.E.C., ENGROLA, S., FERNANDES, J.M.O., JOHNSTON, I.A. What determines growth potential and juvenile quality of farmed fish species? **Reviews in Aquaculture**. V. 5, S168–S193, 2013.

VAN DER MEER, M. B.; MACHIELS, M. A. M.; VERDEGEM, M. C. J. The effect of dietary protein level on growth, protein utilization and body composition of *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 26, p. 901 – 909, 1995.

VAN DER MEER, M. B.; ZAMORA, J. E.; VERDEGEM, M. C. J. Effect of dietary lipid level on protein utilization and the size and proximate composition of body compartments of *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 26, p. 405 - 417, 1997.

VIDAL JUNIOR, M. R.; DONZELE, J. L.; CAMARGO, A. C. S.; ANDRADE, D. R.; SANTOS, L. C. Níveis de proteína bruta para tambaqui (*Colossoma macropomum*), na fase de 30 a 250 gramas. 1.Desempenho dos tambaquis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 3, p. 421 – 426, 1998.

Xu X., Fontaine P., M_elard C. & Kestemont P. Effects of dietary fat levels on growth, feed efficiency and biochemical compositions of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. **Aquaculture International**, v. 9, p. 437 – 449, 2002.

XU, G. F.; WANG, Y. Y.; HAN, Y.; LIU, Y.; YANG, Y. H.; YU, S. I.; MOU, Z. B. Growth, feed utilization and body composition of juvenile Manchurian trout, *Brachymystax lenok* (Pallas) fed different dietary protein and lipid levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 21, p. 332 – 340, 2015.

YANG, S. D.; LIOU, C. H.; LIU, F. G. Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 213, p. 363 – 372. 2002.

WILSON, R. P. Protein and amino acids. In: Halver J. E., Hardy R.W. (Eds.) **Fish Nutrition**. 3rd version. Elsevier Science, San Diego, USA. p. 144–179, 2002.

ZEHRA, S.; KHAN, M. A. Dietary protein requirement for fingerling *Channa punctatus* (Bloch), based on growth, feed conversion, protein retention and biochemical composition. **Aquaculture International**, v. 20, p. 383 – 395, 2012.

ZHANG, J.; ZHOU, F.; WANG, L. L; SHAO, Q.; XU, Z. Dietary protein requirement of juvenile Black Sea Bream, *Sparus microcephalus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. S2, p. 151 – 164, 2010.

CAPÍTULO 3 – SUBSTITUIÇÃO DA PROTEÍNA POR MISTURA DE AMINOÁCIDOS CRISTALINOS PARA JUVENIS DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum*

RESUMO – Um dos maiores desafios para aquicultura intensiva é a redução dos níveis de inclusão de farinha de peixe em dietas para organismos aquáticos, pois os substitutos geralmente são deficientes em alguns aminoácidos indispensáveis. A substituição da proteína por aminoácidos cristalinos e peptídeos, em determinadas proporções, pode ser utilizada sem prejudicar o desempenho dos animais em fase inicial de crescimento. O objetivo deste estudo foi determinar o nível máximo de substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos sem prejudicar o desempenho e o desenvolvimento muscular de juvenis de tambaqui em fase inicial de crescimento (200 ± 50 mg e 21 ± 2 mm). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro réplicas. Uma dieta semipurificada com 31,9 % de PB foi utilizada como dieta base deste estudo. Assim, o perfil de aminoácidos totais presentes na fração proteica (caseína-gelatina) foi substituído por mistura de aminoácidos cristalinos nas proporções de 0, 25, 50, 75 e 90% (D0, D25, D50, D75 e D90, respectivamente). Além das dietas com substituição, foi utilizado um tratamento em que a fonte de proteína foi composta por farinha de peixe (DFP). O desempenho zootécnico dos peixes foi avaliado, assim como a composição corporal, análises morfométricas das fibras musculares e de aminoácidos livres da musculatura esquelética. As respostas de TEP (taxa de eficiência proteica) e VPP (valor produtivo da proteína) entre os juvenis dos tratamentos de substituição (D0 a D90) foram as maiores nos tratamentos D50 e D75 ($P < 0,05$), porém os resultados das variáveis CT (comprimento total), P (peso final) e TCE (taxa de crescimento específico) foram maiores nos juvenis dos tratamentos de até 50 % de substituição ($P < 0,05$) e não diferiram entre si ($P > 0,05$). A composição corporal dos juvenis de tambaqui variou de acordo com os níveis de substituição da fração proteica de 0 a 90 %, o teor de proteína corporal e matéria mineral demonstraram queda com o aumento dos níveis de substituição ($P < 0,05$). A porcentagem total de aminoácidos indispensáveis na musculatura esquelética diminuiu com o aumento dos níveis de substituição da proteína íntegra por mistura de aminoácidos sintéticos ($P < 0,05$). Por outro lado, foi observado o inverso com a porcentagem total de aminoácidos dispensáveis ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para as diferentes classes de diâmetro das fibras ($P > 0,05$), exceto para a classe de fibras menores que $10 \mu\text{m}$ ($P < 0,05$). Os resultados demonstram que a substituição da proteína por aminoácidos cristalinos em até 50 % pode ser utilizada em estudos futuros relacionados a exigência de aminoácidos durante a fase inicial de desenvolvimento do tambaqui.

Palavras-chave: aminoácidos indispensáveis, aminoácidos dispensáveis, nutrição, dieta semipurificada.

CHAPTER 3 – SUBSTITUTION OF PROTEIN BY CRYSTALLINE AMINOACIDS TO TAMBAQUI JUVENILES *Colossoma macropomum*

ABSTRACT - One of the biggest challenges for intensive aquaculture is the reduction of the inclusion levels of fishmeal in diet formulations, because substitutes are usually deficient in indispensable amino acids. The substitution of protein by crystalline amino acids and peptides can be used without impairing fish performance during the initial growth phase (200 ± 50 mg and 21 ± 2 mm). The aim of this study was determine the maximum level of protein replacement by crystalline amino acids without impairing performance and muscle development in tambaqui at early stages of growth. The experiment was conducted in a completely randomized design with six treatments and four replicates. Diet with 31.9 % of crude protein was used as a basal diet. Total amino acids profile present in protein (casein-gelatin) was replaced by mixtures of crystalline amino acids at levels of 0, 25, 50, 75 and 90% (D0, D25, D50, D75 and D90, respectively). Additionally, a control treatment with fishmeal (DFM) as protein source was used. Tambaqui juveniles were evaluated by growth performance, body composition, morphometric analysis of skeletal muscle fibers and free amino acids profile in skeletal muscle. Results of TEP (protein efficiency ratio) and VPP (protein productive value) in fish that received amino acid substitution (0 – 90 %) were higher in juveniles of D50 and D75 ($P < 0.05$) treatments. However, results of CT (total length), P (weight) and TCE (specific growth rate) ($P < 0.05$) were higher in treatments up to 50% of substitution. Body composition of tambaqui juveniles changed according to the substitution levels of protein from 0 to 90%, crude protein and ash levels decreased with increasing levels of substitution. The total percentage of AAI (indispensable amino acids) decreased with the increasing levels of replacement ($P < 0.05$). On the other hand, the inverse was observed regarding the total percentage of AAD (dispensable amino acids) ($P < 0.05$). Morphometric analysis did not show differences in fibers frequency between treatments D0 to D90 ($P > 0.05$), except for class 10 ($P < 0.05$). The results of this study show that substitution up to 50 % can be useful for future studies to determine the appropriate amino acid profile in diets to tambaqui during early stage of development.

Key words: indispensable amino acids, dispensable amino acids, nutrition, semi-purified diet.

INTRODUÇÃO

A proteína é o nutriente mais oneroso das dietas para peixes, e a farinha de peixe é o principal ingrediente proteico das formulações para a maioria das espécies aquícolas. Este ingrediente é utilizado devido à qualidade e quantidade de proteína e de aminoácidos indispensáveis que apresenta, uma vez que esses nutrientes são considerados componentes críticos que atuam na estrutura e metabolismo dos organismos vivos (NRC, 2011). A nutrição é um dos pontos importantes durante a fase inicial de desenvolvimento dos peixes, pois nesta fase os animais apresentam altas taxas de crescimento, e desta forma, têm alta exigência em aminoácidos (CONCEIÇÃO et al., 2010). A redução dos níveis de inclusão da farinha de peixe nas dietas é um dos maiores desafios para a aquicultura intensiva, pois os substitutos devem atender às altas necessidades proteicas dos peixes e, conseqüentemente, às exigências em aminoácidos indispensáveis (ALAMI-DURANTE et al., 2010). As fontes alternativas de proteína geralmente são deficientes em alguns aminoácidos indispensáveis (PERES; OLIVA-TELES, 2005, VAREILLES et al., 2012, JOBLING, 2015) e uma prática comum é a suplementação destes por meio da utilização de aminoácidos cristalinos (YUAN et al., 2011; NUNES et al., 2014).

Anteriormente aos estudos para determinação da exigência em aminoácidos indispensáveis, é necessário estabelecer o nível de substituição da proteína íntegra por aminoácidos cristalinos que não afete o crescimento, a utilização do alimento e a condição fisiológica dos animais (MARCOULI et al., 2004; PERES; OLIVA-TELES, 2005). A maioria dos estudos de exigências de aminoácidos é baseada em experimentos de dose resposta com a utilização de dietas purificadas ou semi-purificadas com substituição parcial por aminoácidos cristalinos (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2014); porém, estas respostas podem ser subestimadas caso as dietas não promovam crescimento adequado (DABROWSKI; GUDERLEY, 2002). Estudos anteriores demonstraram que a substituição (ZAMBONINO INFANTE et al., 1997; MARCOULI et al., 2004; PERES; OLIVA-TELES, 2005) ou a suplementação (TESSER et al., 2005) da proteína por aminoácidos cristalinos e peptídeos, em determinadas proporções,

pode ser utilizada sem afetar o desempenho dos animais em fase inicial de crescimento.

A retenção de proteína corporal depende do potencial de crescimento, idade ou peso corporal, e disponibilidade dos aminoácidos nos alimentos (VERSTEGEN; JONGBLOED, 2003). Peixes jovens depositam menos gordura e mais proteína corporal do que peixes adultos, sendo que os aminoácidos devem estar presentes em proporções adequadas nas dietas pela combinação de ingredientes ou suplementação de forma precisa em cada fase de crescimento (STOREBAKKEN et al., 2000; PORTZ; FURUYA, 2013). Segundo Rodrigues (2014), os estudos relacionados às exigências nutricionais do tambaqui se concentram em animais entre 1 e 100 g, e isto se deve à complexidade existente no manejo e avaliação de peixes na fase inicial de desenvolvimento. No entanto, estudos relacionados à exigência em aminoácidos são necessários para elaboração de dietas ambiental e economicamente sustentáveis, além de promover adequado desenvolvimento aos peixes (FURUYA; FURUYA, 2010), em todas as fases de desenvolvimento .

Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar o nível máximo de substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos sem prejudicar o desempenho e desenvolvimento muscular de juvenis de tambaqui em fase inicial de crescimento. Além disso, este estudo servirá de base para a proposição de uma dieta base para pesquisas futuras de aminoácidos específicos para juvenis da espécie nesta fase, que auxiliarão no desenvolvimento de um pacote tecnológico adequado à cadeia produtiva das espécies nativas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Protocolo nº 018504/12, ligada ao Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 2.520 tambaquis recém metamorfoseados em juvenis (200 ± 50 mg e 21 ± 2 mm) distribuídos em 24 tanques com capacidade de 100 L, na densidade de 70 juvenis.L⁻¹, com aeração e fluxo de água contínuos, em sistema aberto. O delineamento foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro réplicas. Uma dieta semipurificada com 31,9 % de PB proveniente de caseína e gelatina, avaliada em estudo anterior (KOJIMA, 2016, capítulo 2 desta tese) foi utilizada como dieta base deste estudo. O perfil de aminoácidos totais da caseína e gelatina (Tabela 1) foi analisado para o preparo de uma mistura de aminoácidos cristalinos com o mesmo perfil, usada para substituição nas proporções de 0, 25, 50, 75 e 90% do total de aminoácidos presentes na fração proteica (caseína e gelatina). Uma outra dieta, na qual caseína e gelatina foram substituídas por farinha de peixe e com quantidade de nitrogênio semelhante ao da dieta semipurificada base, também foi utilizada. As dietas foram nomeadas de acordo com o nível de substituição dos aminoácidos da proteína pela mistura de aminoácidos cristalinos e pela fonte de proteína (D0, D25, D50, D75, D90 e DFP, respectivamente) (Tabela 2).

Os ingredientes secos das dietas foram moídos em micromoído, misturados, e após o acréscimo dos ingredientes líquidos, as dietas foram peletizadas e secas em estufa à 55 °C. Estas dietas foram moídas e os peletes foram separados em peneira granulométrica em seis tamanhos de acordo com o diâmetro: 0,25 a 0,49 mm; 0,50 a 0,70 mm; 0,71 a 0,99 mm; 1,00 a 1,40 mm; 1,41 a 1,99 mm e acima de 2,0 mm e armazenados a -20°C até sua utilização. Após o preparo das dietas, o perfil de aminoácidos em cada uma delas foi analisado (Tabela 3). O sexto tratamento consistiu na substituição da proteína por farinha de peixe com a quantidade de nitrogênio semelhante ao da dieta base,

Tabela 1. Perfil de aminoácidos (%) presentes na caseína e gelatina.

| Aminoácidos (%) | Ingredientes | |
|-----------------------|--------------|----------|
| | Caseína | Gelatina |
| <i>Indispensáveis</i> | | |
| Lisina | 6,99 | 3,43 |
| Arginina | 3,19 | 8,00 |
| Metionina | 2,67 | 0,91 |
| Fenilalanina | 4,40 | 2,26 |
| Treonina | 3,68 | 1,79 |
| Histidina | 2,35 | 0,81 |
| Valina | 5,63 | 2,20 |
| Isoleucina | 4,26 | 1,37 |
| Leucina | 7,96 | 2,65 |
| Triptofano | 1,28 | nc |
| <i>Dispensáveis</i> | | |
| Alanina | 2,73 | 8,73 |
| Aspartato | 6,65 | 5,59 |
| Prolina | 8,82 | 13,39 |
| Glutamato | 18,71 | 9,80 |
| Glicina | 1,72 | 22,83 |
| Serina | 5,01 | 3,29 |
| Cisteína | 0,84 | 0,38 |
| Tirosina | 5,00 | 0,60 |

*nc: não calculado devido à baixa quantidade detectada.

Tabela 2. Formulação e composição das dietas experimentais com substituição do perfil de aminoácidos da mistura proteica (caseína e gelatina) por mistura de aminoácidos cristalinos ou farinha de peixe.

| Ingredientes (%) | Dietas | | | | | |
|--|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | DFP | D0 | D25 | D50 | D75 | D90 |
| Caseína | - | 24,00 | 18,00 | 12,00 | 6,00 | 2,40 |
| Gelatina | - | 6,00 | 4,50 | 3,00 | 1,50 | 0,60 |
| Farinha de peixe ¹ | 50,00 | - | - | - | - | - |
| Dextrina | 8,60 | 15,25 | 15,25 | 15,25 | 15,25 | 15,25 |
| Hidrolisado proteico ² | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Óleo de peixe | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| Óleo de Soja | 3,10 | 3,10 | 3,10 | 3,10 | 3,10 | 3,10 |
| Lecitina | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 | 2,50 |
| CMC ³ | 5,00 | 5,00 | 5,07 | 6,30 | 7,00 | 7,40 |
| Mistura de Minerais e Vitaminas ⁴ | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| Amido | 17,15 | 30,50 | 30,50 | 30,50 | 30,50 | 30,50 |
| Celulose ⁵ | 2,65 | 2,65 | 2,65 | 2,65 | 2,65 | 2,65 |
| Mistura de aminoácidos ⁶ | 0,00 | 0,00 | 6,80 | 13,70 | 20,50 | 24,60 |
| Composição analisada⁷ | | | | | | |
| UM (%) | 3,6 | 5,9 | 5,5 | 6,6 | 7,0 | 6,8 |
| MM (%) | 12,5 | 2,6 | 2,7 | 2,3 | 2,2 | 2,3 |
| NT (%) | 4,8 | 5,1 | 4,3 | 4,2 | 3,9 | 3,9 |
| PB (%) | 30,2 | 31,9 | 26,9 | 26,2 | 24,4 | 24,4 |
| FB (%) | 2,9 | 1,8 | 2,3 | 2,7 | 2,5 | 2,9 |
| EE (%) | 17,63 | 8,2 | 7,4 | 7,5 | 7,9 | 7,8 |
| EB(kcal.kg ⁻¹) | 4682 | 4572 | 4559 | 4539 | 4443 | 4421 |
| E:P (kcal.g ⁻¹) | 15,6 | 14,3 | 16,9 | 17,3 | 18,2 | 18,1 |

¹ Farinha de tilápia - Zippy Alimentos. ² Hidrolisado proteico comercial - ACTIPAL Fish FL 50 - Aquativ. ³ Carboximetilcelulose - Synth. ⁴ Mistura mineral e vitamínica - Guabi (ingrediente.kg⁻¹mistura): vitamina A=2.500 UI; vitamina D3=600.000UI; vitamina E=37.500 UI; vitamina K3=3.750 mg; vitamina C=50.000 mg; tiamina=4.000 mg; riboflavina=4.000 mg; piridoxina=4.000 mg; vitamina B12=4.000 mg; niacina= 122.500 mg; biotina=15 mg; ácido fólico=1.250 mg; pantotenato de cálcio=1.200 mg; cobre=2.500 mg; cobalto=125 mg; ferro=15 g; iodo=375 mg; manganês=12,5 g; selênio=87,5 mg; zinco=12,5 g. ⁵ Celulose microcristalina - Rhoster⁶ Mistura de aminoácidos cristalinos (%) - Vetec: Ác. Aspartico=6,4; ác.glutâmico=16,9; serina=4,67; glicina=5,94; histidina=2,0; arginina=4,1; treonina=3,3; alanina=3,9; prolina=9,7; tirosina=4,12; valina=4,94; metionina=2,3; cisteína=0,7; isoleucina=3,68; leucina=6,9; fenilalanina=4,0; lisina=6,3; triptofano=1,0; CMC=8,9. ⁷ Composição analisada com base na matéria seca. Umidade (UM); matéria mineral (MM); nitrogênio total (NT); proteína bruta (PB); fibra bruta (FB); extrato etéreo (EE); energia bruta (EB); relação energia:proteína (E:P)

Tabela 3. Perfil de aminoácidos (%) presentes nas dietas experimentais.

| Aminoácidos (%) ¹ | Dietas | | | | | |
|------------------------------|--------|------|------|------|------|------|
| | DFP | D0 | D25 | D50 | D75 | D90 |
| <i>Indispensáveis</i> | | | | | | |
| Lisina | 1,77 | 2,13 | 1,87 | 1,79 | 1,63 | 1,58 |
| Arginina | 2,09 | 1,36 | 1,27 | 1,28 | 1,23 | 1,22 |
| Metionina | 0,64 | 0,74 | 0,62 | 0,59 | 0,59 | 0,68 |
| Fenilalanina | 1,06 | 1,29 | 1,14 | 1,18 | 1,19 | 1,12 |
| Treonina | 1,03 | 0,96 | 0,88 | 0,89 | 0,82 | 0,80 |
| Histidina | 0,52 | 0,42 | 0,47 | 0,48 | 0,52 | 0,47 |
| Valina | 1,09 | 1,53 | 1,35 | 1,39 | 1,39 | 1,38 |
| Isoleucina | 0,85 | 1,12 | 0,92 | 0,94 | 0,82 | 0,93 |
| Leucina | 1,86 | 2,55 | 2,13 | 2,12 | 2,10 | 2,08 |
| Triptofano | nc | nc | nc | nc | nc | nc |
| <i>Dispensáveis</i> | | | | | | |
| Alanina | 2,23 | 1,29 | 1,14 | 1,10 | 0,95 | 0,93 |
| Aspartato | 1,51 | 1,10 | 1,66 | 1,67 | 1,63 | 1,64 |
| Prolina | 2,51 | 3,21 | 2,89 | 2,84 | 2,67 | 2,84 |
| Glutamato | 3,39 | 5,34 | 4,84 | 4,84 | 4,74 | 4,62 |
| Glicina | 3,57 | 1,84 | 1,72 | 1,59 | 1,42 | 1,42 |
| Serina | 1,14 | 1,38 | 1,29 | 1,26 | 1,16 | 1,13 |
| Cisteína | 0,04 | 0,05 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,02 |
| Tirosina | 0,78 | 1,18 | 1,09 | 1,10 | 1,04 | 1,04 |

¹ Com base na matéria natural.

DFP: dieta com fração proteica composta por farinha de peixe; D0: dieta base com 30 % de inclusão da mistura caseína e gelatina (4:1); D25, D50, D75 e D90: dietas com substituição de 25, 50, 75 e 90 % de aminoácidos presentes na mistura caseína e gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos.

*nc: não calculado devido à baixa quantidade detectada.

A duração deste experimento foi de 60 dias. Ao início do experimento, foram coletadas amostras de 200 juvenis para posterior avaliação biométrica, 15 para análise histológica do músculo esquelético, 100 para análise de composição corporal e 100 para análise de aminoácidos livres no músculo. Os peixes foram coletados 12 horas após a última alimentação do dia e mortos por aprofundamento do plano anestésico por benzocaína ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$). Ao final do experimento, após a coleta de 15 peixes para determinação do perfil de aminoácidos livres na musculatura esquelética e 5 para análise histológica do músculo esquelético dorsal, metade dos peixes sobreviventes em cada repetição foi coletada para análise de composição corporal, e a outra metade foi coletada para avaliação biométrica de peso e comprimento. A partir dos dados de comprimento total médio (CT, mm) e peso médio (P, g) foram calculados o ganho em peso (GP); taxa de crescimento específico (TCE) e fator de condição (K) segundo as expressões:

$$GP = \text{Peso médio final} - \text{Peso médio inicial}$$

$$TCE = \frac{(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) \times 100}{\text{tempo (dias)}}$$

$$k = \frac{\text{peso}}{\text{comprimento total}^b}$$

O valor de **b** foi obtido por meio da logaritimização dos dados de peso e de comprimento total de todos os peixes amostrados para biometria. Esses dados foram plotados em gráfico e o valor de **b** obtido pela equação linear: $y = a + bx$, e o valor calculado foi de 2,99.

A qualidade da água foi monitorada diariamente para oxigênio dissolvido e temperatura, enquanto a condutividade e o pH foram monitorados três vezes por semana, e a concentração de amônia foi avaliada quinzenalmente, e apresentaram os seguintes valores médios: $6,0 \pm 0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido; $30,0 \pm 0,8^\circ\text{C}$ de temperatura, $228,7 \pm 63,3 \mu\text{S.cm}^{-1}$ de condutividade, $7,9 \pm 0,1$ de pH e $0,03 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de amônia total.

Os peixes foram alimentados à vontade até a saciedade aparente para evitar a falta e sobra das dietas. A quantidade consumida foi monitorada

diariamente pela pesagem das dietas ao início e final do dia. Com estes dados, foram calculados o consumo das dietas (C) e a conversão alimentar aparente (CAA), e com os dados biométricos e dados de consumo, foram calculados as variáveis de taxa de eficiência proteica (TEP) e valor produtivo da proteína (VPP), segundo as expressões:

$$CAA = \frac{\text{consumo de dieta}}{\text{ganho em peso}}$$

$$TEP = \frac{\text{ganho em peso}}{\text{consumo de proteína}}$$

$$VPP = \frac{(\text{peso final} \times \text{proteína corporal final}) - (\text{peso inicial} \times \text{proteína corporal inicial})}{\text{consumo de proteína}} \times 100$$

Avaliação da composição corporal, dietas experimentais e perfil de aminoácidos totais e aminoácidos livres

As amostras de peixes coletadas no início e no final da fase experimental foram moídas, liofilizadas por 72 horas e analisadas em duplicata segundo metodologias propostas pela AOAC (2000): para determinação das porcentagens de proteína bruta (PB) por equipamento LECO (LECO Instruments, St Joseph, Michigan, USA), multiplicado pelo fator de conversão 6,25; extrato etéreo (EE) por lavagem com éter de petróleo por seis horas em extrator Soxhlet; matéria mineral (MM) por meio da incineração da amostra em mufla à temperatura de 600°C durante 4 horas; e energia bruta (EB) por bomba calorimétrica de Parr. A fibra bruta (FB) foi determinada pelo método Filter Bag Technique da Ankon. A matéria seca (MS) foi determinada pela pesagem da matéria úmida, pré-secagem por meio de liofilização das amostras, e determinação da matéria seca a partir da diferença do peso da amostra após secagem final em estufa a 105 °C.

As análises de perfil de aminoácidos totais e livres dos ingredientes e das dietas foram realizadas por meio de cromatografia líquida de alta precisão

(HPLC) no Instituto de Tecnologia de Alimentos, em Campinas, SP. As análises de perfil de aminoácidos totais foram realizadas após hidrólise ácida (HCl, 6N) das amostras por 24 horas, derivatização com fenilisotilcianato (PITC), separação dos aminoácidos por HPLC (coluna LUNA C18 100Å 5u 250x4,6mm 00G-4252-EQ) em fase reversa, detecção por UV a 254 nm, e quantificação por calibração interna multinível com ácido α -aminobutírico (AAAB) como padrão interno. As análises de triptofano foram realizadas por método colorimétrico de acordo com Spies (1976).

As análises de aminoácidos livres do tecido muscular foram realizadas na musculatura dorsal separada das outras partes do peixe (cavidade abdominal, cabeça e nadadeira caudal), de acordo com Dabrowski et al. (2005). A dissecação foi realizada em superfície gelada, com auxílio de material cirúrgico específico para o procedimento. Todo o processamento foi realizado em baixa temperatura (presença de gelo seco), e após a separação, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer a -80 °C até serem liofilizadas e enviadas para análise. As concentrações de aminoácidos livres foram calculadas com base na matéria úmida do tecido muscular. Para análise de aminoácidos livres da musculatura esquelética, as amostras foram homogeneizadas com metanol acidificado com HCl 0,1M (80 % MeOH e 20 % HCl 0,1M), derivatizadas com fenilisotilcianato (PITC), e os aminoácidos separados por HPLC (Coluna HPLC Luna 3u C18(2) 100A 250x4,6mm 00G-4251-E0), e quantificação por calibração interna multinível padrão interno metionina sulfona.

Histologia do músculo esquelético

Para o processamento histológico de análise da musculatura esquelética foram retiradas amostras da região da musculatura dorsal e fixadas em solução de Karnovsky (pH 7,2) por 24 horas, posteriormente estas foram lavadas em tampão fosfato Sorensen (pH7,2; 0,2M) e preservadas em solução de etanol 70%. Após o processo de fixação, as amostras foram submetidas ao processo de desidratação em concentrações alcoólicas crescentes (70 - 95%) para

posterior inclusão em Histoiresina® (Leica, Germany), seguindo protocolo determinado pelo fabricante.

Foram realizados cortes transversais de 3 µm de espessura no músculo dorsal, e os cortes foram corados com Hematoxilina e Floxina B (HF), com posterior uso de lamínula para finalizar o processo de preparação das lâminas. Após a captura de imagens realizada em microscópio Olympus BX43 adaptado a um sistema de analisador de imagens (CellSens 1.8 Standard), foram calculadas as áreas (A) de 600 fibras musculares por amostra para o cálculo do diâmetro por meio da expressão $d=2(A^{0,5} \times \pi^{-0,5})$ de acordo com Valente et al. (1999). As fibras musculares foram divididas em classes de tamanho, baseado no diâmetro, seguindo a metodologia proposta por Assis et al. (2004); *classe 10* = $d \leq 10$ µm; *classe 20* = $10 < d \leq 20$ µm; *classe 30*: $20 < d \leq 30$ µm; *classe 40* = $30 < d \leq 40$ µm e *classe 50* = $d > 40$ µm. Após a classificação, foram analisadas cinco fibras menores e cinco fibras maiores de cada tratamento.

Análises estatísticas e interpretação dos dados

Todos os dados foram analisados para normalidade (Cramer-von Mises) e homoscedasticidade das variâncias (Levene), e os resultados percentuais foram submetidos a transformação arcoseno, assim como transformação dos dados quando necessária. Os dados de crescimento, sobrevivência e diâmetro médio das fibras musculares foram avaliados por *one-way ANOVA*, e as médias foram analisadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os dados de ganho em peso (GP) foram analisados por regressão linear. Todas as análises e transformações das variáveis biométricas foram realizadas no programa SAS n. 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

RESULTADOS

Desempenho zootécnico

Neste estudo, a sobrevivência dos juvenis de tambaqui não foi afetada pelos níveis de substituição da proteína íntegra por mistura de aminoácidos ($P>0,05$). Os resultados de desempenho de crescimento dos peixes do tratamento DFP não foram incluídos nas análises estatísticas, porém, foram numericamente maiores comparados aos demais tratamentos. Considerando o crescimento dos juvenis dos tratamentos que receberam as dietas compostas por caseína-gelatina como fonte proteica (D0 a D90), verificou-se que o desempenho dos peixes dos tratamentos com menores níveis de substituição (D25 e D50) foi semelhante ao crescimento observado nos peixes do tratamento D0 ($P>0,05$). Os resultados de TEP e VPP dos juvenis do tratamento D90 foram inferiores ($P<0,05$) aos resultados dos juvenis dos tratamentos D50 e D75 (Tabela 4).

Foi verificada aceitabilidade das dietas experimentais pelos juvenis de tambaqui em todos os tratamentos. Porém, o consumo foi maior com o aumento do nível de substituição e a CAA demonstrou comportamento inverso ($P<0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Desempenho dos juvenis de tambaqui alimentados com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP). Peso e comprimento total iniciais de 200 ± 50 mg e 21 ± 2 mm, respectivamente.

| Variáveis | Dietas | | | | | | Valor de P |
|------------------------------------|-------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|
| | DFP* | D0 | D25 | D50 | D75 | D90 | |
| CT (cm) | 8,2±0,2 | 6,0±0,5 ^a | 5,3±0,5 ^{ab} | 5,5±0,2 ^{ab} | 4,5±1,0 ^c | 4,4±0,2 ^c | 0,0005 |
| P (g) | 9,9±0,7 | 4,3±1,0 ^a | 3,2±0,8 ^{ab} | 3,3±0,3 ^{ab} | 2,5±0,4 ^b | 1,5±0,2 ^c | 0,0001 |
| GP (g)** | 9,7±0,7 | 4,1±1,0 | 3,0±0,8 | 3,1±0,3 | 2,3±0,4 | 1,4±0,2 | |
| TCE (%.dia⁻¹) | 6,9±0,1 | 5,5±0,4 ^a | 5,0±0,4 ^{ab} | 5,1±0,2 ^{ab} | 4,6±0,3 ^b | 3,8±0,2 ^c | 0,0001 |
| K | 0,018±0,001 | 0,020±0,001 ^{ab} | 0,021±0,001 ^a | 0,020±0,001 ^{ab} | 0,019±0,001 ^b | 0,019±0,001 ^b | 0,0003 |
| S (%) | 92,9±5,7 | 88,6±7,1 | 89,6±1,6 | 90,0±2,7 | 95,7±3,6 | 93,3±4,7 | 0,2254 |
| C (% peso.dia⁻¹) | 3,3±0,2 | 4,8±0,4 ^c | 5,5±0,3 ^{ab} | 5,1±0,2 ^{bc} | 5,3±0,4 ^{abc} | 5,9±0,2 ^a | 0,0027 |
| CAA | 1,0±0,1 | 1,5±0,1 ^a | 1,8±0,2 ^b | 1,7±0,1 ^{ab} | 1,8±0,2 ^b | 2,2±0,1 ^c | 0,0001 |
| TEP | 3,3±0,1 | 2,0±0,2 ^{ab} | 2,0±0,1 ^{ab} | 2,3±0,1 ^a | 2,3±0,2 ^a | 1,9±0,1 ^b | 0,0154 |
| VPP (%) | 39,6±1,7 | 26,0±2,3 ^{ab} | 25,1±1,7 ^{ab} | 28,4±0,8 ^a | 27,0±2,2 ^a | 22,0±0,9 ^b | 0,0045 |

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

* Não incluído na análise estatística.

** Análise por regressão linear.

Comprimento total (CT); peso (P); ganho em peso (GP); taxa de crescimento específico (TCE); fator de condição (K); sobrevivência (S); consumo (C); conversão alimentar aparente (CAA); taxa de eficiência proteica (TEP); valor produtivo da proteína (VPP).

Os resultados de GP foram analisados por regressão linear ($p < 0,0001$), e demonstraram tendência de diminuição do GP com o aumento dos níveis de substituição (Figura 1).

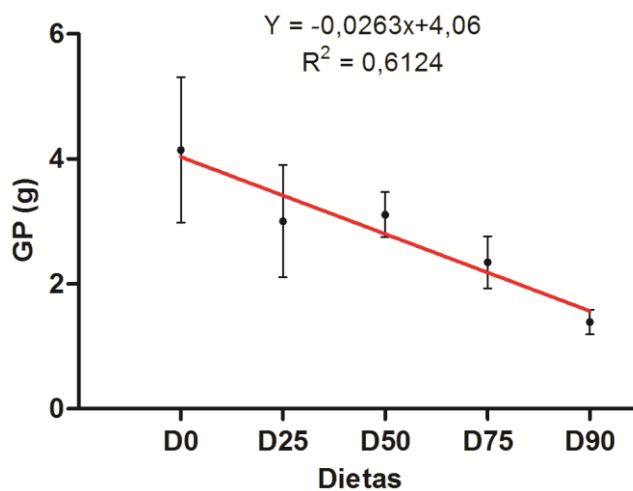


Figura 1. Modelo de regressão linear do ganho em peso (GP) dos juvenis de tambaqui após alimentação por 60 dias com dietas com níveis crescentes de substituição da fração proteica por mistura de aminoácidos cristalinos (0, 25, 50, 75 e 90 %).

As substituições da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos não alteraram a MS e energia corporal dos juvenis dos tratamentos D0 a D90 ($P > 0,05$). As respostas de EE diferiram somente entre os juvenis dos tratamentos D0 e D50 ($P < 0,05$), enquanto as respostas de PB e MM apresentaram diminuição com o aumento da porcentagem de substituição ($P < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Composição corporal de juvenis de tambaqui alimentados com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP).

| Composição corporal* | Dietas | | | | | | |
|----------------------|----------|----------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Inicial | Final | | | | | |
| | | DFP** | D0 | D25 | D50 | D75 | D90 |
| MS (%) | 17,8±0,1 | 28,1±0,1 | 24,9±1,1 | 25,0±0,8 | 25,3±0,6 | 24,5±0,5 | 24,5±0,3 |
| MM (%) | 2,6±0,1 | 3,2±0,1 | 1,9±0,1 ^a | 1,7±0,1 ^{ab} | 1,5±0,1 ^c | 1,5±0,1 ^c | 1,5±0,1 ^c |
| PB (%) | 13,0±0,1 | 12,0±0,2 | 12,7±0,1 ^a | 12,5±0,4 ^{ab} | 12,4±0,3 ^{ab} | 11,9±0,2 ^{bc} | 11,6±0,1 ^c |
| EE (%) | 1,5±0,1 | 12,7±0,3 | 9,3±0,8 ^b | 10,0±0,6 ^{ab} | 10,8±0,7 ^a | 10,2±0,5 ^{ab} | 10,4±0,4 ^{ab} |
| EB (kcal/kg) | 870±0,3 | 1824±8 | 1609±105 | 1616±77 | 1693±57 | 1623±41 | 1628±38 |

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

*Matéria natural

**Não incluído na análise estatística.

Matéria seca (MS); matéria mineral (MM); proteína bruta (PB); extrato etéreo (EE); energia bruta (EB).

Aminoácidos livres

As porcentagens de aminoácidos livres da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui foram afetadas pelos níveis de substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos. As porcentagens de AAD acompanharam o aumento dos níveis de substituição, por outro lado, as porcentagens de AAI foram decrescentes (Tabela 6).

As porcentagens de Lys e Phe não diferiram entre os peixes ($P > 0,05$) dos tratamentos com substituição (D0 a D90), enquanto a porcentagem de Met foi superior apenas nos juvenis do tratamento D0 ($P < 0,05$). Nos juvenis alimentados com a dieta controle (D0) e com a menor substituição (D25), os aminoácidos Arg e Thr não foram detectados, assim como o aminoácido Val não foi detectado nos juvenis dos tratamentos com os maiores valores de substituição (D50, D75 e D90) (Tabela 6).

Em relação aos aminoácidos dispensáveis, a porcentagem de Ala foi maior nos peixes do tratamento D90 ($P < 0,05$) e semelhante entre os juvenis dos tratamentos D0, D25, D50 e D75 ($P > 0,05$). As concentrações de Asp foram semelhantes ($P > 0,05$) entre os juvenis de todos os tratamentos, exceto entre os juvenis dos tratamentos D0 e D50 ($P < 0,05$). Entre os juvenis dos tratamentos de substituição (D0 a D90), as porcentagens de Pro, Hyp, Gly, Ser e Cys foram decrescentes com o aumento da substituição, enquanto o de Tau demonstraram resposta inversa ($P < 0,05$) (Tabela 6).

A concentração total de aminoácidos livres da musculatura esquelética foi semelhante entre os juvenis de todos os tratamentos, exceto entre os tratamentos D25 e D75 ($P < 0,05$). A concentração total de aminoácidos indispensáveis (AAI) demonstrou queda com o aumento dos níveis de substituição ($P < 0,05$). Por outro lado, nos resultados de concentração total de aminoácidos dispensáveis (AAD) observou-se o inverso (Figura 2).

Tabela 6. Médias e desvio padrão das porcentagens de aminoácidos livres presentes na musculatura dorsal de juvenis de tambaqui, alimentados com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP).

| Aminoácidos | Diets | | | | | |
|---------------------------|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | DFP* | D0 | D25 | D50 | D75 | D90 |
| Indispensáveis (%) | | | | | | |
| Lys | 2,28±0,1 | 4,54±0,40 | 3,62±0,53 | 4,05±0,36 | 3,70±0,50 | 4,21±0,31 |
| Arg | nd | nd | nd | 0,35±0,04 ^{ab} | 0,41±0,04 ^a | 0,33±0,03 ^b |
| Met | 1,79±0,13 | 6,58±0,99 ^a | 3,71±0,65 ^b | 1,74±0,23 ^d | 2,55±0,13 ^c | 1,98±0,11 ^{cd} |
| Phe | 1,07±0,19 | 1,13±0,45 | 0,93±0,15 | 0,86±0,02 | 0,73±0,12 | 0,77±0,12 |
| Thr | nd | nd | nd | 0,67±0,13 | 0,98±0,20 | 0,96±0,15 |
| His | 6,46±0,49 | 11,59±0,74 ^a | 10,23±1,01 ^{ab} | 10,21±1,08 ^{ab} | 8,18±0,90 ^{bc} | 7,06±1,32 ^c |
| Val | nd | 1,82±0,25 ^a | 1,13±0,11 ^b | nd | nd | nd |
| Ile | 1,43±0,20 | 0,37±0,15 ^c | 1,83±0,24 ^a | 1,20±0,38 ^b | 0,93±0,06 ^b | 0,97±0,27 ^b |
| Leu | 0,23±0,03 | nd | 0,27±0,02 | 0,22±0,05 | 0,21±0,02 | 0,21±0,04 |
| Total AAI (%) | 13,26±0,92 | 26,01±0,75 ^a | 21,72±1,38 ^b | 19,31±1,40 ^{bc} | 17,70±1,55 ^c | 16,51±1,30 ^c |
| Dispensáveis (%) | | | | | | |
| Ala | 1,68±0,27 | 1,89±0,19 ^b | 2,02±0,09 ^b | 2,04±0,63 ^b | 2,81±0,46 ^b | 4,34±0,56 ^a |
| Asp | 0,26±0,06 | 0,57±0,25 ^b | 0,83±0,16 ^{ab} | 1,00±0,24 ^a | 0,91±0,05 ^{ab} | 0,79±0,17 ^{ab} |
| Pro | 2,86±0,49 | 15,27±1,21 ^a | 14,05±2,33 ^{ab} | 10,53±0,99 ^{bc} | 7,58±0,44 ^{cd} | 6,77±1,56 ^d |
| Hyp | 4,80±0,66 | 1,37±0,22 ^a | 1,53±0,18 ^a | 0,82±0,08 ^b | 0,47±0,10 ^c | 0,26±0,03 ^d |
| Glu | 0,99±0,13 | 1,29±0,10 | 1,28±0,05 | 1,32±0,04 | 1,37±0,18 | 1,46±0,10 |
| Gly | 38,42±0,64 | 32,91±2,37 ^a | 33,43±2,09 ^a | 29,20±2,74 ^{ab} | 25,49±2,35 ^b | 25,90±2,19 ^b |
| Ser | 4,79±0,68 | 3,66±0,30 ^{ab} | 4,00±0,55 ^a | 3,03±0,32 ^{bc} | 2,63±0,35 ^c | 2,46±0,38 ^c |
| Tau | 22,03±0,58 | 12,63±2,28 ^c | 16,10±3,00 ^{bc} | 16,49±2,33 ^{bc} | 19,96±2,66 ^{ab} | 25,22±2,77 ^a |
| Cys | 10,92±0,35 | 4,39±0,35 ^a | 5,05±0,32 ^a | 16,25±2,89 ^b | 21,07±3,23 ^b | 16,30±0,59 ^b |
| Total AAD (%) | 86,74±0,92 | 73,99±0,75 ^c | 78,28±1,38 ^b | 80,69±1,40 ^{ab} | 82,30±1,55 ^a | 83,49±1,30 ^a |

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

*Não incluído na análise estatística.

nd = não detectado; AAI = aminoácidos indispensáveis; AAD = aminoácidos dispensáveis.

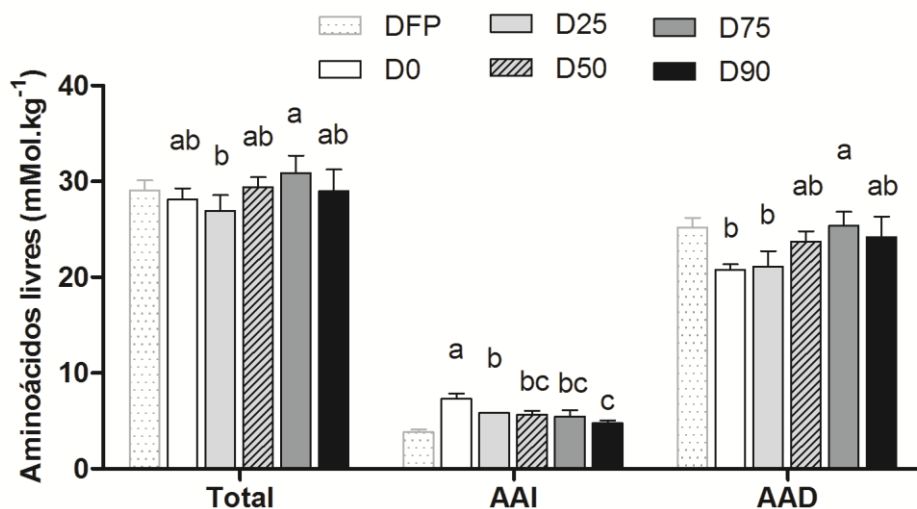


Figura 2. Concentrações (mMol.kg⁻¹) de aminoácidos livres total (Total), aminoácidos indispensáveis (AAI) e aminoácidos dispensáveis (AAD) na musculatura esquelética de juvenis de tambaqui após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP) (não incluído na análise estatística). Médias seguidas da mesma letra em cada conjunto de resultados não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Morfometria das fibras musculares

Ao início do experimento, os juvenis apresentaram maior frequência de fibras (43,8 %) com diâmetro maior que 30 μm (classes 40 e 50) e poucas fibras (0,5 %) de diâmetro abaixo de 10 μm (classe 10) (Figura 3). Foram observadas características de crescimento muscular por hiperplasia (classes 10 a 30) e hipertrofia (classes 40 e 50) (Figura 4).

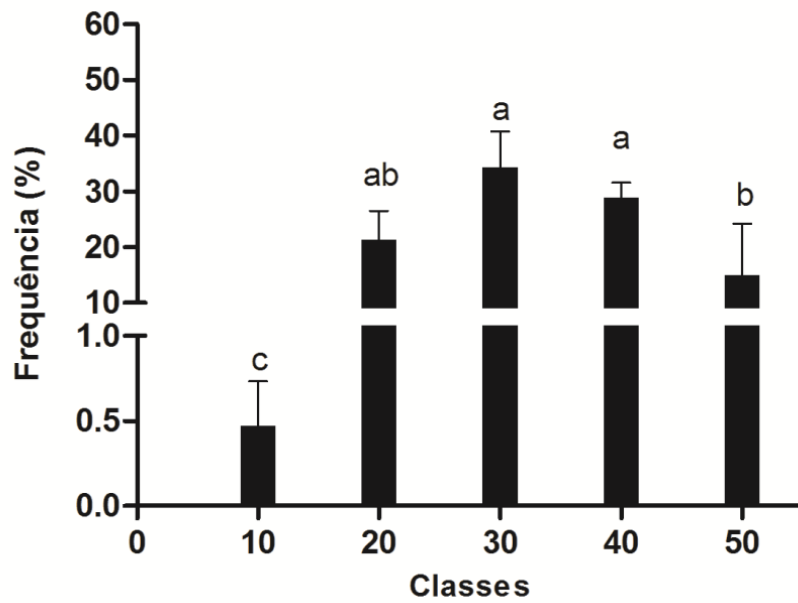


Figura 3. Distribuição da frequência de fibras musculares em diferentes classes de diâmetro em juvenis de tambaqui ao início do período experimental. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

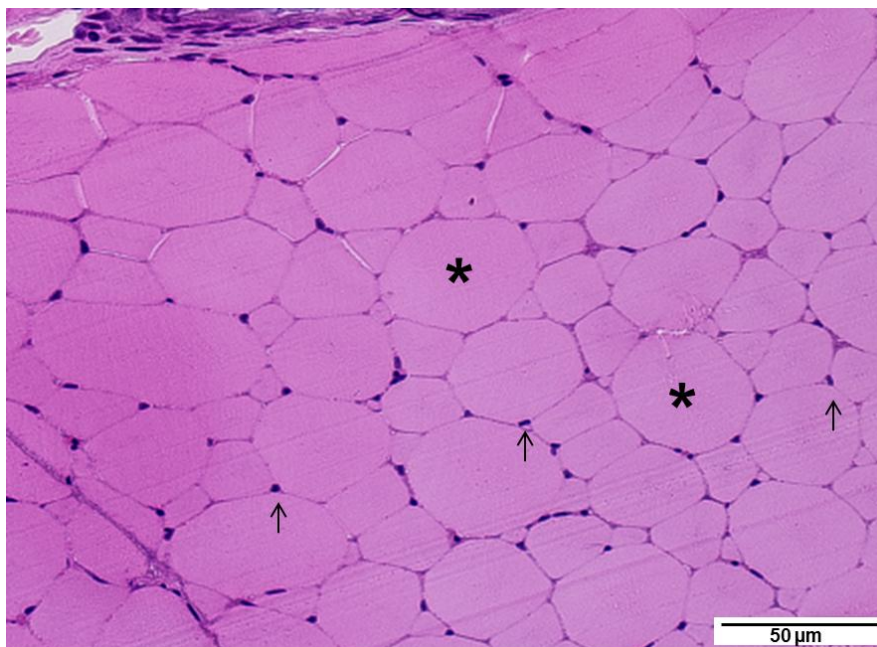


Figura 4. Fotomicrografia da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui ao início do experimento. Corte transversal, Hematoxilina e Floxina B. Fibras musculares com núcleo periférico (↑); fibras musculares rodeadas por fibras menores (*).

Após os 60 dias de alimentação com as dietas experimentais, os juvenis de tambaqui de todos os tratamentos apresentaram tanto fibras musculares de diâmetro menor entre fibras de maior diâmetro (Figura 5). Os crescentes níveis de substituição aumentaram as frequências de fibras menores que 30 μm de 46,3 a 62,1% nos juvenis dos tratamentos D0 e D90, respectivamente. As frequências de fibras maiores demonstraram o inverso (Figura 6). Foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) entre os juvenis dos tratamentos somente para frequência de fibras menores que 10 μm (Figura 6).

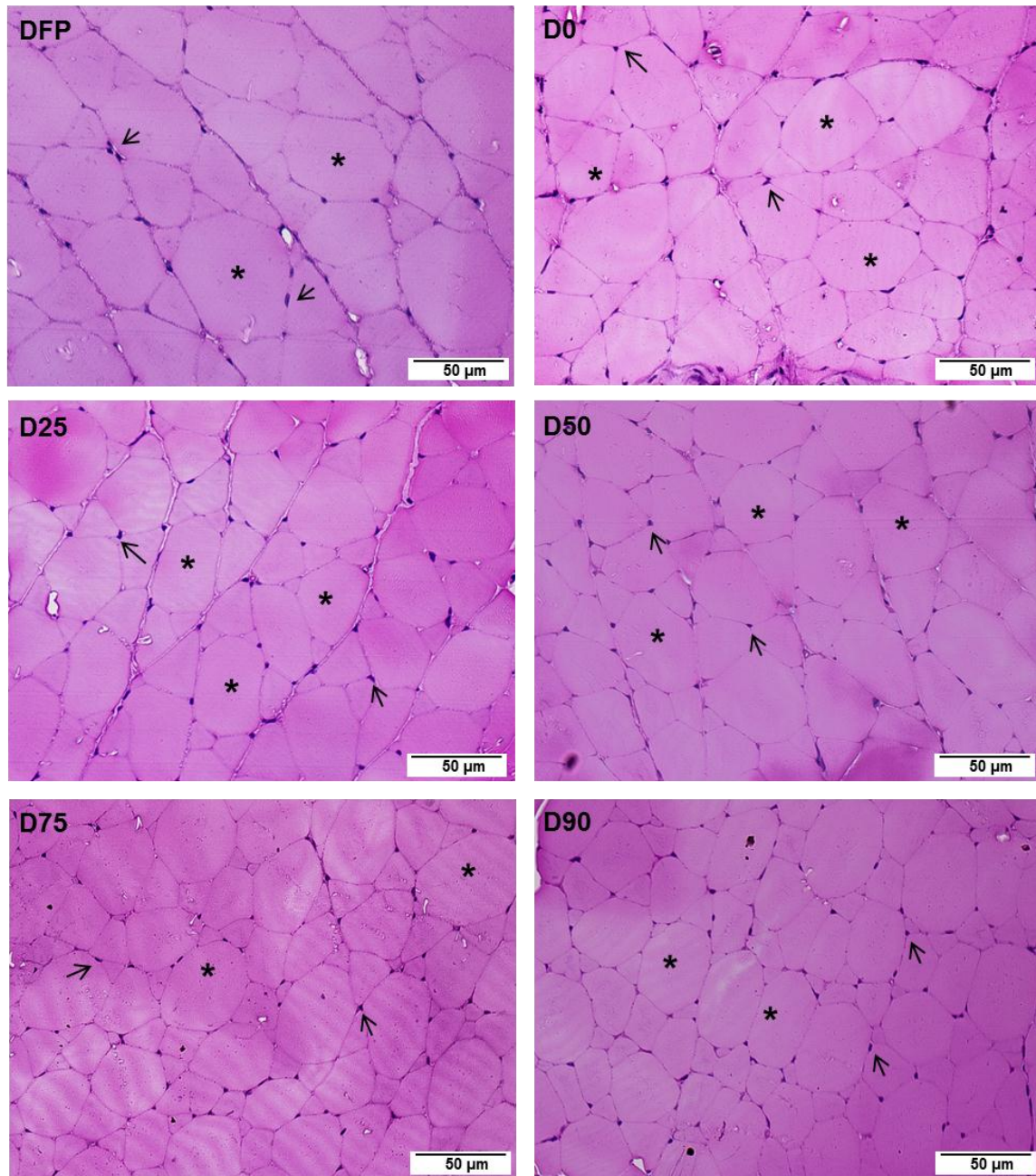


Figura 5. Fotomicrografias da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui alimentados por 60 dias com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP). Fibras maiores rodeadas por fibras menores (*); núcleo periférico (↑). Notar a presença de fibras musculares com diâmetro maior nos juvenis do tratamento DFP e maior proporção de fibras com diâmetro menor nos juvenis dos tratamentos D75 e D90. Hematoxilina e Floxina B.

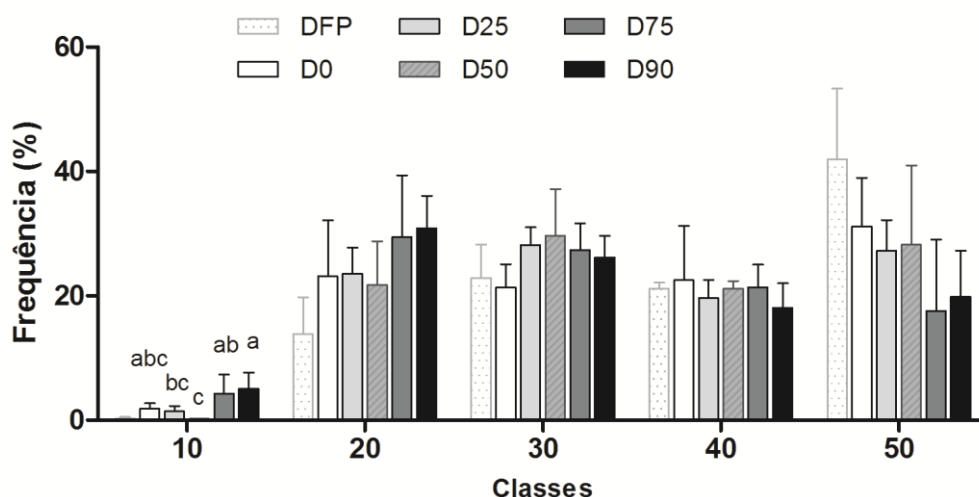


Figura 6. Distribuição da frequência de fibras musculares em diferentes classes de diâmetro (classe 10: $d \leq 10 \mu\text{m}$; classe 20: $10 < d \leq 20 \mu\text{m}$; classe 30: $20 < d \leq 30 \mu\text{m}$; classe 40: $30 < d \leq 40 \mu\text{m}$; classe 50: $d > 40 \mu\text{m}$) em juvenis de tambaqui, após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas contendo crescentes substituições da fração proteica composta por caseína-gelatina por mistura de aminoácidos cristalinos em níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90), e substituição da mistura proteica por farinha de peixe (DFP) (não incluído na análise estatística). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Os resultados de diâmetro médio das cinco maiores e menores fibras dos juvenis do tratamento DFP foram numericamente superiores aos demais tratamentos. Após análise das cinco fibras com menor diâmetro médio, os juvenis do tratamento D50 demonstraram o maior diâmetro médio de fibra. Ainda, o diâmetro médio das fibras maiores apresentou diminuição com o aumento dos níveis de substituição da fração proteica por mistura de aminoácidos cristalinos (Tabela 7).

Tabela 7. Diâmetro médio das cinco fibras menores e maiores da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui após 60 dias de alimentação com dietas semi-purificadas com níveis crescentes de substituição da fração proteica por mistura de aminoácidos cristalinos nos níveis de 0, 25, 50, 75 e 90 % (D0, D25, D50, D75 e D90) e substituição da fração proteica (caseína e gelatina) por farinha de peixe (DFP).

| Diâmetro das cinco fibras (µm) | Dietas | | | | | |
|--------------------------------|----------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | DFP* | D0 | D25 | D50 | D75 | D90 |
| Menores | 10,7±0,9 | 8,7±0,6 ^b | 9,0±0,9 ^b | 10,6±0,8 ^a | 7,4±1,3 ^c | 6,8±0,8 ^c |
| Maiores | 77,2±3,2 | 66,3±4,9 ^a | 63,1±4,6 ^{ab} | 61,3±3,2 ^{bc} | 57,1±4,8 ^c | 58,2±5,2 ^c |

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

*Não incluído na análise estatística.

DISCUSSÃO

Os peixes usados neste estudo eram tambaquis recém metamorfoseados em juvenis, que já apresentavam o trato digestório assim como os outros sistemas orgânicos bem desenvolvidos. Durante os 60 dias de experimento, aumentaram o peso de 21,5 (D0) a 49,5 vezes (DFP) nos dois tratamentos controle.

Os resultados de desempenho (CT, P, TCE e K) dos juvenis de tambaqui na faixa de 0,2 a 4,3 g, alimentados com dietas semi-purificadas contendo substituições de 25 a 90% do perfil de aminoácidos da fração proteica da caseína-gelatina (4:1) por mistura de aminoácidos cristalinos com mesmo perfil, indicaram que a substituição de até 50% promoveu desempenho semelhante ao dos juvenis de tambaqui alimentados com dieta sem substituição (D0). Em estudo com juvenis de *Senegalese sole* (4,26 a 11,6 g) alimentados com dietas com quantidades crescentes de substituição (20, 35 e 50 %) da proteína da farinha de peixe por aminoácidos cristalinos, não foram observadas diferenças no crescimento entre os juvenis dos diferentes tratamentos, sendo que a substituição de até 50 % foi recomendada para utilização em estudos de exigência em aminoácidos para a espécie (PÉREZ-

JIMENEZ et al., 2014). Altos níveis de substituição da proteína íntegra por aminoácidos cristalinos são importantes em estudos de dose-resposta para determinação da exigência em aminoácidos, uma vez que estes níveis permitem ampla manipulação de aminoácidos das dietas (PÉREZ-JIMENEZ et al., 2014). No entanto, no presente estudo, não apenas a alta concentração de aminoácidos livres nas dietas com maior porcentagem de substituição pode ter causado uma diminuição do desempenho de crescimento, mas, também, a porcentagem de proteína bruta. Observou-se uma diminuição dos valores de PB com o aumento da inclusão dos aminoácidos, e esse fato pode estar relacionado à pureza dos mesmos.

O consumo das dietas semi-purificadas foi numericamente maior comparado ao consumo da dieta DFP, e crescente de acordo com o aumento da substituição por aminoácidos cristalinos. O maior consumo das dietas com substituição pode ter ocorrido devido à presença de aminoácidos livres que estimulam a ingestão de alimento, segundo Kasumyan e Doving (2003) os aminoácidos Ala, Cys e Ser são estimulantes da ingestão de alimentos para muitas espécies de peixes. No entanto, o consumo elevado da dieta D90 não foi suficiente para garantir o crescimento dos juvenis deste tratamento. A redução no desempenho de peixes alimentados com dietas com aminoácidos cristalinos na forma livre comparados aos peixes alimentados com aminoácidos ligados a proteína podem ocorrer devido a lixiviação e diferentes taxas de absorção dos aminoácidos (PERES; OLIVA-TELES, 2005; BODIN et al., 2012). O excesso de aminoácidos livres devido a rápida absorção causam desbalanço no perfil de aminoácidos dos tecidos, e estes são removidos por oxidação hepática aumentando a excreção de amônia e o esqueleto carbônico pode ser utilizado na síntese de lipídeos e carboidratos, ou ainda, estes aminoácidos são excretados diretamente na forma livre. Todos estes processos causam queda na eficiência de utilização do nitrogênio (BODIN et al., 2012).

Os resultados das análises de MM e PB demonstraram mesmo comportamento de queda dos resultados de desempenho com o aumento dos níveis de substituição da proteína por mistura de aminoácidos. O teor de EE dos juvenis do tratamento DFP foi numericamente maior e pode ter ocorrido

devido à porcentagem de lipídio da dieta (17,63 %), fato observado também em outro estudo com juvenis da mesma espécie que receberam dietas com até 10,4 % de lipídio (CAMARGO et al., 1998). A taxa de crescimento é resultado do aumento da taxa de síntese proteica e diminuição da taxa de degradação, ou a combinação dos dois processos (DABROWSKI; GURDELEY, 2002). Na musculatura de *Anguilla anguilla* foi observado aumento nas taxas de síntese proteica com o aumento da qualidade da proteína dietética, enquanto as taxas de degradação da proteína não foram afetados (HIGUERA et al., 1999). No presente estudo, os resultados de TEP e VPP, que são variáveis relacionadas à quantidade de PB da dieta convertida em peso corporal e quantidade da PB consumida convertida em PB corporal (SÁ; FRACALLOSSI, 2002), foram menores nos juvenis alimentados com a dieta D90. Também foi observado menor peso, menor quantidade de PB corporal e a maior frequência de fibras menores que 10 μm .

Previamente ao início do experimento os juvenis de tambaqui foram alimentados apenas com náuplios de artêmia e apresentavam 56,2 % de fibras com diâmetro de até 30 μm . Porém, ao final dos 60 dias de alimentação, os peixes que receberam maiores níveis de substituição da proteína por mistura de aminoácidos (D75 e D90) apresentam desempenho reduzido e também tiveram predominância de fibras musculares menores que 10 μm . Apesar de diversos estudos definirem a maior frequência de fibras pequenas como crescimento hiperplásico (JOHNSTON; HALL, 1999; ASSIS et al., 2004; JOHNSTON, 2006; LEITÃO et al., 2011; NEBO et al., 2013; KOJIMA et al., 2015), neste estudo, o mesmo perfil de distribuição de fibras musculares, ou, posto de outra forma, a maior frequência de fibras pequenas (<10 μm) pode ser indicativo de que houve queda na síntese e/ou catabolismo proteico nos peixes dos tratamentos D75 a D90, resultando em redução da massa muscular, como observado em larvas ou juvenis de pacu *P. mesopotamicus* que passaram por privação alimentar (KOJIMA et al, 2015; MENOSSEI, 2014) ou receberam dietas de baixo valor nutricional (LEITÃO, 2013). Inversamente, nos juvenis dos tratamentos D0 a D50 foi observada menores frequências de fibras com diâmetro inferior a 10 μm e maior diâmetro médio das cinco maiores fibras

musculares, indicando investimento em crescimento hipertrófico. Isso mostra que os processos dinâmicos de hiperplasia e hipertrofia são responsáveis pelo crescimento muscular do tambaqui nessa fase inicial de desenvolvimento, e a alimentação é um dos fatores que afetam o desenvolvimento muscular, como já demonstrado por outros autores (CHAPALAMADUGU et al., 2009; ALAMI-DURANTE et al., 2010).

A musculatura esquelética nos peixes pode variar de 60 a 70% do peso corporal total (AYALA et al., 2010) e é a maior reserva de peptídeos e aminoácidos livres no corpo (DABROWSKI; GUDERLAY, 2002; DAVIS; FIOROTTO, 2009), sendo a musculatura branca a responsável pelo maior pool de aminoácidos livres em peixes (JURSS; BASTROP, 1995). Os aminoácidos livres estão presentes em quantidades menores na musculatura branca de juvenis comparados aos peixes adultos devido à elevada utilização destes para a síntese proteica (SIDDIQUI et al., 1973; BALLANTYNE, 2001) e utilização como fonte de energia (TERJESEN et al., 2006); desta forma, o desbalanço de aminoácidos nas dietas pode afetar o crescimento dos peixes (ARAGÃO, et al 2007). No presente estudo, a análise de aminoácidos livres da musculatura esquelética mostrou relação direta entre a substituição da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos e a porcentagem de AAD total; ou seja, quanto maior o nível de substituição, maior a porcentagem de AAD no tecido muscular dos juvenis de tambaqui. Por outro lado, a porcentagem de AAI total foi decrescente, acompanhando os menores resultados observados de desempenho nos juvenis dos tratamentos com maiores níveis de substituição (D75 e D90). Em condições desfavoráveis de alimentação, as vias catabólicas para gerar ATP são ativadas enquanto as vias de síntese proteica são inibidas, para limitar os gastos energéticos (SALEM et al., 2010; VAREILLES et al., 2012). O desbalanço na composição de aminoácidos induz a degradação de proteínas musculares para fornecer aminoácidos para outras funções vitais (VAREILLES et al., 2012).

A diminuição nas porcentagens de AAI livres na musculatura dos peixes com o aumento nos níveis de substituição da porção proteica observada neste estudo é um indicador de deficiência, possivelmente causada pela excreção

dos aminoácidos livres em excesso nas dietas e pelo desbalanço devido às diferentes velocidades de absorção das fontes de aminoácidos e competição por transportadores específicos (ZHANG et al., 2006; KWASEK et al., 2010), resultando em aumento da porcentagem de AAD devido ao catabolismo proteico. Durante a falta ou deficiência de algum aminoácido dietético, o *turnover* proteico pode atuar como fonte emergencial dos mesmos para manter os processos vitais (JURSS; BASTROP 1995; CONCEIÇÃO et al., 2003). O processo de *turnover* dos aminoácidos é específico nos diferentes tecidos, porém, no geral, os peixes catabolizam de 40 a 50 % das proteínas corporais para o pool de aminoácidos para reutilização na síntese de proteínas (COWEY; LUQUET, 1983).

Nos tratamentos DFP, D0 e D25 as quantidades de Arg e Thr não foram detectadas pelo método utilizado. Porém, vale ressaltar que a Arg é o primeiro limitante em ingredientes de origem vegetal e está envolvida no metabolismo do nitrogênio, ácido glutâmico, síntese de poliaminas, produção de oxido nítrico, síntese de creatinina e regeneração de ATP no músculo (DENIS et al., 1998; ZHOU et al 2012; LIN et al 2015). Já a Val foi detectada somente na musculatura dos juvenis dos tratamentos D0 e D25. Os aminoácidos de cadeia ramificada (Val, Leu e Ile) desempenham papel importante na síntese proteica e inibem a degradação proteica (HOLECEK et al., 2001; SHIMOMURA et al., 2006), e estão envolvidos em diferentes vias metabólicas para crescimento, reparo de tecidos e manutenção do balanço de nitrogênio corporal (RAHIMNEJAD; LEE, 2013). Estes aminoácidos também competem pelo mesmo transportador na membrana celular (LI et al., 2009); portanto, possivelmente devido à maior disponibilidade de aminoácidos nas dietas suplementadas, os juvenis dos tratamentos com os maiores níveis de substituição não foram capazes de absorver quantidades suficientes deste aminoácido para manter as taxas de síntese proteica para manutenção do desempenho em relação aos juvenis dos tratamentos que receberam menores níveis de substituição.

No presente estudo, a quantidade de His apresentou redução com o aumento da substituição por aminoácidos cristalinos, possivelmente devido à

passagem direta dos aminoácidos livres pelo lúmen intestinal, ou ainda, devido à função da His presente na musculatura branca dos peixes como fonte de energia que pode ser utilizada em situações de privação alimentar (ABE; OHMAMA, 1987; HAN et al., 2013). O aumento da Ala livre no músculo dos peixes com os crescentes níveis de substituição de proteína pode ser um importante indicador de catabolismo proteico, pois este aminoácido que está presente em maiores concentrações no músculo (BALLANTYNE, 2001) é precursor da glicose (LI et al., 2009), formada através do ciclo da glicose-alanina (WU, 2009). A falta de diferença estatística na porcentagem de Glu livre no músculo dos juvenis de tambaqui entre os tratamentos D0 a D90 demonstra a importância deste aminoácido como doador de grupo amina durante síntese de AAD. Aminoácidos como Val, Ile e Leu são substratos para síntese de glutamina nos tecidos animais (WU, 2009), o que torna difícil a compreensão do perfil de resposta dos AAD, baseados apenas nos resultados observados neste trabalho.

CONCLUSÃO

Apesar do melhor desempenho dos peixes do tratamento DFP, os resultados obtidos neste estudo indicam que juvenis de tambaqui na faixa de 0,2 g de peso apresentam crescimento satisfatório com dietas semi-purificadas à base de caseína e gelatina. Comparando-se os resultados dos peixes que receberam as dietas semi-purificadas, conclui-se que até 50 % do perfil de aminoácidos da proteína pode ser substituído por mistura de aminoácidos cristalinos sem prejudicar o desenvolvimento dos juvenis de tambaqui de 0,2 a 4,3 g. Poucos estudos contemplam a exigência dietética em PB e aminoácidos para as fases iniciais de desenvolvimento dos peixes, assim, este estudo traz como contribuição, informações importantes para futuros estudos de exigência para juvenis de tambaqui.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; OHMAMA, S. Effect of starvation and sea-water acclimation on the concentration of free l-histidine and related dipeptides in the muscle of eel, rainbow trout and Japanese dace. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**. V.88, p.507 – 511, 1987.
- ALAMI-DURANTE, H.; WRUTNIAK-CABELLO, C.; KAUSHIK, S. J.; MÉDALE, F. Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 156, p. 561 – 568, 2010.
- ASSIS, J. M. F. de; CARVALHO, R. F.; BARBOSA, L.; AGOSTINHO, C. A.; DAL PAI SILVA, M. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, v. 237, p. 251-267, 2004.
- ARAGÃO, C.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; LACUISSE, M.; YÚFERERA, M.; DINIS, M. T. Do dietary amino acid profiles affect performance of larval gilthead seabream? **Aquatic Living Resources**, v. 20, p. 155 – 161, 2007.
- AYALA, I.; SANTAELLA, M.; MARTINEZ, C.; PERIAGO, M. J.; GIL, F.; BLANCO, A.; ALBORS, O. L. Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. **Food Science and Technology**, v.43, p. 465-45, 2010.
- BALLANTYNE, J. S. Amino acid metabolism. In: **Fish Physiology**, Nitrogen Excretion, eds Wright P. A., Anderson P. M., editors. New York: Academic Press; v.19, p. 77 – 107, 2001.
- BODIN, N.; DELFOSSE, G.; THU, T. T. N.; LE BOULENGÉ, E.; ABOUDI, T.; LARONDELLE, Y.; ROLLINET, X. Effects of fish size and diet adaptation on growth performances and nitrogen utilization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) juveniles given diets based on free and/or protein-bound amino acids. **Aquaculture**, v. 356-357, p. 105 – 115, 2012.
- CAMARGO, A. C. S.; JÚNIOR, M. V.V.; DONZELE, J. L.; de ANDRADE, D. R.; dos SANTOS, L. C. Níveis de energia metabolizável para Tambaqui (*Colossoma macropomum*) dos 30 aos 180 gramas de peso vivo. 1. Composição das carcaças. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, p. 409 - 415, 1998.

CHAPALAMADUGU, K. C.; ROBISON, B. D.; DREW, R. E.; POWELL, M. S.; HILL, R. A.; AMBERG, J. J.; RODNICK, K. J.; HARDY, R. W.; HILL, M. L.; MURDOCH, G. K. Dietary carbohydrate level affects transcription factor expression that regulates skeletal muscle myogenesis in trout. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v.153, p. 66 – 72, 2009.

CONCEIÇÃO, L. E. C.; GRASDALEN, H.; RØNNESTAD, I. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. **Aquaculture**, v.227, p.221 - 232, 2003

CONCEIÇÃO, L. E. C.; YÚFERA, M.; MAKRIDIS, P.; MORAIS, M.; DINIS, M. T. Live feeds for early stages of fish rearing. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 613–640, 2010.

COWEY, C. B.; LUQUET, P. In “IVth International Symposium Protein Metabolism and Nutrition.” pp. 365–384. Editions INRA, Clermont-Ferrand, France, 1983.

DABROWSKI, K.; GUDERLEY, H. Intermediary metabolism. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.) **Fish nutrition**. 3.ed. Washington: Academic Press, p.309-365, 2002.

DABROWSKI, K.; TERJESEN, B. F.; ZHANG, Y.; PHANG, J.; LEE, K. J. A concept of dietary dipeptides: a step to resolve the problem of amino acid availability in early life of vertebrates. **The Journal of Experimental Biology**, v.208, p. 2885 -2894, 2005.

DAVIS, T.A.; FIOROTTO, M. L. Regulation of muscle growth in neonates. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.12, p.78 – 85, 2009.

DENIS, E.; FRCSI, M. D.; LIEBERMAN, M. D.; THOMAS, J.; FAHEY III, M. D.; JOHN, M.; DALY, M. A. F. Immunonutrition: the role of arginine. **Nutrition**, v.14, p.7–8, 1998.

FRACALOSSO, D. M.; RODRIGUES, A. P. O.; SILVA, T. S. C.; CYRINO, J. E. P. Técnicas experimentais em nutrição de peixes. In: FRACALOSSO, D.M. e CYRINO, J.E.P. **NUTRIAQUA: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. 1ª ed. Ampliada. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. p.37-63, 2013.

FURUYA, W. M.; FURUYA, V. R. B. Nutritional innovations on amino acids supplementation in Nile tilapia diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.39, supl.especial, p. 88 - 94, 2010.

HAN, Y.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S. Interactive effects of dietary arginine and histidine on the performances of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles. **Aquaculture**, v.414–415, p. 173–182, 2013.

HIGUERA, M.; AKHARBACH, H.; HIDALGO, M. C.; PERAGÓN, J.; LUPIÁÑEZ, J. A.; GARCÍA-GALLEGO, M. Liver and white muscle protein turnover rates in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of dietary protein quality. **Aquaculture**, v. 179, p.203 – 216,1999.

HOLECEK, M.; SPRONGL, L.; TILSER, I. Metabolism of branched-chain amino acids in starved rats: the role of hepatic tissue. **Physiology Research**, v. 50, p. 25 – 33, 2001.

JOBLING, M. Fish nutrition research: past, present and future. **Aquaculture International**, 2015.

JOHNSTON, I.; HALL, T. Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. **American Fisheries Society Symposium**, v.40, p. 85 – 116, 1999.

JOHNSTON, I. A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2249-2264, 2006.

JÜRSS, K.; BASTROP, R. Amino acid metabolism in fish. In: HOCHACHKA, PW. and MOMMSEN, TP. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Amsterdam: Elsevier, vol. 5, p. 159 - 189, 1995.

KASUMYAN, A. O.; DOVING, K. B. Taste preferences in fishes. **Fish and Fisheries**, v. 4, p. 289 – 347, 2003.

KOJIMA, J. T.; LEITÃO, N. J.; MENOSSI, O. C. C.; FREITAS, T. M.; DAL-PAI SILVA, M.; PORTELLA, M. C. Short periods of food restriction do not affect growth, survival or muscle development on pacu larvae. **Aquaculture**, v. 436, p. 137 – 142, 2015.

KWASEK, K.; ZHANG, Y.; DABROWSKI, K. Utilization of protein, dipeptide-protein and amino acid based diets by juvenile koi carps and effect on body free amino acid concentrations. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94, p.35–43, 2010.

LEITÃO, N. J.; DAL PAI-SILVA, M.; ALVES, F. L. DE A.; PORTELLA, M. C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, v. 315, p. 78-85, 2011.

LEITÃO, N. J. **Dietas microencapsuladas: produção e avaliação para alimentação de larvas altriciais de peixes de água doce**. 91 f.(Tese de Doutorado em Zootecnia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids** v.37, p.43 – 53, 2009.

Lin, H.; Tan, T.; Zhou, C.; Niu, J; Xia, D.; Huang, Z.; Wang, J.; Wang, Y. Effect of dietary arginine levels on the growth performance, feed utilization, non-specific immune response and disease resistance of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. **Aquaculture**, v. 437, p.382–389, 2015.

MARCOULI, P. A.; ALEXIS, M. N.; ANDRIOPOULOU, A.; ILIOPOULOU-GEORGUDAKI, J. Development of a reference diet for use in indispensable amino acid requirement studies of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. **Aquaculture Nutrition**, v. 10, pp. 335 – 344, 2004.

MENOSSE, O. C. C. **Efeitos do jejum sobre o desempenho zootécnico, crescimento e degradação muscular e alterações hepáticas de juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus***. (Tese de Doutorado em Aquicultura) Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

NEBO, C.; PORTELLA, M. C.; CARANI, F. R.; DE ALMEIDA, F. L. A.; PADOVANI, C. R.; CARVALHO, R. F.; DAL-PAI-SILVA, M. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, B**, V. 164, P.268–274, 2013.

NRC (National Research Council). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington, DC: National Academy Press. 2011.

NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; BROWDY, C. L.; VAZQUEZ-ANON, M. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. **Aquaculture**, v. 431, p. 20 – 27, 2014.

PERES, H.; OLIVA-TELES, A. The effect of dietary protein replacement by crystalline amino acid on growth and nitrogen utilization of turbot *Scophthalmus maximus* juveniles. **Aquaculture**, v. 250, p. 755 – 764, 2005.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; PERES, H.; OLIVA-TELES, A. Effective replacement of protein-bound amino acids by crystalline amino acids in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, p. 60 – 68, 2014.

PORTZ, L.; FURUYA, W. M. Energia, proteína e aminoácidos. In: FRACALLOSSI, D.M. e CYRINO, J.E.P. NUTRIAQUA: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1ª ed. Ampliada. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. p.65-78, 2013.

RAHIMNEJAD, S.; LEE, K. J. Dietary valine requirement of juvenile red sea bream *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 416–417, p. 212–218, 2013.

RODRIGUES, A. P. Nutrição e alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.40, n. 1, p. 135 – 145, 2014.

SÁ, M. V. D. C. E.; FRACALOSSO, D. M. Exigência Protéica e Relação Energia/Proteína para Alevinos de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1-10, 2002.

SALEM, M.; KENNEY, P. B.; REXROAD, C. E. III.; YAO, J. Proteomic signature of muscle atrophy in rainbow trout. **Journal of Proteomics**, v.73, p. 778 – 789, 2010.

SHIMOMURA, Y.; YAMAMOTO, Y.; BAJOTTO, G.; SATO, J.; MURAKAMI, T.; SHIMOMURA, N.; KOBAYASHI, H.; MAWATARI, K., 2006. Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 529S–532S, 2006.

SIDDIQUI, A. Q; SIDDIQUI, A. H.; AHMAD, K. Free amino acid contents of the skeletal muscle of carp at juvenile and adult stages. **Comparative Biochemistry and Physiology**, B, v. 44, p. 725 – 728, 1973.

STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K. D.; BAEVERFJORD, G. Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with wheat gluten. **Aquaculture**, v.184, p.115-132, 2000.

TERJESEN, B. F.; LEE, K. J.; ZHANG, Y.; FAILLA.; DABROWSKI, K. Optimization of dipeptide–protein mixtures in experimental diet formulations for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alevins. **Aquaculture**, v. 254, p.517–525, 2006.

TESSER, M., TERJESEN, B. F., ZHANG, Y., PORTELLA, M. C., DABROWSKI, K. Free- and peptide-based dietary arginine supplementation for the South American fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 443 – 453, 2005.

VALENTE, L. M. P.; ROCHA, E.; GOMES, E. F. S.; SILVA, M. W.; OLIVEIRA, M. H.; MONTEIRO, R. A. F.; FAUCONNEAU, B. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 55, p. 675–69, 1999.

VAREILLES, M.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; GÓMEZ-REQUENI, P.; KOUSOULAKI, K.; RICHARD, N.; RODRIGUES, P. M.; FLADMARK, K. E.; RONNESTAD, I. Dietary lysine imbalance affects muscle proteome in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative 2D-DIGE study. **Marine Biotechnology**, v. 14, p. 643 – 654, 2012.

VERTEGEN, M. W. A.; JONGBLOED, A. W. Crystalline amino acids and nitrogen emission. In: J. P. F. D’Mello, editor. *Amino Acids in Animal Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK. P. 448-449. 2003.

YUAN, Y.; GONG, S.; YANG, H.; LIN, Y.; YU, D.; LUO, Z. Effect of supplementation of crystalline or coated lysine and/or methionine on growth performance and feed utilization of the Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. **Aquaculture**, v.316, p.31-36, 2011.

WU, G. Y. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, p.1 – 17, 2009.

ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; CAHU, C. L.; PERES, A. Partial Substitution of Di- and Tripeptides for Native Proteins in Sea Bass Diet Improves *Dicentrarchus labrax* Larval Development. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 608 – 614, 1997.

ZHANG, Y.; DABROWSKI, K.; HLLIWA, P.; GOMULKA, P. Indispensable amino acid concentrations decrease in tissues of stomachless fish, common carp in response to free amino acid- or peptide-based diets. **Amino Acids**, v. 31, p. 165-172, 2006.

Zhoua, Q. C.; Zeng, W. P.; Wang, H. L.; Xie, F. J.; Wang, T.; Zheng, C. Q. Dietary arginine requirement of juvenile yellow grouper *Epinephelus awoara*. **Aquaculture** , v.350–353, p.175–182, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os níveis de 49,46 % e 31,9 % de proteína bruta foram suficientes para atender às exigências em proteína bruta para o máximo desempenho de ganho em peso de tambaquis na faixa de 70 a 430 mg e para juvenis na faixa de peso de 250 a 5500 mg, respectivamente. E o excesso de proteína prejudica o crescimento hiperplásico da musculatura esquelética de tambaqui na faixa de peso de 70 a 430 mg.

A substituição de até 50 % do perfil de aminoácidos da proteína por mistura de aminoácidos cristalinos pode ser utilizada sem prejudicar o desempenho de crescimento e desenvolvimento da musculatura esquelética dos juvenis de tambaqui de 0,2 a 4,3 g.

Desta forma, os resultados de exigência proteica e substituição da proteína por mistura de aminoácidos encontrados neste estudo poderão contribuir com informações para futuras pesquisas em exigência proteica e aminoácidos específicos da espécie durante as fases iniciais de desenvolvimento, visando o desenvolvimento muscular para o melhor desempenho e qualidade de produtos, como o filé do peixe.