

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

**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**

Hellen Buzollo
Zootecnista

2014

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

**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**

Hellen Buzollo

Orientador: Prof. Dr. Dalton José Carneiro

Coorientadora: Profa.Dra. Rosângela Kiyoko Jomori Bonichelli

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

2014

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXIGÊNCIA DE PROTEÍNA DIGESTÍVEL EM DIETAS PARA JUVENIS DE TAMBACUI
E A DINÂMICA DO CRESCIMENTO MUSCULAR POR ASPECTOS MORFOLÓGICOS
E TURNOVER ISOTÓPICO DO CARBONO-13 E DO NITROGÊNIO-15

AUTORA: HELLEN BUZOLLO

ORIENTADOR: Prof. Dr. DALTON JOSE CARNEIRO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSANGELA KIYOKO JOMORI BONICHELLI

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



Prof. Dr. DALTON JOSE CARNEIRO

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. RODRIGO TAKATA

Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro / Cordeiro/RJ



Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / Campus Experimental de Dracena



Profa. Dra. FERNANDA REGINA CARANI

Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu



Prof. Dr. LUCIANO HAUSCHILD

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 28 de novembro de 2014.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

HELLEN BUZOLLO – nasceu em São José do Rio Preto, SP, no dia 15 de outubro de 1982. Em agosto de 2004 ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Unesp, Câmpus de Ilha Solteira, SP, realizando estágio no Laboratório de Ictiologia Neotropical (LINEO), sob orientação do Professor Doutor Alexandre Ninhaus Silveira, onde desenvolveu sua Iniciação Científica com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Em janeiro de 2009, graduou-se em Zootecnia. Em março de 2009, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) em Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Dalton José Carneiro, com bolsa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), submetendo sua dissertação à banca examinadora em fevereiro de 2011. Em março de 2011, ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia na FCAV também sob orientação do Prof. Dr. Dalton José Carneiro, com auxílio e bolsa financiados pela FAPESP.

*“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível”.*

São Francisco de Assis.

*Aos meus pais Valmir e Silvia e ao meu irmão Bruno,
pelo amor incondicional, por sempre acreditarem em mim,
pelas orações e incentivo ...*

*Ao meu amor Adilson por não medir esforços
para me apoiar e incentivar. Sempre amigo e companheiro nas batalhas e
conquistas. Obrigada por fazer minha vida mais feliz. Te amo!*

Dedico

Agradecimentos

À Deus por me mostrar que nada é impossível, por ser meu escudo e segurança.

Ao meu orientador Dalton José Carneiro pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos, dedicação e confiança no meu trabalho.

A minha coorientadora Rosângela Kiyoko Jomori Bonichelli pelas inúmeras sugestões, por toda colaboração na realização deste trabalho e pela amizade e carinho.

A Profa. Dra. Maria Célia Portella pelo apoio e confiança, me dando a chance de ingressar no laboratório de Nutrição.

Aos membros da Banca Examinadora da Qualificação: Dr. Eduardo Gianini Abimorad, Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, Profa. Dra. Marta Verardino De Stéfani e Dra. Natália de Jesus Leitão. Muito obrigada pelas correções e sugestões, tão importantes para a redação final deste trabalho.

Aos membros da Banca de Defesa: Dr. Rodrigo Takata, Dra. Fernanda Regina Carani, Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi e Prof. Dr. Luciano Hauschild. Muito obrigada pela disponibilidade, atenção e sugestões dadas ao trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelas concessões da Bolsa de Estudos e Auxílio à Pesquisa.

À todos os funcionários do CAUNESP, compartilhando idéias e proporcionando conversas descontraídas. Em especial a Silvinha e Elaine pela amizade durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti, a todos os funcionários e alunos do Centro de Isótopos Estáveis da UNESP de Botucatu, que me receberam de braços abertos e tornaram possível a conclusão deste trabalho.

A empresa Guabi e ao sempre atencioso Giovani Sampaio Gonçalves pela doação dos alimentos utilizados.

Aos meus amigos e colegas que trabalham direta ou indiretamente no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, pelo grande auxílio durante todas as etapas deste trabalho: Juliana (Tomys), Rodrigo (Gimbo), Thiago (Nogento), Jesaias, Thiago (Strumi), Carol Nebo, Olívia (Taxinha), Thyssia, Andressa, Thalys,

Taís, Caio Gomez, Bruna, Fernanda Carani, Gisele Fávero, Naiara, Joana, Natalia Leitão e em especial as minhas amadas irmãs Lidiane e Ligia, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus amigos Max Ternero Cangani, Fabiana Almeida e Nayara Tavares pela nossa amizade de tantos anos, por sempre estarem dispostos a me ouvir, pelas risadas que demos juntos, enfim por toda cumplicidade.

A Elisamara Raposo pelos momentos e emoções que passamos durante o tempo que moramos juntas.

A minha família e amigos, em especial aos meus pais (Silvia e Valmir), Bruno, Regina, meus avós e meus queridos sogros pelas constantes orações e amor incondicional.

Em especial ao meu amado esposo e companheiro de todas as horas Adilson José Pazzini, por todos esses anos de compreensão devido minha ausência e felicidade plena. Amo muito você!!!

Aos tambaquis deste trabalho, em respeito às vidas sacrificadas.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	iv
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ESPÉCIE ESCOLHIDA.....	2
3. DIGESTIBILIDADE DOS ALIMENTOS.....	3
4. NÍVEIS DE PROTEÍNA NA DIETA DE TAMBAQUI	5
5. DESENVOLVIMENTO MUSCULAR EM PEIXES TELEÓSTEOS.....	7
6. UTILIZAÇÃO DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS AMBIENTAIS.....	9
7. OBJETIVOS.....	12
7.1. OBJETIVO GERAL.....	12
7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
CAPÍTULO 2 - COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE DA PROTEÍNA, EXTRATO ETÉREO E ENERGIA DE ALIMENTOS PARA O TAMBAQUI <i>Colossoma macropomum</i>	24
RESUMO	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO E INSTALAÇÕES.....	27
2.2. DIETAS EXPERIMENTAIS	27
2.3. COLETA DE FEZES.....	30
2.4. ANÁLISES LABORATORIAIS	31
2.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
3. RESULTADOS	33
3.1. ALIMENTOS PROTEICOS.....	33
3.2. ALIMENTOS ENERGÉTICOS	34
4. DISCUSSÃO.....	35
4.1. ALIMENTOS PROTEICOS.....	35
4.2. ALIMENTOS ENERGÉTICOS	38
5. CONCLUSÃO	41
CAPÍTULO 3 - EXIGÊNCIA DE PROTEÍNA DIGESTÍVEL E CRESCIMENTO MUSCULAR DE JUVENIS DE TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>)	48
RESUMO	49
1. INTRODUÇÃO.....	50

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. PEIXES.....	52
2.2. DIETAS EXPERIMENTAIS	52
2.3. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO PRODUTIVO.....	55
2.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS FIBRAS MUSCULARES	57
2.5. AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS	55
3. RESULTADOS	58
3.1. DESEMPENHO PRODUTIVO	58
3.2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	63
4. DISCUSSÃO.....	68
4.1. DESEMPENHO PRODUTIVO	68
4.2. MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES	71
5. CONCLUSÃO	73
CAPÍTULO 4 - <i>TURNOVER</i> ISOTÓPICO DE CARBONO $\delta^{13}\text{C}$ E NITROGÊNIO $\delta^{15}\text{N}$ NO TECIDO MUSCULAR DE JUVENIS DE TAMBAQUI <i>Colossoma macropomum</i> ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA DIGESTÍVEL.....	82
RESUMO	83
1. INTRODUÇÃO.....	84
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	85
2.2. DIETAS EXPERIMENTAIS	89
2.3. DETERMINAÇÃO DO <i>TURNOVER</i> DO CARBONO ($\delta^{13}\text{C}$) E DO NITROGÊNIO ($\delta^{15}\text{N}$) NO TECIDO MUSCULAR: AMOSTRAGENS E ANÁLISES ISOTÓPICAS.....	91
2.4. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO PRODUTIVO.....	93
2.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	93
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
3.1. PADRONIZAÇÃO ISOTÓPICA	94
3.2. DESEMPENHO PRODUTIVO	96
3.3. <i>TURNOVER</i> ISOTÓPICO ENTRE AS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	98
4. CONCLUSÃO	105



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 015810/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Exigência de proteína digestível em juvenis de tabaqui e a dinâmica do crescimento muscular por aspectos morfológicos e turnover isotópico do carbono-13 e do nitrogênio-15**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Dalton José Carneiro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 05 de Agosto de 2011.

Jaboticabal, 10 de Agosto de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

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

RESUMO - Dentre as espécies nativas com potencial para aquicultura, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) destaca-se pela rusticidade, facilidade de adaptação ao cultivo e alta produtividade em sistema intensivo. Considerando a falta de informações sobre exigências proteicas para a espécie, torna-se necessário estabelecer as exigências desse nutriente, para formulação de dietas que permitam na espécie, a expressão de um melhor desempenho e ótimas características de carcaça, associadas a uma menor excreção de nutrientes ao meio ambiente e redução dos custos com a alimentação. A tese está dividida em quatro capítulos, apresentando uma revisão sobre os temas abordados no projeto e os resultados descritos na forma de artigos para publicação. Assim, estudou-se, primeiramente, a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína, extrato etéreo e energia de nove alimentos proteicos (farelo de soja, farelo de algodão, farinha de salmão, farinha de resíduos de filetagem de tilápia, farinha de vísceras de aves, farinha de penas hidrolisadas, glúten de milho, glúten de trigo e levedura de álcool) e de sete alimentos energéticos (milho, sorgo, farelo de trigo, quirera de arroz, óleo de soja, óleo de peixe e óleo de milho), os mais comumente utilizados em dietas comerciais para peixes. A maioria dos CDA dos alimentos proteicos foram altos para as frações de proteína, extrato etéreo e energia, com exceção do CDA da proteína para levedura, CDA do extrato etéreo para glúten de trigo e CDA da energia para o farelo de algodão e levedura, que foram inferiores a 65%. Os juvenis de tambaquis aproveitaram bem os alimentos energéticos avaliados, apresentando elevados CDA. Na sequência, determinou-se a exigência em proteína digestível (PD) para juvenis de tambaquis, além de avaliar os mecanismos de crescimento muscular hiperplásico e hipertrófico. O nível proteico interferiu ($P < 0,005$) no desempenho zootécnico dos animais e a exigência de proteína digestível para o tambaqui, nas condições experimentais avaliadas, foi de 29%, com alterações na celularidade muscular, com maior frequência de fibras de diâmetros maiores (D80 e $D \geq 80 \mu\text{m}$), distribuídas em padrão de mosaico. Nesta fase, caracterizou-se o processo de hipertrofia, mas o processo de hiperplasia ainda estava ocorrendo devido a presença de fibras presentes nas classes D10 e D20. Por fim, no quarto capítulo, apresenta-se os resultados da avaliação do *turnover* isotópico do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) no tecido muscular e do índice de participação percentual das dietas no tecido ao longo do tempo, de acordo com o crescimento dos animais em resposta às exigências nutricionais. O perfil que caracterizou o crescimento dos animais ao longo do tempo foi diferente entre os tratamentos ($P < 0,05$); e os níveis proteicos de 29 e 32% destacaram-se desde as primeiras avaliações biométricas. As taxas de *turnover* do carbono e do nitrogênio no tecido muscular foram mais aceleradas quanto maior o nível proteico. As equações isotópicas mostraram um padrão similar entre as dietas contendo 29 e 32% de PD, juntamente com os

resultados de crescimento dos peixes. Assim, no contexto de todas as análises efetuadas para avaliar a exigência de proteína digestível em dietas para o tambaqui, a dieta com 29% PD mostrou ser mais adequada para o desempenho produtivo dos juvenis, na fase de crescimento estudada.

Palavras-chave: digestibilidade, desenvolvimento muscular, desempenho produtivo, exigência proteica, isótopos estáveis

DIGESTIBLE PROTEIN REQUIREMENT IN DIETS FOR JUVENILE TAMBAQUI AND DYNAMICS OF MUSCLE GROWTH BY MORPHOLOGICAL ASPECTS AND TURNOVER ISOTOPIC CARBON-13 AND NITROGEN-15

ABSTRACT - Among the native species with potential for aquaculture, tambaqui *Colossoma macropomum* is distinct for its hardiness, ease of cultivation and adaptation to high productivity in intensive system. There is a lack of information about protein requirements for tambaqui. Thus, is it necessary to establish the requirements for this nutrient for better formulations of diets. An efficient use of protein allows the expression of better performance and optimum body characteristics. Efficient use of protein is also associated with less excretion of nutrients into the environment and cost reduction of feeding. The thesis is divided into four chapters, preseting an overview of the topics covered in the project and results are described in the form of articles for publication. Thus, we investigated, at first, the determination of apparent digestibility coefficients (ADC) of protein, ether extract and energy of the nine protein feedingstuffs (soybean meal, cottonseed meal, salmon meal, tilapia filleting residue meal, poultry by-product meal, feather meal, corn gluten, wheat gluten and alcohol yeast) and seven energy feedingstuffs (corn, sorghum, wheat meal, broken rice, soya oil, fish oil and corn oil), the most commonly used in commercial fish diets. The most of ADC protein feedingstuffs were high for the fractions of protein, ether extract and energy, with the exception of the ADC protein alcohol yeast, ADC ether extract to wheat gluten and ADC of energy for the cottonseed meal and alcohol yeast. All were less than 65%. Juvenile tambaquis availed well the energetic feeds, providing high ADC. Further, we determined the requirements of digestible protein for juvenile tambaquis, and to evaluate the mechanisms of hyperplastic and hypertrophic muscle growth. The protein level affected all parameters ($P < 0.005$). The digestible protein requirement for tambaqui in our experimental conditions was 29%, causing changes in muscle cellularity, with increased frequency of larger diameter fibers (D_{80} and $D_{\geq 80\mu m}$), distributed in a mosaic pattern. Characterized at this stage the hypertrophy process, but the hyperplasia process was still occurring due to presence of fibers present in the D_{10} and D_{20} classes. Finally, the fourth section evaluated the turnover of carbon ($\delta^{13}C$) and nitrogen ($\delta^{15}N$) isotopes in muscle tissue and rate of percentual participation of diets (the carbon and nitrogen) into the muscle tissue over time according to animals growth in response to nutritional requirements. During the day of experiment, the animals grew over time, across all treatments ($P < 0.05$); and between treatments, the protein levels of 29% and 32 detach from the first weighing. The speed of isotopic changes in the muscle tissue were inf luenced by the characteristics diets, and turnover rates of carbon and nitrogen were accelerated over the higher protein level. Isotopic equations showed a similar pattern between diets containing 29 and 32% of DP, along with the analysis of the weight of the fish. A diet with 29% DP was more adequate to productive performance of tambaquis juvenile in growth phase studied.

KEYWORDS: digestibility, muscle development, growth performance, protein requirement, stable isotopes

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 - Introdução

A preocupação com a escassez dos recursos naturais disponíveis, associada ao aumento da demanda por alimentos promove a procura por modelos de produção sustentáveis, implicando em significativas mudanças nos sistemas tradicionais de produção animal. A criação de peixes em confinamento busca um maior refinamento tecnológico, visando aumento de desempenho dos animais, redução dos custos e melhora na qualidade do produto, além disso, deve ser ambientalmente correta com adoção de estratégias de produção bem pensadas e projetos responsáveis de manejo da emissão de efluentes em piscicultura (CYRINO et al., 2010).

No Brasil, existem várias espécies de peixe com potencial para a criação em confinamento, com destaque para o tambaqui *Colossoma macropomum* e seus híbridos. O tambaqui apresenta diversas características que o torna a espécie nativa mais produzida atualmente, com carne de excelente qualidade, boa oferta de juvenis e conversão alimentar, além do grande aproveitamento dos alimentos (ARAÚJO-LIMA; GOMES, 2005).

Com o aumento da produção intensiva de tambaqui, surge a necessidade de novos estudos que visem melhorar o desempenho produtivo da espécie. Para tal, é essencial o conhecimento da digestibilidade de nutrientes e energia dos alimentos e dietas, buscando formulações que resultem em ótimo desempenho dos peixes. Sem os dados de digestibilidade, não é possível saber se os nutrientes fornecidos realmente são aproveitados, o que pode levar a um desbalanceamento entre proteína e outros nutrientes e energia, e conseqüentemente à produção de dietas pouco eficientes e o aumento nos custos de produção (GONÇALVES; CARNEIRO, 2003).

Dietas formuladas com base em proteína bruta podem não atender as exigências nutricionais dos organismos aquáticos. O uso de dietas não balanceadas ou a alimentação excessiva reduzem a absorção de nutrientes pelos peixes, o que pode resultar em excesso de matéria orgânica nos sistemas de produção (CYRINO et al., 2010). Nesse sentido, estudos com determinação das exigências são

necessários, principalmente os de exigência de proteica, considerando que a proteína é o nutriente mais caro de uma dieta e irá compor o tecido muscular. De maneira geral, a determinação das exigências nutricionais nas diferentes espécies é realizada com a avaliação do desempenho produtivo proporcionado pelas dietas. Neste estudo, para melhor avaliar a eficiência das dietas, além das variáveis convencionais de desempenho foram utilizadas metodologias mais intrínsecas à dinâmica do crescimento muscular, como a morfologia e celularidade das fibras musculares dos peixes e o *turnover* isotópico do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) no tecido muscular.

2 - Espécie escolhida

No Brasil, entre as espécies nativas com potencial para a aquicultura está o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), por apresentar grande potencial para a atividade piscícola e possuir boas qualidades zootécnicas (GRAEF, 1995). Nativo da região amazônica, a espécie pertence à família Characidae e a subfamília Serrasalminae, distribuindo-se na parte tropical da América do Sul e na Amazônia Central. É disseminado praticamente em todo Brasil, apesar de temperaturas abaixo de 20°C serem limitantes ao seu crescimento e bem estar (ZANIBONI FILHO; MEURER, 1997).

O tambaqui é a espécie nativa mais produzida na aquicultura continental, com grande crescimento contínuo no último censo, partindo de 38.833 toneladas em 2008 e atingindo 111.084 toneladas em 2011 (MPA, 2013). Também merece destaque a produção de seu híbrido, o tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) com 49.818 toneladas de peixe produzido no país em 2011.

O tambaqui é o segundo maior peixe de escamas da Amazônia, atingindo mais de 1 m de comprimento e 30 kg no ambiente natural. A oferta de juvenis é regular, sua reprodução é induzida com utilização de hormônios, cuja prática já tem um protocolo bem estabelecido (ARAÚJO-LIMA; GOMES, 2005).

Atualmente, com o crescimento e desenvolvimento das pisciculturas, o tambaqui é criado em diferentes sistemas de produção, apresentando bons resultados em sistema semi-intensivo em tanques escavados (MELO; IZEL;

RODRIGUES, 2001; ARBELÁEZ-ROJAS; FRACALOSSI; FIM, 2001) e em sistema intensivo com o uso de tanques-rede (GOMES et al., 2004; BRANDÃO et al., 2004; GOMES et al, 2006; SILVA; GOMES; BRANDÃO, 2007a). Como adapta-se a diferentes sistemas de produção, em sua dieta podem ser utilizadas diferentes fontes proteicas e energéticas, aceitando dietas industrializadas e se beneficiando da produtividade primária do viveiro, aproveitando o zooplâncton como fonte de proteína (GOMES; SILVA, 2009). A sua dieta natural inclui zooplâncton, frutos e sementes, sendo considerado um onívoro com tendência a frugívoro (HONDA, 1974).

Apesar da importância econômica do tambaqui, as dietas comerciais fornecidas a esses animais criados em confinamento são usualmente não específicas. No entanto, para o melhor desempenho com menor custo, sabe-se que é indicado fornecer aos peixes dietas espécie-específicas e ainda, para cada fase de criação. Ainda há muito a ser estudado, e para melhorar a alimentação do tambaqui, é fundamental que se conheça o nível de aproveitamento dos alimentos, com estudos de digestibilidade e a determinação das exigências nutricionais para o ótimo crescimento.

3- Digestibilidade dos alimentos

Os peixes aproveitam os alimentos de forma diferente, pois possuem hábitos alimentares específicos. Nutricionalmente, para melhorar a qualidade da dieta dos peixes é preciso primeiramente quantificar a fração do nutriente ou energia do alimento ingerido que não é excretada nas fezes, o que pode ser feito por meio de estudos de digestibilidade (OLIVEIRA FILHO; FRACALOSSI, 2006). Essas informações auxiliam na formulação de dietas que atendam às necessidades nutricionais, evitando tanto a sobrecarga fisiológica quanto a ambiental (Mc GOOGAN; REIGH, 1996; PEZZATO et al., 2004).

Vários fatores influenciam os coeficientes de digestibilidade dos alimentos em peixes: espécie, idade, hábito alimentar, anatomia do sistema digestivo e metabolismo, características dos alimentos como origem (animal ou vegetal), e composição, temperatura da água, tipo de processamento do alimento e métodos utilizados para a coleta de fezes (CHO; BUREAU, 2001; BOMFIM; LANNA, 2004).

A determinação *in vivo* da digestibilidade em peixes pode ser feita através de dois métodos: direto ou indireto. Nenhum dos métodos considera a presença de materiais de origem endógena ou metabólica nas fezes, e as perdas podem chegar a 5% (NRC, 2011) podendo subestimar os coeficientes de digestibilidade encontrados; portanto, os dados obtidos são de digestibilidade aparente e não verdadeira. Os peixes vivem no ambiente aquático, sendo difícil determinar perdas endógenas como os produtos da oxidação das proteínas e lipídios, tais como enzimas digestivas, muco e células da parede intestinal e substâncias presentes na bile (LOVELL, 1998).

Dentre os métodos de determinação da digestibilidade, o mais empregado é o indireto. Este permite a coleta parcial das fezes e a alimentação voluntária do animal por meio da utilização de um marcador indigestível na dieta. Admite-se que toda quantidade de marcador ingerido aparecerá nas fezes, pois permanecerá constante ao longo do processo digestivo (NRC, 2011). O marcador mais utilizado em estudos de digestibilidade em peixes é o óxido de crômio (AUSTRENG, 1978; PEZZATO et al., 2002; BREMER NETO et al., 2003; ABIMORAD; CARNEIRO, 2004; GUIMARÃES; MIRANDA; ARAÚJO, 2014). Não existe padrão que fixe a quantidade de óxido de crômio ideal para os ensaios de digestibilidade, e são usados: 0,01% (BREMER NETO et al., 2003); 0,1% (BORGHESI; DAIRIKI; CYRINO, 2009); 0,5% (ABIMORAD; CARNEIRO, 2004; ZHOU et al.; 2004); 0,7% (ANDERSON et al., 1992); 1% (AUSTRENG, 1978; GUIMARÃES; MIRANDA; ARAÚJO, 2014).

As formas de coleta de fezes no método indireto podem ser diversas. Os pesquisadores da área vêm estudando várias metodologias para coleta de fezes em peixes (dissecação intestinal, extrusão manual, sucção anal, pipetagem imediata na água, filtração contínua de água e decantação das fezes), com o intuito de averiguar as mais adequadas para padronização (BOMFIM; LANNA, 2004). Abimorad e Carneiro (2004) avaliaram os métodos de coleta de fezes em juvenis de pacus por dissecação intestinal, sistema de Ghelph convencional e modificado e extrusão manual e concluíram que todos os métodos de coleta de fezes estudados podem ser adotados, com segurança, para determinação dos coeficientes de digestibilidade dos alimentos para o pacu, desde que usados de forma criteriosa. O método de coleta de fezes para os estudos de digestibilidade em peixes é indispensável para que se

obtenha precisão nos resultados (AUSTRENG, 1978; SMITH, 1980). Dentre as metodologias desenvolvidas destaca-se o sistema de Guelph e suas adaptações. Este sistema consiste de aquários cilíndricos de fundo cônico, contendo em suas extremidades inferiores registros de esfera e mangueiras de látex acopladas a tubos de ensaio, nos quais as fezes ficavam depositadas após a decantação (GONÇALVES; CARNEIRO, 2003). As principais vantagens do sistema são a obtenção de quantidades satisfatórias de fezes, possibilitando a aplicação do método em peixes de qualquer tamanho, bem como a manutenção dos peixes em condições normais e reduzidas de estresse (CHO; SLINGER, 1979 citado por FRACALOSSI et al., 2013).

Ainda são poucos os estudos de nutrição realizados para o tambaqui, (CARNEIRO, 1981; SILVA; FILHO; OLIVEIRA-PEREIRA, 2003; VIDAL JUNIOR et al., 2004; SILVA et al., 2007b; OLIVEIRA et al., 2008, GUIMARÃES; MIRANDA; ARAÚJO, 2014), principalmente de alimentos utilizados em dietas comerciais. A utilização de alimentos altamente digestíveis torna-se mais importante em condições de criação de alta densidade, que além de elevar os índices zootécnicos do tambaqui, reduzirá o excesso de nutriente na água.

4 – Níveis de proteína na dieta de tambaqui

A criação intensiva de peixes requer a utilização de uma alimentação balanceada, formulada com os mais diversos ingredientes e processos de elaboração, para que haja um melhor aproveitamento das dietas pelos peixes. A dieta deve atender as exigências nutricionais, pois o seu desbalanceamento afeta negativamente o aproveitamento dos nutrientes (PEZZATO et al., 2004). Nesse sentido, tem sido dada atenção para estudos de exigências proteicas. Comercialmente, um fato relevante é a associação direta entre o preço da dieta e o teor de proteína. Entre as espécies animais, os peixes necessitam de maiores quantidades de proteína na dieta e o custo com alimentação corresponde de 50 a 70% dos custos totais de produção (MUÑOZ – RAMÍRES; CARNEIRO, 2002; ABIMORAD et al., 2009; BUZOLLO, 2011).

Proteínas são compostos orgânicos constituídos por aminoácidos conjugados em proporções que são características de cada proteína. A proteína corporal está

constantemente sujeita a dois processos: a síntese (anabolismo) e degradação (catabolismo) (WEBSTER; LIM, 2002). No corpo do peixe, as proteínas são os constituintes principais dos tecidos estruturais de proteção (por exemplo, ossos, ligamentos, escamas e pele), tecidos moles (órgãos, músculos) e fluidos corporais (LALL; ANDERSON, 2005). Durante o processo metabólico, as proteínas são hidrolisadas, liberando aminoácidos que serão distribuídos por meio da corrente sanguínea para órgãos e tecidos. Dietas com insuficiência de proteínas e aminoácidos podem reduzir o crescimento e a eficiência alimentar, mobilizando a proteína de alguns tecidos para a manutenção de funções vitais. Por outro lado, a proteína fornecida em excesso pela dieta será utilizada para a produção de energia, e não na formação de tecido muscular e crescimento (WILSON, 2002). As exigências em proteína dos peixes são usualmente expressas como porcentagem fixa da dieta ou como a relação de quilocalorias de energia dietética por gramas de proteína (PORTZ; FURUYA, 2013).

Os primeiros estudos de exigência em proteína dietética para o tambaqui surgiram com Macedo (1979), que determinou, pela primeira vez, a exigência de proteína bruta para juvenis de tambaquis, trabalhando com animais na faixa de 5 a 300 g em viveiros. O autor testou dietas práticas isoenergéticas contendo concentrações de 14, 18, 22 e 26% de proteína bruta (PB). Para a fase de 5 a 20 g, a exigência dos juvenis foi de 22% PB e, para a fase seguinte (20-300g), 18% PB proporcionou um desempenho de produção semelhante às dietas com 22 ou 26% PB. Oishi et al. (2010), testando quatro dietas (sem a inclusão de farinha de peixes) contendo níveis crescentes de proteína bruta de 25, 30, 35 e 45 % em tanques experimentais, observaram melhor desempenho produtivo dos juvenis de tambaqui (peso médio inicial de $46,4 \pm 6,3$ g) quando alimentados com 30 % de PB. Outros estudos com exigência proteica para o tambaqui também foram realizados e todos baseando-se em teores de proteína bruta (CARNEIRO, 1981; MEROLA; CANTELMO, 1987; VAN DER MEER et al., 1995; DE ALMEIDA et al., 2006; SANTOS et al., 2010; DE ALMEIDA et al., 2011). Além disso, diversos fatores influenciam a exigência em proteínas; entre eles, a temperatura da água, a idade do peixe (WILSON, 2002), a taxa de arraçoamento, a qualidade da proteína utilizada e

a participação de fontes energéticas não-proteicas, como os lipídios e os carboidratos (ABIMORAD; CARNEIRO, 2007).

Contudo, pouco pôde ser concluído sobre a nutrição desta espécie, uma vez que preconiza-se que as dietas sejam formuladas com base em nutrientes digestíveis, o que proporcionaria um conhecimento mais real da eficiência de utilização proteica dos alimentos.

5 – Desenvolvimento muscular em peixes teleósteos

Em peixes, o tecido muscular constitui a maior parte da massa corporal, representando de 40 a 75% do peso total do animal, e o conhecimento da dinâmica do crescimento muscular por análises morfológicas e morfométricas pode contribuir para o refinamento das informações sobre as respostas de exigências nutricionais pelos animais. Na maioria das espécies de peixes, a musculatura estriada esquelética está organizada em miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal, e estão separados por miosseptos, que são curtos tendões de bainhas de tecido conjuntivo (ALEXANDER, 1969). Na região do nervo da linha lateral, um septo de tecido conjuntivo, o septo transversal, separa a massa muscular em regiões epiaxial e hipoaxial (ALEXANDER, 1969).

Morfologicamente, as fibras musculares são distribuídas em três compartimentos: vermelho, intermediário e branco (KILARSKI, 1990). O compartimento branco é formado predominantemente por fibras musculares maiores (até 100 µm de diâmetro) e com as miofibrilas ocupando entre 75 e 95% do volume total da fibra (SÄNGER, 1992; SÄNGER; STOIBER, 2001). As fibras do músculo branco apresentam velocidade de contração rápida e metabolismo glicolítico, baixa concentração de mioglobina, poucas mitocôndrias e lipídios. São recrutadas na realização de atividades bruscas de locomoção, como na fuga de predadores e captura de presas (SÄNGER; STOIBER, 2001). A musculatura vermelha, apresentam velocidade lenta de contração e metabolismo oxidativo, alta concentração de mioglobina, muitas mitocôndrias, lipídios e excelente suprimento sanguíneo, sendo utilizadas pelo peixe na realização de movimentos lentos e de sustentação, como durante a migração (Johnston, 1999). É formada por fibras menores (até 45 µm de diâmetro), pode estender-se ao longo de todo o corpo do

animal em uma fina camada na região subdermal ou apresentar-se de forma mais localizada na região do nervo da linha lateral. Entre estas duas áreas distintas, encontra-se a musculatura intermediária, com características morfofisiológicas intermediárias entre as fibras vermelhas e brancas (SÄNGER; STOIBER, 2001)

Mudanças no crescimento somático dos peixes são atribuídas principalmente a mudanças na musculatura branca, devido às variações na hipertrofia muscular e / ou hiperplasia (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001). O crescimento muscular em peixes depende da proliferação e diferenciação de células miogênicas precursoras (células satélites ou quiescentes) (JOHNSTON, 1999; JOHNSTON et al., 2000; ROWLERSON; VEGGETTI, 2001). Quando ativados, proliferam, diferenciam-se, e seus núcleos são internalizados por fibras existentes, aumentando a síntese de miofibrilas, que caracterizam o crescimento muscular hipertrófico (JOHNSTON, 1999). Na hiperplasia, os mioblastos proliferativos agregam-se à superfície da fibra madura, gerando novos miotubos, que, separando-se, dão origem a novas fibras musculares (JOHNSTON, 1999; DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007).

A hiperplasia é dividida em hiperplasia estratificada e em mosaico. A hiperplasia estratificada ocorre entre os compartimentos vermelho e branco. É responsável pelo espessamento das camadas musculares a partir de zonas germinais de proliferação celular nas regiões dorsal e ventral dos miômeros nas fases iniciais do desenvolvimento de peixes teleósteos (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001). A hiperplasia em mosaico é melhor observada na musculatura branca e é caracterizada pela ocorrência de fibras pequenas (25 μm) entre fibras maiores, formando um mosaico de fibras de diferentes tamanhos e estágios de diferenciação (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001; JOHNSTON, 2006); ela ocorre principalmente na fase juvenil dos peixes.

Células do tecido muscular são plásticas e adaptáveis (SÄNGER, 1993) e fatores como mudanças no plano de nutrição, como fonte de lipídios (FAUCONNEAU et al., 1997), substituição de fontes proteicas (ALAMI-DURANTE et al., 2010), alterações no nível proteico das dietas (JOHNSTON et al., 2002; BJORNEVIK et al., 2003; SILVA et al., 2009), temperatura (ASSIS et al., 2004; LÓPEZ-ALBORS et al., 2008; PAULA et al., 2014), fotoperíodo (JOHNSTON et al., 2003) e idade (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001; CARANI et al., 2008) podem

interferir nos processos de hiperplasia e hipertrofia. Nesse âmbito, a avaliação histológica do crescimento muscular poderá complementar as investigações de exigências nutricionais.

Os mecanismos de crescimento muscular por hipertrofia e hiperplasia tem sido estudado para várias espécies de peixes, como para larvas e juvenis de pacu *P. mesopotamicus* (ALMEIDA et al., 2008; LEITÃO et al. 2011; PAULA et al., 2014), juvenis de pirarucu *Arapaima gigas* (CARANI et al., 2008); juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* (NEBO et al., 2013), de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (ALAMI-DURANTE et al., 2010), sendo poucas informações para juvenis de tambaqui (ALVES-COSTA et al., 2013a; ALVES-COSTA et al., 2013b). Assim, esses resultados poderão também contribuir para o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos no crescimento do músculo esquelético dos juvenis de tambaqui.

6 – Utilização de isótopos estáveis ambientais

Metabolicamente, o crescimento muscular reflete a incorporação dos nutrientes da dieta, especificamente dos bioelementos, como os átomos de carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio e enxofre, que são os responsáveis por mais de 90% de todos os tecidos vivos. A incorporação dos átomos das dietas nos tecidos animais pode ser mensurada pela técnica dos isótopos estáveis, uma vez que o *turnover* destes elementos químicos nos tecidos vivos está associado ao crescimento dos animais (DUCATTI, 2007a). O termo isótopo vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato de que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. A expressão *estáveis* significa que não emitem radiação. Os isótopos são átomos do mesmo elemento químico (mesmo número de prótons), mas que diferem em número de nêutrons, apresentando diferentes massas (DAWSON; BROOKS, 2001).

Os isótopos estáveis mais utilizados em estudos biológicos são os de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$). Os resultados baseiam-se na determinação da proporção $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, respectivamente (MANETTA; BENEDITO-CECILIO, 2003). A razão isotópica é mensurada através de espectrômetro de massa, que mede a razão entre o isótopo pesado e o leve de uma amostra, em comparação a um padrão

internacional, *PeeDee Belemnite* (PDB) para os isótopos de Carbono-13 e o padrão internacional aceito para o nitrogênio é o do ar atmosférico (DUCATTI, 2007a).

Plantas do ciclo fotossintético C_4 são mais ricas em carbono-13 que plantas do ciclo fotossintético C_3 , com uma diferença média de 14‰, devido ao fracionamento que ocorre durante a fixação fotossintética do carbono, e este processo ocorre por ciclos diferentes, *Calvin-Benson* e *Hatch-Slack*, para C_3 e C_4 , respectivamente (DUCATTI, 2007b; PEREIRA; BENEDITO, 2007). Essa variação isotópica oferece a possibilidade de utilizar as plantas e seus subprodutos como marcadores naturais em animais, sem a necessidade de sintetizar compostos especificamente marcados como os isótopos radioativos, que possuem controle de uso e restrição de segurança, além da possibilidade de danos à saúde (DUCATTI, 2007a). A via fotossintética C_3 inclui arroz, leguminosas, trigo, cevada, hortaliças, beterraba, mandioca, algodão, alfafa, soja, feijão, frutíferas em geral, gramíneas temperadas, entre outros, e a via C_4 é encontrada no milho, sorgo, cana-de-açúcar e outras gramíneas tropicais (DUCATTI et al., 2011).

Por outro lado, o fracionamento isotópico do nitrogênio das plantas assemelha-se ao de sua fonte de nitrogênio. Primeiro, porque as plantas não fracionam o nitrogênio quando absorvem nitrato, e segundo, porque as plantas reutilizam seu nitrogênio com produtos em um grau maior que os animais. Assim, as vias biossintéticas em plantas que não fracionam o nitrogênio dependem de uma variação na composição das fontes de nitrogênio, que induz as plantas a terem sinais isotópicos distintos (GANNES; MARTÍNEZ DEL RIO; KOCH, 1998; PEREIRA; BENEDITO, 2007). Adicionalmente, também ocorrem distinções entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de fontes alimentares de origem animal e vegetal, possibilitando a formulação de dietas com diferentes assinaturas isotópicas de ^{15}N . O uso dos isótopos estáveis como marcadores baseia-se nas observações de que o tecido animal reflete praticamente a composição isotópica da dieta, devido ao pequeno fracionamento associado aos processos de respiração e de incorporação destes elementos pelo animal (DENIRO; EPSTEIN, 1978); o valor de fracionamento caracteriza a diferença entre o tecido animal e o sinal “puro” da dieta.

A aplicação sistemática dos isótopos estáveis em estudos de alimentação e nutrição de peixes é ainda recente. A técnica é uma ferramenta com potencial para

aprimorar os conhecimentos dos processos metabólicos na nutrição de peixes (ZUANON et al., 2006), contribuindo para o avanço das pesquisas nesta área. Contudo, ressalta-se que a técnica possui as próprias restrições (GU et al., 1994), como a premissa metodológica de diferenças isotópicas entre tecido animal inicial e a nova dieta. Apesar de ser uma técnica que reflete a composição de carbono e nitrogênio oriundo dos nutrientes da dieta, ela exige mais tempo para obtenção dos resultados, necessidade de homogeneização refinada das amostras e custo analítico maior. Ainda assim, esta é uma técnica que permite verificar com precisão os diferentes momentos que os peixes começam a utilizar os nutrientes da dieta através de retenção dos átomos de carbono e nitrogênio em seus tecidos (JOMORI et al., 2008).

Dietas com assinaturas isotópicas distintas podem ser usadas para medir taxas de *turnover* em todos os tecidos do animal (CALDARA et al., 2007). Isotopicamente, o *turnover* consiste na síntese do novo tecido corporal e na degradação do velho. A taxa de *turnover* está associada ao crescimento, refletindo a composição isotópica da dieta nos tecidos animais. Grande parte dos estudos envolvendo *turnover* de compostos celulares concentra-se em proteínas; em peixes, a taxa de troca proteica tem sido avaliada em alguns estudos (LAN GAR; GUILLAUME, 1994; DE LA HIGUERA et al., 1999; PERAGÓN et al., 2001; ZUANON et al., 2006; JOMORI et al., 2011). O tecido muscular apresenta pronunciadas mudanças na taxa de síntese e degradação proteica em resposta à qualidade da proteína (DE LA HIGUERA et al., 1999). O nível não adequado de proteína, associado ao baixo valor biológico, afeta o crescimento animal, causando prejuízos financeiros e maiores impactos ambientais pela sobrecarga de excretas do animal.

7 – Objetivos

7.1. *Objetivo geral*

O objetivo do trabalho foi avaliar a absorção de nutrientes e energia dos principais alimentos proteicos e energéticos usados em dietas comerciais para a produção de juvenis de tambaquis. Com estes resultados, determinar a exigência em proteína digestível para juvenis de tambaqui, em ensaios de desempenho produtivo, da celularidade das fibras musculares e do *turnover* isotópico dos nutrientes no tecido muscular.

7.2. *Objetivos específicos*

- Determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína, do extrato etéreo e da energia de nove alimentos proteicos e de sete alimentos energéticos para tambaqui;
- Determinar a exigência de proteína digestível em juvenis de tambaqui com base nos dados de desempenho produtivo, composição corporal e eficiência nutricional;
- Avaliar o crescimento muscular por hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares em juvenis alimentados com dietas contendo diferentes níveis proteicos;
- Estudar o *turnover* isotópico do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e do nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) no tecido muscular de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes níveis proteicos;
- Comparar a participação percentual das dietas (pelo carbono e nitrogênio) no tecido muscular, de acordo com o crescimento dos animais e em resposta às exigências nutricionais.

8- Referências

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, p. 1101- 1109, 2004.

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**, Oxford, v. 13, p. 1-9, 2007.

ABIMORAD, E. G.; FAVERO, G. C.; CASTELLANI, D.; GARCIA, F. ; CARNEIRO, D. J. Dietary supplementation of lysine and/or methionine on performance, nitrogen retention and excretion in pacu *Piaractus mesopotamicus* reared in cages. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 295, p. 266-270, 2009.

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.

ALEXANDER, R. The orientation of muscle in the myomeres of fishes. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, v. 49, p. 263-290, 1969.

ALMEIDA, F. L.; CARVALHO, R. F.; PINHAL, D.; PADOVANI, C. R.; MARTINS, C.; DAL PAI SILVA, M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Mícron**, New York, v. 39, p. 1306-1311, 2008.

ALVES-COSTA, F. A.; BARBOSA, C. M.; AGUIAR, R. C. M.; MARECO, E. A.; DAL-PAI-SILVA, M. Differential Expression of Myogenic Regulatory Factor Genes in the Skeletal Muscles of Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818) from Amazonian Black and Clear Water. **International Journal of Genomics**, p. 1-9, 2013a.

ALVES-COSTA, F. A.; BARBOSA, C. M.; AGUIAR, R. C. M.; MARECO, E. A.; DAL-PAI-SILVA, M. Morphometry and expression of MyoD and Myogenin in white and red skeletal muscles of juvenile fish *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818). **Acta Zoologica**, Stockholm, v. 0: p. 1–8, 2013b.

ANDERSON, J. S.; LALL, S. P.; ANDERSON, D. M.; CHANDRASOMA, J. Apparent and true availability of amino acids from common feed ingredients for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in sea water. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 108, p. 111-114, 1992.

ARBELÁEZ-ROJAS, G. A.; FRACALOSI, D. M.; FIM, J. D. I. Composição Corporal de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, e Matrinxã, *Brycon cephalus*, em Sistemas de Cultivo Intensivo, em Igarapé, e Semi-Intensivo, em Viveiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 1059-1069, 2004.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R.; GOMES, L. C. Tambaqui. In: BALDISSEROTO, B; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Ed. Santa Maria: da UFSM, 2005. cap. 8, p.175-202.

ASSIS, J. M. F.; 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**, Amsterdam, v. 237, p. 251–267, 2004.

AUSTRENG, E. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of gastrointestinal tract. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 13, p. 265-272, 1978.

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.

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

BOMFIM, M. A. D.; LANNA, E. A. T. Fatores que afetam os coeficientes de digestibilidade nos alimentos para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, v. 1, n. 1, p. 20-30, 2004.

BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K.; CYRINO, J. E. P. Apparent digestibility coefficient of selected feed ingredients for dourado *Salminus brasiliensis*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, p. 453-458, 2009.

BREMER NETO, H.; GRANER, C. A. F.; PEZZATO, L. E.; PADOVANI, C. R.; CANTELMO, O. A. Diminuição do teor de óxido de cromo (III) usado como marcador externo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 249-255, 2003.

BUZOLLO, H. **Processamentos e níveis proteicos das dietas nos desempenhos técnico e econômico da produção de tilápia do Nilo em gaiolas**. 2011. 95f. Dissertação - (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A.; DENADAI, J. C.; ANDRADE, G. A.; GIOSO, M. M. Glutamina e turnover do carbono no tecido adiposo de leitões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1601-1607, 2007.

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.

CARNEIRO, D. J. Digestibilidade protéica em dietas isocalóricas para o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, Pisces). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE AQUICULTURA, 2; ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTORES, 2, 1980, Jaboticabal. **Anais...** Brasília: SUDEPE, 1981. p. 78-80.

CHO, C. Y.; BUREAU, D. P. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, suppl. 1, p. 349-360, 2001.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R., DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, supl. esp., p. 68-87, 2010.

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

DAWSON, T. E.; BROOKS, P. D. Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. In: Unkovich M. et al. (Ed.). **Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001. cap. I, p. 1-18.

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

DE ALMEIDA, L. C.; LUNDSTEDT, L. M.; MORAES, G. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 17, p. 253-262, 2011.

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

DENIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, United States, v. 42, p. 495-506, 1978.

DUCATTI, C. Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, supl. esp., p. 1-10, 2007a.

DUCATTI, C. Isótopos estáveis ambientais (Apostila). Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2007b, p. 205.

DUCATTI, C.; MARTINS, C. L.; ARRIGONI, M. B.; MARTINS, M. B.; JÚNIOR, L. C. V.; DENADAI, J. C. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, supl. esp., p. 68-75, 2011.

FAUCONNEAU, B.; ANDRE, S.; CHMAITILLY, J.; LE BAIL, P. Y.; FRIEG, F.; KAUSHIK, S. J. Control of skeletal muscle fibres and adipose cell size in the flesh of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 50, p. 296–314, 1997.

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.; CYRINO, J. E. P. (Ed). **Nutriaqua**: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura Aquática, 2013. p. 37-64.

GANNES, L. Z.; MARTINEZ DEL RIO, C.; KOCH, P. Natural abundance variation in stable isotopes and their uses in animal physiological ecology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 119A, p. 725–737, 1998.

GOMES, L. C., BRANDÃO, F. R., CHAGAS, E. C., FERREIRA, M. F. B., LOURENÇO, J. N. P. Efeito do volume do tanque-rede na produtividade de tambaqui (*Colossoma macropomum*) durante a recria. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, p. 111–113, 2004.

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**, Amsterdam, v. 253, p. 374–384, 2006.

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

GONÇALVES, E. G.; CARNEIRO, D. J. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia de alguns ingredientes utilizados em dietas para o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 779 –786, 2003.

GRAEF, E. W. As espécies de peixes com potencial para criação no Amazonas. In: VAL, A.L.; HONCZARYK, A. (Ed.). **Criando peixes na Amazônia**. Manaus: INPA, 1995. p. 29-43.

GU, B.; SCHELL, D. M.; ALEXANDER, V. Stable Carbon and nitrogen Isotopic Analysis of the Plankton Food Web in a Subarctic Lake. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Otfawa, v. 51, p. 1338-1344, 1994.

GUIMARÃES, I. G.; MIRANDA, E. C.; ARAÚJO, J. G. Coefficients of total tract apparent digestibility of some feedstuffs for Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.188, p. 150–155, 2014.

HONDA, E. M. S. Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas – II: alimentação de tambaqui, *Colossoma bidens* (Spix). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 4, p. 47-53, 1974.

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

JOHNSTON, I. A.; MCLAY, H. A.; ABERCROMBY, M.; ROBINS, D. Early thermal experience has different effects on growth and muscle fibre recruitment in spring- and autumn-running Atlantic salmon populations. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 203, p. 2553–2564, 2000.

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**, Cambridge, v. 209, p. 2249-2264, 2006.

JOMORI, R. K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M.C. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, p. 370-381, 2008.

JOMORI, R. K.; DUCATTI, C.; ABIMORAD, E.D.; ASSANO, M. Relative contribution of formulated diet by carbon isotopic *turnover* in muscle of the fish juveniles. In. **WORLD AQUACULTURE**, 2011, **Abstracts**; p. 574.

KILARSKI, W. Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach *Rutilus rutilus* (L.). **Journal of Fish Biology**, London, v. 36, p. 353-362, 1990.

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

LANGAR, H.; GUILLAUME, J. Effect of feeding pattern and dietary protein source on protein synthesis in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 108A, p. 461-466, 1994.

LEITÃO, N. J.; DAL PAI-SILVA, M.; ALMEIDA, F. L. A.; PORTELLA, M. C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, 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.

LOVELL, R. T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1998. 260p.

MACEDO, E. M. **Níveis de proteína bruta em dietas para o crescimento do tambaqui, *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818 (Pisces Characidae)**. 1979. 71f. Dissertação – (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1979.

MANETTA, G. I.; BENEDITO-CECILIO, E. Aplicação da técnica de isótopos estáveis na estimativa da taxa de *turnover* em estudos ecológicos: uma síntese. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 121-129, 2003.

McGOOGAN, B. B.; REIGH, R. C. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 141, p. 233-244, 1996.

MELO, L .A. S.; IZEL, A. C. U.; RODRIGUES, F. M. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila e barragens no Estado do Amazonas. **Boletim Técnico Embrapa Amazônia Ocidental**, Manaus, 2001.

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**, Amsterdam, v. 66, p. 223-233, 1987.

MPA, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília. 2013. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL4.doc>. Acesso em: 27 abr. 2014.

MUÑOZ-RAMÍREZ, A. P.; CARNEIRO, D. J. Lysine and methionine supplementation in diets with low protein level for the initial growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 909-916, 2002.

NRC - National Research Council. **Fish and Shrimp**. Washington: National Academy Press, 2011. 376p.

NEBO, C.; PORTELLA, M. C.; CARANI, F. R.; 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, Part B**, Oxford, v. 164, p. 268–274, 2013.

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**, Manaus, v. 40, n. 4, p. 757 – 762, 2010.

OLIVEIRA FILHO, P. R. C.; FRACALOSSO, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, supl. 4, p.1581-1587, 2006.

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**, Oxford, v. 14, p. 10–13, 2008.

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.

PERAGON, J.; BARROSO, J. B.; GARCIA-SALGUERO, L.; HIGUERA, M.; LUPIÁÑEZ, J.A. Growth, protein-*turnover* and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development. **The International of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 1227-1238, 2001.

PEREIRA, A. L.; BENEDITO, E. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas. **Revista Biociência**, Taubaté, v. 13, n. 1-2, p. 16-27, 2007.

PEZZATO, L. E.; MIRANADA, E. C.; BARROS, M. M.; PINTO, L. G. Q.; FURUYA, W. M.; PEZZATTO, A. C. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 4, p.1595- 1604, 2002.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Aquabio, 2004. p. 75-172.

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

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: JOHNSTON, I.A. (Ed.). **Muscle development and growth, fish physiology**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 103–140 (Series, 18).

SÄNGER, A. M. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 33, p. 97-104, 1992.

SÄNGER, A. M. Limits to the acclimation of fish muscle. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 3, p. 1-15, 1993.

SÄNGER, A. M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: JOHNSTON, I.A. (Ed.). **Muscle development and growth, fish physiology**, San Diego: Academic Press, 2001. p. 187–237 (Series, 18).

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

SILVA, J. A. M.; FILHO, M. P.; 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**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1815-1824, 2003.

SILVA, C. R.; GOMES, L. C.; BRANDÃO, F. R. Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 264, p. 135–139, 2007a.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; CAVERO, B. A. S.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colosssoma macropomum* Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 37, n. 1, p. 157 – 164, 2007b.

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**, Dordrecht, v. 30, p. 29-39, 2009.

SMITH, L. S. Digestion in teleost fishes. In: FAO/UNDP. **Training course in fish feed technology**. Washington, 1980. v. 11, p. 3-17.

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**, Oxford, v. 26, p. 901-909, 1995.

VIDAL JÚNIOR, M. V.; DONZELE, J. L.; ANDRADE, D. C.; 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**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 2193-2200, 2004.

WEBSTER, C. D.; LIM, C. Introduction to Fish Nutrition. In: _____. (Ed.). **Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture**. Wallingford: CAB Publishing, 2002. p. 1-27.

WILSON, R. P. Amino Acids and Proteins. In: HALVER, J.E; HARDY, R.W. **Fish nutrition**. 3rd ed., San Diego: Academic Press, 2002. p. 144-179.

ZANIBONI FILHO, E., MEURER, S. Limitações e potencialidades do cultivo de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) na região subtropical brasileira. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, supl. esp. 24, p. 169-172, 1997.

ZHOU, Q. C.; TAN, B. P.; MAI, K. S.; LIU, Y. J. Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 241, n. 1-4, p. 441-451, 2004.

ZUANON, J. A. S.; PEZZATO, A. C.; PEZZATO, L. E.; PASSOS, J. R. S; BARROS, M. M.; DUCATTI, C. Muscle $\delta^{13}\text{C}$ change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects of growth and carbon turnover. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, n. 145, p. 101–107, 2006.

**CAPÍTULO 2 - COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE DA
PROTEÍNA, EXTRATO ETÉREO E ENERGIA DE ALIMENTOS
PARA O TAMBAQUI *Colossoma macropomum***

Hellen Buzollo

UNESP – Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

E-mail: hellen_buzollo@yahoo.com.br

Normas para submissão ao periódico “Aquaculture Nutrition”

Resumo

O objetivo deste trabalho foi determinar os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDA_{PB}), do extrato etéreo (CDA_{EE}) e da energia (CDA_{EB}) de alimentos proteicos e energéticos usados em dietas para tambaqui. Foram utilizados 480 juvenis ($70,0 \pm 8,58$ g) distribuídos em 32 tanques (450 L). Foram formuladas dezesseis dietas-teste, constituídas em 69,5% por uma dieta de referência, acrescidas de 30% do alimento testado, com exceção do glúten de trigo e os óleos que foram incluídos em 10% e 0,5% de óxido de cromo-III (Cr_2O_3) como marcador inerte. A coleta das fezes foi baseada no sistema de Guelph modificado. Os valores de CDA_{PB} da maioria dos alimentos proteicos apresentaram-se altos, tendo o glúten de milho a maior digestibilidade proteica (96,56%) e a levedura, de menor digestibilidade (58,14%). Para a fração do extrato etéreo, os alimentos proteicos confirmaram-se como excelentes fontes, com exceção do glúten de trigo (61,57%). Os CDA_{EB} dos alimentos proteicos apresentaram altos valores para o glúten de milho (83,54%) e farinha de vísceras de aves (83,58%), e baixos valores para o farelo de algodão (51,51%) e levedura (43,16%). Em relação aos alimentos energéticos, pode-se verificar que as melhores médias de CDA_{PB} foram apresentadas pelo milho (90,76%) e pelo farelo de trigo (87,77%). Os valores de CDA_{EB} apresentaram-se maiores para o sorgo (93,55%) e as fontes de óleo testadas: milho, soja e peixe (96,21%, 95,67% e 96,29%, respectivamente). Todos os alimentos energéticos confirmaram-se como excelentes fontes de lipídios em dietas para o tambaqui.

Palavras-chave: alimentos, *Colossoma macropomum*, digestibilidade, energéticos, proteicos

1. Introdução

A alimentação compreende o maior custo na produção de peixes e o suprimento preciso dos nutrientes aumenta a eficiência da produção. Nesse sentido, o primeiro passo é conhecer os coeficientes de digestibilidade aparente dos alimentos. A determinação da digestibilidade quantifica a fração do nutriente não excretada nas fezes, de forma que possa ser utilizada no metabolismo pelo animal (NRC 2011), refletindo positivamente nos índices produtivos, diminuindo a excreção de nutrientes no ambiente de criação (Oliveira Filho & Fracalossi 2006), colaborando assim para uma produção sustentável da atividade.

Vários fatores influenciam nos valores de coeficientes de digestibilidade dos alimentos em peixes: a metodologia utilizada para a coleta de fezes, a espécie, a idade, a composição do alimento, a temperatura da água e o tipo de processamento do alimento (Bomfim & Lanna 2004).

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é encontrado na parte tropical da América do Sul e na Amazônia Central. É uma espécie de importância econômica, praticamente disseminada em todo o Brasil, devido ao domínio na produção de juvenis, rápido crescimento e excelente sabor da carne. É onívoro, tendendo a frugívoro e pode utilizar diferentes fontes proteicas e energéticas com eficiência numa ampla faixa de combinações entre elas (Oliveira *et al.* 2013). Alguns estudos de digestibilidade foram realizados para a espécie, porém abordam o uso de alimentos alternativos regionais (Carneiro 1981; Silva *et al.* 2003; Vidal *et al.* 2004; Silva *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2008; Guimaraes *et al.* 2014).

Apesar da importância comercial do tambaqui, ainda são escassos os estudos de digestibilidade de nutrientes para a espécie, principalmente os alimentos mais utilizados em dietas comerciais, impossibilitando o avanço na formulação de dietas expressas na base digestível, que é a fração do alimento aproveitada. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi determinar os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína, do extrato etéreo e da energia de nove alimentos proteicos e de sete alimentos energéticos para o tambaqui.

2. Material e métodos

O ensaio experimental foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP).

2.1. Material biológico e instalações

Foram utilizados 480 juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) procedentes da piscicultura Agroindustrial Tambaqui Ltda, localizada em Manaus – AM, com peso médio inicial de $70 \pm 8,58$ g. Os animais foram distribuídos em 32 tanques experimentais contendo 450 L, aeração e abastecimento contínuos, por água proveniente de poço artesiano, com taxa de renovação de aproximadamente 3,5 vezes ao dia, na densidade de 15 peixes por tanque. Durante o ensaio, foram monitoradas as seguintes variáveis físico-químicas da água: pH (PHTEK – pH100): $7,85 \pm 0,17$, temperatura: $29,72 \pm 0,34$ °C, oxigênio dissolvido (YSI- *Yellow Springs Instruments* 550A): $5,71 \pm 0,34$ mg L⁻¹, condutividade elétrica (PHTEK – CD203): $150,75 \pm 17,62$ µS cm⁻¹, amônia total: $189,17 \pm 59,29$ µg L⁻¹ (Koroleff 1976); nitrato: $419,96 \pm 100,28$ µg L⁻¹ (Golterman *et al.* 1978); nitrito: $28,68 \pm 39,09$ µg L⁻¹ (Golterman *et al.* 1978) e fósforo total: $200,89 \pm 61,00$ µg L⁻¹ (Mackereth *et al.* 1978). Os valores apresentados foram considerados dentro dos valores aceitáveis para a espécie (Araide *et al.* 2004; Araujo-Lima & Gomes 2005). A cada dois dias foram realizadas as sifonagens do fundo dos tanques para a retirada dos resíduos de alimento e fezes, e a lavagem das pedras porosas.

2.2. Dietas experimentais

Para determinar a digestibilidade de cada alimento foi elaborada uma dieta de referência com 23,7% de proteína bruta e 3898 cal g⁻¹ de energia bruta (Tabela 1). Foram avaliados 16 alimentos, divididos em dois grupos: **a) energéticos**: milho, sorgo, quirera de arroz, farelo de trigo, óleo de peixe, óleo de milho e óleo de soja; **b) proteicos**: farelo de soja, glúten de trigo, glúten de milho, levedura de álcool (spray-dried), farelo de algodão, farinha de salmão, farinha de resíduos de filetagem de tilápia, farinha de vísceras de aves e farinha de penas. Com estes alimentos moídos e analisados (Tabela 2), foram formuladas 16 dietas-teste constituídas em

69,5% por uma dieta de referência, 0,5% de óxido de crômio-III (Cr_2O_3) como marcador inerte, acrescidas de 30% do alimento testado, com exceção dos óleos e glúten de trigo que foram incluídos em 10%. Adotamos a inclusão de 10% para o glúten de trigo devido a suas propriedades coesão e visco-elástica que proporcionam ligações necessárias para o pelete, mas que podem resultar em um pelete com textura de borracha e muito duro (Day *et al.* 2006).

Para confecção das dietas, os ingredientes foram moídos, misturados manualmente, umedecidos e processados em extrusora Extec, modelo Ex Micro, com matriz de 5mm. Os grânulos foram desidratados em estufa de ventilação forçada a 55°C, por 24 horas.

Tabela 1 - Composição percentual e químico-bromatológica da dieta referência (valores com base na matéria natural)

Ingredientes	%
Farinha de Peixe (resíduos filetagem tilápia)	20,20
Farelo de Soja	8,89
Milho	33,51
Farelo de Trigo	22,00
Quirera de Arroz	14,00
Fosfato Bicálcico	0,80
Calcário Calcítico	0,10
Suplemento mineral e vitamínico ⁽¹⁾	0,50
<i>Composição analisada (%) ⁽²⁾:</i>	
Matéria seca	88,54
Proteína bruta	23,70
Extrato etéreo	6,01
Fibra Bruta	7,46
Matéria mineral	8,14
Extrato Não Nitrogenado ⁽³⁾	43,23
Energia bruta (cal g ⁻¹)	3898,50
Cálcio	1,49
Fósforo	0,75

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

⁽²⁾ Composição calculada a partir da composição analisada dos ingredientes

⁽³⁾ ENN = MS – (PB + EE + MM + FB)

Tabela 2 - Composição químico-bromatológica dos alimentos utilizados nas dietas experimentais (valores com base na matéria natural).

Alimentos	MS ⁽¹⁾	PB ⁽²⁾	EE ⁽³⁾	MM ⁽⁴⁾	EB ⁽⁵⁾
	(%)	(%)	(%)	(%)	cal ⁻⁹
Fontes energéticas:					
Quirera de Arroz	88,72	8,19	1,53	0,80	3754,49
Farelo de Trigo	90,07	16,59	3,96	5,08	3888,89
Milho	88,16	8,16	3,61	1,24	3868,84
Sorgo	89,14	9,24	3,96	1,29	3934,18
Óleo de milho	100,00	-	100,00	-	9417,00
Óleo de soja	100,00	-	100,00	-	9379,00
Óleo de peixe	100,00	-	100,00	-	9319,00
Fontes proteicas:					
Farelo de soja	89,62	47,44	2,88	6,56	4174,15
Farelo de algodão	91,37	44,61	1,82	5,71	4047,83
Glúten de milho	91,91	63,20	4,82	2,10	3652,53
Glúten de trigo	90,07	80,55	4,22	0,57	5111,61
Levedura de álcool (spray dried)	95,23	36,27	2,21	7,27	4317,00
Farinha de salmão	91,91	66,35	8,34	15,00	4391,49
Farinha de resíduos de filetagem tilápia	98,03	60,24	10,48	25,20	4269,04
Farinha de vísceras de aves	96,87	65,82	14,21	16,39	5001,51
Farinhas de penas	94,92	76,24	12,82	3,30	5647,56

⁽¹⁾MS= matéria seca; ⁽²⁾PB = proteína bruta; ⁽³⁾EE = extrato etéreo; ⁽⁴⁾MM = matéria mineral; ⁽⁵⁾EB = energia bruta

2.3. Coleta de fezes

Foram utilizados 16 coletores de fibra de vidro, com aproximadamente 80 litros de água, construídos segundo o sistema de Ghelph modificado, descrito por Goncalves & Carneiro (2003), com sistema de circulação contínua de água.

Após um período de adaptação em que os peixes receberam somente a dieta de referência por sete dias, foi realizada uma coleta inicial de fezes com todos os peixes. Em seguida, foi iniciado o arraçoamento com as dietas-teste. Os peixes

foram divididos em dois grupos (16 tanques/grupo). O grupo 1 recebeu as 16 dietas-teste por sete dias. Posteriormente, os peixes foram transferidos para os 16 coletores, compondo a repetição 1 de cada alimento. O mesmo procedimento foi realizado com o grupo 2. Terminadas as coletas dos grupos 1 e 2, as dietas-teste foram sorteadas novamente dentro de cada grupo para a sua nova distribuição e composição das repetições 3 e 4.

As dietas-teste foram fornecidas até a saciedade aparente, duas vezes ao dia (8h30min e 17h30min), durante sete dias. No sétimo dia, os animais foram alimentados três vezes durante o dia (8h30min, 14h e 17h30min). Às 18h00min, os 15 peixes de cada réplica foram transferidos para os tanques coletores, onde as fezes foram coletadas em intervalos de três horas durante a noite, facilitando o manejo e causando menos estresse aos animais. Durante as três horas em que as fezes ficaram nos coletores, os tubos cônicos tipo Falcon utilizados foram protegidos por caixas térmicas com gelo, com a finalidade de reduzir a degradação das fezes. Após coletadas, as fezes foram armazenadas em temperatura a -15°C , até que fosse atingida a quantidade suficiente para determinação das análises laboratoriais. Terminada a fase de coleta, as amostras foram liofilizadas (Thermo Electron Corporation Fisher®) e analisadas.

2.4. Análises laboratoriais

As concentrações de óxido de cromo-III das fezes e das rações foram determinadas por digestão nitro-perclórica, com leitura em espectrofotômetro de acordo com a metodologia descrita por Furukawa & Tsukahara (1966). O extrato etéreo foi determinado pelo método de hidrólise ácida (AOAC 1990) no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP). As análises de proteína bruta foram determinadas usando LECO FP 528 Nitrogen Analyzer (LECO Instruments, St Joseph, Michigan, USA), e as análises de energia bruta foram realizadas em bomba calorimétrica (IKA C2000 basic); ambas análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV). Para a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA), tanto da dieta referência quanto das dietas-teste, foi utilizada a metodologia descrita por Nose (1960), por meio da seguinte equação:

$$CDA=100- \left[100 \left(\frac{\% \text{ de marcador na dieta}}{\% \text{ de marcador nas fezes}} \times \frac{\% \text{ de nutriente nas fezes}}{\% \text{ de nutriente na dieta}} \right) \right]$$

Os coeficientes de digestibilidade dos alimentos (milho, quirera de arroz, farelo de trigo, farelo de soja e farinha de resíduos de filetagem de tilápia) que também estavam presentes na dieta referência foram calculados de acordo com a fórmula sugerida por Forster (1999), que considera as proporções de cada nutriente oriundo do ingrediente estudado e da dieta referência:

$$CDA_{\text{ingrediente}} = \frac{[(a+b) \times CDA_{\text{dieta-teste}} - (a) \times CDA_{\text{dieta referência}}]}{b}$$

Onde: a = proporção de proteína, extrato etéreo ou energia oriunda do ingrediente na dieta referência, multiplicado por 70%; b = proporção de proteína, extrato etéreo ou energia do ingrediente, multiplicado 30%. Para os óleos e glúten de trigo: a = multiplicado por 90% e b = multiplicado por 10%.

Para o cálculo da digestibilidade da proteína, do extrato etéreo e da energia dos demais alimentos estudados, foi utilizada a seguinte equação, de acordo com Reigh *et al.* (1990):

$$CDA_{\text{ingrediente}} (\%) = (100/30) \times [\text{teste} - (70/100 \times \text{referência})]$$

em que: CDA = digestibilidade aparente da proteína, do extrato etéreo ou da energia do alimento; Teste = digestibilidade aparente da proteína, do extrato etéreo ou da energia presente na dieta-teste; Referência = digestibilidade aparente da proteína, do extrato etéreo ou da energia presente na dieta-referência.

2.5. Delineamento experimental e análises estatísticas

Os coeficientes de digestibilidade dos alimentos foram analisados separadamente de acordo com a sua função: energética ou proteica. Para os alimentos proteicos o delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com nove tratamentos constituídos pelos alimentos testados e quatro repetições; para os alimentos energéticos o delineamento experimental adotado foi

inteiramente casualizado com sete tratamentos constituídos pelos alimentos testados e quatro repetições. Os dados foram avaliados pela análise de variâncias paramétrica (ANOVA) e testados quanto à normalidade dos erros e homocedasticidade das variâncias. Quando detectadas diferenças significativas nas variáveis analisadas, as comparações das médias foram estudadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SAS 9.1 (SAS Inst. Inc., Cary, North Carolina, USA).

3. Resultados

3.1. Alimentos proteicos

O glúten de milho apresentou maior coeficiente de digestibilidade aparente para a proteína bruta (CDA_{PB}), enquanto a fonte proteica de menor digestibilidade foi a levedura de álcool (Tabela 3). O farelo de soja e o glúten de trigo, também apresentaram altos valores de CDA_{PB} , não diferindo estatisticamente ($P>0,05$) do glúten de milho.

Os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDA_{PB}) da farinha de salmão, da farinha de vísceras, farinha de resíduo de filetagem de tilápia e da farinha de penas não diferiram estatisticamente ($P>0,05$) entre si. O farelo de algodão apresentou valor intermediário de CDA_{PB} entre os alimentos avaliados.

Quanto à fração extrato etéreo, os ingredientes proteicos apresentaram coeficientes de digestibilidade aparente (CDA_{EE}) altos, com destaque para a farinha de penas e farinha de vísceras de aves. O glúten de trigo foi exceção apresentando menor coeficiente de digestibilidade.

Considerando a digestibilidade da fração energética, o glúten de milho e a farinha de vísceras de aves foram os mais digestíveis entre os alimentos avaliados, e estes não diferiram ($P>0,05$) do farelo de soja e da farinha de salmão. De um modo geral, os alimentos proteicos apresentaram bons coeficientes de digestibilidade para energia, com exceção do farelo de algodão e da levedura que foram menos digestíveis.

Tabela 3 - Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (CD_{PB}), do extrato etéreo (CD_{EE}) e da energia bruta (CD_{EB}) dos alimentos proteicos avaliados para o tambaqui

Alimentos	Proteína		Extrato Etéreo		Energia	
	CD_{PR} %	PD %	CD_{FF} %	EED %	CD_{FR} %	ED %
Farelo de soja	92,18 ± 0,78 ^{ab}	43,73	89,20 ± 2,54 ^{ab}	2,57	81,38 ± 0,93 ^{ab}	3396,92
Farelo de algodão	77,91 ± 2,65 ^d	34,75	88,60 ± 5,84 ^{ab}	1,61	51,51 ± 3,92 ^e	2085,04
Farinha de salmão	87,70 ± 1,86 ^{bc}	58,19	92,01 ± 7,01 ^{ab}	7,67	80,75 ± 1,25 ^{ab}	3546,13
Farinha de resíduos de filetagem de tilápia	82,92 ± 1,31 ^{cd}	49,95	87,05 ± 0,51 ^{ab}	9,12	68,61 ± 0,50 ^{cd}	2928,99
Farinha de vísceras de aves (hidrolisada)	85,84 ± 1,47 ^c	56,50	95,16 ± 0,38 ^a	13,52	83,58 ± 2,22 ^a	4180,26
Farinhas de penas	82,64 ± 1,16 ^{cd}	63,00	95,58 ± 1,39 ^a	12,25	75,62 ± 5,44 ^{bc}	4270,68
Glúten de milho	96,56 ± 1,69 ^a	61,02	81,80 ± 6,43 ^b	3,94	83,54 ± 3,84 ^a	3051,32
Glúten de trigo	93,31 ± 1,48 ^{ab}	75,16	61,57 ± 1,98 ^c	2,60	62,33 ± 0,85 ^d	3186,07
Levedura de álcool (<i>spray dried</i>)	58,14 ± 3,43 ^e	21,09	90,48 ± 3,12 ^{ab}	2,00	43,16 ± 2,44 ^f	1863,22
<i>Valor de F</i>	125,79**		13,69**		101,99**	
<i>Coeficiente de variação(%)</i>	2,36		4,70		3,98	

±desvio padrão. Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente (Tukey $P>0,05$). ** significativo ao nível de 1% de probabilidade. PD - proteína digestível. EED - extrato etéreo digestível. ED - energia digestível

3.2. Alimentos energéticos

Pode-se verificar que a melhor média de coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDA_{PB}) foi apresentada pelo milho, e em seguida pelo farelo de trigo (Tabela 4) e este não diferiu ($P>0,05$) da quirera de arroz. O sorgo apresentou o menor CDA_{PB} .

Em geral, os coeficientes de digestibilidade aparente do extrato etéreo (CDA_{EE}) para os ingredientes energéticos avaliados foram altos, todos acima de 80%.

Os maiores valores de digestibilidade aparente da energia bruta (CDA_{EB}), foram obtidos para as fontes de óleo avaliadas e o sorgo, não diferindo estatisticamente ($P>0,05$). A quirera de arroz e o milho não diferiram estatisticamente ($P>0,05$). O farelo de trigo foi o ingrediente menos digestível.

Tabela 4 - Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (CD_{PB}), do extrato etéreo (CD_{EE}) e da energia bruta (CD_{EB}) dos ingredientes energéticos avaliados para o tambaqui

Ingredientes	Proteína		Extrato Etéreo		Energia	
	CD _{PB} %	PD %	CD _{EE} %	EED %	CD _{EB} %	ED %
Quirera de arroz	85,54 ± 0,74 ^b	7,01	89,58 ± 2,54 ^{ab}	1,37	84,54 ± 0,29 ^b	3174,05
Farelo de Trigo	87,77 ± 2,48 ^{ab}	14,56	91,18 ± 4,45 ^a	3,61	73,80 ± 0,28 ^c	2870,00
Milho	90,76 ± 1,73 ^a	7,41	82,76 ± 1,55 ^b	2,99	86,07 ± 1,91 ^b	3329,91
Sorgo	81,23 ± 1,65 ^c	7,51	94,94 ± 4,74 ^a	3,76	93,55 ± 0,88 ^a	3680,43
Óleo de milho	-		88,01 ± 4,20 ^{ab}	88,01	96,21 ± 1,87 ^a	9060,10
Óleo de soja	-		88,29 ± 4,98 ^{ab}	88,29	95,67 ± 0,56 ^a	8972,89
Óleo de peixe	-		90,97 ± 1,07 ^{ab}	90,97	96,29 ± 2,11 ^a	8973,27
<i>Valor de F</i>	20,69**		3,55**		124,81**	
<i>Coefficiente de variação</i>	2,04		3,99		1,50	

±desvio padrão. Valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente (Tukey P>0,05). ** significativo ao nível de 1% de probabilidade. PD - proteína digestível. EED - extrato etéreo digestível. ED - energia digestível

4. Discussão

Juvenis de tambaqui foram capazes de digerir a fração proteica, a lipídica e a da energia de forma muito eficaz de quase todos os alimentos testados.

4.1. Alimentos proteicos

O glúten de milho resultante do processamento do milho para a retirada do amido mostrou-se como excelente fonte proteica e energética para o tambaqui. Esses altos valores de digestibilidade podem ser explicados pela qualidade da proteína deste ingrediente, pois o glúten de milho é uma proteína concentrada e comercialmente garantida para conter no mínimo 60% de proteína bruta, baixo conteúdo de fósforo e alta digestibilidade (Gatlin III *et al.* 2007), podendo ser um substituto de fontes proteicas de origem animal nas dietas de peixes. Porém, um fator limitante é o elevado conteúdo de carotenóides, que pode conferir uma cor amarelada aos filés (Park *et al.* 1997). Outro fator limitante do glúten de milho está relacionado à baixa palatabilidade, devido ao alto teor de ácidos graxos insaturados (Cha *et al.* 2000). Os ácidos graxos insaturados são susceptíveis ao desenvolvimento de rancidez. Os grãos em geral, possuem a enzima lipoxidase que estimula a rancidez; o processamento para obtenção do glúten de milho não inativa

esta enzima (Pupa 2004). Em outros estudos que avaliaram a digestibilidade de nutrientes deste ingrediente em peixes onívoros, apresentaram resultados semelhantes para CDA_{PB} e CDA_{EB} ; com 95,6% e 86%, respectivamente, em pacu (Abimorad *et al.* 2008); 95,0% e 88,0%, respectivamente, em jundiás (Oliveira Filho & Fracalossi 2006) e CDA_{PB} de 95,96% da PB em tilápias do Nilo (71,19%) (Pezzato *et al.* 2002). Já o valor de CDA_{EB} e CDA_{EE} para o tambaqui foi inferior ao encontrado em tilápias do Nilo (Pezzato *et al.* 2002).

O glúten de trigo apresentou-se como boa fonte de proteína para o tambaqui, mas este não aproveita de forma eficaz a fração do extrato etéreo e energia. Este ingrediente é um coproduto do isolamento do amido da farinha de trigo, que apresenta alta digestibilidade, e um interessante perfil de aminoácidos, em especial um elevado nível de glutamina (Apper-Bossard *et al.* 2013). A glutamina promove a síntese de aminoácidos não-essenciais para a deposição de proteína corporal. Além disso, é uma importante fonte de energia para os enterócitos, fornecendo nitrogênio para a biossíntese de nucleotídeos necessários para a replicação celular das células da mucosa do intestino (Yan & Qiu-Zhou, 2006, Silva *et al.* 2010). Por outro lado, o glúten de trigo apresenta níveis menores de aminoácidos importantes, como lisina e metionina (Gatlin *et al.* 2007), o que pode limitar seu uso. Apesar de ser uma boa fonte proteica, estudos de digestibilidade com esse ingrediente são escassos com espécies onívoras (Schneider *et al.* 2004), mas é considerada uma fonte altamente digestível para espécies carnívoras como truta *Oncorhynchus mykiss* (Hardy 1996), salmão *Salmo salar* (Storebakken *et al.* 2000) e silver perch *Bidyanus bidyanus* (Allan *et al.* 2000).

O farelo de soja é frequentemente utilizado na formulação de dietas para peixe. Isso se deve pela boa composição em nutrientes, por conter a maioria dos aminoácidos essenciais para os peixes (NRC 2011), e ao fato de diminuir os custos de produção das dietas, por ser um produto acessível (Hernández *et al.* 2007). Os juvenis de tambaqui apresentaram alta digestibilidade para os nutrientes avaliados e energia. O farelo de soja pode ser utilizado pelo tambaqui em estudos de substituição de fontes proteicas de origem animal. Abimorad *et al.* (2008) obtiveram alto CDA_{PB} (90,6%) e CDA_{EB} de 78,1% com pacu, valores próximos aos encontrados para o tambaqui.

Resultados do CDA para proteína, energia e gordura apresentados pelo tambaqui para as farinhas de salmão, de vísceras de aves e de penas apresentaram valores de digestibilidade superiores a 70% e estão próximos aos encontrados para o pacu (CDA_{PB} de 83,40% e CDA_{EB} de 69,99% para a farinha de vísceras e CDA_{PB} de 75,73% e CDA_{EB} de 79,52% para a farinha de penas), segundo Abimorad & Carneiro (2004).

O coeficiente de digestibilidade aparente da proteína e da energia da farinha de resíduos de tilápia foi ligeiramente inferior aos demais alimentos proteicos testados, com exceção da proteína da levedura, e também da fração da energia do farelo de algodão e da levedura. Uma hipótese para o baixo CDA_{PB} e CDA_{EB} deve-se a qualidade da matéria-prima. A farinha de resíduos de tilápia utilizada neste estudo foi constituída de resíduos de filetagem e é a mais facilmente encontrada no Brasil. Esse ingrediente apresentou um elevado conteúdo de matéria mineral (25,20%) na sua composição, que pode incluir ossos e escamas, além do teor de gordura (10,48%) pela inclusão de cartilagens e vísceras, ocasionando uma diminuição do CDA de proteína e energia da fonte avaliada. Valor do CDA_{PB} foi superior ao obtido por Pezzato *et al.* (2002) (78,55%) com tilápia do Nilo e inferior ao determinado por Abimorad & Carneiro (2004) com juvenis de pacu (88,40%). No entanto, a farinha de peixe é o principal ingrediente proteico indicado, por fornecer os aminoácidos limitantes em dietas para peixes, haja vista sua ótima palatabilidade. Entretanto, pelo seu elevado custo, tem-se avaliado fontes alternativas de proteína para reduzir a inclusão desse ingrediente. Outros fatores também podem explicar o menor coeficiente de digestibilidade da farinha de resíduo de tilápia obtido quando comparada ao farelo de soja como a qualidade do resíduo utilizado, forma de processamento, tempo de estocagem e composição final do produto. Por outro lado, alimentos de origem vegetal possuem uma melhor padronização no processamento e melhores condições de armazenamento quando comparados aos subprodutos de origem animal (Gonçalves 2007).

O coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDA_{PB}) e da energia do farelo de algodão foi semelhante ao CDA_{PB} para tilápia-do-nilo (74,87%), observados por Pezzato *et al.* (2002) e menor do que os relatados por Abimorad & Carneiro (2004) com o pacu (86% e 59,55%, respectivamente). Gaylord & Gatlin

(1996) relataram que os valores menores de CDA_{PB} do farelo de algodão podem estar relacionados ao alto nível de fibra presente no alimento, que no Brasil é em torno de 14,08% (Rostagno *et al.* 2005). Outro fator que pode ter ocasionado os baixos coeficientes de digestibilidade pode estar associado à alta concentração do gossipol, que atua como fator antinutricional. O gossipol pode ser tóxico e se acumular no fígado dos animais, levando a uma redução no crescimento (Pastore *et al.* 2013).

A levedura de álcool não se mostrou uma boa fonte de proteína e energia para os juvenis de tambaquis. O baixo CDA_{PB} encontrado para levedura pode ser atribuído à baixa digestibilidade de certos aminoácidos contidos na levedura (Storebakken *et al.* 1998). Outros autores também observaram baixo valor do CDA_{PB} e CDA_{EB} da levedura, Meurer *et al.* 2003 com tilápia do Nilo (CDA_{PB} de 77,39% e CDA_{EB} de 62,77%) e Abimorad & Carneiro 2004 em pesquisa com pacu (CDA_{PB} de 68,86% e CDA_{EB} de 45,77%). A levedura possui alguns fatores que afetam a sua utilização na alimentação animal, como o conteúdo de nitrogênio não proteico e de parede celular, cerca de 14,0 a 30,0%, respectivamente (Meurer *et al.* 2000). Já para a fração do extrato etéreo, a levedura apresentou ótima digestibilidade para os juvenis de tambaqui. Estudos mostraram que a inclusão de levedura pode melhorar o desempenho de peixes, como descrito por Meurer *et al.* (2000). Os autores observaram que a inclusão de até 6,0% deste alimento nas rações para juvenis de tilápia do Nilo, melhorou linearmente seu desempenho.

4.2. Alimentos energéticos

Os alimentos energéticos apresentaram altos coeficientes de digestibilidade para as frações proteica, energética e de extrato etéreo, permitindo sua inclusão em dietas comerciais como fonte de energia mais barata.

O milho é o grão mais utilizado na alimentação de animais, por sua grande disponibilidade e ser considerado o ingrediente de origem vegetal mais palatável de todos os cereais. É constituído basicamente de amido e é também fonte de energia, betacarotenos e vitamina A (Pastore *et al.* 2013). Este ingrediente se destacou quanto a digestibilidade da proteína para os juvenis de tambaqui. Guimaraes *et al.* (2014) também estudaram esta espécie e obtiveram um CDA_{PB} mais baixo, de

87,5%. Outra espécie onívora, o pacu, que possui a morfologia do trato digestório semelhante à do tambaqui apresentou menor valor para CDA_{PB} (84,38%) (Abimorad & Carneiro 2004). Boscolo *et al.* (2002), em estudo com tilápia do Nilo encontraram altos valores de CDA_{PB} do milho (93,40%). Para a fração da energia, Abimorad & Carneiro (2004), avaliando os CDA_{EB} em pacus obtiveram valores semelhantes para milho (86,69%), assim como Gonçalves (2007), que estudou alimentos energéticos para tilápia do Nilo e observou que o CDA_{EB} do milho foi de 86,15%. Quanto a fração do extrato etéreo, existem poucos trabalhos publicados com digestibilidade aparente para peixes. Pezzato *et al.* (2002), em um estudo com tilápia do Nilo apresentou uma média de CDA_{EE} do milho (69,02%) inferior ao observado para o tambaqui.

O farelo de trigo é nutricionalmente semelhante ao milho, rico em carboidratos e energia, porém apresenta o dobro de proteína. Assim como o milho, o farelo de trigo foi altamente digestível para o tambaqui para a fração proteica e de extrato etéreo. Os valores de CDA_{PB} foram similares aos observados por Guimaraes *et al.* (2014) para tambaqui (84,4%) e Abimorad *et al.* (2008) para pacu (87,7%), e inferior ao relatado por Pezzato *et al.* (2002) e Boscolo *et al.* (2002) para tilápia do Nilo (91,13% e 91%, respectivamente). Para a fração do extrato etéreo, o valor encontrado no presente estudo foi superior ao observado por Pezzato *et al.* (2002) com CDA_{EE} de 67,37%. Por outro lado, o tambaqui não aproveitou adequadamente a fração energética do farelo de trigo, assim como foi relatado por Guimaraes *et al.* (2014), que também trabalharam com essa espécie (68,2%). Essa diferença na digestibilidade da fração energética do farelo de trigo em relação ao milho, sorgo e quirera de arroz, por exemplo, pode ser consequência do teor de fibra bruta no farelo de trigo. Wilson (1995) afirmou que a fibra bruta é um componente dos alimentos constituintes da ração, sendo indigestível para a maioria das espécies de peixes, não devendo ser adicionada ao alimento. Altos níveis de fibra bruta na dieta diminuem o tempo de passagem do alimento no intestino, piorando o aproveitamento dos nutrientes (Lanna *et al.* 2004). Isso ocorre pelo fato que a parte indigestível ou digerida e não absorvida de um alimento ocupar o espaço que poderia estar sendo ocupado por um novo alimento (Meurer *et al.* 2002).

A quirera de arroz é um subproduto do beneficiamento do arroz, usado como ingrediente energético na fabricação de dietas para peixes, pois é rico em amido e

outros carboidratos que promovem a melhora na extrusão, podendo ser um substituto de outros cereais, como o milho, sorgo, o trigo e a cevada (Pastore *et al.* 2013). O CDA_{PB} da quirera de arroz foi superior ao encontrado por Guimaraes *et al.* (2014) (72,8%) com a mesma espécie e semelhante ao obtido por Oliveira Filho & Fracalossi (2006) (85,9%) com juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). O CDA_{EB} encontrado neste estudo foi maior que o apresentado por Guimaraes *et al.* (2014) (80,7%). Quanto a fração do extrato etéreo, a quirera de arroz não diferiu estatisticamente ($P>0,05$) dos demais alimentos, demonstrando que o tambaqui, por ser um peixe de hábito alimentar onívoro com tendência a frugívoro, pode variar a sua alimentação com a disponibilidade dos alimentos durante o cultivo.

O sorgo apesar de ser um eventual substituto para o milho por assemelhar-se com sua composição química e em seu valor nutritivo, apresentou um coeficiente de digestibilidade menor para proteína. Embora o valor de proteína bruta do sorgo estudado tenha sido um pouco mais alto que a apresentada para o milho, a qualidade da proteína do milho foi superior, apresentando provavelmente um melhor balanceamento dos aminoácidos. Outros autores também encontraram valores inferiores para o CDA_{PB} do sorgo 71,4% para o tambaqui (Guimaraes *et al.* 2014) e tilápia do Nilo com 67,83% (Pezzato *et al.* 2002). Por outro lado, CDA para extrato etéreo e energia do sorgo foi o maior entre os alimentos testados, juntamente com as fontes de óleos. Apesar de ser um alimento bem aproveitado para o tambaqui, são inexistentes estudos com o objetivo de avaliar a substituição do milho pelo sorgo, além do seu efeito sobre o desempenho produtivo.

Os óleos são importantes fontes empregadas em dietas de peixes. Neste estudo, as três fontes avaliadas mostraram-se bem aproveitadas pelo tambaqui. O óleo de peixe utilizado foi produzido a partir do resíduo de processamento de tilápia, durante a produção da farinha deste peixe. Apesar de serem fontes bem utilizadas na alimentação de peixes, existem poucos trabalhos que abordam CDA de óleos para espécies de água doce. O óleo de soja também foi estudado para o tambaqui pelos autores Guimaraes *et al.* (2014), que encontraram um CDA_{EB} de 89,85% e para tilápia do Nilo por Boscolo *et al.* (2002), que obtiveram um CDA_{EB} de 92,7%, valores estes inferiores ao encontrado no presente estudo.

Dentro do nosso conhecimento, este estudo foi o primeiro a avaliar para o tambaqui, um elevado número de alimentos comumente usados nas dietas comerciais. Porém, futuros estudos com outras fontes alimentares são pertinentes, uma vez que o tambaqui é uma espécie de grande importância comercial. Os dados de coeficientes de digestibilidade dos alimentos auxiliarão os nutricionistas na tomada de decisão de quais alimentos utilizarem nas dietas, levando em consideração, principalmente, a qualidade dos ingredientes, preços e sazonalidade dos alimentos. Garantindo assim, dietas mais adequadas e nutrientes que serão realmente aproveitadas pelos peixes, de forma a minimizar os excessos e desperdícios, visando uma produção mais sustentável.

Além disso, todos os resultados encontrados neste estudo possibilitarão estudos das exigências nutricionais com base em nutrientes digestíveis, para a formulação de dietas com melhor qualidade nutritiva e desempenho produtivo.

5. Conclusão

O tambaqui, de forma geral, aproveitou bem os alimentos proteicos e energéticos avaliados, apresentando elevados CDA, com exceção da levedura que apresentou valores baixos para CDA_{PB} e CDA_{EB} . O glúten de milho, dentre os alimentos proteicos, foi o que apresentou maior CDA_{PB} e CDA_{EB} . As farinhas de vísceras de aves e a de penas apresentaram os maiores valores de CDA_{EE} . Entre os alimentos energéticos, o sorgo e as fontes de óleo avaliadas apresentaram excelentes CDA. Os alimentos analisados podem ser utilizados, respeitando-se os limites de inclusão, em dietas práticas para esta espécie.

Agradecimento

Ao Centro de Aquicultura da UNESP pelo fornecimento da estrutura para condução do experimento e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo: 2011/12963-2) e auxílio financeiro (Processo: 2012/09126-4).

Referências

- Abimorad, E.G. & Carneiro, D.J. (2004) Fecal collection methods and determination of crude protein and of gross energy digestibility coefficients of feedstuffs for pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *R. Bras. Zootec.*, **33**, 1101-1109.
- Abimorad, E.G., Squassoni, G.H. & Carneiro, D.J. (2008) Apparent digestibility of protein, energy, and amino acids in some selected feed ingredients for pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquac. Nutr.*, **14**, 374-380.
- Allan, G.L., Parkinson, S., Booth, M.A., Stone, D.A.J., Rowland, S.J., Frances, J. & Warner-Smith, R. (2000) Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. *Aquaculture*, **186**, 293-310.
- Apper-Bossard, E., Feneuil, A., Wagner, A. & Respondek, F. (2013) Use of vital wheat gluten in aquaculture feeds. *Aquat. Bio.*, **9**, 21.
- Araújo-Lima, C. A. R. & GOMES, L. C. (2005) Tambaqui. In: Espécies nativas para piscicultura no Brasil (Baldisseroto, B; Gomes, L. C.) pp. 175-202. Ed. Santa Maria, MS, Brasil.
- Aride, P.H.R., Roubach, R. & Val, A.L. (2004). Water pH in central Amazon and its importance for tambaqui (*Colossoma macropomum*) culture. *World Aquac.*, **35**, 24–27.
- AOAC (1990). Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA, vol. 1. 684p.
- Bomfim, M.A.D. & Lanna, E.A.T. (2004) Fatores que afetam os coeficientes de digestibilidade nos alimentos para peixes. *R. Eletr. Nutr.*, **1**, 20-30.

Boscolo, W.R., Hayashi, C. & Meurer, F. (2002) Apparent digestibility of the energy and nutrients of conventional and alternatives foods for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, **31**, 539-545.

Carneiro, D.J. (1981) Digestibilidade protéica em dietas isocalóricas para o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, Pisces). In: *Anáís do II Simpósio Brasileiro sobre Aquicultura*, pp.78-80. SUDEPE, Brasília, DF, Brasil.

Cha, J.Y., Flores, R.A. & Park, H. (2000) Reduction of carotenoids in corn gluten meal with soy flour. *Transactions of the ASAE*, **43**, 1169-1174.

Day, L., Augustin, M.A., Batey, I.L. & Wrigley, C.W. (2006) Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends Food Sci. Technol.*, **17**, 82-90.

Forster, I. (1999) A note on the method of calculating digestibility coefficients of nutrients provided by single ingredients to feeds of aquatic animals. *Aquac. Nutr.*, **5**, 143-145.

Fukurawa, A. & Tsukahara, H. (1966) On the acid digestion for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of fish feed. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **32**, 502-506.

Gaylord, T.G. & Gatlin, D.M. (1996) Determination of digestibility coefficients of various feedstuffs for red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, **139**, 303-314.

Gatlin III, D. M., Barrows, T. F., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E., Stone, D., Wilson, R. & Wurtele, E. (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac Res*, **38**, 551-579.

Golterman, H.L., Clymo, R.S. & Ohnstad, M.A.M. (1978) Methods for physical and chemical analysis of freshwater, 213p. IBP, Blackwell Sci. Pub, London, UK.

Goncalves, E.G. & Carneiro, D.J. (2003) Apparent digestibility coefficients of protein and energy of some ingredients used in pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829), diets. *R. Bras. Zootec.*, **32**, 779-786.

Gonçalves, G.S. (2007) Digestibilidade e exigência de lisina, proteína e energia em dietas para a tilápia do Nilo. PhD thesis, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, SP, Brasil.

Guimaraes, I.G., Miranda, E.C. & Araujo, J.G. (2014) Coefficients of total tract apparent digestibility of some feedstuffs for Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Anim. Feed. Sci. Technol.*, **188**, 150-155

Hardy, R.W. (1996) Alternative protein sources for salmon and trout diets. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, **59**, 71-80.

Hernández, M. D., Martínez, F. J., Jover, M. & García, B. G. (2007) Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture*, **263**, 159-167.

Koroleff, F. (1976) Determination of nutrients. In: Methods of seawater analysis. (Granshoffk, K., kremling, K. & Ehrhardt, M., ed.), pp. 117 – 187. Chemic, Weinhein, Germany.

Lanna, E.A.; Cecon, P.R.; Pezzato, L.P.; Furuya, W.M.; Barros, M.M. & Bomfim, M. A.D. (2004) Digestibilidade aparente e transito intestinal em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em função da fibra bruta da dieta. *R. Bras. Zootec.*, **33**, 2186-2192.

Mackereth, F.J.H., Heron, J. & Talling, J.F. (1978) Water Analyses, 120p. Freshwater Biological Association, UK.

Meurer, F.; Hayashi, C.; Soares, C.M. & Boscolo, W.R. (2000) Utilização de levedura *spray dried* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Sci.*, **22**, 479-484.

Meurer, F.; Hayashi, C., Boscolo, W.R. & Soares, C.M. (2002) Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *Rev Bras Zootec.*, **31**, 566-573.

Meurer, F., Hayashi, C. & Boscolo, W.R. (2003) Apparent digestibility of some protein sources for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, **32**, 1801-1809.

NRC- National Research Council. (2011) *Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes*, 376p. National Academy Press, Washington, DC, USA.

Nose, T. On the digestion of food protein by gold-fish (*Carassius auratus* L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.) (1960) *Bull. Fresh. Fish Res. Lab.*, **10**, 11-22.

Oliveira Filho, P.R. & Fracalossi, D.M. (2006) Apparent digestibility coefficients of feed ingredients for jundia juveniles. *R. Bras. Zootec.*, **35**, 1581-1587.

Oliveira, A.C.B., Martinelli, L.A., Moreira, M.Z. & Cyrino, J.E.P. (2008) Determination of apparent digestibility coefficient in fish by stable carbon isotopes. *Aquac. Nutr.*, **14**, 10-13.

Oliveira, A.C.B., Miranda, E. & Correa, R. (2013) Exigências nutricionais e alimentação do tambaqui. In: *Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira* (Fracalossi, D. M. & Cyrino, J. E. P. ed.), 1st ampl. pp. 231-240. Sociedade Brasileira de Aquicultura Aquática, Florianópolis, SC, Brasil.

Park, H., Flores, R. A. & Johnson, L. A. (1997) Preparation of Fish Feed Ingredients: Reduction of Carotenoids in Corn Gluten Meal. *J Agric. Food Chem*, **45**, 2088-2092.

Pastore, S.C.G., Gaiotto, J.R., Ribeiro, F.A.S. & Nunes, A.J.P. (2013) Formulação de Rações e Boas Práticas de Fabricação. In: Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira (Fracalossi, D. M. & Cyrino, J. E. P. ed.), 1st ampl. pp. 295-345. Sociedade Brasileira de Aquicultura Aquática, Florianópolis, SC, Brasil.

Pezzato, L.E., de Miranda, E.C., Barros, M.M., Pinto, L.G.Q., Furuya, W.M. & Pezzato, A.C. (2002) Apparent digestibility of feedstuffs by Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, **31**, 1595-1604.

Pupa, J. M. R. (2004) Óleos e gorduras na alimentação de aves e suínos, *R. Eletr. Nutr.*, **1**, 69-73.

Reigh, R.C.; Braden, S.L. & Craig, R.J. (1990) Apparent digestibility coefficients for common feedstuffs in formulated diets for red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Aquaculture*, **84**, 321-334.

Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., Oliveira, R. F., Lopes, D. C., Ferreira, A. S. & Barreto, S. L. T. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais, pp. 24-186. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Schneider, O., Amirkolaie, A.K., Vera-Cartas, J., Eding, E.H., Schrama, J.W. & Verreth, J.A.J. (2004) Digestibility, faeces recovery, and related carbon, nitrogen and phosphorus balances of five feed ingredients evaluated as fishmeal alternatives in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquac. Res.*, **35**, 1370-1379.

Silva, J.A.M.; Filho, M.P. & Oliveira-Pereira, M.I. (2003) Frutos e Sementes Consumidos pelo Tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) Incorporados em Rações. Digestibilidade e Velocidade de Trânsito pelo Trato Gastrointestinal. *R. Bra. Zootec.*, **32**, 1815-1824.

Silva, J.A.M.; Pereira-Filho, M.; Cavero, B.A.S. & Oliveira-Pereira, M.I. (2007) Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818). *Acta Amazon.*, **37**, 157 – 164.

Silva, L.C.R., Furuya, W.M., Natali, M.R.M., Schamber, C.R., Santos, L.D. & Vidal, L.V.O. (2010) Desempenho e morfometria intestinal de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas suplementadas com L-glutamina e L-glutamato. *R. Bras. Zootec.*, **39**, 1175-1179.

Storebakken, T., Kvien, I.S., Shearer, K.D., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J. & Berge, G.M. (1998) The apparent digestibility of diets containing fish meal, soybean meal or bacterial meal fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*): evaluation of different faecal collection methods. *Aquaculture*, **169**, 195-210.

Storebakken, T., Shearer, K.D., Baeverfjord, G., Nielsen, B.G., Asgard, T., Scott, T. & De Laporte, A. (2000) 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*, **184**, 115-132.

Vidal, M.V., Donzele, J.L., de Andrade, D.R. & dos Santos, L.C. (2004) Determination of the digestibility of tambaqui (*Colossoma macropomum*) food nutrients by the techniques with internal and external indicators. *R. Bras. Zootec.*, **33**, 2193-2200.

Wilson, R.P. (1995) Lipid nutrition of finfish. In: Nutrition and utilization technology in aquaculture (LIM, C; SESSA, D.J. Eds.). Champaign: AOAC Press, pp. 74-81.

Yan, I. & Qiu-zhou, X. (2006) Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture*, **256**, 389-394.

**CAPÍTULO 3 - EXIGÊNCIA DE PROTEÍNA DIGESTÍVEL E CRESCIMENTO
MUSCULAR DE JUVENIS DE TAMBQUI (*Colossoma
macropomum*)**

Hellen Buzollo

UNESP – Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

E-mail: hellen_buzollo@yahoo.com.br

Normas para submissão ao periódico “Aquaculture”

Resumo:

Colossoma macropomum, também conhecido como tambaqui, é uma espécie de peixe economicamente importante no Brasil e em outros países da América Latina e novos estudos estão sendo conduzidos com o propósito de melhorar a produtividade desta espécie. O objetivo do trabalho foi determinar a exigência em proteína digestível para juvenis de tambaquis, por meio de parâmetros de desempenho produtivo e eficiência nutricional, além de avaliar os efeitos das dietas experimentais sobre as características morfológicas e de celularidade das fibras musculares profundas. Foram utilizados 1750 tambaquis (peso $6,53 \pm 0,43$ g e comprimento $7,58 \pm 0,18$ cm) distribuídos aleatoriamente em 35 tanques (450 L), na densidade de 50 peixes por tanque. Sete dietas experimentais isoenergéticas foram formuladas com diferentes níveis de proteína digestível (PD) (14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32%). A exigência de PD determinada pelo modelo de regressão segmentada – modelo broken line, com base nos valores médios de ganho em peso, foi de 29%. O incremento nos níveis de PD das dietas para 29% melhorou significativamente as médias de peso final, ganho em peso, consumo, taxa de crescimento específico e ganho em proteína bruta, causando alterações no diâmetro da fibra do compartimento profundo. As fibras foram distribuídas em padrão de mosaico, caracterizado por fibras de diferentes diâmetros. Os tratamentos com 29 e 32% de PD, proporcionaram aumento na frequência nas classes de fibras grandes (diâmetro superior a $50\mu\text{m}$), indicando o crescimento hipertrófico no músculo esquelético durante a fase juvenil, embora a hiperplasia também estivesse acontecendo nesses tratamentos.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, desempenho produtivo, hiperplasia, hipertrofia, musculatura esquelética, peixe, proteína

1. Introdução

Dentre as espécies com potencial para aquicultura está o tambaqui (*Colossoma macropomum*), sendo a espécie nativa mais produzida na aquicultura continental, com um grande crescimento contínuo no último censo, atingindo 111.084 toneladas em 2011 (MPA, 2013). Deve-se a isso suas qualidades como rusticidade, sabor da carne, crescimento rápido e hábito alimentar onívoro, que facilita a aceitação às dietas formuladas e adaptação à criação em cativeiro (Araújo-Lima e Gomes, 2005). Para que haja melhor aproveitamento na piscicultura, assim como sua exploração de forma racional, é primordial que se estude suas exigências nutricionais, contribuindo com novas estratégias de criação e com a manutenção da espécie. Nesse sentido, estudos de exigência proteica são fundamentais, por esta representar o mais alto custo na formulação de dietas práticas.

Durante o processo digestivo e metabólico, as proteínas são hidrolisadas, liberando aminoácidos livres que serão distribuídos por meio da corrente sanguínea para órgãos e tecidos. Dietas com insuficiência de proteínas e aminoácidos podem reduzir o crescimento e a eficiência alimentar, mobilizando a proteína de alguns tecidos para a manutenção de funções vitais. Por outro lado, a proteína fornecida em excesso pela dieta será utilizada para a produção de energia, e não na formação de tecido muscular e crescimento (Wilson, 2002). Apesar de existirem pesquisas sobre alimentação e nutrição de tambaqui (Macedo, 1979; Carneiro, 1981; Merola e Cantelmo, 1987; Van der Meer et al., 1995; Oishi et al., 2010; De Almeida et al., 2006; Santos et al., 2010; De Almeida et al., 2011), ainda há muito para ser investigado, principalmente em relação a nutrientes digestíveis, para obtenção de dietas nutricionalmente completas e realmente assimiladas pelos peixes.

O crescimento é o critério mais importante e comumente utilizado para medir a resposta dos peixes às dietas experimentais (Fracalossi et al., 2013). Além das variáveis convencionais de desempenho, outras metodologias podem ser utilizadas para avaliar o crescimento dos peixes, como a morfologia e celularidade das fibras do músculo estriado esquelético, principal constituinte do filé. Nos peixes, o músculo estriado esquelético pode ocupar de 40 a 70% da massa corporal total (Sänger e Stoiber, 2001), servindo como importante fonte de proteínas utilizadas na

alimentação humana. A musculatura é distribuída nas camadas vermelha, branca e intermediária. É formada principalmente por fibras brancas profundas, que apresentam velocidade de contração rápida e metabolismo glicolítico, baixa concentração de mioglobina, poucas mitocôndrias e lipídios. São recrutadas na realização de atividades bruscas de locomoção, como na fuga de predadores e captura de presas (Sänger e Stoiber, 2001). A musculatura vermelha, apresentam velocidade lenta de contração e metabolismo oxidativo, alta concentração de mioglobina, muitas mitocôndrias, lipídios e excelente suprimento sanguíneo, sendo utilizadas pelo peixe na realização de movimentos lentos e de sustentação, como durante a migração (Johnston, 1999). É formada por fibras menores (até 45 µm de diâmetro), pode estender-se ao longo de todo o corpo do animal em uma fina camada na região subdermal ou apresentar-se de forma mais localizada na região do nervo da linha lateral. Entre as camadas de músculo vermelho e branco, está a camada intermediária (Koumans e Akster, 1995; Johnston, 1999; Sänger e Stoiber, 2001).

O crescimento do músculo esquelético em peixes ocorre principalmente a partir de mudanças na musculatura branca, devido às variações na hipertrofia muscular e / ou hiperplasia (Rowlerson e Veggetti, 2001). Na hipertrofia, as células mio-satélites se fundem às fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos, para maior síntese de miofibrilas, aumento a área das fibras pré-existentes, enquanto que na hiperplasia ocorre a formação de novos miotubos na superfície das fibras existentes, com posterior diferenciação em novas fibras musculares (Koumans e Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowlerson e Veggetti, 2001). Os mecanismos de desenvolvimento muscular por hipertrofia e hiperplasia têm sido estudados para várias espécies de peixes (Aguiar et al., 2005; Carani et al., 2008; Alami-Durante et al., 2010; Leitao et al., 2011; Nebo et al., 2013), sendo poucas informações existentes para juvenis de tambaqui (Alves-Costa et al., 2013a, 2013b), principalmente estudos que envolvam exigências proteicas.

O objetivo do trabalho foi determinar a exigência em proteína digestível para juvenis de tambaquis por meio de parâmetros de desempenho produtivo e eficiência nutricional, além de avaliar os efeitos dos diferentes níveis proteicos sobre as características morfológicas e de celularidade das fibras musculares brancas.

2. Material e métodos

2.1. Peixes

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal, no Centro de Aquicultura da UNESP, no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos. Comitê de ética nº 015810/11.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos e cinco repetições. Juvenis de tambaquis com peso médio inicial de $6,53 \pm 0,43$ g e comprimento médio inicial de $7,58 \pm 0,18$ cm foram distribuídos aleatoriamente em 35 tanques (450 L providos de aeração e abastecimento contínuos, por água proveniente de poço artesiano, com taxa de renovação de aproximadamente 3,5 vezes ao dia), na densidade de 50 peixes por tanque.

Durante o ensaio, foram monitoradas as seguintes variáveis físico-químicas da água: pH $7,7 \pm 0,1$ (PHTEK – pH100), temperatura $27,6 \pm 0,1$ °C (YSI- *Yellow Springs Instruments* 550A), oxigênio dissolvido (YSI- *Yellow Springs Instruments* 550A) $4,5 \pm 0,3$; amônia: $41,8 \pm 32,7$ $\mu\text{g L}^{-1}$ (Koroleff, 1976), nitrato: $132,1 \pm 36,9$ $\mu\text{g L}^{-1}$, nitrito: $18,3 \pm 17,8$ $\mu\text{g L}^{-1}$ (Golterman et al., 1978) e fósforo total: $72 \pm 63,1$ $\mu\text{g L}^{-1}$ (Mackereth et al., 1978). Os valores apresentados foram considerados dentro dos valores aceitáveis para a espécie (Araide et al., 2004; Araujo-Lima e Gomes 2005). A cada cinco dias foram realizadas as sifonagens do fundo dos tanques para a retirada dos resíduos de alimento e fezes, e a lavagem das pedras porosas.

2.2. Dietas experimentais

Sete dietas foram formuladas para serem isoenergéticas (na base digestível) e apresentarem sete níveis de proteína digestível (14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32%) (Tabela 1), determinadas com base nos coeficientes de digestibilidade aparente dos alimentos (Capítulo 2). A farinha de resíduos de filetagem de tilápia utilizada em cada dieta foi incluída na proporção de 25% do total proteico.

As análises bromatológicas das dietas foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do CAUNESP/Jaboticabal, SP, Brasil, de acordo com as normas da AOAC (2000). As dietas experimentais, após a formulação,

moagem e mistura dos ingredientes, foram processadas em extrusora *Exteec*, modelo *Ex Micro*, com matriz de 5mm e secas em estufa com circulação de ar a 55 °C, durante 24 horas. Após secas, as dietas foram colocadas em sacos plásticos etiquetados e armazenadas em freezer (-18°C).

Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, três vezes ao dia (8:00, 14:00 e 17:30 horas), durante 120 dias.

Tabela 1. Formulação e composição bromatológica das dietas experimentais com diferentes níveis proteicos (valores com base na matéria natural)

Ingredientes	Dietas						
	14%PD	17%PD	20%PD	23%PD	26%PD	29%PD	32%PD
Farinha de peixe	7,11	8,63	10,15	11,66	13,20	14,72	16,24
Farelo de soja	9,30	16,00	22,70	29,49	36,70	42,83	49,60
Farelo de trigo	16,00	16,90	16,08	15,60	13,65	17,00	16,53
Quirera de arroz	57,42	49,18	42,54	35,40	29,10	19,00	11,70
Óleo de soja	2,80	2,50	2,30	2,10	2,00	1,70	1,60
Óleo de peixe	2,80	2,50	2,30	2,10	2,00	1,70	1,60
Fosfato bicálcico	2,62	2,46	2,24	2,10	1,93	1,75	1,55
Calcário	1,12	1,00	0,86	0,72	0,59	0,47	0,35
Antifúngico	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
BHT, antioxidante	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Suplemento mineral e vitamínico ⁽¹⁾	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Composição Bromatológica ⁽²⁾							
Matéria Seca (%)	91,00	91,10	91,10	91,10	91,10	91,20	91,30
Proteína Bruta (%)	16,07	19,45	22,68	25,95	29,26	32,63	35,89
Proteína Digestível (%)	14,00	17,00	20,00	23,00	26,00	29,00	32,00
Extrato Etéreo (%)	8,40	8,10	7,90	7,80	7,80	7,50	7,60
Fibra Bruta (%)	5,30	3,80	5,60	5,70	5,60	6,00	6,10
Matéria Mineral (%)	3,20	5,50	4,40	5,00	5,60	6,20	6,80
ENN (%) ⁽³⁾	54,10	50,50	47,20	43,70	40,20	36,40	32,80
Energia Bruta (cal g ⁻¹)	4096,50	4112,40	4138,10	4161,90	4195,70	4216,10	4252,50
Energia Digestível (cal g ⁻¹)	3391,00	3374,50	3376,00	3374,40	3389,10	3366,40	3377,40
Relação ED/PD (cal g ⁻¹)	24,26	19,79	16,90	14,70	13,05	11,60	10,55
Composição aminoácidos (%)							
<i>Aminoácidos essenciais</i>							
Arginina	1,23	1,37	1,76	1,86	2,14	2,32	2,74
Histidina	0,32	0,38	0,52	0,52	0,62	0,66	0,72
Isoleucina	0,65	0,77	0,92	1,05	1,20	1,33	1,49
Leucina	1,10	1,39	1,52	1,74	1,97	2,17	2,41
Lisina	0,87	1,07	1,31	1,54	1,74	1,98	2,18
Metionina	0,29	0,33	0,38	0,42	0,47	0,52	0,57
Fenilalanina	0,65	0,79	1,01	1,17	1,27	1,47	1,55
Treonina	0,60	0,71	0,89	1,00	1,14	1,27	1,36
Triptofano	0,18	0,21	0,21	0,26	0,27	0,30	0,34
Valina	0,84	0,96	1,12	1,26	1,41	1,55	1,73
<i>Aminoácidos não essenciais</i>							
Ácido Aspártico	1,33	1,73	2,12	2,53	1,51	3,22	3,47
Ácido Glutâmico	2,66	3,16	3,77	4,29	4,80	5,38	5,96
Alanina	0,87	0,97	1,17	1,28	1,45	1,61	1,75
Cistina	0,22	0,27	0,22	0,31	0,35	0,34	0,40
Glicina	0,93	1,14	1,30	1,45	1,66	1,83	2,04
Serina	0,73	0,88	1,07	1,20	1,36	1,52	1,66
Prolina	0,87	1,00	1,22	1,35	1,52	1,71	1,89
Tirosina	0,50	0,59	0,69	0,78	0,90	0,95	1,10

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

(2) Composição calculada a partir da composição analisada dos ingredientes

(3) Extrativo Não Nitrogenado (ENN) = MS - (PB + EE + MM + FB)

2.3. Avaliação do desempenho produtivo

Na avaliação dos parâmetros de desempenho, ao final do período experimental todos os peixes foram pesados e medidos. O desempenho produtivo foi avaliado pela taxa de sobrevivência, ganho em peso médio, conversão alimentar aparente, consumo diário médio de dieta, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência proteica, de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\text{Sobrevivência (S)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ inicial de peixes} - \text{n}^\circ \text{ final de peixes}}{\text{n}^\circ \text{ inicial peixes}} \times 100$$

$$\text{Ganho em peso médio (GP)} = \text{peso médio final} - \text{peso médio inicial}$$

$$\text{Conversão alimentar aparente (CA)} = \frac{\text{consumo de dieta}}{\text{ganho em peso}}$$

$$\text{Consumo diário médio de dieta (CDD)} = \frac{\text{consumo de dieta por peixe}}{\text{tempo (dias)}}$$

$$\text{Taxa de crescimento específico (TCE)} = \frac{(\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}) \times 100}{\text{tempo (dias)}}$$

$$\text{Taxa de eficiência proteica (TEP)} = \frac{\text{ganho em peso vivo}}{\text{proteína bruta consumida}}$$

Na determinação da composição corporal foram utilizados vinte e cinco peixes de uma amostra inicial e dois de cada parcela, totalizando 10 peixes por tratamento ao longo do experimento, simultaneamente às biometrias. Os peixes, que ficaram em jejum por 24 horas, foram eutanaziados por imersão em gelo e congelados em freezer para posterior análise bromatológica.

Os peixes coletados foram moídos (com as vísceras) e homogeneizados para a determinação da porcentagem de 1ª e 2ª matéria seca, porcentagem de proteína bruta pelo método LECO FP 528 nitrogen analyzer (LECO Instruments, St Joseph, Michigan, USA), porcentagem de gordura pelo método de hidrólise ácida (AOAC 1990) e porcentagens de cinzas (Mufla a 550 °C), além de energia bruta determinada em bomba calorimétrica de Parr, de acordo com a metodologia da AOAC (2000). As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição de

Organismos Aquáticos do CAUNESP/Jaboticabal, SP, Brasil e no Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, Brasil.

Com os resultados da composição corporal e do desempenho, foram realizados os cálculos de eficiência de retenção de proteína bruta e de energia bruta, ganho em proteína bruta e ganho em lipídeo de acordo com as expressões que se seguem:

$$\text{Eficiência de retenção de proteína bruta (ER}_{PB} \text{ (\%))} = \frac{[(PBf \times Pf) - (PBi \times Pi) \times 100]}{CPB}$$

$$\text{Eficiência de retenção de energia bruta (ER}_{EB} \text{ (\%))} = \frac{[(EBf \times Pf) - (EBi \times Pi) \times 100]}{CEB}$$

$$\text{Ganho em proteína bruta (G}_{PB} \text{ (g))} = \frac{[(PBf \times Pf) - (PBi \times Pi) \times 100]}{GP/\text{peixe}}$$

$$\text{Ganho em lipídeo (G}_{L} \text{ (g))} = \frac{[(EEf \times Pf) - (EEi \times Pi) \times 100]}{GP/\text{peixe}}$$

Onde:

PBf, EBf e EEf: proteína bruta, energia bruta e extrato etéreo final na carcaça

PBi, EBi e EEi: proteína bruta, energia bruta e extrato etéreo inicial na carcaça

CPB: consumo de proteína bruta

CEB: consumo de energia bruta

GP: ganho em peso/peixe

Pi, e Pf: peso médio inicial e final da amostra

Foi mensurado o peso do fígado e gordura visceral para cálculo do índice hepato-somático e índice gorduro-viscero-somático dos peixes ao final do período experimental:

$$\text{Índice hepato-somático (IHS (\%))} = \frac{P_{\text{fígado}}}{P_{\text{t peixe}}} \times 100$$

$$\text{Índice gorduro-viscero-somático (IGVS (\%))} = \frac{P_{\text{gv}}}{P_{\text{t peixe}}} \times 100$$

Onde:

$P_{\text{fígado}}$: peso do fígado

P_{gv} : peso da gordura visceral

P_{t} : peso total do peixe

2.4. Análise histológica das fibras musculares

Para a avaliação morfológica e morfométrica da musculatura esquelética de juvenis de tambaqui alimentados com dietas com níveis crescente de proteína digestível, amostras musculares de tambaqui ($n = 8$) foram coletadas no início e ao final do período experimental. Fragmentos da musculatura branca obtidos da região dorsal, abaixo da nadadeira esquerda dos juvenis foram fixados em solução de Karnovsky e após 24 horas foram lavados em tampão fosfato de Sorensen (pH 7,2) e preservados em solução alcoólica 70%. Os fragmentos fixados foram incluídos em Historesina[®] (Leica, Germany) de acordo com recomendação do fabricante. Cortes histológicos transversais com três micrômetros de espessura foram obtidos com a utilização de micrótomo automático LEICA, modelo RM 2155, utilizando-se navalhas de vidro. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Floxina B a 0,5%.

Utilizando um sistema de análise de imagens (Olympus DP73), foi calculado o menor diâmetro de 500 fibras musculares brancas por animal para avaliar o crescimento muscular dos juvenis de tambaquis submetidos aos diferentes tratamentos. O menor diâmetro foi determinado para evitar possíveis erros que possam ocorrer, caso algum exemplar não seja seccionado exatamente em corte transversal (Dubowitz, 1985). Posteriormente, as fibras musculares foram distribuídas em classes na dependência de seu diâmetro: classe 10 ($<10 \mu\text{m}$), classe 20 ($\geq 10 \mu\text{m}$, $<20 \mu\text{m}$), classe 30 ($\geq 20 \mu\text{m}$, $<30 \mu\text{m}$), classe 50 ($\geq 30 \mu\text{m}$, $<50 \mu\text{m}$), classe 80 ($\geq 50 \mu\text{m}$, $<80 \mu\text{m}$) e classe >80 ($\geq 80 \mu\text{m}$), com base nos resultados obtidos por Dal Pai-Silva et al. (2003) e Almeida et al. (2008).

2.5. Avaliações estatísticas

Os dados foram testados para normalidade dos erros e homocedasticidade das variâncias e submetidos à análise de variância (ANOVA). Para os dados de fibras musculares e de desempenho produtivo, quando detectados diferenças significativas nas variáveis analisadas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A exigência de proteína digestível para o máximo crescimento do tambaqui foi estimada por meio da análise de regressão segmentada linear-platô (modelo *broken line*) com base no ganho em peso, no programa SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

3. Resultados

3.1. Desempenho Produtivo

Não houve mortalidade durante o período experimental. Os juvenis permaneceram bem adaptados às condições ambientais e às dietas oferecidas.

As médias dos resultados de desempenho produtivo, eficiência de retenção de nutrientes e índices hepato-somático e gorduro-víscero-somático estão apresentados na Tabela 2. Os níveis de proteína digestível nas dietas tiveram influência direta em todas as variáveis analisadas para o tambaqui ($P < 0,05$).

As médias dos parâmetros de desempenho produtivo como PF, GP, CDD e TCE foram maiores com o aumento do nível proteico (Tabela 2). Os tratamentos com 29 e 32% de PD não diferiram entre si ($P > 0,05$), e para os demais tratamentos, conforme diminuiu-se o nível proteico, as médias foram gradativamente menores ($P < 0,05$). Por outro lado, a elevação do nível de proteína na dieta resultou em decréscimo da TEP ($P < 0,05$).

O incremento no nível de proteína digestível para 26% melhorou significativamente a média de CA, não diferenciando estatisticamente dos peixes alimentados com 20, 23, 29 e 32% de PD. Os resultados de ER_{PB} e ER_{EB} reduziram significativamente com a elevação do nível proteico.

Tabela 2. Desempenho de juvenis de tambaqui alimentados por 120 dias com dietas com diferentes níveis de proteína digestível¹

Parâmetros	Nível de Proteína Digestível (%)										ANOVA	
	14	17	20	23	26	29	32	Valores de P	Valores de F			
Peso inicial (PI) (g)	6,61 ± 0,01*	6,56 ± 0,01	6,57 ± 0,01	6,58 ± 0,01	6,55 ± 0,01	6,53 ± 0,01	6,51 ± 0,01					
Peso final (PF) (g)	54,67 ± 4,45 F	76,72 ± 2,85 E	90,65 ± 2,49 D	114,93 ± 3,60 C	137,70 ± 3,24 B	174,59 ± 5,80 A	164,14 ± 11,87 A	<.0001	305,54			
Ganho em peso (GP) (g) **	48,06 ± 4,18	70,16 ± 2,54	84,09 ± 2,25	108,35 ± 3,58	131,15 ± 3,43	168,06 ± 5,77	157,63 ± 11,89	<.0001	513,41			
Consumo diário médio de dieta (CDD) (g)	0,61 ± 0,05 F	0,71 ± 0,05 F	0,82 ± 0,07 E	1,00 ± 0,05 E	1,18 ± 0,05 D	1,67 ± 0,04 C	1,44 ± 0,06 B	<.0001	265,27			
Conversão alimentar aparente (CA)	1,45 ± 0,07 C	1,21 ± 0,05 B	1,17 ± 0,07 AB	1,11 ± 0,03 AB	1,08 ± 0,03 A	1,19 ± 0,05 AB	1,10 ± 0,08 AB	<.0001	19,11			
Taxa de eficiência proteica (TEP)	4,09 ± 0,20 A	4,11 ± 0,20 A	3,69 ± 0,22 B	3,41 ± 0,08 BC	3,11 ± 0,10 C	2,55 ± 0,12 D	2,55 ± 0,18 D	<.0001	76,51			
Taxa de crescimento específico (TCE) (%/dia)	1,76 ± 0,05 F	2,05 ± 0,04 E	2,19 ± 0,03 D	2,38 ± 0,05 C	2,54 ± 0,05 B	2,74 ± 0,05 A	2,69 ± 0,08 A	<.0001	246,88			
Eficiência de retenção de proteína bruta (ER _{pb}) (%)	46,81 ± 2,13 AB	48,95 ± 2,63 A	46,47 ± 2,74 AB	41,82 ± 2,95 BC	40,50 ± 3,96 C	37,64 ± 1,02 CD	34,04 ± 2,33 D	<.0001	18,66			
Eficiência de retenção de energia bruta (ER _{EB}) (%)	35,53 ± 5,38 AB	40,76 ± 2,00 A	37,85 ± 3,14 AB	36,68 ± 1,41 AB	36,13 ± 2,83 AB	33,05 ± 0,97 B	34,87 ± 3,56 AB	0,0223	3,13			
Ganho em proteína bruta (G _{pb}) (g)	11,41 ± 0,19 C	11,90 ± 0,18 BC	12,62 ± 0,64 ABC	12,25 ± 0,94 BC	13,01 ± 1,03 ABC	14,05 ± 1,26 A	13,40 ± 1,11 AB	<.0001	5,46			
Ganho em lipídio (G _l) (g)	15,21 ± 0,94 A	13,06 ± 0,45 B	11,25 ± 0,88 C	9,34 ± 0,19 D	8,17 ± 0,69 D	8,68 ± 0,88 D	8,61 ± 1,43 D	<.0001	47,98			
Índice hepato-somático (IHS) (%)	1,87 ± 0,17 A	1,66 ± 0,18 AB	1,50 ± 0,18 B	1,43 ± 0,08 B	1,36 ± 0,18 B	1,50 ± 0,14 B	1,47 ± 0,14 B	<.0001	5,9			
Índice gorduro-viscero-somático (IGVS) (%)	4,68 ± 0,57 A	3,67 ± 0,21 B	2,83 ± 0,27 C	2,42 ± 0,07 C	2,32 ± 0,41 C	2,67 ± 0,20 C	2,39 ± 0,18 C	<.0001	38,86			

¹ valores são média ± desvio padrão

** Estatística feita pelo modelo de regressão segmentada (*Broken Line*)

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente (Tukey P>0,05)

O G_{PB} foi maior ($P < 0,05$) para os juvenis de tambaquis alimentados com 29% de PD e este não diferiu estatisticamente dos peixes alimentados com 26 e 32% de PD. Os peixes alimentados com 14% de PD apresentaram o menor G_{PB} ($P < 0,05$). Por outro lado, o tratamento com 14% de PD proporcionou aos peixes maior G_L ($P < 0,05$), seguido pelo tratamento com 17% de PD e os demais tratamentos não diferiram estatisticamente entre si.

A dieta com menor teor proteico digestível (14%) apresentou maior média ($P < 0,05$) de IHS e IGVS (Tabela 2), seguido pelo tratamento de 17% de PD. Os demais tratamentos não diferiram entre si.

O ganho em peso é a variável quantitativa mais comumente utilizada em experimentos de avaliação de dietas com diferentes níveis de um determinado nutriente essencial para peixes (Robbins et al., 1979). A análise de regressão segmentada para GP está apresentada na Figura 1, mostrou que houve uma resposta crescente até o nível de 29 % PD (nível ótimo de PD) e valores superiores não foram proporcionalmente aproveitados pelos juvenis de tambaquis

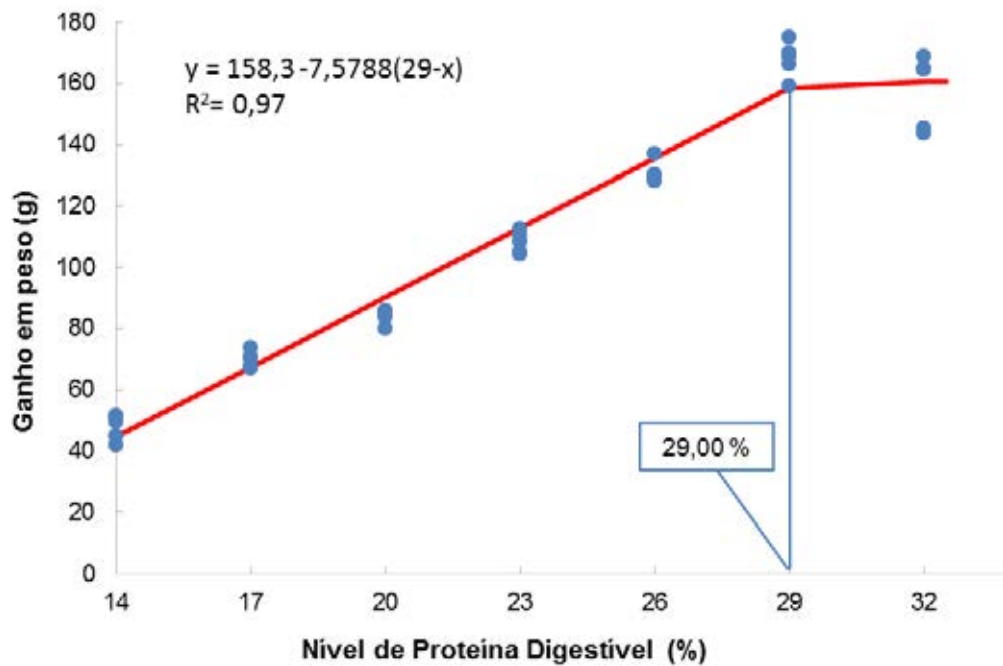


Figura 1. Análise de regressão segmentada (*Broken Line*) para as médias de ganho em peso em função dos níveis de proteína digestível em dietas para juvenis de tambaqui.

Os resultados médios de composição corporal dos juvenis de tambaquis estão apresentados na Tabela 3. Com a elevação nos níveis de proteína digestível, os juvenis de tambaquis apresentaram maiores médias ($P < 0,05$) de proteína bruta depositada na carcaça, com maior valor para o tratamento com 29% de PD.

O maior teor de gordura na carcaça ($P < 0,05$) foi observado para os peixes alimentados com 14% PD, seguido dos tratamentos com 17 e 20% de PD. Por outro lado, os peixes alimentados com 14 e 17% de PD tiveram menor ($P > 0,05$) umidade corporal que os demais tratamentos.

O efeito dos níveis proteicos não influenciou estatisticamente na variável cinzas ($P > 0,05$) na carcaça dos juvenis de tambaquis analisados.

Tabela 3. Composição química corporal média de juvenis de tambaquis alimentados com diferentes níveis de proteína digestível por 120 dias (valores expressos em % de matéria natural)

Tratamento	14 % PD	17 % PD	20 % PD	23 % PD	26 % PD	29 % PD	32 % PD	ANO VA valor	Valor de p
Umidade (%)	68,81 ± 0,65*	E 70,84 ± 0,28	D 71,67 ± 0,52	CD 73,04 ± 0,30	B 74,59 ± 0,12	A 72,22 ± 0,38	BC 73,10 ± 0,79	B	57,9 <0,0001
Proteína Bruta (%)	11,57 ± 0,16	C 11,97 ± 0,17	BC 12,63 ± 0,59	ABC 12,28 ± 0,89	BC 13,00 ± 0,98	ABC 14,00 ± 1,20	A 13,37 ± 1,06	AB	5,18 <0,0001
Gordura (%)	14,12 ± 0,79	A 12,48 ± 0,41	B 10,89 ± 0,82	C 9,16 ± 0,17	D 8,08 ± 0,66	D 8,59 ± 0,84	D 7,93 ± 0,40	D	67,9 <0,0001
Cinzas (%)	3,31 ± 0,41	3,24 ± 0,30	3,47 ± 0,63	3,40 ± 0,52	3,49 ± 0,62	3,47 ± 0,33	3,52 ± 0,53		0,21 0,9692
Energia Bruta (cal g ⁻¹)	2159,97 ± 56,33 A	1974,19 ± 76,55 B	1797,36 ± 94,98 C	1679,83 ± 24,01 CD	1573,90 ± 21,61 D	1665,06 ± 38,66 CD	1622,03 ± 119,94 D	D	37,5 <0,0001

*média±desvio padrão

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente (Tukey P>0,05); **significativo ao nível de 1% de probabilidade

3.2. Análise Morfométrica

As fibras musculares dos juvenis de tambaquis (peso $6,53 \pm 0,43\text{g}$ e comprimento $7,58 \pm 0,18\text{cm}$) no início do experimento apresentavam um aspecto poligonal ou de forma redonda, multinucleadas, com núcleos localizados na periferia da fibra (Figura 2A). Fibras com tamanhos diferentes estavam separadas por um tecido conjuntivo fino, semelhante ao endomísio (Figura 2). Grupos de fibras estavam distribuídos em fascículos, separados por tecido conjuntivo, chamado perimísio (Figura 2B).

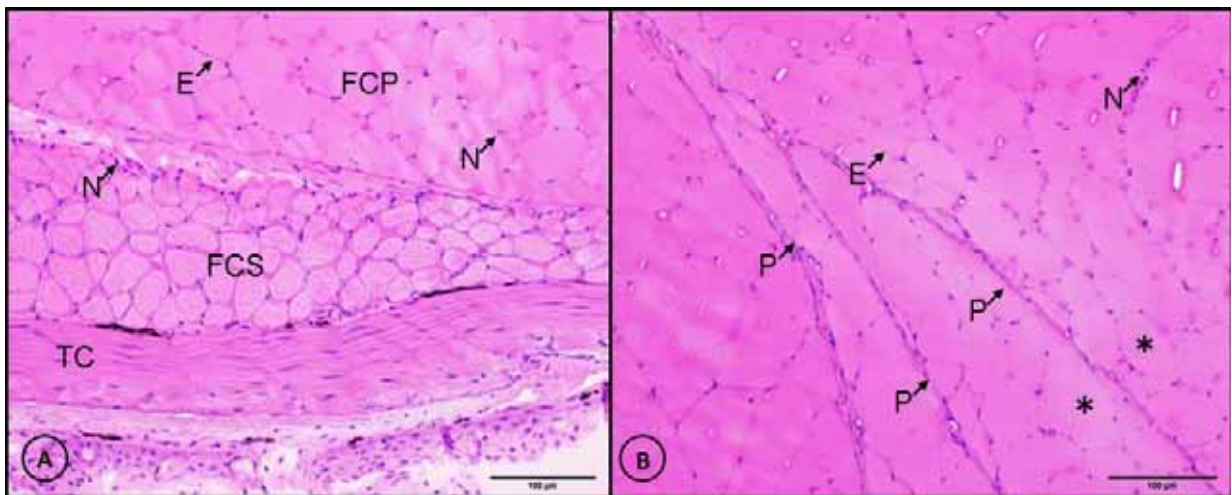


Figura 2. Fotomicrografias da musculatura esquelética de juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) no início do experimento, em corte transversal. A – Região da linha lateral, B – Região dorsal, (N) Núcleos, (*) Mosaico de fibras, (P) Perimísio, (E) Endomísio, (FCP) Fibras no compartimento profundo, (FCS) Fibras do compartimento superficial; (TC) Tecido Conjuntivo. Hematoxilina/Floxina (H/FloB).

No início do experimento, a análise morfométrica da musculatura de tambaquis identificou a maioria das fibras ($32,95 \pm 2,84\%$) nas classes 20 e 30 (Figura 3) e a presença de muitas fibras de pequeno diâmetro em torno das fibras maiores (Figura 2B), indicando o processo de hiperplasia em mosaico. O processo de hipertrofia também foi observado com presença de fibras nas classes 50, 80 e $\geq 80\mu\text{m}$.

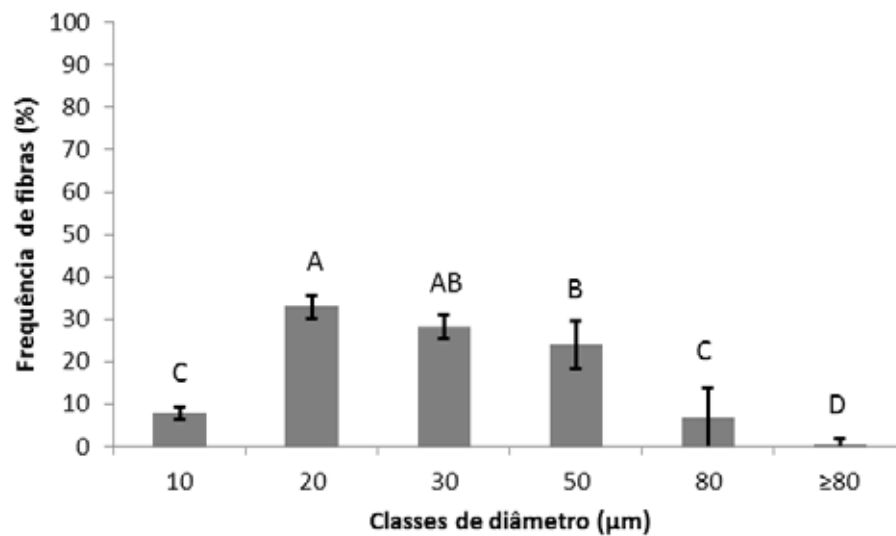


Figura 3. Distribuição das fibras musculares de juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) nas classes de diâmetro antes do início da alimentação com as dietas experimentais. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Ao final do período experimental (120 dias), as fibras musculares dos tambaquis de todos os tratamentos avaliados apresentaram um aspecto poligonal ou de forma redonda, multinucleadas, com núcleos localizados na periferia da fibra (Figuras 4 e 5). Todos os tratamentos continham fibras de tamanhos diferentes, separados por tecido conjuntivo (endomísio) e organizadas em fascículos, (Figura 4D), pelo de perimísio.

A análise morfométrica das fibras evidenciou significativas alterações no diâmetro da fibra do compartimento profundo (Figura 6; Tabela 4). Os menores teores proteicos digestíveis (14 e 17%) avaliados para o tambaqui proporcionaram maior frequência de fibras ($P < 0,05$) na classe de menor diâmetro (D10) (8,66% e 7,97%, respectivamente). Fibras musculares nessas classes de diâmetro indicam um intenso crescimento hiperplásico. A maior frequência de fibras musculares com diâmetro maior que 80 μm foi observada nos tratamentos com 29 e 32 % de PD, caracterizando crescimento hipertrófico. Os tratamentos com valores intermediários de proteína digestível (20, 23 e 26%) não apresentaram diferença estatística quanto à distribuição das fibras musculares nas classes de diâmetro.

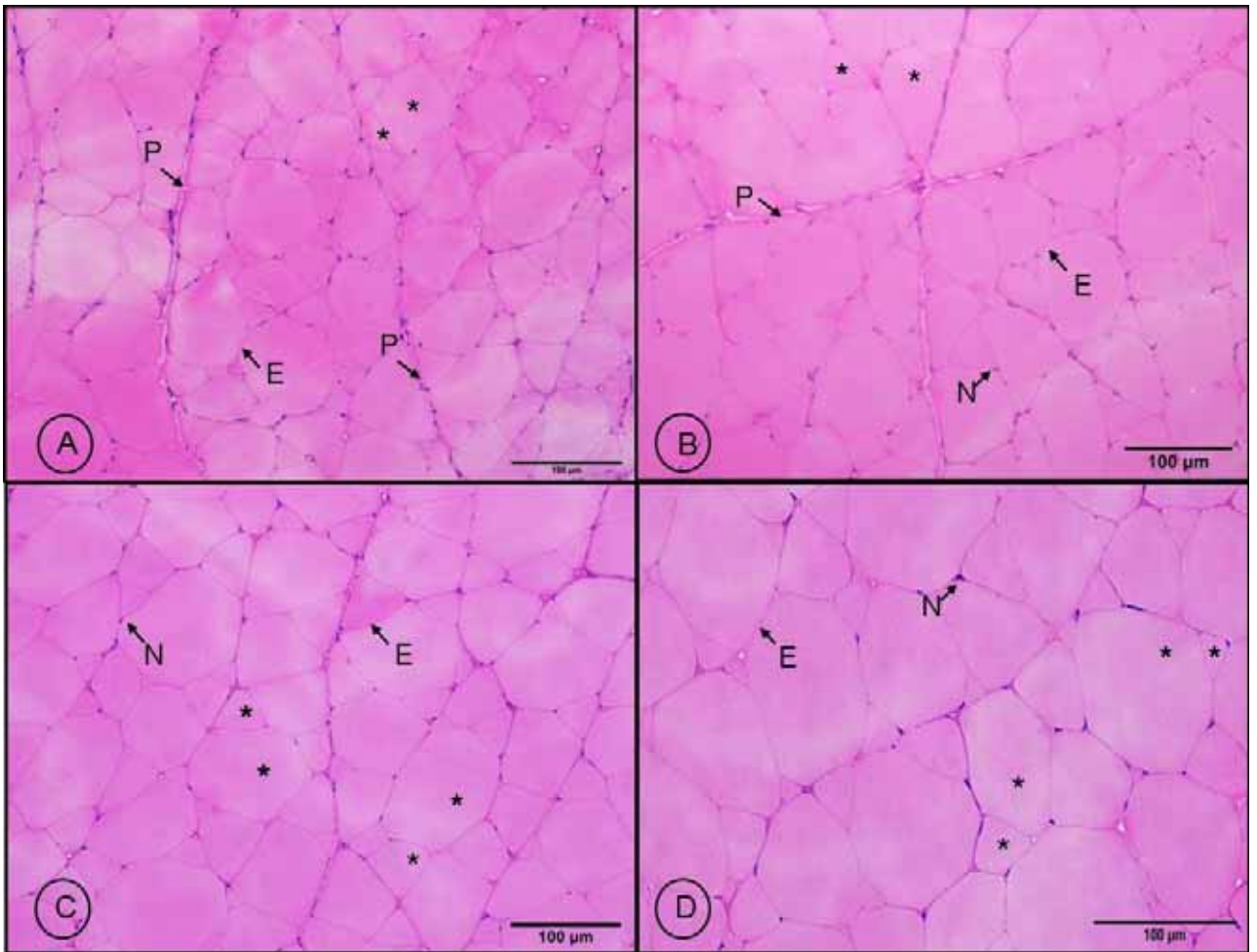


Figura 4. Secção transversal da musculatura branca de juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) aos 120 dias de experimentação. A: Tratamento 14% PD, B: Tratamento 17% PD, C: Tratamento 20% PD, D: Tratamento 23% PD, (N) Núcleos, (*) Mosaico de fibras, (P) Perimísio, (E) Endomísio. Hematoxilina/Floxina (H/FloB).

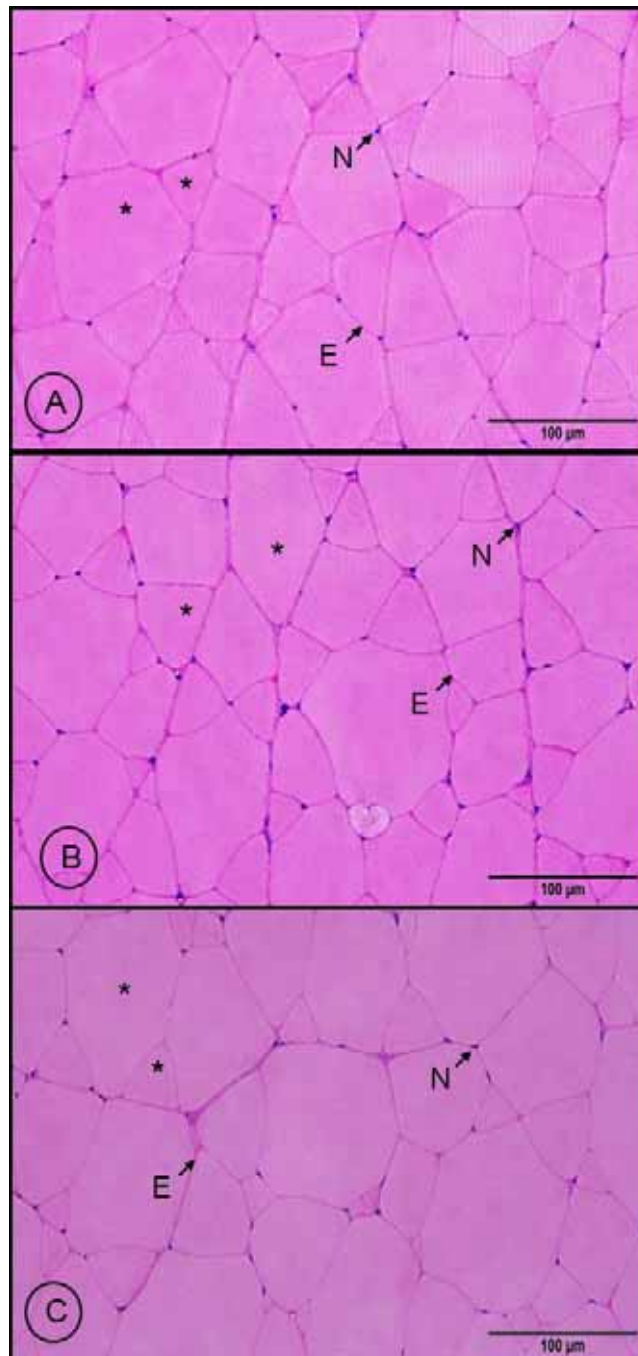


Figura 5. Secção transversal da musculatura branca de juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) aos 120 dias de experimentação. A: Tratamento 26% PD, B: Tratamento 29% PD, C: Tratamento 32% PD, (N) Núcleos, (*) Mosaico de fibras, (E) Endomísio. Hematoxilina/Floxina (H/FloB).

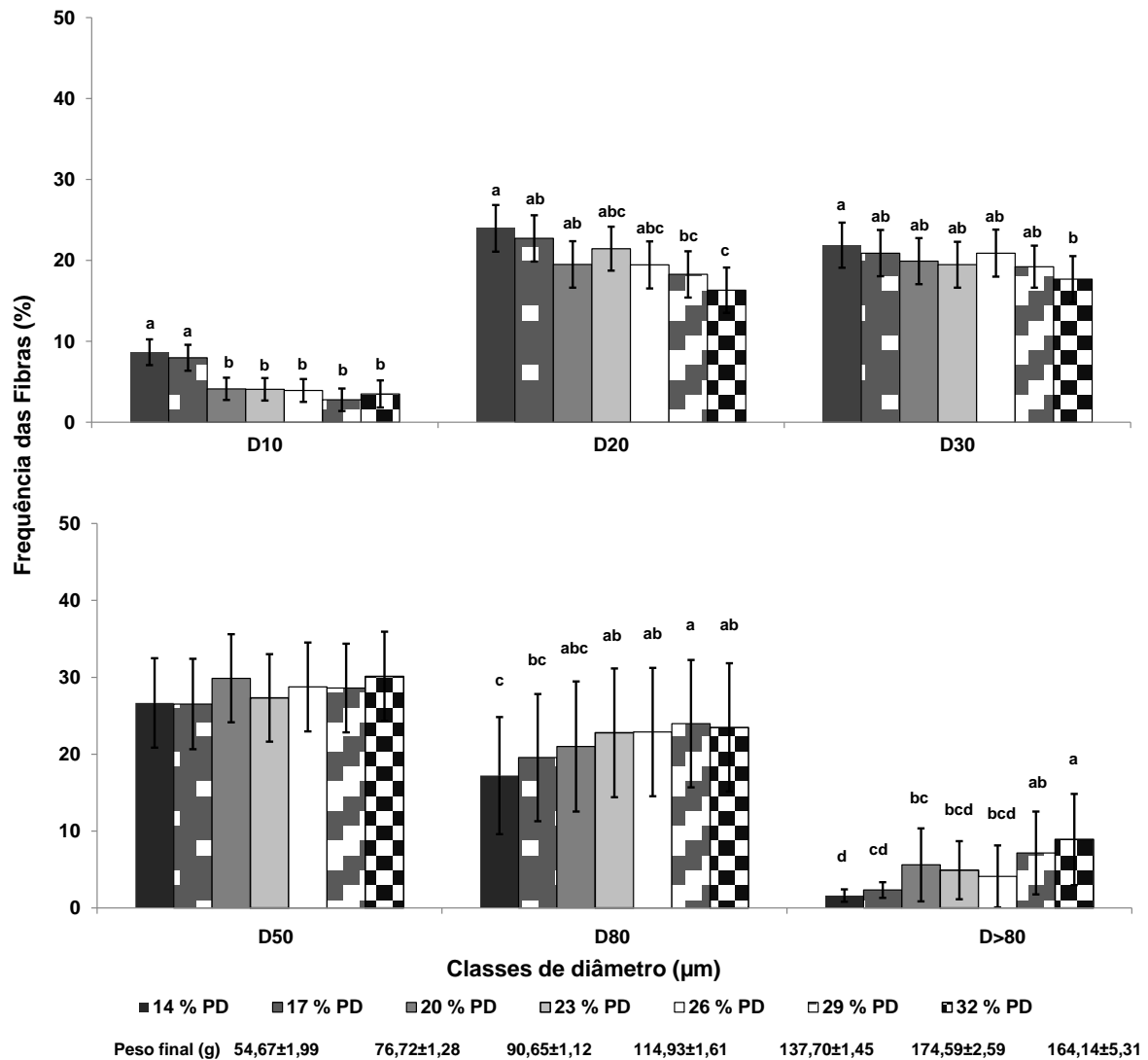


Figura 6. Distribuição das fibras musculares em classes de diâmetro em juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) aos 120 dias de experimento. Comparação feita entre os tratamentos em cada classe separadamente. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Tabela 4 - Diâmetro de fibras musculares brancas de juvenis de tambaquis alimentados por 120 dias com dietas contendo diferentes níveis proteicos¹

Diâmetros (μm)	Nível de Protéina Digestível							
	14%	17%	20%	23%	26%	29%	32%	
D 5 menores	3,04 ± 0,59	D 3,40 ± 0,83	CD 4,84 ± 0,23	A 4,67 ± 0,42	AB 4,56 ± 0,74	AB 4,63 ± 0,39	AB 3,55 ± 0,44	BCD
D 5 maiores	82,63 ± 0,09	E 83,76 ± 0,10	E 94,67 ± 1,44	C 91,96 ± 1,14	D 93,22 ± 1,23	CD 97,74 ± 0,16	B 100,9 ± 0,38	A

¹ valores de média ± desvio padrão

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

4. Discussão

4.1. Desempenho produtivo

Em estudos com exigências nutricionais para peixes objetivam alcançar o máximo potencial zootécnico da espécie em estudo, com um nível mínimo de nutriente, determinante na relação custo-benefício na composição da dieta (Portz et al., 2000). Os estudos de exigência proteica para peixe, em geral, são realizados com este nutriente na sua forma bruta. Com isso, torna-se difícil a comparação com o valor de proteína digestível apontado no presente estudo. Diversos estudos sobre exigência proteica de tambaqui produziram resultados diferentes. Macedo (1979) alimentando tambaquis em viveiros determinaram a exigência de proteína bruta para juvenis de tambaquis em 18% PB (30 a 300g). Merola e Cantelmo (1987), utilizando gaiolas flutuantes, testaram dietas com 30, 35 e 40% de proteína bruta e não obtiveram nenhuma diferença significativa na média de peso corporal final. O presente estudo mostrou que o nível de proteína digestível ideal para juvenis de tambaquis (6,50 a 175g) criados em tanques experimentais de fibrocimento foi de 29 %, que correspondeu a 32,63% de proteína bruta. Valor superior ao encontrado por Oishi et al. (2010) com 30% PB e inferior aos relatados por Santos et al. (2010) com 36% PB; De Almeida et al. (2011) com 35% PB e Van der Meer et al. (1995) com 40% PB, todos criando tambaquis em tanques experimentais e com faixa de pesos semelhantes.

Estes resultados podem ser consequência de inúmeros fatores que afetam a exigência de proteína nos peixes, dificultando a comparação dos dados. Como por exemplo, sistema de criação, temperatura da água, tamanho dos animais, duração do experimento, taxa de alimentação, densidade de estocagem, qualidade da proteína, tipo de ingrediente utilizado, nível de energia, processamento das dietas e uso de técnicas estatísticas adequadas. Geralmente, torna-se necessário a condução de mais de um estudo até a obtenção mais clara da estimativa da exigência. Contudo, deve-se considerar que a exigência seja estimada na forma de proteína digestível, pois permitirá a elaboração de dietas com adequado balanceamento para elevar o crescimento, a eficiência de utilização dos nutrientes e energia e a qualidade da carcaça para o tambaqui.

Foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de crescimento dos tambaquis. O GP melhorou com o aumento do nível da proteína na dieta e tendeu a piorar quando a exigência foi suprida, assim como o CDD, sugerindo que a relação ED/PD adequada pode ter estimulado o apetite, como relatado por Oishi et al. (2010) também estudando o tambaqui e Botaro et al. (2007) trabalhando com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). O consumo da dieta é regulado pela concentração energética da mesma (CHO, 1992) e quando a relação energia/proteína é alta, ao se saciarem, os peixes ingerem menos proteína, comprometendo o GP. Essa diferença de crescimento influenciou os dados de CA, revelando que o tratamento com menor teor proteico apresentou pior CA. O baixo nível de proteína na dieta leva a uma pior CA, provavelmente por causa da ingestão de níveis de nutrientes inadequados para promover o crescimento (Lin et al., 2010) ou mesmo pela diferença na proporção de aminoácidos entre as dietas.

No presente estudo, a TEP diminuiu significativamente com o aumento do nível de proteína digestível na alimentação, corroborando com as observações de outros trabalhos: Al Hafedh (1999) com tilápia do Nilo; Furuya et al. (2005) com tilápia do Nilo; Mohanta et al. (2008) com “silver barb” (*Puntius gonionotus*); Oishi et al. (2010) com tambaqui; Bicudo et al. (2010) com pacu (*Piaractus mesopotamicus*); Sá et al. (2014) com “Patagonian blennie” (*Eleginops maclovinus*). Estes maiores valores da TEP podem estar associados à maior utilização de energia de fontes não-proteicas (alta relação ED:PB) nos níveis mais baixos de inclusão de proteína, com o maior uso da fração proteica da dieta para crescimento (Abimorad et al. 2007).

O desempenho avaliado pela TCE variou entre 1,76 e 2,74 % por dia. Esses resultados são considerados altos quando comparados aos obtidos por Abimorad e Carneiro (2007) que registraram TCE de 0,72 a 0,85%, em estudo com pacu e por Oishi et al. (2010) com TCE de 0,80 a 0,90% em estudo com tambaqui. Por outro lado, Al Hafedh (1999) encontraram TCE de 2,51 a 3,50% em tilápias com peso inicial de 0,51g. Altas TCE podem resultar não só das diferenças entre as dietas e espécies utilizadas, mas também do menor peso inicial, uma vez que peixes menores apresentam crescimento mais acelerado e requerem mais proteína para o crescimento que peixes maiores (Webster e Lim, 2002).

A eficiência de retenção de proteína (ER_{PB}), que indica quanto da PB consumida na dieta foi convertida em PB corporal, foi menor com o aumento de proteína digestível na dieta dos tambaquis. Furuya et al. (2000) e Oishi et al. (2010) também observaram uma relação inversa entre o aumento no nível de PB na dieta e a eficiência de sua retenção na carcaça. Para Bowen (1987), o nível de PB estimado para máximo ganho em peso fornece excesso desse nutriente, reduzindo a eficiência de sua utilização, já que parte não é utilizada para a síntese proteica, sendo catabolizada e, dessa forma, o valor estimado para retenção está sempre abaixo do nível encontrado para máximo ganho em peso.

No presente estudo, os tambaquis alimentados com a dieta de níveis de proteína digestível elevados (29 e 32 %) foram capazes de reter maior quantidade dessa proteína na carcaça e não transformá-la em gordura corporal, indicando que o tambaqui aproveita de maneira eficiente esse nutriente nestas dietas. Essa característica pode conferir a esses animais uma carne mais proteica e com menos gordura, sem prejuízo econômico, fatores que são de interesse primordial aos produtores atuais. O aumento da concentração de PB corporal e diminuição da concentração de lipídios totais com o aumento da concentração proteica na dieta também foram observados por Fernandes et al. (2001), em trabalho realizado com juvenis de pacu, que possui a morfologia do trato digestório semelhante à do tambaqui.

A deposição de gordura está relacionada ao balanceamento de aminoácidos e à relação energia/proteína da dieta (Cho, 1992). A medida que os níveis proteicos foram elevados, o G_{LIP} e ER_{EB} declinaram. Isto pode estar relacionado ao fato de que uma menor fração da proteína ter sido utilizada como fonte energética, possivelmente em função do adequado balanceamento das dietas, que poderia ter atendido às necessidades energéticas dos juvenis, e não desviar a proteína de sua principal função, que é a produção de tecidos magros. Além disso, o peso dos peixes também deve ser levado em consideração, pois espera-se que peixes de maior peso apresentem maior conteúdo de gordura corporal, fato não observado no presente estudo. Porém, outros estudos comprovam tal observação (Ozorio et al., 2009; Sá e Fracalossi, 2002; Abimorad e Carneiro, 2007).

Na literatura ainda não está padronizada uma faixa considerada ideal para o IHS ou IGVS. As diferenças observadas nas médias entre os tratamentos para os parâmetros de G_L e ER_{EB} e conseqüentemente nas porcentagens de gordura e EB na composição corporal dos tambaquis tiveram uma correlação com os IHS e IGVS, ou seja, os tambaquis avaliados produziram gordura suficiente para alterar tais índices. Os tambaquis submetidos aos menores teores proteicos digestíveis apresentaram maior deposição de gordura corporal. No entanto, o estudo de exigência proteica realizado com juvenis de tilápia do Nilo por Furuya et al. (2005), em juvenis de pacu por Bicudo et al. (2010) e em “Patagonian blennie” por Sá et al. (2014) não detectaram essa correlação com os IHS e IGVS. O maior acúmulo de gordura corporal obtidos com as dietas com menores teores proteicos, pode ser explicada pelo fato destas dietas apresentarem maiores proporções de fontes energéticas não proteicas.

4.2. Morfologia e morfometria das fibras musculares

Em peixes que possuem rápido crescimento e atingem grandes tamanhos, como o tambaqui, o crescimento do músculo depende de mecanismos hiperplásicos e hipertróficos que permanecem ativos por um período prolongado, desde o desenvolvimento precoce até a idade adulta (Rowlerson e Veggetti 2001).

O comportamento de crescimento muscular observado para o tambaqui desde a coleta inicial até o final do período experimental, revela uma hiperplasia predominante no músculo esquelético dos juvenis, o que foi também observado para a mesma espécie por Alves-Costa et al. (2013b), e por outros peixes que possuem morfologia do trato digestório semelhante à do tambaqui, como o pacu (Dal Pai et al., 2000; Almeida et al., 2008, 2010; Leitão et al., 2011). Hiperplasia em mosaico não é vista em espécies de pequeno porte, pois provoca um grande aumento do número de fibras durante o crescimento juvenil, evento importante para espécies aquícolas comerciais (Rowlerson e Veggetti, 2001), incluindo o tambaqui.

O presente estudo é o primeiro a descrever o comportamento de crescimento muscular envolvendo exigência proteica digestível em tambaqui. Os peixes alimentados com 14 % de PD cresceram mais lentamente e tiveram menor ganho em proteína (Tabela 2 e Figura 6), aumento da frequência de fibras de diâmetros

menores (D10 e D20) e diminuição da frequência de fibras grandes (D80 e $D \geq 80$ μm) no compartimento profundo do músculo esquelético (fibras brancas).

Juvenis de tambaqui alimentados com 29 e 32% PD tiveram maior participação da hipertrofia no crescimento da musculatura e um crescimento mais acelerado desse tecido, acompanhado pelo maior desempenho produtivo observado. Tais fatos são confirmados pelas maiores médias de GP, CDD, TCE e G_{PB} . O processo de hiperplasia também estava acontecendo nesses tratamentos. Silva et al. (2009), também em estudo de exigência proteica para juvenis de seabream *Pagellus bogaraveo* (Brunnich), observaram que dietas acima de 40% de PB proporcionaram um maior crescimento, acompanhado de aumento no número de fibras musculares recém formadas. Johnston et al. (2002), em estudo com duas linhagens de salmão do atlântico (*Salmo solar* L.), observaram que a dieta rica em proteína favoreceu o crescimento muscular através do aumento no recrutamento das fibras (em torno de 15%). Porém, ao contrário do que foi observado para o tambaqui, alterações no teor proteico da dieta não refletiram no crescimento da fibra muscular de juvenis de salmão do atlântico observado por Bjornevik et al. (2003). Uma provável explicação, segundo os autores, está na relação energia/proteína (E:P), que, quando alta, prejudica o aporte proteico, favorece o acúmulo de lipídios e conseqüentemente, reduz o crescimento.

De acordo com Zimmerman e Lowery (1999) e Johnston et al. (2003a), o recrutamento de novas fibras durante o crescimento muscular pára quando os peixes atingem cerca de 44% do seu tamanho final; depois disso, o crescimento muscular ocorre principalmente pela hipertrofia. Almeida et al. (2010) observaram em estudo com pacu, que apresenta um rápido crescimento, que este padrão de crescimento das fibras musculares pode mudar ao longo do curso do ciclo de vida do animal. Dessa maneira, tanto o tamanho do corpo e a fase de crescimento devem ser levados em consideração em estudos da musculatura esquelética durante o crescimento dos peixes. Além disso, já foi demonstrado que fatores como mudanças no plano de nutrição, fonte de lipídio (Fauconneau et al., 1997), substituição de fontes proteicas (Alami-Durante et al., 2010) alterações no nível proteico das dietas (Johnston et al., 2002; Bjornevik et al., 2003; Silva et al., 2009), temperatura (Assis et al., 2004; Lopez-Albors et al., 2008; Paula et al., 2014), fotoperíodo (Johnston et

al., 2003b) e idade (Carani et al., 2008; Rowleron e Veggetti, 2001) podem interferir nos processos de hiperplasia e hipertrofia.

5. Conclusão

O estudo estabeleceu como ideal a exigência de proteína digestível para juvenis de tambaqui em 29%, na faixa de peso médio de 6 a 175 g. Análise morfológica e morfométrica mostrou que os diferentes níveis proteicos provocaram significativas alterações no diâmetro da fibra do compartimento profundo. Com o aumento do nível proteico em 29 e 32% de PD, o processo de crescimento hipertrófico foi favorecido, colaborando para o maior desempenho produtivo de juvenis de tambaqui.

Agradecimento

Ao Centro de Aquicultura da UNESP pelo fornecimento da estrutura para condução do experimento e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo: 2011/12963-2) e auxílio financeiro (Processo: 2012/09126-4).

Referências

- Abimorad, E.G., Carneiro, D.J., 2007. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles - fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquac. Nutr.* 13, 1-9.
- Aguiar, D.H., Barros, M.M., Padovani, C.R., Pezzato, L.E., Dal Pai-Silva, M., 2005. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *J. Fish Biol.* 67, 1287-1298.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA, vol. 1. 684p.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Al Hafedh, Y.S., 1999. Effects of dietary protein on growth and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquac. Res.* 30, 385-393.
- Alami-Durante, H., Medale, F., Cluzeaud, M., Kaushik, S.J., 2010. 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.* 303, 50-58.
- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal, D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. *Micron.* 39, 1306-1311.
- Almeida, F.L.A., Pessotti, N.S., Pinhal, D., Padovani, C.R., Leitao, N.D.J., Carvalho, R.F., Martins, C., Portella, M.C., Dal Pai-Silva, M., 2010. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu

- (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron*. 41, 997-1004.
- Alves-Costa, F.A., Barbosa, C.M., Aguiar, R.C.M., Mareco, E.A., Dal-Pai-Silva, M., 2013a. Differential Expression of Myogenic Regulatory Factor Genes in the Skeletal Muscles of Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818) from Amazonian Black and Clear Water. *Int. J. Gen.*, 9.
- Alves-Costa, F.A., Barbosa, C.M., Aguiar, R.C.M., Mareco, E.A., Dal-Pai-Silva, M., 2013b. Morphometry and expression of MyoD and Myogenin in white and red skeletal muscles of juvenile fish *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818). *Acta Zool.*, 9.
- Araújo-Lima, C. A. R.; Gomes, L. C. 2005. Tambaqui. In: B. Baldisseroto, L. C. GOMES. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Ed. da UFSM, Santa Maria, MS, pp.175-202.
- Aride, P.H.R., Roubach, R., Val, A.L. 2004. Water pH in central Amazon and its importance for tambaqui (*Colossoma macropomum*) culture. *World Aquac.*, **35**, 24–27.
- Assis, J.M.F., Carvalho, R.F., Barbosa, L., Agostinho, C.A., Dal Pal-Silva, M., 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*. 237, 251-267.
- Bicudo, A.J.A., Sado, R.Y., Cyrino, J.E.P., 2010. Growth performance and body composition of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) in response to dietary protein and energy levels. *Aquac. Nutr.* 16, 213-222.
- Bjornevik, M., Beattie, C., Hansen, T., Kiessling, A., 2003. Muscle growth in juvenile Atlantic salmon as influenced by temperature in the egg and yolk sac stages and diet protein level. *J. Fish Biol.* 62, 1159-1175.

- Bowen, S.H., 1987. Dietary-Protein Requirements of Fishes - A Reassessment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 1995-2001.
- Botaro, D., Furuya, W. M., Silva, L. C. R., Santos, L. D., Silva, T.S.C., Santos, V. G. 2007. Redução da proteína da dieta com base no conceito de proteína ideal para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 517-525.
- Carani, F.R., Aguiar, D.H., Almeida, F.L.A, Goncalves, H.S., Padovani, C.R., Silva, M.D.P., 2008. Morphology and skeletal muscle growth in pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). *Acta Sci. Biol. Sci.* 30, 205-211.
- Carneiro, D.J. 1980. Digestibilidade protéica em dietas isocalóricas para o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, Pisces). *Anais do 2º Simpósio Brasileiro sobre Aquicultura; 2º Encontro Nacional de Ranicultores.* SUDEPE, Brasília, DF, Brasil. p. 78-80.
- Cho, C.Y., 1992. Feeding systems for rainbow-trout and other salmonids with reference to current estimates of energy and protein-requirements. *Aquaculture.* 100, 107-123.
- Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregorio, E.A., Curi, P.R., 2000. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of the pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anat. Histol. Embryol.* 29, 283-289.
- Dal Pai-Silva, M., Carvalho, R.F., Pellizzon, C.H., Dal Pai, V., 2003. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue Cell.* 35, 179-187.

- De Almeida, L.C., Lundstedt, L.M., Moraes, G., 2006. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. *Aquac. Nutr.* 12, 443-450.
- De Almeida, L.C., Avilez, I.M., Honorato, C.A., Hori, T.S.F., Moraes, G., 2011. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. *Aquac. Nutr.* 17, E253-E262.
- Dubowitz, V. Normal muscle. 1985. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*, 2 ed. Bailliere Tindal, London, pp. 41-81.
- Fauconneau, B., Andre, S., Chmaitilly, J., LeBail, P.Y., Krieg, F., Kaushik, S.J., 1997. Control of skeletal muscle fibres and adipose cells size in the flesh of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 50, 296-314.
- Fernandes, J.B.K., Carneiro, D.J., Sakomura, N.K., 2001. Sources and levels of crude protein in diets for pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fingerlings. *Rev. Bras. Zootec.* 30, 617-626.
- Furuya, W.M., Hayashi, C., Furuya, V.R.B., Soares, C.M. 2000. Exigência de Proteína para Alevino Revertido de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.*, 29, 1912-1917.
- Furuya, W.M., Botaro, D., de Macedo, R.M.G., dos Santos, V.G., Silva, L.C.R., Silva, T.D., Furuya, V.R.B., Sales, P.J.P., 2005. Ideal protein concept for dietary protein reduction of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.* 34, 1433-1441.
- Golterman, H.L.; Clymo, R.S.; Ohnstad, M.A.M. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of freshwater*. London: IBP, Blackwell Sci. Pub., pp. 213.

- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture*. 177, 99-115.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Campbell, P., Mitchell, D., Whyte, D., Dingwall, A., Nickell, D., Selkirk, C., Robertson, B., 2002. Effects of dietary protein level on muscle cellularity and flesh quality in Atlantic salmon with particular reference to gaping. *Aquaculture*. 210, 259-283.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickell, D., Robertson, B., Paxton, C.G.M., Burt, M.L., 2003a. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* 206, 1337-1351.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Smart, A., Campbell, P., Nickell, D., Alderson, R., 2003b. Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. *J. Exp. Biol.* 206, 3425-3435.
- Koroleff, F. 1976. Determination of nutrients. In: Granshoffk (ed.). *Methods of seawater analysis*. Verlag. Chemic. Weinheim., pp. 117 – 187.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Com. Biochem. Physiol. A*. 110, 3-20.
- Leitao, N.J., Dal Pai-Silva, M., Almeida, F.L.A, Portella, M.C., 2011. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. *Aquaculture*. 315, 78-85.
- Lin, S., Luo, L., Ye, Y., 2010. Effects of dietary protein level on growth, feed utilization and digestive enzyme activity of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Aquac. Nutr.* 16, 290-298.

- Lopez-Albors, O., Abdel, I., Periago, M.J., Ayala, M.D., Alcazar, A.G., Gracia, C.M., Nathanailides, C., Vazquez, J.M., 2008. Temperature influence on the white muscle growth dynamics of the sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. Flesh quality implications at commercial size. *Aquaculture*. 277, 39-51.
- Macedo, E. M. 1979. Níveis de proteína bruta em dietas para o crescimento do tambaqui, *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818 (Pisces Characidae). Dissertação Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 71pp.
- Mackereth, F.J.H., Heron, J., Talling, J.F. 1978. *Water Analyses*. London: Freshwater Biological Association, pp.120.
- Merola, N., Cantelmo, O.A., 1987. Growth, feed conversion and mortality of cage-reared tambaqui, *Colossoma macropomum*, fed various dietary feeding regimes and protein-levels. *Aquaculture*. 66, 223-233.
- MPA. 2013. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília, DF,2013. <http://www.mpa.gov.br/index.php/monitoramento-e-controle/informacoes-e-estatisticas>
- Mohanta, K.N., Mohanty, S.N., Jena, J.K., Sahu, N.P., 2008. Protein requirement of silver barb, *Puntius gonionotus* fingerlings. *Aquac. Nutr.* 14, 143-152.
- Nebo, C., Portella, M.C., Carani, F.R., Almeida, F.L.A, Padovani, C.R., Carvalho, R.F., Dal-Pai-Silva, M., 2013. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 164, 268-274.
- Oishi, C.A., Nwanna, L.C., Pereira Filho, M., 2010. Optimum dietary protein requirement for Amazonian Tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, fed fish meal free diets. *Acta Amazon.* 40, 757-762.

- Ozorio, R.O.A., Valente, L.M.P., Correia, S., Pousao-Ferreira, P., Damasceno-Oliveira, A., Escorcio, C., Oliva-Teles, A., 2009. Protein requirement for maintenance and maximum growth of two-banded seabream (*Diplodus vulgaris*) juveniles. *Aquac. Nutr.* 15, 85-93.
- Paula, T.G., Almeida, F.L.A, Carani, F.R., Vechetti-Junior, I.J., Padovani, C.R., Simoes Salomao, R.A., Mareco, E.A., dos Santos, V.B., Dal-Pai-Silva, M., 2014. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 169, 31-37.
- Portz, L., Dias, C.T.S., Cyrino, J.E.P. 2000. Regressão segmentada como modelo na determinação de exigências nutricionais de peixes. *Sci. Agri.* 57, 601-607.
- Reigh, R.C.; Braden, S.L.; Craig, R.J. 1990. Apparent digestibility coefficients for common feedstuffs in formulated diets for red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Aquaculture.* 84, 321-334.
- Robbins, K.L., Norton, H.W., Baker D.H. 1979. Estimation of nutrient requirements from growth data. *J. Nutri.* 109, 1710-1714.
- Rowlerson, A., Veggetti, A. 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth, Fish Physiology Series*, 18. Academic Press, San Diego, pp.103–140.
- Sá, M.V.D.C.E., Fracalossi, D.M., 2002. Exigência Protéica e Relação Energia/Proteína para Alevinos de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Rev. Bras. Zootec.* 31, 1-10.

- Sa, R., Gavilan, M., Rioseco, M.J., Llancabure, A., Vargas-Chacoff, L., Augsburger, A., Bas, F., 2014. Dietary protein requirement of Patagonian blennie (*Eleginops maclovinus*, Cuvier 1830) juveniles. *Aquaculture*. 428, 125-134.
- Sänger, A. M.; Stoiber, W. 2001. Muscle Fiber Diversity and Plasticity. In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth, Fish Physiology Series*, 18. Academic Press, San Diego, pp. 187–237.
- Santos, L., Filho, M.P., Sobreira, C., Ituassu, D., da Fonseca, F.A.L., 2010. Protein requirement of tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*) after feed deprivation. *Acta Amazon*. 40, 597-604.
- Silva, P., Valente, L.M.P., Galante, M.H., Andrade, C.A.P., Monteiro, R.A.F., Rocha, E., 2009. Dietary protein content influences both growth and size distribution of anterior and posterior muscle fibres in juveniles of *Pagellus bogaraveo* (Brunnich). *J. Muscle Res. Cell Motil.* 30, 29-39.
- Van der Meer, M.B., Machiels, M.A.M., Verdegem, M.C.J., 1995. The effect of dietary protein level on growth, protein utilization and body composition of *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquac. Res.* 26, 901-909.
- Webster, C. D., Lim, C. 2002. Introduction to Fish Nutrition. In: _____. (Ed.). *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*: CAB Publishing, pp. 1-27.
- Wilson, R.P. 2002. Amino Acids and Proteins. In: Halver, J.E; Hardy, R.W. *Fish nutrition*. third ed., San Diego: USA: Academic Press, pp.144-179.
- Zimmerman, A.M., Lowery, M.S., 1999. Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). *J. Exp. Zool.* 284, 299-308.

CAPÍTULO 4 - *TURNOVER* ISOTÓPICO DE CARBONO $\delta^{13}\text{C}$ E NITROGÊNIO $\delta^{15}\text{N}$ NO TECIDO MUSCULAR DE JUVENIS DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum* ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA DIGESTÍVEL

Hellen Buzollo

UNESP – Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

E-mail: hellen_buzollo@yahoo.com.br

Normas para submissão ao periódico “Aquaculture”

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar o crescimento e o *turnover* dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio em tecido muscular de juvenis de tambaqui alimentados com dietas contendo diferentes níveis de proteína digestível. Foram utilizados 1750 tambaquis (peso $6,53 \pm 0,43$ g e comprimento $7,58 \pm 0,18$ cm) distribuídos em 35 tanques (450 L), na densidade de 50 peixes por tanque. Sete dietas experimentais isoenergéticas ($3378,4 \text{ cal.g}^{-1}$) foram formuladas com níveis de proteína digestível (PD) de 14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32%. Durante 120 dias de experimento, os animais cresceram ao longo do tempo, em todos os tratamentos ($P < 0,05$); e entre os períodos avaliados, os níveis proteicos de 29 e 32% destacaram-se desde as primeiras avaliações biométricas, aos 30 dias, com médias de peso semelhantes ($P > 0,05$) e superiores às médias nos demais tratamentos ($P < 0,05$). A velocidade das mudanças isotópicas no tecido muscular foi influenciada pelas características das dietas, e as taxas de *turnover* do carbono e do nitrogênio foram mais aceleradas quanto maior o nível proteico. O período de experimentação de 120 dias foi suficiente para os peixes refletirem a composição isotópica das dietas, em todos os tratamentos. Contudo, a contribuição isotópica percentual da dieta no tecido em função do tempo foi diferente, com índices que alcançaram cerca de 96 a 97%, em 49 a 63 dias de alimentação, para as dietas de 29 e 32% de PD e índices de 81 a 82% para as dietas de 14 e 17% de PD, no mesmo período. Os dados isotópicos analisados pelas equações exponenciais e pela análise exploratória evidenciaram a formação de três grupos com características homogêneas em repostas aos efeitos dos níveis proteicos, um agrupamento entre as dietas com 14, 17 e 20% de PD, outro com os teores intermediários (23 e 26%) e um terceiro com os mais elevados (29 e 32%). Assim, a dieta contendo 29% de proteína digestível mostrou ser a mais atrativa para o desempenho produtivo dos juvenis de tambaqui, na fase de crescimento estudada.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, isótopos estáveis, *turnover*, proteína, músculo.

1. Introdução

O Brasil se destaca como um dos países de maior potencial para a expansão da aquicultura, devido à extensão territorial e ricos recursos hídricos, com cerca de 20 espécies nativas cultivadas (MPA, 2013). A necessidade de desenvolver tecnologias que viabilizem a produção de espécies nativas tem levado os pesquisadores brasileiros a constantes estudos, principalmente no que diz respeito à alimentação e nutrição de peixes, uma vez que estes gastos podem atingir 60% do custo total de produção. A proteína aparece como o nutriente mais oneroso no preparo de dietas para organismos aquáticos. Dessa forma, estudos que minimizem o nível de proteína são pertinentes.

O crescimento é o critério mais importante e comumente utilizado para medir a resposta dos peixes às dietas e ingredientes experimentais (Fracalossi et al., 2013). O crescimento pode ser medido por resultados de desempenho produtivo, composição corporal e eficiência nutricional. Porém, outras ferramentas têm sido utilizadas para avaliar o metabolismo e assimilação de nutrientes dos alimentos, como os isótopos estáveis. A técnica do uso de isótopos estáveis naturais surge como alternativa segura para avaliar a deposição dos elementos de potenciais constituintes alimentares (Ducatti, 2007). Além disso, esta é uma técnica que permite verificar com precisão os diferentes momentos que os peixes começam a utilizar os nutrientes da dieta, através de retenção dos átomos de carbono e nitrogênio em seus tecidos (Jomori et al., 2008), e assim, possibilitar o estudo das taxas de *turnover* desses elementos nos tecidos animais.

Isotopicamente, o *turnover* consiste na síntese do novo tecido corporal e na degradação do velho. A taxa de *turnover* está associada ao crescimento, refletindo a composição isotópica da dieta nos tecidos animais. Grande parte dos estudos envolvendo o *turnover* de compostos celulares concentra-se em proteínas; e, em peixes, estas taxas de troca proteica foi avaliada em alguns estudos (Langar e Guillaume, 1994; de la Higuera et al., 1999; Peragon et al., 2001; Zuanon et al., 2006; Jomori et al., 2011). O tecido muscular apresenta pronunciadas mudanças na taxa de síntese e degradação proteica em resposta à qualidade da proteína dietética (de la Higuera et al., 1999). O nível de proteína não adequado na dieta está associado ao baixo valor nutricional da dieta. Isso afeta o crescimento animal, causa

prejuízos financeiros e maiores impactos ambientais pela sobrecarga de excretas do animal.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma das espécies mais criadas no Brasil. Devido ao seu hábito alimentar onívoro e oferta regular de juvenis, adapta-se a diferentes sistemas de produção, aceita rações industrializadas, mantendo um equilíbrio na ingestão qualitativa e quantitativa das fontes alimentares de origem animal e vegetal (Oliveira et al., 2013). Constituiu 20,40% da produção aquícola continental do Brasil em 2011, atingindo 111.084 toneladas (MPA, 2013). Apesar de termos algumas pesquisas sobre alimentação e nutrição desta espécie ainda há muito para ser estudado, principalmente estudos com base em nutrientes digestíveis, para obtenção de dietas nutricionalmente completas e realmente assimiladas pelos peixes.

O objetivo deste estudo foi estudar o efeito de níveis de proteína digestível em dietas práticas no *turnover* isotópico do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e do nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) no tecido muscular de juvenis de tambaqui, além de comparar a participação isotópica percentual das dietas no tecido muscular ao longo do tempo.

2. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, Jaboticabal, Brasil. Comitê de ética nº 015810/11.

2.1. Condições Experimentais

2.1.1. Pré-experimento - Padronização isotópica preliminar

Antes de iniciar o ensaio com as dietas experimentais, uma fase pré-experimental foi conduzida com o objetivo de padronizar a composição isotópica dos animais em valores próximos ao “sinal de plantas C_4 ” para que haja diferenciação isotópica das dietas teste, com sinal predominante de planta C_3 .

Primeiramente, os alimentos foram analisados quanto à composição isotópica e divididos em dois grupos: um com sinal característico de plantas do ciclo fotossintético C₄ e o outro com sinal de plantas C₃. A dieta pré-experimental foi formulada predominantemente com ingredientes de plantas "C₄" com 27% de proteína digestível (Tabela 1), determinada com base nos coeficientes de digestibilidade aparente dos alimentos (Capítulo 2). O teor em proteína digestível da dieta para os juvenis de tambaqui foi estabelecido com base nos resultados obtidos por Abimorad et al. (2014) para juvenis de pacu.

Neste período, 4000 juvenis de tambaqui (peso inicial médio de $1,29 \pm 0,31$ g e comprimento total médio de $4,35 \pm 0,38$ cm) foram distribuídos aleatoriamente em 12 tanques de fibrocimento (contendo 450 L), sob aeração e abastecimento contínuos, na densidade de 333 peixes por tanque. Os peixes receberam a dieta pré-experimental "C₄", com diâmetro de 2mm, por um período de 60 dias, com alimentação até a saciedade aparente, oferecida três vezes ao dia (8:00, 14:00 e 17:30 horas). Para análise isotópica do fragmento muscular, foram coletados cinco peixes de cada tanque, amostrados aleatoriamente a cada cinco dias.

Tabela 1. Formulação, composição bromatológica e sinais isotópicos dos ingredientes e da dieta característica de plantas C₄ (valores com base na matéria natural)

Ingredientes	Constituintes %	Composição Isotópica (‰)	
		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Farinha de salmão	23,31	-20,40 ± 0,10	12,01 ± 0,04
Glutenose de milho 60	13,50	-15,19 ± 0,05	1,88 ± 0,07
Levedura de cana	5,00	-12,35 ± 0,05	2,85 ± 0,13
Milho	34,31	-12,76 ± 0,13	3,47 ± 0,03
Sorgo	9,00	-14,16 ± 0,13	1,13 ± 0,05
Quirera de Arroz	13,00	-30,22±0,18	7,13±0,29
Fosfato bicálcico	0,25		
Calcário	0,80		
Antifúngico	0,30		
BHT, antioxidante	0,03		
Suplemento mineral e vitamínico ⁽¹⁾	0,50		
Composição Bromatológica Calculada ⁽²⁾			
Matéria Seca (%)	90,1		
Proteína Bruta (%)	31,9		
Proteína Digestível (%)	27		
Extrato Etéreo (%)	5,5		
Fibra Bruta (%)	5,2		
Matéria Mineral (%)	5,5		
Extrato Não Nitrogenado (%) ⁽³⁾	42,2		
Energia Bruta (cal/g)	4216,4		
Energia Digestível (cal/g)	3587,7		
Composição aminoácidos (%)			
<i>Aminoácidos essenciais</i>			
Arginina	1,58		
Histidina	0,61		
Isoleucina	1,13		
Leucina	2,66		
Lisina	1,50		
Metionina	0,69		
Fenilalanina	1,32		
Treonina	1,07		
Triptofano	0,18		
Valina	1,52		
<i>Aminoácidos não essenciais</i>			
Ácido Aspártico	2,38		
Ácido Glutâmico	4,63		
Alanina	1,94		
Cistina	0,38		
Glicina	1,65		
Serina	1,37		
Prolina	1,81		
Tirosina	0,96		
Composição Isotópica da Dieta C₄			
Carbono-13 (‰)		-16,91 ± 0,11	
Nitrogênio-15 (‰)		7,98 ± 0,03	

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

(2) Composição calculada a partir da composição analisada dos ingredientes

(3) ENN = MS – (PB + EE + MM + FB)

2.1.2. Fase experimental

Após o estágio de padronização isotópica do tecido muscular, 1750 peixes foram selecionados por tamanho para formação de um lote mais homogêneo (peso médio inicial de $6,53 \pm 0,43\text{g}$ e comprimento médio inicial de $7,58 \pm 0,18\text{cm}$) e distribuídos aleatoriamente em 35 tanques (contendo 450 L providos de aeração e abastecimento contínuos, por água proveniente de poço artesiano, com taxa de renovação de aproximadamente 3,5 vezes ao dia), na densidade de 50 peixes por tanque. Foram testadas sete dietas experimentais com diferentes níveis proteicos e com sinais isotópicos característicos ao de plantas do ciclo fotossintético “C₃”. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e cinco repetições, por um período de 120 dias.

Durante as duas fases, foram monitoradas algumas variáveis físico-químicas da água (Tabela 2), que mantiveram-se na faixa de conforto aceitáveis para a espécie (Araide et al., 2004; Araujo-Lima e Gomes 2005). A cada cinco dias foram realizadas as sifonagens do fundo dos tanques para a retirada dos resíduos de alimento e fezes, e a lavagem das pedras porosas.

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água durante o período pré-experimental e experimental

Parâmetros	Pré-Experimental	Experimental
Temperatura (°C) ⁽¹⁾	29,26 ± 0,05	27,65 ± 0,06
Oxigênio Dissolvido (mgL ⁻¹) ⁽¹⁾	4,76 ± 0,25	4,54 ± 0,35
pH ⁽²⁾	7,31 ± 0,21	7,73 ± 0,11
Amônia (µg L ⁻¹) ⁽³⁾	93,95± 38,20	41,82± 32,73
Nitrato (µg L ⁻¹) ⁽⁴⁾	84,69± 37,74	132,06± 36,92
Nitrito (µg L ⁻¹) ⁽⁴⁾	15,10 ± 16,41	18,32 ± 17,83
Fósforo Total (µg L ⁻¹) ⁽⁵⁾	13,10 ± 7,84	72,02 ± 63,09

(1) YSI- Yellow Springs Instruments 550A; (2) (PHTEK – pH100), (3) Koroleff, 1976; (4) Golterman et al., 1978; (5) Mackereth et al., 1978

2.2. Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas para serem isoenergéticas (3378,40 cal ED g⁻¹) e com níveis de proteína digestível (PD) de 14, 17, 20, 23, 26, 29 e 32 % (Tabela 3). As formulações foram determinadas com base nos coeficientes de digestibilidade aparente dos alimentos apresentados no Capítulo 02

As dietas experimentais, após formulação, moagem e mistura dos ingredientes, foram processadas em extrusora *Exteec*, modelo *Ex Micro*, com diâmetro médio de 5mm e secas em estufa com circulação de ar a 55 °C, durante 24 horas. Após secas, foram colocadas em sacos plásticos etiquetados e armazenadas em freezer.

As análises bromatológicas das dietas foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do CAUNESP/Jaboticabal, SP, Brasil, de acordo com as normas da AOAC (2000).

Os juvenis foram alimentados até a saciedade aparente, três vezes ao dia (8:00, 14:00 e 17:30 horas).

Tabela 3. Formulação, composição bromatológica e sinais isotópicos das dietas características de plantas C₃ contendo diferentes níveis proteicos (valores com base na matéria natural)

Ingredientes	Dietas						
	14%PD	17%PD	20%PD	23%PD	26%PD	29%PD	32%PD
Farinha de peixe	7,11	8,63	10,15	11,66	13,20	14,72	16,24
Farelo de soja	9,30	16,00	22,70	29,49	36,70	42,83	49,60
Farelo de trigo	16,00	16,90	16,08	15,60	13,65	17,00	16,53
Quirera de arroz	57,42	49,18	42,54	35,40	29,10	19,00	11,70
Óleo de soja	2,80	2,50	2,30	2,10	2,00	1,70	1,60
Óleo de peixe	2,80	2,50	2,30	2,10	2,00	1,70	1,60
Fosfato bicálcico	2,62	2,46	2,24	2,10	1,93	1,75	1,55
Calcário	1,12	1,00	0,86	0,72	0,59	0,47	0,35
Antifúngico	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
BHT, antioxidante	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Suplemento mineral e vitamínico ⁽¹⁾	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Composição Bromatológica ⁽²⁾							
Matéria Seca (%)	91,00	91,10	91,10	91,10	91,10	91,20	91,30
Proteína Bruta (%)	16,07	19,45	22,68	25,95	29,26	32,63	35,89
Proteína Digestível (%)	14,00	17,00	20,00	23,00	26,00	29,00	32,00
Extrato Etéreo (%)	8,40	8,10	7,90	7,80	7,80	7,50	7,60
Fibra Bruta (%)	5,30	3,80	5,60	5,70	5,60	6,00	6,10
Matéria Mineral (%)	3,20	5,50	4,40	5,00	5,60	6,20	6,80
ENN (%) ⁽³⁾	54,10	50,50	47,20	43,70	40,20	36,40	32,80
Energia Bruta (cal g ⁻¹)	4096,50	4112,40	4138,10	4161,90	4195,70	4216,10	4252,50
Energia Digestível (cal g ⁻¹)	3391,00	3374,50	3376,00	3374,40	3389,10	3366,40	3377,40
Composição aminoácidos (%)							
<i>Aminoácidos essenciais</i>							
Arginina	1,23	1,37	1,76	1,86	2,14	2,32	2,74
Histidina	0,32	0,38	0,52	0,52	0,62	0,66	0,72
Isoleucina	0,65	0,77	0,92	1,05	1,20	1,33	1,49
Leucina	1,10	1,39	1,52	1,74	1,97	2,17	2,41
Lisina	0,87	1,07	1,31	1,54	1,74	1,98	2,18
Metionina	0,29	0,33	0,38	0,42	0,47	0,52	0,57
Fenilalanina	0,65	0,79	1,01	1,17	1,27	1,47	1,55
Treonina	0,60	0,71	0,89	1,00	1,14	1,27	1,36
Triptofano	0,18	0,21	0,21	0,26	0,27	0,30	0,34
Valina	0,84	0,96	1,12	1,26	1,41	1,55	1,73
<i>Aminoácidos não essenciais</i>							
Ácido Aspártico	1,33	1,73	2,12	2,53	1,51	3,22	3,47
Ácido Glutâmico	2,66	3,16	3,77	4,29	4,80	5,38	5,96
Alanina	0,87	0,97	1,17	1,28	1,45	1,61	1,75
Cistina	0,22	0,27	0,22	0,31	0,35	0,34	0,40
Glicina	0,93	1,14	1,30	1,45	1,66	1,83	2,04
Serina	0,73	0,88	1,07	1,20	1,36	1,52	1,66
Prolina	0,87	1,00	1,22	1,35	1,52	1,71	1,89
Tirosina	0,50	0,59	0,69	0,78	0,90	0,95	1,10

Composição Isotópica das dietas C₃

Carbono-13 (‰)	-27,60 ± 0,31	-27,40 ± 0,02	-26,91 ± 0,13	-26,99 ± 0,17	-26,42 ± 0,02	-26,26 ± 0,10	-26,07 ± 0,29
Nitrogênio-15 (‰)	4,67 ± 0,01	4,15 ± 0,01	3,60 ± 0,01	3,27 ± 0,01	3,10 ± 0,00	2,79 ± 0,03	2,69 ± 0,01

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

(2) Composição calculada a partir da composição analisada dos ingredientes

(3) Extrativo Não Nitrogenado (ENN) = MS - (PB + EE + MM + FB)

2.3. Determinação do turnover do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e do nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) no tecido muscular: amostragens e análises isotópicas

Visando projetar a curva exponencial do *turnover* isotópico do carbono-13 (^{13}C) e do nitrogênio-15 (^{15}N) no tecido muscular, cinco peixes por tratamento (um de cada réplica) foram coletados ao acaso nos dias 0, 1, 3, 5, 8, 11, 15, 19, 24, 30, 37, 45, 54, 64, 75, 87, 100 e 120 após o início do experimento. O dia zero refletiu a composição isotópica do alimento consumido antes da troca da dieta C_4 para as sete dietas C_3 (valor isotópico inicial do tecido).

Para coleta do fragmento muscular dorsal, os juvenis de tambaqui foram eutanaziados por imersão em gelo. As amostras foram devidamente acondicionadas, identificadas, congeladas e liofilizadas até peso constante.

As amostras secas (da fase pré-experimental e experimental) foram finamente moídas em moinho criogênico a $-195\text{ }^\circ\text{C}$. Com base no fundamento de que a fração lipídica é mais pobre em carbono-13 que os carboidratos e as proteínas, deixando o tecido mais pobre em ^{13}C (Sotiropoulos et al., 2004), as amostras foram submetidas a extração de gordura pelo método de Soxhlet (em banhos de éter de petróleo por quatro horas). Posteriormente, o material desengordurado foi pesado e colocado em cápsulas de estanho (6 x 4 mm), em alíquotas de 50-70 μg e 500-600 μg para as análises de carbono e nitrogênio, respectivamente. As análises foram realizadas no espectrômetro de massa de razão isotópica, no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociência da UNESP/Botucatu, SP, Brasil com erro de análise na ordem de 0,2‰.

As comparações relativas entre as amostras e os padrões foram expressas como enriquecimento relativo em delta per mil, segundo a equação:

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ou } \delta^{15}\text{N} = \left[\left(\frac{\text{Ramostra}}{\text{Rpadrão}} \right) - 1 \right] \times 10^3, \text{ onde:}$$

R é a razão isotópica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) para as amostras e padrões, respectivamente;

$\delta\text{‰}^{13}\text{C}$ ou $\delta\text{‰}^{15}\text{N}$ é o enriquecimento das amostras em relação ao padrão internacional PDB (*PeeDee Bellemnitella* da Carolina do Sul, USA) para carbono e N_2 atmosférico para nitrogênio (Ducatti et al., 1982).

A incorporação dos átomos de carbono e nitrogênio das dietas no tecido muscular dos peixes em função do tempo foi mensurada usando o modelo exponencial descrito por Ducatti et al. (2002) para animais adultos e que foi adequado para animais em crescimento, pois a taxa de troca do isótopo (k) considera os efeitos do novo tecido adicionado (crescimento) e do *turnover* metabólico, como verificado por Zuanon et al (2006)

$$y(t) = (q/k) + [y_0 - (q/k)] e^{-kt}$$

Na expressão, as simbologias empregadas significam:

$y(t) = \delta\text{‰}^{13}\text{C}_{(t)}$ ou $\delta\text{‰}^{15}\text{N}_{(t)}$ = enriquecimento isotópico do carbono ou nitrogênio no tecido em qualquer tempo t , expresso em ‰, adimensional;

$y_0 = \delta\text{‰}^{13}\text{C}_{\text{inicial}}$ ou $\delta\text{‰}^{15}\text{N}_{\text{inicial}}$ = enriquecimento isotópico do carbono ou nitrogênio inicial, expresso em ‰, adimensional;

$q/k = \delta\text{‰}^{13}\text{C}_{\text{final}}$ ou $\delta\text{‰}^{15}\text{N}_{\text{final}}$ = enriquecimento isotópico do carbono ou nitrogênio ao atingir o patamar de equilíbrio, expresso em ‰ (valor assintótico), adimensional;

k = taxa de substituição e/ou incorporação de carbono ou nitrogênio no tecido, em unidades de tempo⁻¹;

t = tempo em dias.

Com base no valor da constante k , calculou-se a meia vida (T_{50}) do carbono-13 (^{13}C) e do nitrogênio-15 (^{15}N) no tecido muscular, que representa a condição de 50% da fonte isotópica no tecido, de acordo com a equação:

$$T_{50} = \ln 2 / k, \text{ onde:}$$

T_{50} = meia-vida em dias; \ln = logaritmo neperiano; k = taxa de substituição do carbono ou nitrogênio no tecido em unidades de tempo⁻¹.

Também considerando os valores da constante k das curvas exponenciais do *turnover* isotópico para cada tratamento, estimou-se a participação isotópica percentual da dieta no tecido muscular, no decorrer dos 120 dias de alimentação. Os Índices de Participação da dieta foram estimados pelo Modelo Matemático-Isotópico descrito em Jomori et al. (2011):

$$A = e^{-kt}, \text{ em que:}$$

A = Índice de participação da dieta na composição do tecido animal pelo carbono-13 ou nitrogênio-15 em função do tempo, em %;

K = taxa de substituição e/ou incorporação do carbono e do nitrogênio no tecido, em unidade de tempo⁻¹ (constante K da equação exponencial do *turnover*);

t = tempo em dias.

Utilizando o termo “fator de discriminação (Δ)” para expressar a diferença isotópica entre o tecido ao atingir o patamar de equilíbrio e a dieta, determinou-se o fracionamento pela equação:

$$\Delta^{13}\text{C} \text{ ou } \Delta^{15}\text{N} = \delta\%_{\text{final}} \text{ tecido muscular} - \delta\%_{\text{dieta}}$$

2.4. Avaliação do desempenho produtivo

As biometrias foram realizadas mensalmente, coletando-se 50% dos peixes de cada parcela. O desempenho foi analisado pelo peso médio dos peixes ao longo de 120 dias de período experimental.

2.5. Análises estatísticas

Os dados de peso dos animais foram analisados em delineamento inteiramente casualizado pela análise Proc Mixed, com parcela subdividida no tempo no programa SAS 9.1 (SAS Inst. Inc., Cary, North Carolina, USA). Considerando as sete dietas experimentais como tratamentos principais e os períodos de avaliação biométrica (0, 30, 60, 90 e 120 dias) como os secundários. Os valores foram avaliados quanto à normalidade (Cramer Von Mises) e homocedasticidades das

variâncias (teste de Brown e Forsythe). Quando detectadas diferenças significativas, as comparações das médias foram estudadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Os dados de enriquecimento isotópico do carbono e do nitrogênio, no tecido muscular foram ajustados para o modelo exponencial, usando o programa Origin 6.0 Professional (Microcal Software Original 6.0 Professional, 1999) Ainda, para os dados isotópicos aplicou-se a estatística multivariada, por meio de análise de agrupamento hierárquico, no software Statistica 7.0. Para a aplicação desta estatística, os dados isotópicos foram padronizados de modo que os valores fossem transformados em dados com média nula e variância unitária. A análise de agrupamento hierárquico foi processada utilizando-se a medida de dissimilaridade euclidiana como o coeficiente de semelhança. O método de agrupamento aplicado para identificar a similaridade entre grupos foi o de Ward.

3. Resultados e Discussão

3.1. Padronização Isotópica

Após 60 dias recebendo a dieta de padronização isotópica (dieta C₄) com assinatura de -16,91‰ para $\delta^{13}\text{C}$ e 7,98‰ para $\delta^{15}\text{N}$, os peixes, que inicialmente apresentavam uma composição isotópica de -18,55‰ ($\delta^{13}\text{C}$), atingiram um valor de -16,02‰, composição próxima à dieta C₄ (Figura 1A). Para o $\delta^{15}\text{N}$, o sinal isotópico alterou de 8,14‰ para 9,91‰ (Figura 1B), considerando que o tecido animal tende a ser mais rico que a dieta, em relação ao isótopo mais pesado (Ducatti, 2007).

A incorporação dos átomos da dieta foi levemente mais acelerada para ^{13}C . Pela estimativa dos Índices de Participação da dieta no tecido os valores percentuais que representam as mudanças em 60 dias de alimentação foram de 95,28 e 88,12% para o carbono-13 e nitrogênio-15, respectivamente. Os valores isotópicos (aos 60 dias) não atingiram os valores finais estimados para o patamar de equilíbrio (assíntota), que pela equação exponencial seriam valores de -15,81‰ ($\delta^{13}\text{C}$) e 10,06‰ para o ($\delta^{15}\text{N}$). Contudo, o tempo foi suficiente para garantir as mudanças isotópicas necessárias, padronizando o tecido muscular (inicial) em uma composição

isotópica distinta à das dietas experimentais (dieta C₃), e ao mesmo tempo manter o peso médio dos animais numa faixa inferior de 8 g para iniciar a fase experimental, que era tamanho inicial desejado. Com juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*, Abimorad et al. (2014) constataram pela equação exponencial uma troca de 99% dos átomos após cerca de 86,3 e 88 dias, para carbono e nitrogênio, respectivamente. Zuanon et al. (2006), em pesquisa com tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, realizaram um período experimental de 75 dias para testar as trocas isotópicas entre duas dietas (uma C₃ e outra C₄), e observaram que cerca de 53 e 66 dias, respectivamente foram suficientes para preparar os peixes para a avaliação da mudança do $\delta^{13}\text{C}$ muscular. No presente estudo, um maior período pré-experimental não foi adotado para não comprometer a fase subsequente.

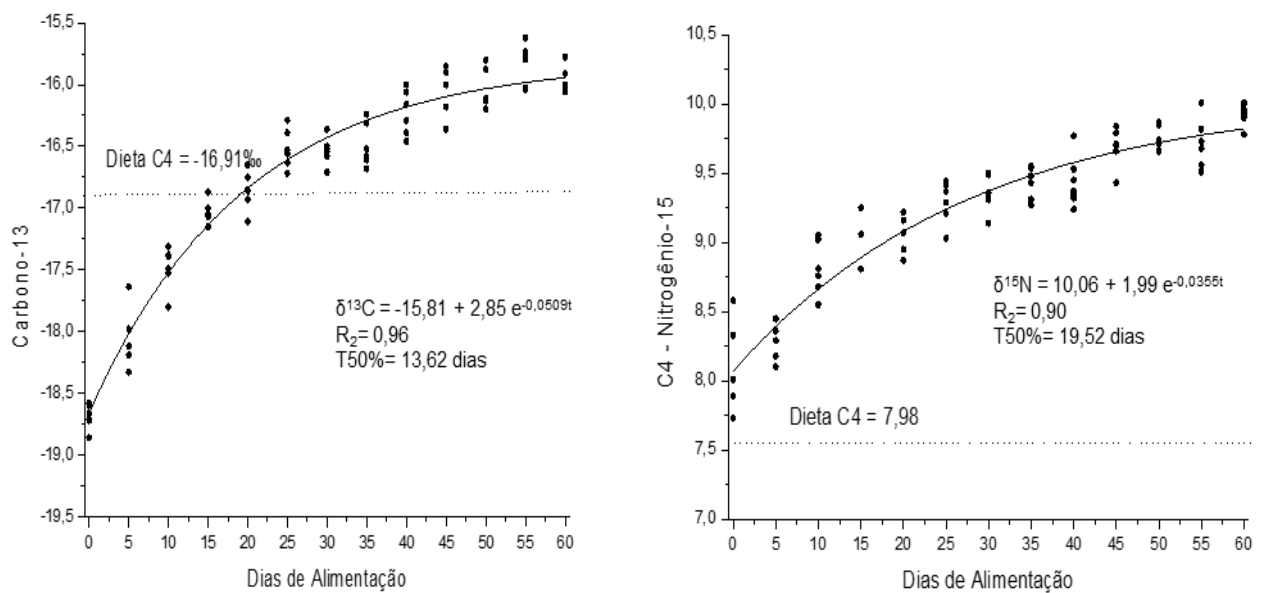


Figura 1 - Troca isotópica do carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) (A) e do nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$) (B) no tecido muscular de juvenis de tambaqui durante o período pré-experimental para padronização isotópica do tecido.

3.2. Desempenho Produtivo

O crescimento dos animais ao longo do tempo foi diferente entre os tratamentos, com perfis distintos durante os 120 dias de alimentação (Figura 2). Pela análise com parcela subdividida no tempo, o crescimento foi influenciado tanto pelos níveis de proteína digestível (PD) como pelo período experimental (PE), assim como pela interação entre os fatores ($P < 0,01$; Tabela 4). As médias de peso em cada fator variaram de 28,71 a 82,94 g entre os níveis de PD e de 21 a 116 g entre os períodos experimentais. Não houve mortalidade durante o período experimental.

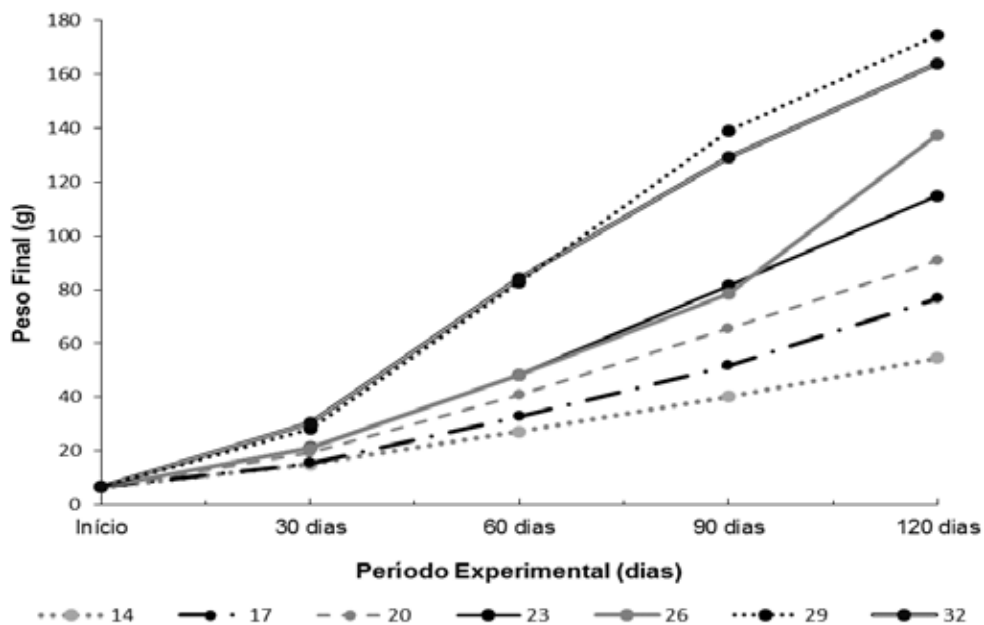


Figura 2 – Valores médios de peso (g) de juvenis de tambaquis submetidos a níveis de proteína digestível ao longo de 120 dias de alimentação.

Tabela 4. Resultados da análise de variância e médias de peso dos juvenis de tambaquis durante o período experimental de 120 dias de alimentação

Estatísticas	Parâmetro avaliado
	Peso Médio, g
Médias para nível proteico (PD):	
14% PD	28,71 ± 17,83
17% PD	36,67 ± 25,92
20% PD	44,50 ± 31,19
23% PD	54,54 ± 40,56
26% PD	58,43 ± 47,70
29% PD	84,03 ± 65,82
32% PD	82,94 ± 60,48
Médias para período experimental (PE):	
Início	6,56 ± 0,33
30 dias	21,55 ± 5,75
60 dias	52,05 ± 21,82
90 dias	83,60 ± 34,94
120 dias	116,20 ± 42,62
Valores de F para:	
Efeito dos níveis de PD	267,23**
Efeito do PE	3749,93**
Efeito da interação PD x PE	95,28**

média ± desvio padrão

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

As médias de peso foram inicialmente semelhantes ($P > 0,05$) e, em todos os tratamentos, os animais cresceram gradualmente ao longo do tempo (Tabela 5). De acordo com o desempenho apresentado no Capítulo 3, as taxas de crescimento específico variaram de 1,76 a 2,74% entre as dietas de 14% a 32% de PD.

Entre os níveis proteicos, houve diferenças estatísticas a cada período avaliado (Tabela 5). As dietas contendo 32 e 29% de PD proporcionaram um crescimento semelhante ($P > 0,05$), com médias superiores às dos demais tratamentos ($P < 0,05$). Os tratamentos com 20, 23 e 26% de PD não diferiram entre si, nos períodos experimentais de 30, 60 e 90 dias. Porém, os resultados obtidos com 20% de PD também assemelharam-se aos obtidos a 17% de PD, e o crescimento também não diferiu entre os níveis de 17% e 14% de PD, até 90 dias.

Ao final do período experimental (120 dias), apenas os peixes dos tratamentos com 29 e 32% de PD continuaram não diferindo entre si e apresentando

as maiores médias de peso. Nos demais tratamentos, o peso foi gradualmente menor, conforme diminuiu-se o nível proteico ($P < 0,05$).

Tabela 5. Médias de peso (g) de juvenis de tambaqui para o efeito da interação entre nível de Proteína Digestível (PD) e Período Experimental (PE)

PD (%)	Início	PE (dias)			
		30	60	90	120
14	6,61 ± 0,38 Ea	14,97 ± 1,66 Dd	27,16 ± 3,47 Cd	40,13 ± 4,10 Bd	54,67 ± 4,45 Af
17	6,56 ± 0,43 Ea	15,48 ± 1,66 Dcd	32,82 ± 3,04 Ccd	51,78 ± 2,37 Bcd	76,72 ± 2,85 Ae
20	6,57 ± 0,37 Ea	19,24 ± 1,02 Dbc	40,70 ± 1,37 Cbc	65,35 ± 2,55 Bbc	90,65 ± 2,49 Ad
23	6,58 ± 0,34 Ea	21,33 ± 1,68 Db	48,39 ± 4,43 Cb	81,46 ± 4,42 Bb	114,93 ± 3,60 Ac
26	6,55 ± 0,33 Ea	21,09 ± 1,61 Db	48,39 ± 3,75 Cb	78,44 ± 5,86 Bb	137,70 ± 3,24 Ab
29	6,53 ± 0,33 Ea	28,29 ± 1,85 Da	82,68 ± 5,64 Ca	138,73 ± 15,42 Ba	174,59 ± 5,80 Aa
32	6,51 ± 0,35 Ea	30,46 ± 1,49 Da	84,24 ± 7,71 Ca	129,33 ± 8,25 Ba	164,14 ± 11,87 Aa

média ± desvio padrão

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

3.3. Turnover Isotópico entre as dietas experimentais

As composições isotópicas iniciais dos juvenis de tambaqui (antes de receber as dietas experimentais) eram em média de $-16,02\text{‰}$ ($\delta^{13}\text{C}$) e de $9,91\text{‰}$ ($\delta^{15}\text{N}$). Esses valores se alteraram conforme os sinais isotópicos das dietas C_3 e, considerando que os juvenis estavam em uma fase de rápido crescimento, o período experimental de 120 dias foi suficiente para que os peixes de cada tratamento refletissem a composição isotópica da respectiva dieta (Figuras 3 e 4). O período no qual a concentração isotópica tecidual refletirá a assinatura isotópica de uma dieta dependerá, em parte, da taxa de *turnover* no tecido, que depende das taxas de aquisição, síntese e catabolismo de cada componente tecidual (Ducatti, 2007).

O *turnover* isotópico do ^{13}C e do ^{15}N no tecido muscular foi representado por diferentes padrões exponenciais (Figuras 3 e 4). As taxas de *turnover* do ^{13}C (constante k) foram crescentes com o aumento do nível proteico, variando nas faixas de 0,0276 e 0,0282 para as dietas com 14 e 17% de PD; de 0,0342 a 0,0451 para as dietas com teores intermediários (20, 23 e 26% de PD); e de 0,0512 e 0,0568 para as dietas com 29 e 32% de PD. Para o *turnover* do ^{15}N , o padrão foi similar, indicando maior síntese proteica nos animais que receberam as dietas com 29 e 32% de PD, devido a maior incorporação dos átomos de C e N no tecido muscular.

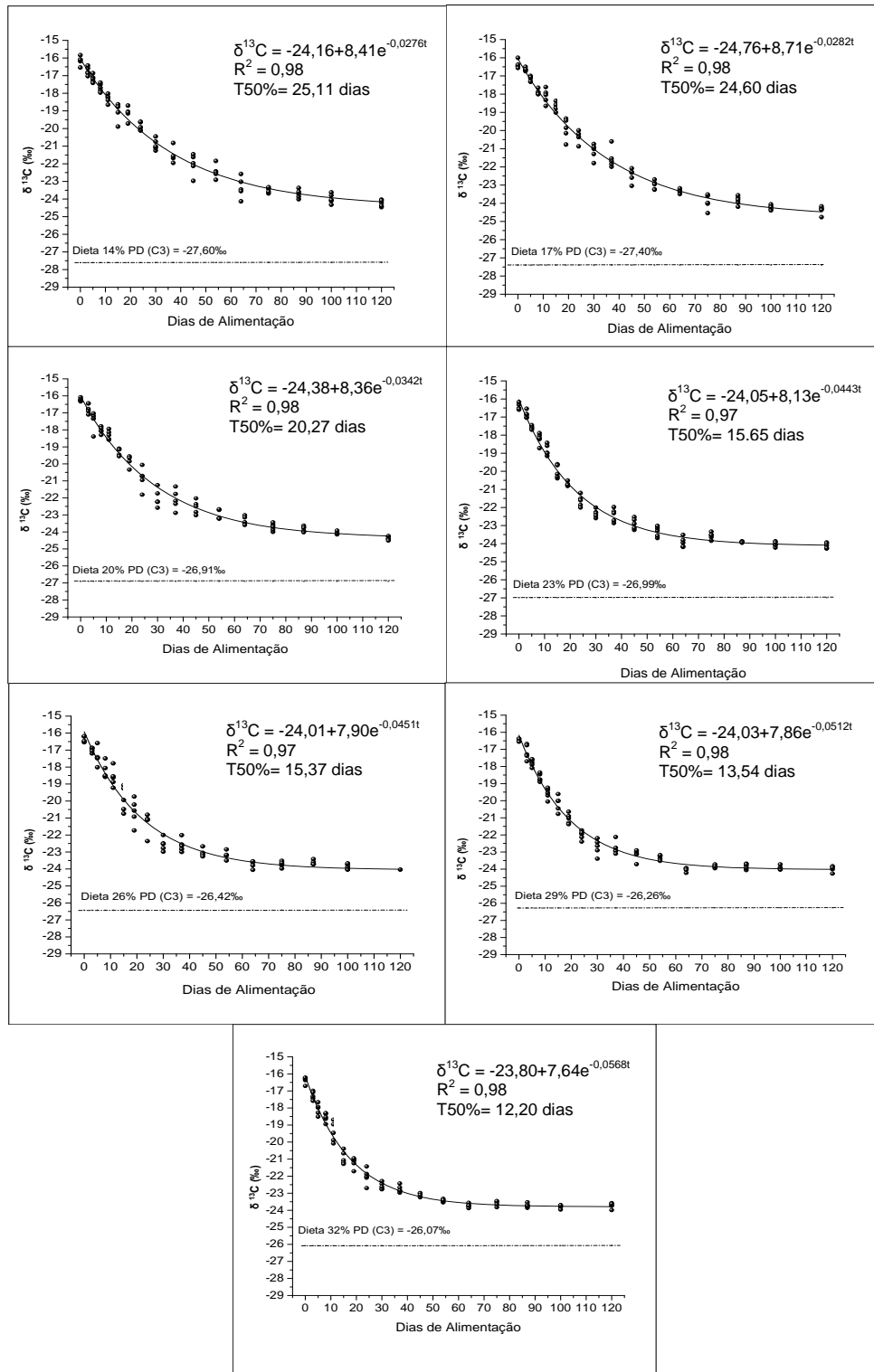


Figura 3: Troca Isotópica de ^{13}C no tecido muscular de juvenis de tambaquis alimentados com dietas contendo diferentes níveis de proteína digestível durante 120 dias.

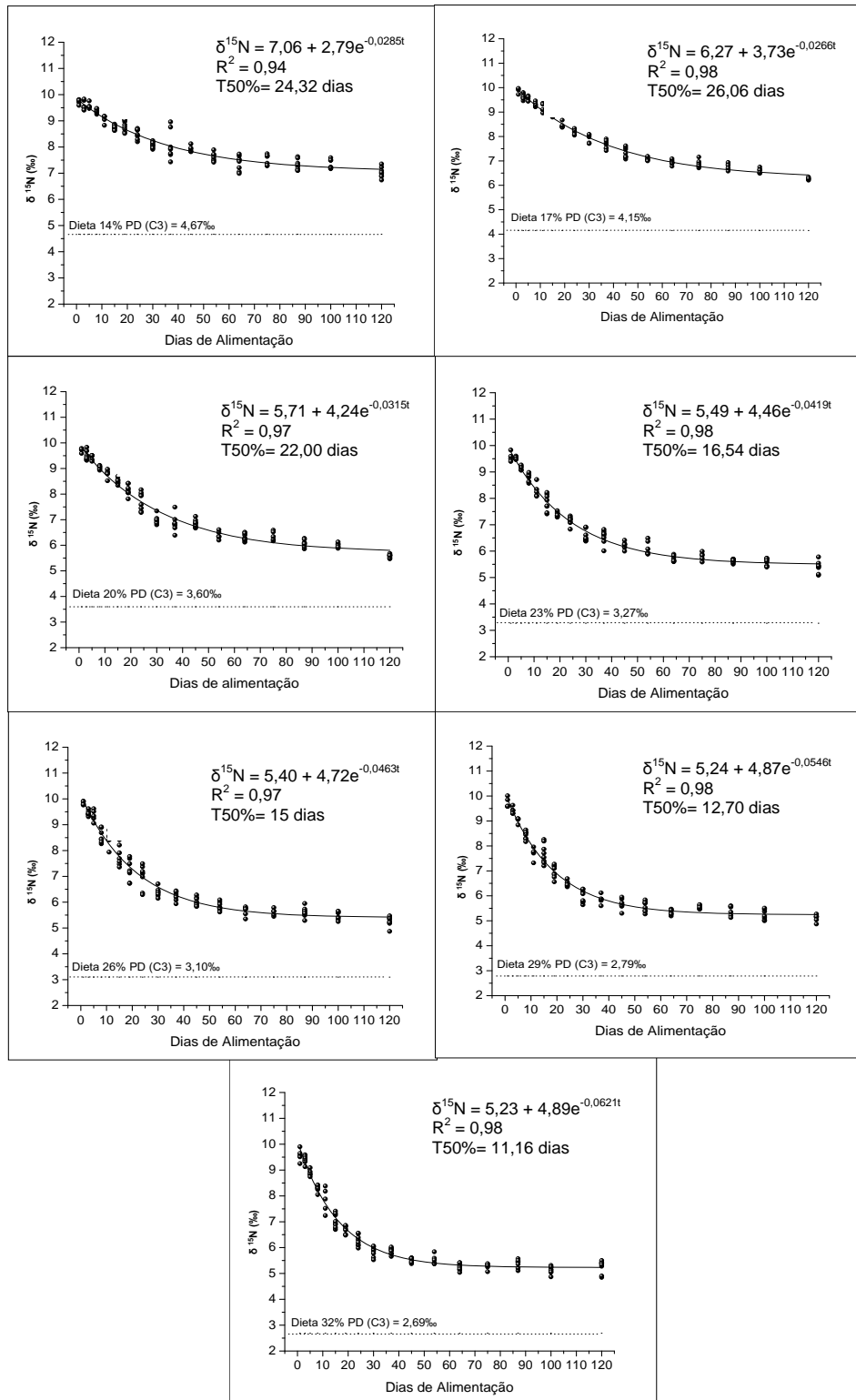


Figura 4: Troca Isotópica de ^{15}N no tecido muscular de juvenis de tambaquis alimentados com dietas contendo diferentes níveis de proteína digestível durante 120 dias.

Assim, os juvenis de tambaquis alimentados com as dietas de menores teores proteicos (de 14 e 17% de PD) alteraram a composição isotópica mais lentamente que os animais dos demais tratamentos, com valores de meia-vida (T_{50}) de aproximadamente 25,11 e 24,60 dias para o ^{13}C e de 24,32 e 26,06 dias para o ^{15}N , respectivamente. A meia-vida isotópica nos animais tratados com as dietas de 29 e 32% de PD foi alcançada em menor tempo, de aproximadamente 13,54 a 12,20 dias para o ^{13}C e de 12,70 a 11,16 dias para o ^{15}N . De acordo com Ducatti et al. (2002), um menor valor de meia-vida indica uma “alta velocidade” de metabolização ou incorporação dos isótopos estáveis no tecido em questão.

Os resultados isotópicos corresponderam às respostas de crescimento em peso (Figura 2 e Tabela 5), em que as menores taxas de crescimento refletiram um *turnover* isotópico mais lento, considerando que as mudanças isotópicas ocorreram principalmente pelo acréscimo de massa tecidual. Além das trocas isotópicas oriundas do crescimento dos animais, a taxa do *turnover* isotópico (constante K) gerada pela equação exponencial integra também o *turnover* metabólico (Zuanon et al., 2006). O *turnover* metabólico, como resultado do catabolismo proteico, foi estudado por Abimorad et al. (2014) em juvenis de pacu alimentados com dietas suplementadas (ou não) com lisina, metionina e lisina-metionina. O desmembramento da constante K em duas taxas, de crescimento e de metabolismo, mostrou que a taxa do último foi menor nos peixes que receberam a lisina suplementar, indicando uma maior contribuição da degradação proteica no *turnover* muscular na ausência desta suplementação. No presente estudo, a partição em degradação proteica e acréscimo de tecido muscular não foi estudada separadamente devido as diferenças significativas de peso obtidas entre os tratamentos ao longo de todo período experimental. Isto caracterizou a importância do fator crescimento para comparar as trocas isotópicas no tecido entre os grupos experimentais. Mudanças isotópicas do ^{13}C e ^{15}N atribuídas principalmente à taxa de crescimento dos peixes também foram verificadas por Maruyama et al. (2001), com goby (*Rhinogobius* sp.); Tominaga et al. (2003), com Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); Zuanon et al. (2006) e Zuanon et al. (2007), em estudos com tilápia do Nilo e Jomori et al. (2008), com larvas de pacu.

Pelas taxas do *turnover* isotópico, a estimativa do Índice de Participação da dieta no tecido muscular indicou que para os peixes alimentados com 29 e 32% de PD, a participação da dieta pelo ^{13}C foi de aproximadamente 96 a 97% após 63 dias de alimentação, ou seja, neste momento de 96 a 97% dos átomos de ^{13}C presente no tecido muscular eram oriundos da dieta experimental (Figura 5A). Para o ^{15}N , estes mesmos valores percentuais foram alcançados em 59 dias (Figura 5B). Para os mesmos períodos, a representatividade do ^{13}C das dietas com 14, 17 e 20% de PD foi respectivamente de 82, 83 e 88% (em 63 dias) e pelo ^{15}N , de 81, 82 e 89% (em 59 dias). As dietas contendo 23 e 26% de PD participaram com aproximadamente 92 a 94%, entre ^{13}C e ^{15}N .

A proximidade em relação à assíntota da exponencial para o $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (formação do platô ou patamar de equilíbrio), que representa mais de 99% da troca isotópica, foi alcançada em tempos de 75 a 90 dias para as dietas com 29 e 32% de PD e de 100 a 115 dias para as dietas contendo 23 e 26% de PD. Já nos peixes que receberam as dietas com 14 a 20% de PD, as trocas isotópicas ocorridas até o final do período experimental (120 dias) não foram suficientes para estabelecer o platô isotópico, indicando em média 96 a 98% de incorporação dos átomos de nitrogênio e carbono no tecido muscular.

A partir do valor da composição isotópica final, estabelecido no patamar de equilíbrio isotópico, foi determinado o fracionamento isotópico ($\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{tecido-dieta}}$ e $\Delta\delta^{15}\text{N}_{\text{tecido-dieta}}$) pela diferença entre os valores do tecido em relação à dieta. Este processo, descrito como um enriquecimento do tecido animal (no isótopo mais pesado), ocorre devido a discriminação isotópica existente durante processos como os da respiração e excreção (De Niro e Epstein, 1978; Ducatti et al., 2002). Os valores de enriquecimento isotópico em ^{15}N foram próximos entre os tratamentos, e da ordem de 2,11 a 2,54‰. Para o $\delta^{13}\text{C}$, o fracionamento aumentou com a diminuição do teor proteico, em média da ordem de 3,14 a 2,53‰ para as dietas de 14 a 20% de PD e de 2,41 a 2,23‰ para as demais. Em tilápia do Nilo, dietas pobres em proteínas causaram maior fracionamento de nitrogênio (Gaye-Siessegger et al., 2004).

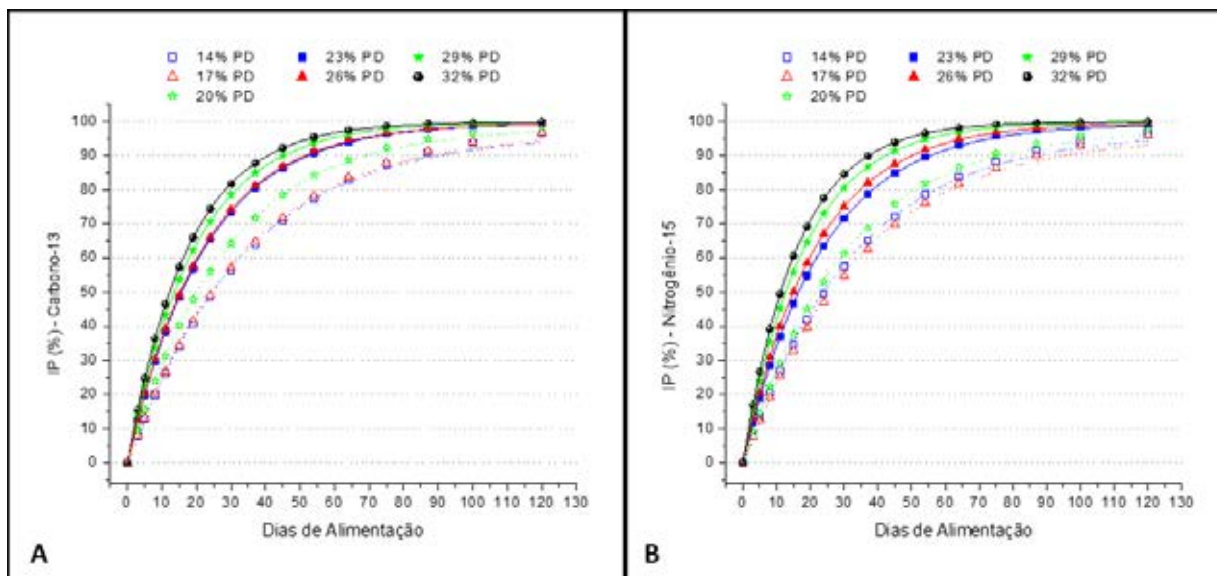


Figura 5: Índice de Participação de ^{13}C (A) e ^{15}N (B) no tecido muscular de juvenis de tambaquis alimentados com dietas contendo diferentes níveis de proteína digestível durante 120 dias.

De maneira geral, as equações isotópicas mostraram a existência de um padrão de reposta similar entre as dietas contendo 29 e 32% de PD e entre as dietas com 14 e 17% de PD. Com os teores intermediários, de 23 e 26% de PD, formou-se um outro grupo, e a dieta com 20% de proteína permaneceu entre os dois últimos. Estes agrupamentos isotópicos ficam mais evidentes pela análise exploratória de dados, pelo método de agrupamento hierárquico (Figura 6). O método hierárquico mostra, de maneira resumida, a similaridade dos resultados isotópicos separando os tratamentos em três grupos, tanto para ^{13}C como para o ^{15}N . Assim, os tratamentos mantiveram-se nos respectivos grupos no decorrer de todo período experimental, reforçando o resultado de que potencial de aproveitamento da dieta, neste estágio do crescimento, foi melhor nos maiores teores proteicos, de 29 e 32% de PD, que culminaram em maiores taxas de crescimento e em *turnover* isotópico mais acelerado. O teor de 29% de PD teve a importância destacada logo aos 30 dias de alimentação, e esta importância foi reforçada principalmente no último período (de 90 a 120 dias), pois a média de peso dos animais neste tratamento continuou sendo mais elevada. Ao contrário do peso final nos tratamentos com níveis inferiores de

proteína digestível, que foi menor quanto menos proteica a dieta. Nestes tratamentos, também ocorreram alterações na celularidade muscular, com maior frequência de fibras de diâmetros menores ($<10\ \mu\text{m}$) nas dietas de 14 e 17% de PD e de fibras musculares de grandes diâmetros ($D \geq 80\mu\text{m}$) nas de 29 e 32% de PD (Buzollo, 2014 – Capítulo 3).

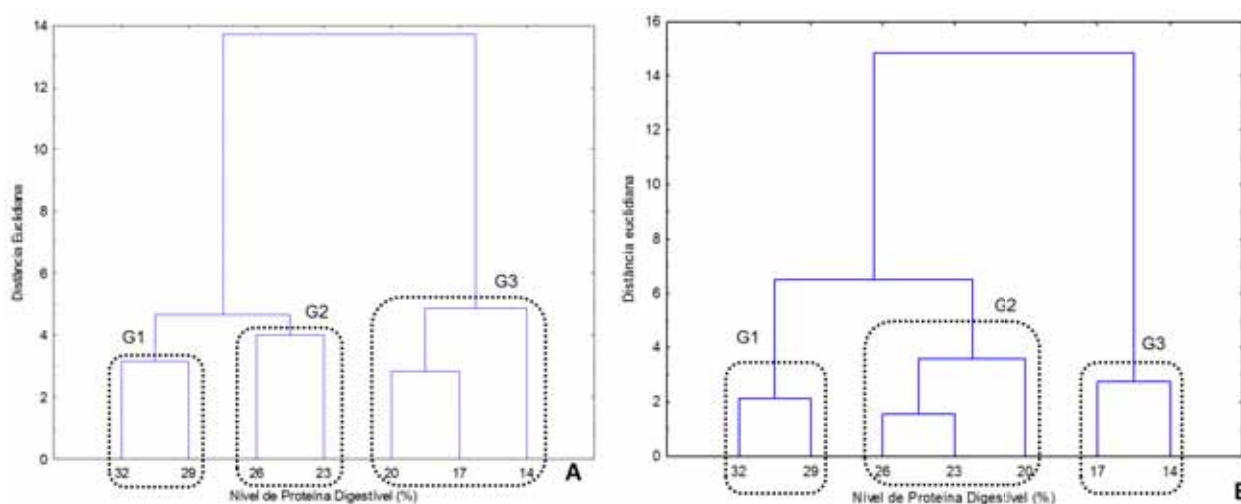


Figura 6: Análise de agrupamento hierárquico. **A** – Grupos formados para sinais de $\delta^{13}\text{C}$ no tecido muscular de juvenis de tambaquis ao longo do período experimental. **B** - Grupos formados para sinais de $\delta^{15}\text{N}$ no tecido muscular de juvenis de tambaquis ao longo do período experimental.

Os resultados isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no tecido muscular complementaram as informações de desempenho produtivo dos animais. Seguindo as premissas metodológicas necessárias, a técnica dos isótopos estáveis permitiu estimar a contribuição percentual das dietas na formação do tecido muscular, ao longo do tempo. Essa precisão foi primordial para assegurar que o nível proteico de 29% de proteína digestível, entre os de 14 a 32%, garante os melhores resultados de desempenho ao longo da fase avaliada. O nível de 32% de PD mostrou-se também importante para o crescimento do tambaqui, no entanto, levando em consideração o custo da proteína, a dieta com 29% de PD torna-se mais atrativa. As informações serão úteis para auxiliar na formulação de dietas com níveis de proteína digestível ideais para os juvenis de tambaqui, visando um bom desempenho produtivo,

melhorias nas condições ambientais de criação (devido a menor excreção de nutrientes) e conseqüentemente, menor custo de produção, uma vez que a proteína é a fração mais onerosa na dieta dos peixes.

4. Conclusão

Os níveis de proteína digestível, de 14 a 32%, em dietas práticas para juvenis de tambaqui, alteram o *turnover* isotópico do carbono-13 e nitrogênio-15 no tecido muscular, acelerando a participação percentual da dieta na composição isotópica do tecido com o aumento do teor proteico. As equações isotópicas, juntamente com a análise exploratória de dados, permitiram a formação de grupos com características homogêneas, manifestadas ao longo de todo o período, em resposta aos efeitos dos níveis proteicos, com destaque para a dieta contendo 29% de PD, que foi a mais adequada para desempenho produtivo dos animais.

Agradecimento

Ao Centro de Aquicultura da UNESP pelo fornecimento da estrutura para condução do experimento e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo: 2011/12963-2) e auxílio financeiro (Processo: 2012/09126-4).

Referências

- Abimorad, E.G., Ducatti, C., Castellani, D., Jomori, R.K., Portella, M.C., Carneiro, D.C., 2014. The use of stable isotopes to investigate the effects of supplemental lysine and methionine on protein turnover and amino acid utilization in pacu, *Piaractus mesopotamicus*, juveniles. *Aquaculture*. 433, 119–124.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Araújo-Lima, C. A. R.; Gomes, L. C. 2005. Tambaqui. In: B. Baldisseroto, L. C. GOMES. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Ed. da UFSM, Santa Maria, MS, pp.175-202.
- Aride, P.H.R., Roubach, R., Val, A.L. 2004. Water pH in central Amazon and its importance for tambaqui (*Colossoma macropomum*) culture. *World Aquac.*, **35**, 24–27.
- Deniro, M. J.; Epstein, S., 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 42, 495-506.
- de la Higuera, M., Akharbach, H., Hidalgo, M.C., Peragon, J., Lupianez, J.A., Garcia-Gallego, M., 1999. Liver and white muscle protein turnover rates in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of dietary protein quality. *Aquaculture*. 179, 203-216.
- Ducatti, C., Matsui, E., Salatti, E. 1982. Fundamentos teóricos dos fatores de correção para a análise das variações relativas das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ por espectrometria de massa. *Energ. Nucl. Agric.* 4, 41-58.
- Ducatti, C., 2007. Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 1-10.

- Ducatti, C., Carrijo, A.S., Pezzato, A.C., Mancera, P.F.D.A., 2002. Modelo teórico e experimental da reciclagem do Carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. *Sci. Agri.* 59, 29-33.
- Fracalossi, D. M., Rodrigues, A.P.O., Silva, T. S.C., Cyrino, J. E. P., 2013. Técnicas Experimentais em nutrição de peixes, in: Fracalossi, D. M., Cyrino, J. E. P. (Eds.), *Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*, 1stEd. Ampliada, Florianópolis, pp. 37-64.
- Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Abel, H., Becker, K., 2004. Individual protein balance strongly influences delta N-15 and delta C-13 values in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Naturwissenschaften.* 91, 90-93.
- Golterman, H.L., Clymo, R.S., Ohnstad, M.A.M. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of freshwater*. London: IBP, Blackwell Sci. Pub., pp. 213.
- Jomori, R.K., Ducatti, C., Carneiro, D.J., Portella, M.C, 2008. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquac. Res.* 39, 370-381.
- Jomori, R.K., Ducatti, C., Abimorad, E.D.; Assano, M., 2011. Relative contribution of formulated diet by carbon isotopic *turnover* in muscle of the fish juveniles. In: *World Aquaculture 2011. Abstracts.* p.574.
- Koroleff, F. 1976. Determination of nutrients. In: Granshoffk (ed.). *Methods of seawater analysis*. Verlag. Chemic. Weinheim., pp. 117 – 187.
- Langar, H., Guillaume, J., 1994. Effect of feeding pattern and dietary-protein source on protein-synthesis in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 461-466.

- Langar, H., Guillaume, J., Metailler, R., Fauconneau, B., 1993. Augmentation of protein-synthesis and degradation by poor dietary amino-acid balance in European sea bass (*Dicentrarchus-labrax*). *J. Nutr.* 123, 1754-1761.
- Mackereth, F.J.H., Heron, J., Talling, J.F. 1978. *Water Analyses*. London: Freshwater Biological Association, pp.120.
- MPA. 2013. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília, DF,2013. <http://www.mpa.gov.br/index.php/monitoramento-e-controle/informacoes-e-estatisticas>.
- Maruyama, A., Yamada, Y., Rusuwa, B., Yuma, M., 2001. Change in stable nitrogen isotope ratio in the muscle tissue of a migratory goby, *Rhinogobius* sp., in a natural setting. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 2125-2128.
- Oliveira, A.C.B.; Miranda, E.; Correa, R. 2013. Exigências nutricionais e alimentação do tambaqui. in: Fracalossi, D. M., Cyrino, J. E. P. (Eds.), *Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse ara a aquicultura brasileira*, 1stEd. Ampliada, Florianópolis, pp. 231-240.
- Peragon, J., Barroso, J.B., Garcia-Salguero, L., de la Higuera, M., Lupianez, J.A., 2001. Growth, protein-turnover rates and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development. *International J. Biochem. Cell Biol.* 33, 1227-1238.
- Sotiropoulos, M.A., Tonn, W.M., Wassenaar, L.I. 2004. Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. *Ecology Freshwater Fish.* 13, 155–160.
- Tominaga, O., Uno, N., Seikai, T., 2003. Influence of diet shift from formulated feed to live mysids on the carbon and nitrogen stable isotope ratio (δ C-13 and

delta N-15) in dorsal muscles of juvenile Japanese flounders, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 218, 265-276.

Zuanon, J.A.S., Pezzato, A.C., Pezzato, L.E., Passos, J.R.S., Barros, M.M., Ducatti, C., 2006. Muscle delta C-13 change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects of growth and carbon turnover. *Comp. Biochem. Physiol.* 145B, 101-107.

Zuanon, J.A.S., Pezzato, A.C., Ducatti, C., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Passos, J.R.S., 2007. Muscle delta C-13 change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings fed lants grain-based diets. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A, 761-765.