

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

Exigências Proteicas de Juvenis de Zebrafish (*Danio rerio*)

Guilherme Eduardo Sassi

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Zootecnia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Botucatu
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

Exigências Proteicas de Juvenis de Zebrafish (*Danio rerio*)

Guilherme Eduardo Sassi

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. **Luiz Edivaldo Pezzato**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Zootecnia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S252e Sassi, Guilherme Eduardo, 1988-
Exigências proteicas de juvenis de Zebrafish (*Danio rerio*) / Guilherme Eduardo Sassi. - Botucatu: [s.n.], 2016
v, 49 f. : fots. color., grafs. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2016

Orientador: Luiz Edivaldo Pezzato

Inclui bibliografia

1. Peixe ornamental - Alimentação e rações. 2. Proteínas na nutrição animal. 3. Peixes - Crescimento. I. Pezzato, Luiz Edivaldo. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Dedicatória

Dedico esta conquista,

Aos meus pais,

Benedito Carlos Sassi e Sueli Conceição Alves Sassi,
pelo amor, carinho e todo incentivo prestado a mim!
Eles são meu alicerce e exemplo.

À meus familiares,

Marita Cristina Sassi, Fabiano José Stahl, Gabriely Sassi Caetano e Rafaely Sassi Stahl,
Pela amizade e apoio prestado a todo momento.

A minha namorada,

Bruna de Almeida Guimarães,
Pela ajuda, amizade, e cumplicidade em todos os momentos.

Ao meu orientador,

Professor Doutor Luiz Edivaldo Pezzato,
Pela amizade, paciência e todo incentivo para trabalharmos juntos!
Um grande exemplo de vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde, persistência e alegria em todo momento para superar meus desafios. Sou grato por tudo que já me proporcionou, Obrigado Senhor.

À minha família e namorada, que apoiaram e torceram por mim nos bons e maus momentos, me fortaleceram e proporcionaram momentos de alegria por toda caminhada. Muito obrigado, amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pela orientação, paciência, confiança, amizade, risadas, companheirismo e ensinamentos. Obrigado pela ajuda e incentivo na minha formação, sou muito grato a todos os momentos em que passamos juntos, foi uma honra trabalhar ao seu lado!

À Profa. Dra. Margarida Maria Barros, pela amizade, carinho, ajuda, ensinamentos e todas contribuições para realização deste trabalho, sempre me ajudou desde o tempo de graduação, tenho muito a agradecer, me sinto honrado em ter trabalho com a Profa. Dra. Margarida Maria Barros, muito obrigado.

À Profa. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – FCA/UNESP/Botucatu, pela contribuição e ajuda nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Dirlei Antonio Berto, pela amizade, companheirismo e ensinamentos prestados ao longo deste tempo, sou grato por todos momentos em que passamos juntos, Muito Obrigado.

À Hinglidj de Carvalho Muller (Kbrita), aluna do curso de graduação em Zootecnia – FMVZ – UNESP – Botucatu, pelo companheirismo e ajuda nas análises bromatológicas.

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique Nobrega, Departamento de Morfologia – IBB – UNESP - Botucatu, e seus alunos de Pós-graduação, pelos ensinamentos e ajuda

prestada neste trabalho, Muito Obrigado.

Aos meus amigos, Renan de Mattos Botelho, Pedro Luiz P. F. de Carvalho (Revoltado), Renie Venn Chan (China), Lucas Duarte (Careca), Rafael Santos de Almeida (Portuga), Matheus Trento (Axila), Mauricio Barros e Renan Diego de Souza, pela amizade, companheirismo e ajuda proporcionada. Muito obrigado!

Aos amigos do Laboratório de Nutrição de Peixes – AquaNutri: Caroline P. Teixeira, Ademir C. Fernandes Júnior, João Fernando A. Koch, Lara Genovez, Jakeline Marcela A. de Freitas, Juliana Mara Costa, Mariucha K. H. Rocha, Rafael L. da Silva, Pedro P. F. de Carvalho, Eric P. de Araújo, Guilherme Eduardo Sassi, Leonardo Sato, Igor S. Tiagua, Paula Novelli, Paula Lima, Rafael Santos de Almeida, Hinglidj de Carvalho Müller, Renie Venn Chan, Matheus G. Trento, agradeço a todos pela imensa ajuda e amizade!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da FMVZUNESP, Botucatu, pelos ensinamentos e disposição em ajudar seus alunos.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação da FMVZ, Seila C. C. Vieira e Ellen Cassemiro Guilhen.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.
Muito Obrigado!

TABELAS

	Página
CAPÍTULO – I	
Tabela 1 : PROTEIN REQUERIMENTS OF ORNAMENTAL FISH SPECIES.....	10
CAPÍTULO – II	
Tabela 1. FORMULATION (%) AND ANALYZED COMPOSITION OF EXPERIMENTAL DIETS.....	38
Tabela 2. GROWTH PERFORMANCE OF ZEBRAFISH FED EXPERIMENTAL DIETS FOR 62 DAYS.....	39
Tabela 3. NUTRIENT AND ENERGY UTILIZATION OF ZEBRAFISH FED EXPERIMENTAL DIETS FOR 62 DAYS.....	40
Tabela 4. WHOLE-BODY COMPOSITION (WET WEIGHT BASIS) OF ZEBRAFISH FED EXPERIMENTAL DIETS FOR 62 DAYS.....	41

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO – I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	02
Revisão de Literatura	02
Zebrafish	04
Zebrafish como Modelo Biológico	07
Exigências Proteicas dos Peixes Ornamentais	08
Dietas Experimentais	12
Processo de Digestão	14
Referências	16

CAPÍTULO – II

Exigência Proteica de Juvenis de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	25
Resumo	25
Abstract	26
Introdução	27
Material e Métodos	28
<i>Dietas experimentais</i>	28
<i>Experimento</i>	29
<i>Análises químicas</i>	30
<i>Parâmetros de crescimento e de utilização do alimento</i>	30
<i>Análises estatísticas</i>	31
<i>Análise Variância Multivariada</i>	32
<i>Análise de Componente Principal (PCA)</i>	32
Resultados	32
<i>Desempenho produtivo</i>	32
<i>Utilização dos nutrientes</i>	32
<i>Composição centesimal</i>	33
Discussão	34
Conclusão	37
Referências	45

CAPÍTULO - I

CAPÍTULO – I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe pertencente à família dos ciprinídeos (NELSON, 1994), originários de rios da Índia, encontrado pela primeira vez no delta do rio Ganges, tem o corpo fusiforme e achatado lateralmente, com listras horizontais escuras em toda a extensão do corpo (Figura 1), motivo pelo qual é conhecido como Zebrafish (SPENCE et al., 2008).



Figura 1. Zebrafish (Dowling, 2012)

Atualmente esta espécie vem sendo usada como modelo biológico, apresentando 70% de semelhança genética com mamíferos, abrangendo a espécie humana (JONES & RACHEL, 2007), o que possui notáveis características que favorecem as pesquisas, incluindo: pequeno tamanho, fácil manejo em laboratório, curto intervalo de geração (12 a 14 semanas), prole numerosa, facilidade de reprodução e alta produção de ovos férteis (CLARK, 2003). Além disso, o zebrafish conta com ferramentas moleculares e informações genômicas que facilitam os estudos com toxicologia, neurobiologia e genética molecular (JOHNSTON et al., 2008; KALUEFF et al., 2014).

Segundo Eaton e Farley (1974) há grandes variações nas taxas de crescimento dessa espécie por não se ter as exigências nutricionais definidas. Segundo esses autores, isso seria responsável pela falta de uniformidade nas taxas de crescimento,

baixa taxa de sobrevivência dessa espécie e grande quantidade de animais contendo deformidades.

Dada a utilização do zebrafish como modelo no desenvolvimento biológico, especialmente durante o início da ontogese, é surpreendente observar que suas larvas são utilizadas para diversos protocolos de primeira alimentação (KAUSHIK, 2011), devido a facilidade em buscar alimentação inerte e não ocorrer canibalismo entre elas.

Embora a literatura apresente poucas informações nutricionais sobre a espécie, pesquisas referentes à sua reprodução, manejo em laboratório e envolvimento com o ambiente vêm aumentando devido a sua importância como modelo biológico (LIU et al., 2013).

O conhecimento das necessidades nutricionais de diferentes espécies de peixes ornamentais é um dos primeiros passos para a criação de novas tecnologias para a sua produção (SALES & JANSSENS, 2003). Essas informações são fundamentais para que seja possível a formulação de rações adequadas para cada espécie (BOONYARATPALIN & LOVELL, 1977).

Determinar as exigências nutricionais de determinada espécie de peixe significa quantificar e qualificar sua necessidade em energia, proteína, aminoácidos, lipídios, ácidos graxos, vitaminas e minerais (PEZZATO et al., 2004). Entretanto essa busca é complexa, uma vez que as exigências são específicas e variam em função de alguns fatores, como: sexo, estágio de maturação sexual, sistema de produção, idade, frequência e taxa de arraçamento, além da qualidade da dieta (PEZZATO et al., 2004).

Em dietas para peixes, a proteína além de onerosa é o nutriente de importância para o desenvolvimento da espécie. Portanto, deve se atender as exigências proteicas para obter adequado crescimento (NUNES, 2011; ABDEL-TAWWAB, 2012).

É necessário conhecer as exigências nutricionais para padronização de dieta referência, que possa ser utilizada em pesquisas com o Zebrafish. Isso é importante pelo fato de que ingredientes específicos da dieta, níveis de nutrientes e, ainda, a presença de fatores antinutricionais podem intervir nas respostas fisiológicas dos peixes adultos e de sua prole (SICCARDI-III et al., 2009).

Sendo a proteína o nutriente de máxima importância na dieta, é de fundamental importância o fornecimento de ração com adequado teor proteico e balanço aminoacídico, são importantes, pois a porção proteica que não for digerida e absorvida será excretada (PEZZATO et al., 2009). O suprimento dietário de proteína é determinante na produtividade dos peixes e, da produção e excreção de resíduos nitrogenados na água (TIBBETTS et al., 2000), pois o excesso pode reduzir o desempenho dos animais e poluir o ambiente de criação e os corpos d'água que receberem os efluentes.

Portanto, a obtenção de informações sobre o melhor nível de proteína na dieta, com consequências para o crescimento, eficiência de utilização de nutrientes e redução no custo da ração são importantes para a formulação de dieta balanceada que atenda as exigências do zebrafish (*Danio rerio*).

Zebrafish

Com o mapeamento do genoma, a genética permite conhecer e identificar os genes responsáveis pelo crescimento de algumas espécies animais; sendo possível, ainda, mapear as regiões de locos das características quantitativas que afetam o crescimento das espécies cultivadas (DAVIS & HETZEL, 2000; FJALESTAD et al., 2003; REID et al., 2005; ARANEDA et al., 2008; LO PESTRI et al., 2009; DUMAS et al., 2010).

Segundo Barbazuk et al. (2000), existe sintonia compartilhada entre os genomas do homem e do Zebrafish. Neste aspecto, o zebrafish tornou-se modelo genético com ampla variedade de ferramentas moleculares e informações disponíveis para análise genômica, embora não perfeito.

Nativo das bacias hidrográficas do Ganges e Brahmaputra, localizadas no nordeste da Índia (SPENCE et al., 2007a), o zebrafish (*Danio rerio*) pertence a família Cyprinidae (NELSON, 1994), tendo como habitat águas dulcícolas e lênticas (FANG, 2001), bem como áreas de várzea. Seu tempo médio de vida é de 42 meses, porém GERHARD et al. (2002) mantiveram o zebrafish por aproximadamente 66 meses. KISHI et al. (2003) informaram que *D. rerio* com idade avançada mantidos em cativeiro, podem ter deformidades esqueléticas e degeneração muscular.

Com cerca de 5 a 7 semanas após a eclosão (10 a 15 mm de comprimento total) inicia o processo de desenvolvimento dos testículos no zebrafish, passando por uma fase inter sexual e, no terceiro mês (12 a 17 mm de comprimento total) o processo de diferenciação gonadal se torna completo. Porém, o desenvolvimento gonadal depende das condições de criação e das características genéticas (MAACK & Segner, 2003; SPENCE et al., 2008).

O zebrafish tem o hábito de viver em cardume, podendo constituir grupos que variam de 5 a 20 indivíduos, o que pode facilitar a sua reprodução uma vez que essa espécie desova em pequenos grupos. Na época reprodutiva os machos são territorialistas e perseguem ativamente as fêmeas (SPENCE et al., 2008). Estes, por sua vez, parecem orientar suas escolhas por meio de sinais químicos (LAWRENCE, 2007; SPENCE et al., 2008). As fêmeas depositam os ovos no substrato e estes são fertilizados pelos machos. Após eclosão, entre quarto a sete dias as larvas começam a ter natação livre e buscam alimentos vivos (BREder & ROSEN, 1996). Em condições controladas de laboratório, os machos podem ser mantidos separados das fêmeas, pois quando unidos podem gerar desovas viáveis, porém irregulares ao longo do tempo.

SINGLEMAN & HOLTZMAN (2014), com base no comprimento padrão (CP) e nos dias pós-fertilização (DPF), sugeriram que a 28,5°C o ciclo de vida do zebrafish pode ser dividido em três fases distintas: fase larval = com duração de aproximadamente 28 dias (3 a 12 mm CP) com início no terceiro DPF; fase juvenil = início em torno dos 28±31 DPF (12 a 18 mm CP), apresentando crescimento exponencial e alterações morfológicas (PARICHY et al., 2009); fase adulta = que ocorre em torno do 3º mês (90 DPF e CP superior a 18 mm), na qual a taxa de crescimento é menor e os peixes atingem a maturidade sexual e são capazes de reproduzir.

Segundo Maack & Segner (2003) e Spencer et al. (2008), o crescimento do *Danio rerio* não ultrapassa os 5 cm de comprimento e o dimorfismo sexual pode ser assim definido: fêmeas comumente maiores que os machos, tendo o corpo com forma arredondado, devido a presença dos ovos, enquanto os machos apresentam corpo esguio e tonalidade escura. Sua elevada capacidade reprodutiva e o curto tempo de geração (12 a 14 semanas) mostram-se como vantagens em relação a outras

espécies de peixes, as quais normalmente apresentam longo intervalo de geração (WEGRZYN & ORTUBAY, 2009).

O zebrafish apresenta intestino longo e desprovido de estômago verdadeiro, sendo considerado onívoro uma vez que pode se alimentar de grande variedade de alimentos, podendo assim consumir grande variedade de crustáceos bentônicos, plâncton, vermes e larvas de insetos (DUTTA, 1993; Moyle & Cech., 2000).

Pesquisas realizadas com *Danio rerio* selvagens, por McClure et al. (2006) e Spence et al. (2007), com base na análise do conteúdo estomacal, mostraram que insetos de origem terrestre em sua maioria são as presas predominantes. Segundo estes mesmos autores, outros componentes principais foram identificados, com destaque para zooplâncton e outros insetos (58,6%), ovos de invertebrados e aracnídeos (2,5%), fitoplâncton (5,9%) e outros componentes não identificados (33%).

Estes peixes podem ser alimentados em cativeiros com presas vivas de fácil obtenção como a *Artemia* sp. e *Brachionus* sp., simulando os alimentos encontrados na natureza e, por alimentos proteicos de origem animal e vegetal (WATANABE et al., 1983). A partir destas informações, Ulloa et al. (2011) sugeriram que o zebrafish seria capaz de modificar e adaptar o seu sistema digestório em resposta à dieta fornecida, o que facilita a formulação de dietas e a elaboração de protocolos de alimentação que melhor reflita sua fisiologia digestiva e seu comportamento alimentar. Informações consideradas como básicas para a nutrição animal, como a exigência de proteína, ainda são escassas para a maior parte dos peixes ornamentais (SALES & JANSSENS, 2003). Portanto, maiores estudos são necessários para expressar o máximo desenvolvimento da espécie. Entretanto, segundo Lawrence (2007) são escassas as informações sobre as exigências nutricionais desta espécie, sendo necessários estudos nesse sentido, para as três fases da vida (larval, juvenil e adulto).

Zebrafish como Modelo Biológico

Em 2012 o zebrafish tornou-se modelo biológico preferencial nas pesquisas na área da biomedicina, por apresentar vantagem biológica e experimental sobre os

outros modelos biológicos. Dentre estas vantagens, pode-se destacar: baixo custo de manutenção, facilidade na reprodução, fecundação externa, transparência dos ovos fecundados, rápido desenvolvimento embrionário, curto intervalo de geração (3 a 4 meses para a maturidade sexual) e fácil manipulação, tanto das matrizes quanto dos embriões (LONG et al., 1997; BRIGGS, 2002). Outras vantagens foram, ainda, apresentadas por Lawrence (2007), das quais se destacam: matrizes de pequeno tamanho, produção constante de ovos, uma fêmea pode produzir no ano 200 ovos/semana, alta taxa de sobrevivência larval e baixo custo de manutenção.

Segundo Kint et al. (2013), em 1951 foi publicado o primeiro artigo científico usando o Zebrafish como modelo vertebrado, sendo, entretanto, o mesmo significativamente utilizado em pesquisas no final do século vinte (Figura 2).

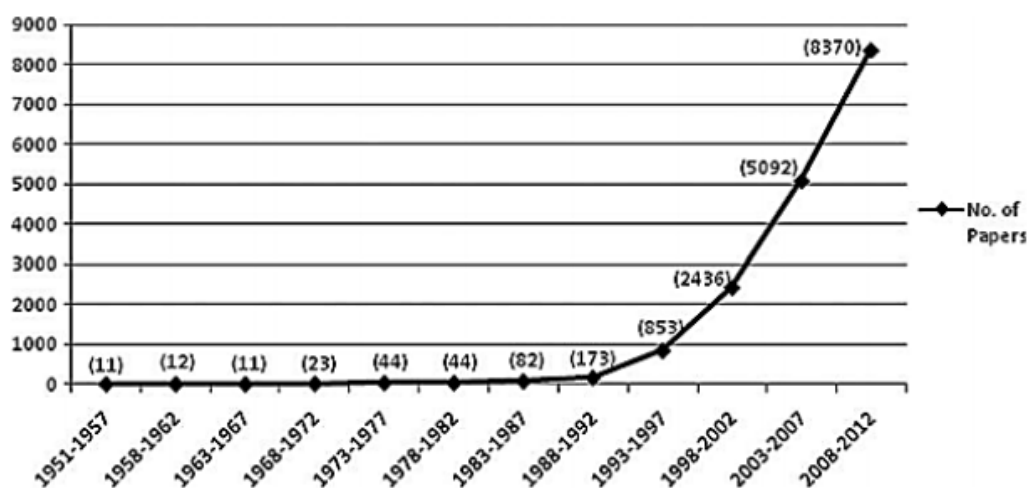


Figura 2: Numero de artigos científicos que utilizaram o *Danio rerio* como modelo biológico (Kint et al., 2013).

O genoma humano e do Zebrafish partilham de similaridade genética, em torno de 70% (LIESCHKE & CURRIE, 2007; DEO & MACRAE, 2011). Algumas áreas da biomedicina são favorecidas com essa semelhança, tais como a cardiologia, imunologia, oncologia e genética. Isto favorece as pesquisas na área da fisiologia humana, além de possibilitar a identificação de novos genes e suas funções em vertebrados (DAHM & GEISLER, 2006).

Fecundação externa, fácil manipulação e transparência dos ovos do zebrafish e a possibilidade de manipular e monitorar suas fases de desenvolvimento (Kimmel et al., 1995) permitem realizar experimentos em que os resultados precisam ser

visualizados, como por exemplo, a utilização de marcadores fluorescentes que têm alvo os órgãos (como o coração), com respostas celulares e fisiológicas exatas (DEO & MACRAE, 2011).

Exigências Proteicas dos Peixes Ornamentais

A literatura apresenta poucas informações sobre as exigências nutricionais do Zebrafish (LIU et al., 2013) mas, para o seu adequado desenvolvimento é necessário conhecer as suas necessidades nutricionais básicas para que se possa formular dietas mais adequadas para cada estágio do desenvolvimento dessa espécie. Conhecer a exigência proteica é primordial para a saúde e crescimento dos peixes (NRC, 2011) e, além disso, a proteína é responsável pelo maior custo da dieta (ROBINSON & LI, 1997).

As proteínas são moléculas grandes e complexas, compostas por aminoácidos covalentes, unidos por ligações peptídicas (GUYTON & HALL, 2011; NELSON & COX, 2011). As proteínas são essenciais para o funcionamento de todos os organismos vivos (NRC, 2011), compondo de 65 a 75% do tecido orgânico dos peixes, sendo responsáveis pela estrutura (músculo, colágeno e queratina), mecanismos de regulação do metabolismo (enzimas e hormônios), transporte (hemoglobina) e defesa (anticorpos) (NELSON E COX., 2011; NRC., 2011).

Portanto, para os peixes obterem os aminoácidos é necessária a ingestão de proteína, que por sua vez será hidrolisada liberando dipeptídeos, tripeptídeos e aminoácidos livres, que são absorvidos pelo epitélio intestinal, que por meio do sangue são distribuídos para os tecidos e órgãos (BICUDO, 2008; WU, 2013).

Se comparado com outros animais terrestres, os peixes necessitam de maior quantidade de proteínas em sua dieta, com teores de proteína bruta que podem variar de 24,0 a 50,0% de proteína bruta dependendo da fase de desenvolvimento da espécie (PEZZATO et al., 2004). Segundo Furuya et al. (2005), os peixes necessitam de dietas que contenham quantia exata e corretamente balanceada em seus aminoácidos, para que seja atendida suas exigências para manutenção e produção.

A necessidade proteica de uma espécie de peixe também depende da proporção dos outros nutrientes na dieta. Nestes termos é fundamental que a dieta

esteja balanceada em todos os nutrientes, ou seja, o balanço entre esses elementos é fundamental para o adequado funcionamento do metabolismo do peixe (SANZ et al., 2000). Além disso, o balanceamento da dieta pode contribuir para manter a qualidade da água, por reduzir a excreção de nitrogênio ao meio e, dessa forma, permitir a criação sustentável de peixes (TIBBETTS et al., 2000).

Por outro lado, o fornecimento de dietas com níveis inadequados de proteína, superior ou inferior à exigência, pode prejudicar a saúde e o desenvolvimento dos peixes. Se a dieta contiver quantidade de proteína menor que aquela necessária é de se esperar que o peixe tenha menor crescimento ou perda de peso, em consequência da degradação de proteína dos tecidos, para manter as funções vitais do organismo (MILLWARD, 1989). Enquanto que níveis acima do exigido tem custo energético e metabólico para deaminar estes aminoácidos e, ainda, pode a excretar resíduos nitrogenados no ambiente (STEFFENS, 1989; HAYASHI et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2005; NRC, 2011).

Os peixes têm facilidade em utilizar a proteína como fonte de energia, por meio do catabolismo da proteína para produção de energia (HALVER e HARDY, 2002; KAUSHIK & SEILIEZ, 2010; PEZZATO et al., 2004). No entanto, tal processo não é desejável e, por isso, é preferível do ponto de vista econômico, maior taxa de síntese (anabolismo) em favor do crescimento do que a degradação (catabolismo) (HEPHER et al., 1989). O catabolismo da proteína pelos peixes pode ocorrer com maior facilidade, pelo fato do sistema digestório e metabólico dos peixes são adaptados à utilização deste nutriente como fonte energética (LOVELL, 1989; MOYES & WEST, 1995).

Segundo CHO (1992), a quantidade ótima de proteína na dieta dos peixes esta marcada por um delicado balanço entre a energia digestível e a proteína bruta. Com base nesse conceito, utilizar fontes energéticas não proteicas é mais eficiente por melhorar a retenção de proteína pelo animal e diminuir a excreção de nitrogênio. Aumentar a concentração de carboidratos e lipídeos na dieta pode diminuir a degradação das proteínas e aminoácidos; entretanto, esta quantidade tem que ser ajustada para não exceder as necessidades energéticas e, conseqüentemente, o balanço de energia e proteína da dieta (NRC, 2011).

Segundo COWEY (1980), a excreção de nitrogênio pelos peixes teleósteos é feita na forma de amônia, sendo 97% do total eliminados pelas brânquias, sem gasto

de energia e, somente, os 3% restantes eliminados pela urina. Entretanto, devido ao alto custo das fontes proteicas, associado à poluição ambiental em função do uso excessivo das fontes nitrogenadas nas dietas, necessita-se reavaliar tanto as fontes como os níveis de proteína a serem utilizadas na formulação das rações comerciais de peixes(SILVA & ANDERSON, 1995).

As informações sobre as exigências em proteína e aminoácidos pelos peixes são geralmente obtidas em pesquisas com base em dose-resposta, tendo como critério de avaliação o desempenho proporcionado pelas dietas (NRC, 2011; COUTINHO, 2012).

Dessa forma, pesquisas são necessárias para zebrafish para que possam expressar seu potencial de crescimento, máxima eficiência de utilização de nutrientes e saúde. Infelizmente, parte das rações disponíveis são confeccionadas sem que considere o nível mais adequado de proteína e, nem sempre com os alimentos mais eficientes para a formulação das rações para estas espécies.

A produção de peixes ornamentais no Brasil está em expansão, sendo lucrativa oque favorece o desenvolvimento do mercado (JUNIOR, 2001; RIBEIRO, 2008). Cingapura atualmente é o maior exportador de peixes ornamentais e o Brasil aparece na 18º posição mundial (FISHSTATS PLUS, 2011).

Apesar de não haver estimativa sobre a quantidade de Zebrafish produzida ou comercializada no Brasil, essa espécie tem potencial para a piscicultura ornamental. Atualmente sua produção tem sido principalmente destinada a pesquisas como modelo biológico. O zebrafish é candidato para dominar a produção de peixes ornamentais, por seu baixo custo de produção, fácil manejo e técnicas simplificadas de produção (LIU et al., 2013).

As rações utilizadas para alimentação dos peixes ornamentais nos aquários devem apresentar máxima eficiência. Os aquarofilistas exigem que as rações comerciais tenham máxima eficiência nutritiva, pois o produto do metabolismo da proteína, que é principalmente a amônia, compromete a qualidade da água e põe em risco a saúde dos peixes (PANNEVIS, 1993; NG et al., 1993; EARLE, 1995; PANNEVIS & EARLE, 1995; MACARTNEY, 1996; RAJ & JESILY, 1996).

Para que uma ração para peixes ornamentais possa ser aceita pelo mercado, a mesma deve atender as necessidades nutricionais dos peixes. Segundo SALES &

JANSSENS (2003) há informação sobre a exigência proteica para algumas espécies de peixes ornamentais em aquários, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Exigência de Proteína Bruta para Peixes Ornamentais (Adaptado de SALES & JANSSENS, 2003).

Nome	Tamanho Inicial (g)	Fonte de Proteína	Parâmetros Analisados	Exigência Dietaria (%)	Referencias
Guppy (<i>P. reticulata</i>)	0,1	Farinha de peixe, Caseína	Ganho de Peso, Conversão Alimentar, Desenvolvimento Gonadal	30-40	1
Goldfish (<i>C. auratus</i>)	0,008	Farinha de peixe, Caseína	Taxa de Crescimento Especifico, Eficiência Alimentar, Retenção de Nutrientes	53	2
Tin foil barb (<i>B. altus</i>)	0,81	Caseína	Ganho de Peso	41,7	4
Discus (<i>S. aequifasciata</i>)	4,5	Farinha de peixe, Caseína	Taxa de Crescimento Especifico	44,9 -50,1	5
Redhead cichlid (<i>C. synspilum</i>)	0,28	Farinha de Peixe	Taxa de Crescimento Especifico	40,81	6
Angelfish (<i>P. scalare</i>)	0,44	Farinha de Peixe e Soja	Ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência proteica	34	7

¹Shim & Chua (1986); ²Fiogbé & Kestemont (1995); ³Lochmann & Phillips (1994); ⁴Elangovan & Shim (1997); ⁵Chong et al. (2000); ⁶Olvera-nova et al. (1996); ⁷Zuanon et al. (2006)

A composição de aminoácidos corporal do Zebrafish é semelhante ao relatado em outras espécies de cyprinideos (GOMES et al., 2010). Sabe-se que existe relação

entre o perfil de aminoácidos corporal e os exigidos pelas espécies (MAMBRINI & KAUSHIK, 1995), o que permite pressupor sua exigência aminoacídica (KAUSHIK et al., 2011). Gatlin (1987) comparou as exigências de aminoácidos das espécies *Carassius auratus*, *Notemigonus crysoleucas* e *Pimephales promelas* com os aminoácidos corporais e concluiu que existem semelhanças.

Em pesquisas realizadas com *Golden shiners*, *Fathead minnows* e *Goldfish*, espécies que pertencerem à família *Cyprinidae*, Gatlin (1987) verificou que apresentavam semelhante composição aminoacídica corporal, que suas exigências em aminoácidos também eram semelhantes, além de que não diferiram das exigências já determinadas para a carpa comum (*Cyprinus carpio*).

Segundo Fiogbe e Kestemont (1995), para o máximo crescimento do zebrafish sua dieta deve conter teores de proteína bruta de 30 a 53 %. Estes valores se mostram pouco consistentes e, como são poucas as informações sobre sua exigência nutricional tem sido recomendado o emprego das informações existentes para a carpa comum (LOCHMAN & PHILLIPS, 1996; CARVALHO et al., 2004; DABROWSKI et al., 2005). Westerfield (2000) propôs uma dieta comercial, específica para o zebrafish, contendo entre 46,0 e 50,0% de proteína bruta, apresentando-se na forma de pó fino.

Segundo SHIM & CHUA (1986) e SHIM & NG (1988), como são poucos os estudos sobre as exigências nutricionais dos peixes ornamentais, a alimentação desses peixes tem sido realizada com base nas recomendações existentes com peixes de maior interesse comercial (YANONG, 1999; SALES & JANSSENS, 2003). Além disso, o número de espécies ornamentais cultivadas é grande e apresentam hábitos alimentares variados. Com base nesta realidade e, em função da grande demanda do Zebrafish para atender as pesquisas biológicas e, ainda, como espécie para fins ornamentais, estudos são necessários para que seja possível formular uma dieta mais adequada para essa espécie.

Dietas Experimentais

Dietas artificiais são utilizadas de forma efetiva no cultivo de peixes, podendo ser aplicada de maneira prática ou experimental. Porém, quando utilizadas

experimentalmente, elas devem ser fabricadas de maneira que não haja interferência nos resultados dos estudos biológicos.

Os peixes devem ser arraçoados com dieta adequadamente balanceada, para a espécie e para a fase de vida do animal (PEZZATO, 1995), ressaltando que as dietas a serem oferecidas aos peixes devem ser elaboradas com ingredientes que forneçam todos os nutrientes para suprir as exigências do animal (WILSON, 1995). Além disso, a mesma deve ser processada (extrusada ou peletizada) para que tenha boa estabilidade física na água para que não ocorram perdas de nutrientes e/ou degradação do ambiente (NRC, 2011).

Pode-se observar que estudos sobre as exigências nutricionais com peixes, utilizam dietas práticas, purificadas ou semipurificadas. A escolha do tipo de dieta a ser utilizada depende da natureza da pesquisa e da substância a ser testada.

As rações experimentais devem, preferencialmente, ter composição química bem definida, de forma a não interferir nos resultados. Como exemplo, em estudos com minerais recomenda-se o uso de dieta purificada para minimizar a ação das substâncias antinutricionais (LOVELL, 1998; HARDY & BARROWS, 2002; NRC, 2011).

De acordo com NRC (2011) utilizar um ingrediente padrão, como a farinha de peixe, por exemplo, em dietas semipurificadas, serve para melhorar a sua palatabilidade. Entretanto, as dietas semipurificadas devem conter ingredientes com composição e valor nutritivo conhecido, a fim de evitar interferência nos resultados dos estudos. Ensaio posteriores que com dietas praticas são de extrema importância para validar os resultados obtidos originalmente com dietas semipurificadas (FRACALOSSO et al., 2012). São muitas as dificuldades quando da determinação das exigências de algumas espécies pouco estudadas. Pois existem dúvidas para a obtenção destas informações, dentre as quais se destacam a falta de informes sobre o comportamento alimentar, morfologia e fisiologia do sistema digestório (CHO et al., 1985; NRC, 2011).

Dentre os alimentos utilizados na confecção das dietas dos peixes ornamentais, se destacam os concentrados protéicos de origem animal, que apresentem melhor palatabilidade, elevados teores de vitaminas do complexo B e alto teor de minerais, principalmente de cálcio e fósforo. Entretanto, os alimentos proteicos de origem vegetal também compõem estas dietas, pelo preço mais

competitivo e maior disponibilidade no mercado, embora possam conter fatores antinutricionais. Os cereais também são usados nas dietas de peixes ornamentais que são importantes fontes de energia, além de melhorarem a estabilidade física da dieta (FURUYA et al., 1997; PEZZATO et al., 2004; NRC, 2011).

Processo de Digestão

De maneira geral, as espécies de peixes apresentam elevadas necessidades, tanto de proteína quanto de aminoácidos, sendo a dieta a principal fonte para os peixes cultivados (Pillay, 1990). O metabolismo proteico é complexo, tendo início na digestão e absorção dos aminoácidos e peptídeos. Porém os peixes apresentam grande variedade de hábitos alimentares, podendo ser carnívoros, herbívoros e onívoros. Essa ampla variedade de espécies de peixes, apresenta diferentes formas de digestão do alimento, desde a forma de apreensão quanto à forma da digestão química e enzimática (Pough et al., 2006).

O processo de digestão de proteínas é a combinação dos processos físicos, químicos e enzimáticos que inicia assim que o alimento é apreendido e ingerido, terminando quando as fezes e os produtos nitrogenados da digestão são excretados (NRC, 2011). Porém, alguns peixes possuem peculiaridade quanto à anatomia digestiva, tendo, por exemplo, os ciprinídeos, que não possuem estômago definido, quais apresentam diferentes locais das ações enzimáticas quando comparado com peixes que possuem estômago funcional (Fänge and Grove, 1979).

A digestão química se inicia no estômago, devido ao fato de não existir secreção de enzimas digestivas pela boca e faringe, nos peixes (HORN, 1988). A capacidade dos peixes em utilizar os nutrientes ingeridos depende da presença de enzimas em locais apropriados da parede e ao longo do lúmen do trato digestório (Tengjaroenkul et al., 2000). Geralmente, a distribuição e intensidade da atividade das enzimas intestinais variam com os hábitos alimentares e a morfologia intestinal (Cockson; Bourne, 1972; Hofer; Schiemer, 1981; Kuzmina, 1984; Kuzmina & Smirnova, 1992; Sabapathy; Teo, 1993).

A produção de sucos gástrico ocorre na maioria das espécies de peixes, exceto naquelas que não possuem estômago definido (ciprinídeos), nessas espécies nem o ácido clorídrico ou a pepsina são formados (Fänge and Grove, 1979). Então

para essas espécies, a digestão ocorre no intestino quando há o encontro das enzimas com esses alimentos.

No pâncreas são armazenadas enzimas proteolíticas, principalmente tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidases e elastase (Fange and Grove, 1979). Ao ser secretado na luz intestinal, o tripsinogênio é convertido em tripsina por proteases secretadas pelas células presentes no epitélio da mucosa intestinal, as demais enzimas são ativadas pela tripsina e iniciam a ação sobre o substrato (Fange and Grove, 1979).

A lipase e amilase, em peixes sem estômago definido pode ocorrer à síntese na mucosa intestinal (Borlongan, 1990). A amilase em peixes herbívoros pode aparecer em maiores concentrações no intestino, devido ser essencial à digestão de carboidratos presentes no alimento (Borlongan, 1990). Apesar de ser encontrada lipase no sítio anterior do intestino e nos cecos pilóricos de alguns peixes (Gisbert et al., 1999), a digestão de lipídeos continua nas demais porções do intestino (Smith, 1989).

A absorção dos aminoácidos no intestino delgado pode ocorrer a partir de transporte passivo (Lovell, 1998), ou de dois prováveis sistemas de transporte ativo, semelhante ao das hexoses, sendo uma para aminoácido neutros, um para básicos e outro para ácidos (Nunes., 1998). As proteínas intactas também podem ser absorvidas diretamente para o sistema sanguíneo, via rota paracelular ou absorvido pelos enterócitos via pinocitoses (Horn., 1998). Após entrarem nos enterócitos, os mesmos são transportados pela corrente sanguínea até o fígado como aminoácidos livres ou lipoproteínas (NRC, 2011).

Uma particularidade presente em peixes é o fato de, em fase larval não apresentarem o seu trato gastrointestinal completamente desenvolvido (Ferraris et al., 1987; Ronnestad et al., 1999), isto por sua vez pode levar ao problema de baixa atividade proteolítica (Kuz'mina., 1996) e reduzida capacidade de absorção de nutrientes, o que leva a absorção de aminoácidos livres, provenientes da dieta natural (Ronnestad et al., 1999).

O capítulo 2, intitulado “Exigência Proteica de Juvenis de Zebrafish (*Danio rerio*)”, encontra-se redigido de acordo com as normas editoriais da *Journal Zebrafish* – Editor Chefe: Stephen C. Ekker, PhD – ISSN Online: 1557-8542.

REFERENCIAIS

- Abdel-Tawwab M. Interactive effects of dietary protein and live bakery yeast, *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fry and their challenge against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture International*, 2012; v. 20, p.317-331.
- Araneda C, Neira R, Lam N and Iturra P. Salmonids. In: Kocher T and Kole C. *Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals*. Springer Verlag, Berlin. 2008; p.1-43.
- Barbazuk W, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Edmund W, Bedell J, McPherson JD, Johnson S. The syntenic relationship of the Zebrafish and human genomes, *Genome Res.* 2000; v.10, p.1351-1358.
- Bicudo AJA. Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos. 2008; p. 122. (Tese Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Bicudo AJA, Cyrino JEP. Estimating amino acid requirement of brazilian freshwater fish from muscle amino acid profile. *Journal of the World Aquaculture Society*. 2009; v. 40, n. 6, p.818-823.
- Boonyaratpalin M, Lovell RT. Diet preparation for aquarium fishes. *Aquaculture*. 1977; v.12, p.53-62.
- Borlongan IG. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture*. 1990; v 89, p 315-325.
- Breder CM, Rosen DE. *Modes of reproduction in fishes*. New York, Natural History Press.1966; 941p.
- Briggs JP. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative. Physiology*, 2002; v. 282, n. 1.
- Carvalho A, Sá R, Olivia-Teles A, Bergot P. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cuprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture*. 2004; v.234, p.319–333.
- Cho, CY, Cowey CB, Watanabe T. *Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development*. Ottawa: IDRC. 1985; 154p.

- Cho CY. Feeding for rainbow trout and other salmonids, with reference to current estimates of energy and protein requirement. *Aquaculture*, Amsterdam. 1992; v. 100, p. 107-123.
- Clark, M. Genomics and mapping of teleostei. *Comparative and Functional Genomics*. 2003; v.4, p.182-193.
- Cockson, A., Bourne, D. Enzymes in the digestive tract of two species of euryhaline fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1972; v. 41A, p. 715–718.
- Coutinho F, Peres H, Guerreiro I, Pousão-Ferreira P, Olivia-Teles A. Dietary protein requirement of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) juveniles. *Aquaculture*. 2012; v.356-357, p.391-397.
- Cowey, CB. Protein metabolism in fish. In: *Protein Deposition in Animals*. Buttery PJ and Lindsay DB. Butterworths, London, Boston. 1980; 271-288pp.
- Buttery PJ, Lindsay DB. Protein deposition in animals. London: Butterworths. 1980; p.271-288.
- Dahm, R.; Geisler, R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol*. 2006; p 1–17.
- Davis GP, Hetzel DJS. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. *Aquaculture Research*. 2000; v.31, p.3-10.
- Deo RC, Macrae CA. The zebrafish: scalable in vivo modeling for systems biology. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2011; v3, p335-346.
- Dowling JE. What can a zebrafish see with only an off-pathway and other fish stories *Journal of Ophthalmic and Vision Research*. 2012; v7, p 97-99.
- Duma A, France J, Bureau D. Modelling growth and body composition in fish nutrition: where have we been and where are we going. *Aquacul Res*. 2010; V 41, p 161-181.
- Dutta S. Food and feeding habits of *Danio rerio* (Ham. Buch.) inhabiting gadigarh stream, Jammu. *J Freshw Biol*. 1993; v 5, p 165–168.
- Earle KE. The nutritional requirements of ornamental fish. *Vet. Q*. 17, 1995; p 53–55.
- Eaton R, Farley R. Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the laboratory. 1974; v 1:195–204.
- Fang F. Phylogeny and species diversity of the South and Southeast Asian cyprinid genus *Danio* Hamilton (Teleostei, Cyprinidae). PhD Thesis, Stockholm University, Stockholm, Sweden. 2001.

- Fange R, and Grove D. Digestion. In Hoar WS, Randall DJ, Brett JR. Fish Physiology. Academic Press, New York, USA; 1979; p 162-260.
- Fiogbe E, Kestemont P. An assessment of the protein and amino acid requirement in goldfish (*Carassius auratus*) larvae. J Appl Ichthyol. 1995; v 11, p 282–289.
- Fishstat plus. Universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. FAO Fisheries Department, Fisheries information, Data and Statistics Unit, 2008.
- Fjalestad KT, Moen T, Gomez-Raya L. Prospects for genetic technology in salmon breeding programmes. Aquacult Res. 2003; v 34, p 397–406.
- Fracalossi DM, Cyrino JEP. Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira - Nutriaqua. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2012; 375p.
- Ferraris, Ronaldo P.; Tan, Josefa D.; de La Cruz, Margarita C. Development of the digestive tract of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): histology and histochemistry. Aquaculture, v. 61, n. 3, p. 241-257, 1987.
- Furuya WM, Botaro D, Macedo RMG, Santos VG, Silva LCR, Siva TC, Furuya VRB, Sales JP. Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia. 2005; v. 34, n. 5, p.1433-1441.
- Furuya WM, Furuya VB, Soura SR. Desempenho de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidas a dietas farelada, peletizada e extrusada, na terminação In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Juiz de Fora, Anais, 1997.
- Gatlin DM. Whole-body amino acid composition and comparative aspects of amino acid nutrition of the goldfish, golden shiner and fathead minnow. Aquaculture; 1987; v 60, p 223–229.
- Gerhard GS, Kauffman EJ, Wang X, Stewart R, Moore JL, Kasales CJ, Demidenko E, Cheng KC. Life spans and senescent phenotypes of zebrafish (*Danio rerio*). Experimental Gerontology. 2002; v.37, p.1055–1068.
- Gisbert E, Sarasquete MC, Williot P, Castello-Orvay F. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. Journal of Fish Biology, 1999; v. 55, p. 596-616.
- Gomez-Requeni P, Conceição LE, Olderbakk Jordal AE, Ronnestad I. A reference growth curve for nutritional experiments in zebrafish (*Danio rerio*) and changes in

- whole body proteome during development. *Fish Physiol Biochem.* 2010; v 36, p 1199–1215.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2011; 12 ed, p 1151.
- Halver JE, Hardy RW. Nutrient flow and retention. *Fish Nutrition.* New York: Academic Press. 2002; p. 755-770.
- Hardy RW, Barrows FT. Diet formulation and manufacturing. *Fish nutrition.* 2002; 3 Ed, pp. 505–600.
- Hayashi C, Boscolo WR, Soares CM, Meures F. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 2002; v.31, n. 2, p.823-828.
- Hepher B. Principles of fish nutrition. In: SHILO, M.; SARIG, S. *Fish culture in warm water systems: problems and trends.* NY, USA. 1988. p.121-142.
- HOFER R, SCHIEMER F. Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia,*1981; v. 48, p. 342–345.
- Horn MH. Feeding and Digestion. In Evans EH. *The Physiology of Fishes.* 2 ed, 1998, p 43-64.
- Johnston IA, Macqueen DJ, Watabe S. Molecular biotechnology of development and growth in fish muscle. *Fisheries for Global Welfare and Environment, 5° World Fisheries Congress,* p. 241-262, 2008.
- Jones R. "Let Sleeping Zebrafish Lie: A New Model for Sleep Studies". *PLoS Biology,* 2007; v 5, p 281.
- Junior MVV. Agronegócio de peixes ornamentais no Brasil e no mundo. *Revista Panorama da Aqüicultura,* Rio de Janeiro. 2001; v. 11, n. 65, p. 14-24.
- Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 2014; v 35(2), p 63-75.
- Kaushik S, Georga I, Koumoundouros G. Growth and body composition of Zebrafish (*Danio rerio*) larvae fed a compound feed from first feeding onward: toward implications on nutrient requirements. *Zebrafish.* 2011, v.8, p.87-95.
- Kaushik SJ, Seiliez I. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquaculture Research.* 2010; v. 41, p.322-332.
- Kimmel C, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995; v 203, p 253–310.

- Kinth P, Mahesh G, Panwar Y. Mapping of zebrafish research: a global outlook. *Zebrafish*. 2013; v 10, p 510-517.
- Kishi S, Uchiyama J, Baughman AM, Goto T, Lin MC, Tsai SB. The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Experimental Gerontology*. 2003; v.38, n.7, p.777–786.
- KUZMINA V. V. Relative enzyme activity of the intestinal lumen and mucosa. *Journal of Ichthyology*, 1984; v. 24, p. 140–144.
- KUZ'MINA V V, SMIRNOVA Y G. Distribution of alkaline phosphatase activity along the length of the intestine of freshwater teleosts. *Journal of Ichthyology*, v. 32, p. 1–9, 1992.
- KUZ'MINA, V. V. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture*, v. 148, n. 1, p. 25-37, 1996.
- Lawrence C. Advances in zebrafish husbandry and management. In H.W. Detrich III, M. Westerfield, & L.I. Zon, *Methods in Cell Biology*. 2011; v 104, p 431-451.
- Lawrence C, Best J, James A, Maloney K. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*. 2012; v 368-369, p 103-108.
- Lawrence, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*. 2007; v 269, p 1–20.
- Lawrence C, Mason T. Zebrafish housing systems: a review of basic operating principles and considerations for design and functionality. *ILAR Journal*. 2012; v 53, p 179-191.
- Lieschke GJ, Currie PD. Animals models of human disease: zebrafish into swim view. *Nature*. 2007; v 8, p 353-367.
- Liu L, Su J, Liang XF, Luo Y .Growth Performance, Body Lipid, Brood Amount, and Rearing Environment Response to Supplemental Neutral Phytase in Zebrafish (*Danio Rerio*) Diet. *Zebrafish*, 2013; v.10; p.433-438.
- Lochman R, Phillips H. Nutrition and feeding of baitfish. *Aquacult Mag*. 1996; v 4, p 87–89.
- Long Q, Meng A, Wang H, Jessen JR, Farrell MJ, Lin S. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. 1997; v 124, p 4105–4111.

- Lo pestri R, Lisa C, Di Stasio L. Molecular genetics in aquaculture. *Ital J of Anim. Sci.* 2009; v 8, p 299-313.
- Lovell T. Nutrition and feeding of fish. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998; 267p.
- Lovell T. Nutrition and feeding of fish. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989; 260p.
- Maack G, Segner H. Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology.* 2003; v 62, p 895-906.
- Macartney A. Ornamental fish nutrition and feeding. In: Kelly, N.C., Wills, J.M. (Eds.), *Manual of Companion Animal Nutrition and Feeding.* British Small Animal Veterinary Association, Gloucestershire, UK, 1996; p. 244–251.
- Mambrini M, Kaushik SJ. Indispensable amino acid requirements of fish: correspondence between quantitative data and amino acid profiles of tissue proteins. *J Appl Ichthyol* 1995; 11:240–247.
- Mcclure MM, McIntyre PB, McCune AR. Notes on the natural diet and habitat of eight danioin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *J Fish Biol.* 2006; v 69, p 553–570.
- Meer MB, Machiels MAM, Verdegem MCJ. The effect of dietary protein level on growth, protein utilization and body composition of *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquacult. Res.* 1995; v.26, p.901-909.
- Millward DJ. The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover. *Aquaculture, Amsterdam*, 1989; v. 79, p. 1-28.
- Mommsen TP. Biochemistry and molecular biology of fishes. Amsterdam: Elsevier Press, 1995; v 4, p.367-392.
- MOYES, C.D.; WEST, T.G. Exercise metabolism in fish. In: HOCHACHKA, P.W.;
- Moyle PB, Cech JJ. *Fishes: An introduction to ichthyology*, New Jersey: Prentice Hall. 2000; v 4, p 612.
- National Research Council - NRC. *Nutrient Requeriments of Fishes and Shrimp* Washington: DC. National Academies Press, 2011; 376p.
- Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alergre: Artmed, 2011; v 5, 1274 p.
- Nelson JS. *Fishes of the world.* . Wiley, New York, 1994; v3, p 245.

- Ng WJ, Kho K, Ong SL, Sim TS, Ho JM, Tay SH. Preliminary estimation of tropical ornamental fish metabolite production rates. *Aquaculture*. 1993; v 110, p 263–269.
- Nogueira, GCCB, Salaro AL, Luz RK, Zuano JAS, Lambertucci, DM, Salerno RA, Sakabe R, Araújo WAG. Desempenho produtivo de juvenis de trairão (*Hoplias lacerdae*) alimentados com rações comerciais. *Revista Ceres*. 2005; v. 52, n. 302, p. 491-497.
- Nunes IJ. Nutrição animal básica – 2 ed Belo Horizonte. FEP – MVZ. 1998.
- Nunes CS. Crescimento, hematologia e metabolismo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido ao exercício aeróbico e alimentado com níveis crescentes de proteína. 2011; 144 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- Pannevis MC. Nutrition of ornamental fish. In: Burger IH, The Waltham Book of Companion Animal Nutrition. Pergamon Press, Oxford. 1993; p 85–96.
- Pannevis MC, Earle KE. Nutrition of ornamental fish. *Wien. Tierärztl. Mnschr.* 1995; v 82, p 96–99.
- Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*. 2009, v 238, p 2975-3015.
- Pillay TVR. Principles and Practices. *Aquaculture*. London, Blackwell Scientific Publications, 1990.
- Pezzato LE. Alimentos convencionais e não-convencionais disponíveis para indústria da nutrição de peixes no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS. 1995; p. 34-52.
- Pezzato LE, Barros MM, Furuya WM. Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2009; v.38, p.43-51.
- Pough, FH, Janis CM, Heiser JB. *A Vida dos vertebrados*. Ed Atheneu, São Paulo. 2006; v 4, p 9 – 25.
- Raj VSD, Jesily S. The interrelationship of NH₃-N excretion with changing pH, selected metallic ions and food in *Puntius tetrazona*. *J. Ecobiol.* 1996. v8, p 9–15.
- Reid DP, Szano S, Glebe, Danzmann RG, Ferguson MM .QTL for body weight and condition factor in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow

- trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). 2005; v 94, p 166-172.
- Ribeiro FAZ, Carvalho Junior JR, Fernandes JBK, Nakayama L. Comércio brasileiro de peixes ornamentais. *Revista Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro. 2008; v. 18, n. 110, p. 54-59.
- Robinson EH, LI MH. Low protein diets for channel catfish *Ictalurus unctatus* raised in earthen ponds at high density. *J. World Aquacult. Soc.* 1997; v 28, p 224–229.
- Rønnestad, Ivar; Thorsen, Anders; Finn, Roderick Nigel. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*, v. 177, n. 1, p. 201-216, 1999.
- SABAPATHY, U.; TEO, L. H. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. *Jornal of Fish Biology*, 1993; v. 42, p. 595–602.
- Sales J, Janssens GPJ. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquat. Living Res.*, New York, 2003, v. 16, p. 533–540.
- Sales J, Janssens GPJ. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resources*, Cambridge, 2003; v.16, n.6, p.533-540.
- Sanz A, Garcia Gallego M, De la Higuera M. Protein nutrition in fish: protein/energy ratio and alternative protein sources to fish meal. *J. Physiol. Biochem.* 2000; v.56, p.275-282.
- Shim KF, Chua YL. Some studies on the protein requirement of the guppy, *Poecilia reticulata* (Peters). *J. Aquar. Aquat. Sci.* 1986; v 4, p 79–84.
- Shim KF, Ng SH. Magnesium requirements of the guppy (*Poecilia reticulata* Peters). *Aquaculture*, 1988; v 73, p 131–141.
- Siccardi III AJ, Garris HW, Jones WT, Moseley DB, D`Abramo LR, Watts SA. Growth and survival of zebrafish (*Danio rerio*) fed different commercial and laboratory diets. *Zebrafish*, 2009; v.6, p.275–280.
- Silva SS de, Anderson TA. *Fish nutrition in aquaculture*. 1.ed. London: Chapman Hall. 1995; p 319.
- Singleman C, Holtzman NG. Growth and maturation in the zebrafish *Danio rerio*: a staging tool for teaching and research. *Zebrafish*, 2014; v 11, p 1-11.
- Smith LS. Digestive function in teleost fishes. *Fish Nutrition*. Academic press, San Diego, CA, USA. 1989; p 2-29.

- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, (*Danio rerio*). *Biological Reviews*, 2007a; v 83, p 13-34,.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 2008; v 83, p 13-34.
- Spence R, Fatema MK, Ellis S, Ahmed ZF, Smith C. The diet, growth and recruitment of wild zebrafish (*Danio rerio*) in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 2007b; v.71, p.304-309.
- Steffens W. *Principles of Fish Nutrition*. Chichester; Ellis Horwood Ltd. 1989; p 384.
- Tamaru, CS. "Growth of angelfish, *Pterophyllum scalare*, and guppies, *Poecilia reticulata*, fed commercial feeds developed for foodfish." *AQUACULTURE*, 1998; p 533.
- Tengjaroenkul, Bundit, et al. "Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L." *Aquaculture*. 2000; v 182, p 317-327.
- Tibbetts SM, Lall SP, Anderson DM. Dietary protein requirement of juvenile American eel (*Anguilla rostrata*) fed practical diets. *Aquaculture*. 2000; v.186, n.1 - 2.
- Tibbetts SM, Lall SP, Anderson DM. Dietary protein requirement of juvenile American eel (*Anguilla rostrata*) fed practical diets. *Aquaculture*, 2000; v.186, n.1/2, p.145-155.
- Ulloa PE, Iturra P, Neira R, Araneda C. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2011; v.21, p.649-666.
- Watanabe T, Kitajima C, Fujita S. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*. 1983; v 34, p 115–145
- Westerfield M. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Eugene, Oregon USA, 200; p 385.
- Wilson RP. Fish feed formulation and processing. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, 1995, Piracicaba. Anais... Piracicaba: CBNA, 1995. p. 53-68.
- Wu G. *Amino acids: biochemistry and nutrition*. Boca Raton: CRC Press. 2013.
- Yanong RPE. Nutrition of ornamental fish. *Husbandry and Nutrition*. 1999; v 2(1), p 19-41.

CAPÍTULO - II

Exigência Proteica de Juvenis de Zebrafish (*Danio rerio*)

Resumo

O zebrafish, teleósteo de água doce, apresenta características biológicas e genéticas favoráveis para pesquisas biológicas, entretanto, faltam informações sobre sua exigência nutricional. Neste sentido este trabalho objetivou determinar sua exigência proteica. Utilizou-se 900 juvenis com $25,2 \pm 1,98$ mg e $12,95 \pm 1,91$ mm, distribuídos em 30 aquários de 15 L de volume (30 peixes/aquário) num delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições. As dietas semipurificadas foram formuladas para conter 27,6; 33,2; 38,2; 43,8 e 49,2% de proteína bruta (PB). Após 62 dias, constatou-se que o teor de 27,6% PB foi mais efetivo ($p < 0,01$) para a taxa de eficiência proteica. Entretanto, não houve diferença entre tratamentos para peso, comprimento, taxa de eficiência alimentar e de crescimento específico, consumo de ração e sobrevivência. Em relação a utilização dos nutrientes e composição corporal, a dieta contendo 38,2% de PB proporcionou melhores respostas ($p < 0,01$) para retenção e taxa de retenção de nitrogênio, retenção de energia e quantidade de energia corporal. Pode-se concluir que, dieta contendo 27,6% PB foi adequada para obtenção da melhor taxa de eficiência proteica e desempenho zootécnico e 38,2% PB para utilização dos nutrientes e energia pelo zebrafish.

Protein Requirement of Juvenile Zebrafish (*Danio rerio*)

Abstract

The zebrafish, teleost freshwater, shows biological and genetic characteristics that are propitious for biological research. However, there is a lack of information about their nutritional requirements, considering this the purpose of this study is to determine its protein requirement. Were used 900 fingerlings with $25,2 \pm 1,98$ mg distributed into 30 fish tanks of 15 liters of capacity (30 fishes/fish tank) in a completely randomized with five treatment and six repetitions. The Semipurified diets were formulated to include 27.6; 33.2; 38.2; 43.8; 49.2% of crude protein (CP). After 62 days, it was found that the percentage of 27.6% CP were more effective ($p < 0.01$) to protein efficiency ratio. Although there was no difference between treatments for weight, length, feed efficiency rate and specific growth, feed intake and survival. In relation the use of nutrients and body composition, diet containing 38.2% crude protein provided better responses ($p < 0,01$) for retention and nitrogen retention rate, energy retention and amount of body energy. We can be concluded that a diet containing 27.6% CP was adequate to obtain the best protein efficiency ratio and growth performance and 38.2% CP for use of nutrients and energy for the zebrafish.

Introdução

O zebrafish (*Danio rerio*) tem sido utilizado como modelo biológico em pesquisas na área da biomedicina por possuir o genoma inteiramente sequenciado, fácil manejo reprodutivo (fecundação externa), alta prolificidade, ovos transparentes, alta sobrevivência das larvas, e importante semelhança genética com humanos.¹ Com base nas informações genômicas obtidas com essa espécie, Ulloa et al. (2011)² propuseram que o zebrafish também seja o organismo modelo para estudos na área de nutrição e crescimento de peixes. Apesar de sua importância biológica, existem poucas informações sobre suas exigências nutricionais,² explicitando a importância de novos conhecimentos nessa área, fundamentais para o adequado crescimento desta espécie.

Quando criados em condições laboratoriais, é importante saber a origem e a composição da dieta utilizada na alimentação do peixe, uma vez que a mesma interfere em todas as respostas biológicas dos animais.³ Segundo o NRC (2011)³, as dietas experimentais devem conter todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento da espécie. Dentre os nutrientes da dieta, as proteínas são consideradas os mais importantes para o metabolismo, crescimento e saúde dos animais⁴ e, de maneira geral, os peixes têm exigência em proteína mais elevada do que outros vertebrados, sendo a mesma o nutriente mais oneroso da dieta.⁵

Por isso, estudos com exigência proteica para peixes são importantes, pois o excesso de proteína da dieta ofertada aos peixes pode aumentar a excreção de amônia e sua subsequente acumulação na água, que por sua vez é altamente tóxica para peixes mesmo em baixas concentrações. Além disto, a falta de proteína na dieta ofertada aos peixes também pode acarretar problemas, como inadequado crescimento.³

Embora existam poucas informações sobre as exigências nutricionais do zebrafish, Matthews et al. (2002)⁶ afirmaram que na maioria das pesquisas com esta espécie de peixe tem sido utilizados *nauplios de Artemia* e uma dieta comercial na forma de flocos para peixes tropicais como “protocolo padrão de alimentação” desse peixe; Robson et al. (2008)⁷ avaliaram a influência dos níveis de carboidrato em dietas de larvas até a maturidade sexual e concluíram que sua dieta deve conter até 25% de carboidrato; Westerfield (2000)⁸ sugere para larvas e adultos dessa espécie,

uma dieta comercial contendo níveis de proteínas entre 46-50%; Siccardi et al. (2009)¹³ avaliaram o desempenho de juvenis dessa espécie alimentados com sete dietas, das quais, cinco comerciais, uma semipurificada e outra purificada, e concluíram que o desempenho zootécnico foi significativamente melhor com a dieta semipurificada.

De acordo com Fiogbé & Kestemont (1995)⁹ as exigências proteicas do zebrafish seria de 30 a 53%, e que a mesma pode ser comparada à de outros peixes, como as carpas comum, a qual tem sua exigência nesta faixa,^{3,10} variando conforme a fase de desenvolvimento e hábito alimentar.¹¹ Neste sentido, Lawrence (2007)¹² destacou a importância em se utilizar uma dieta para o zebrafish que tenha potencial para sua máxima resposta de crescimento para não comprometer os resultados dos experimentos.

Este estudo objetivou determinar a exigência de proteína bruta para zebrafish (*Danio rerio*), com dieta semipurificada e em condições experimentais.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos - AquaNutri, Câmpus de Botucatu – SP.

Os procedimentos adotados na condução deste experimento foram aprovados pelo comitê de ética da instituição (protocolo nº 135/2014).

Dietas experimentais

As dietas isoenergéticas foram formuladas com base nas exigências de *Cyprinus carpio*.³ As dietas eram semipurificadas¹⁴ tendo como fonte proteica a albumina e a gelatina, com a adição de 100 g.kg⁻¹ de farinha de salmão como palatilizante, apresentando cinco níveis de proteína bruta (PB): 27,65, 33,27, 38,25, 43,8, 49,21% (Tabela 1).

Para confecção das dietas, os ingredientes foram moídos, pesados e homogeneizados de forma a conter tamanho menor que 0.42 mm. Em seguida foram

peletizadas e secas em estufa de ventilação forçada (55 °C / 24h), quando foram fracionadas para obtenção de grânulos de dois tamanhos (1° - maiores e 2° - menores que 0,42mm), que foram ofertados aos animais de acordo com a fase de desenvolvimento.

Experimento

Os zebrafish foram produzidos no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri – FMVZ, UNESP, Câmpus de Botucatu. Para tal, 30 fêmeas e 60 machos adultos foram introduzidos as 8:00h em um cesto plástico circular, com 50 cm de raio, 60 cm de altura e fundo com tela de 4 mm entrensos. O cesto de reprodução foi instalado num aquário de 1000 litros com aeração constante e temperatura controlada (28°C). Os reprodutores foram alimentados até as 15:00h e às 18:00h realizou-se sifonagem do aquário para retirar resíduos de fezes ou alimento.

Após, para estímulo reprodutivo, em ambiente sem luz, o cesto foi içado e a coluna d'água reduzida para aproximadamente 5 cm de altura. No dia seguinte, às 6:00h a iluminação do ambiente foi restabelecida para novo estímulo reprodutivo e às 8:00h o cesto contendo os reprodutores foi retirado.

Após quatro dias, período para incubação dos ovos, eclosão das larvas e absorção do saco vitelínico, sifonou-se o fundo do aquário para retirada de resíduos, e iniciou-se a alimentação com base em gema de ovo cozida e triturada, e microvermes (*Panagrellus redivivus*). No décimo dia pós-eclosão essa alimentação foi substituída por náuplios de artemia (*Brachipus stagnalis*) e ao vigésimo dia esse alimento foi gradativamente substituído por uma ração semipurificada (34% PB) até completarem 28 dias, momento em que Singlenan & Holtzman (2014)¹⁵ classificam o zebrafish como juvenil.

Para a pesquisa, foram selecionados do lote produzido, 900 juvenis com peso médio de 25.19±1.98 mg e comprimento médio de 12.95±0.15 mm, distribuídos em 30 aquários 15-L (30 peixes/aquário). Os aquários foram abastecidos por um sistema de recirculação de água, provido de filtro físico e biológico para manutenção da qualidade da água além de um sistema de ultravioleta para esterilização do sistema. A temperatura foi mantida constante com aquecimento controlado por termostato em 28 °C.

Foram mensuradas semanalmente as variáveis físicas e químicas da água, e a temperatura aferida quatro vezes ao dia, utilizando-se sonda multiprobe YSI 556® (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA). Nesse período os valores registrados foram: pH (kit Labcon®) 7.2 ± 0.2 , oxigênio dissolvido $8.34 \pm 0.26 \text{ mg L}^{-1}$, sólidos totais dissolvidos $0.05 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ e amônia tóxica $0.001 \pm 0 \text{ ppm}$ (kit Labcon®), temperatura $28.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$, os quais mantiveram-se dentro dos parâmetros recomendados para zebrafish.²

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e seis repetições, considerando cada aquário uma unidade experimental. Os tratamentos foram caracterizados pelos níveis de proteína bruta nas dietas: 27.65, 33.27, 38.25, 43.8, 49.21%. As rações foram ofertadas durante o experimento em função do tamanho dos peixes. O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia, em intervalos de tempo de três horas, com início às 08:30.

Ao final de 62 dias experimentais, para determinação do peso final e posterior cálculo dos índices zootécnicos, os peixes foram mantidos em jejum por 12 h, sendo em seguida eutanasiados com dose letal de solução de benzocaína (300 mgL^{-1}), conforme recomendado por Wilson et al. (2009).¹⁶ Após mensurações, 20 peixes por aquário foram congelados para posterior análises centesimal da carcaça.

Análises químicas

A análise bromatológica das dietas e dos animais foi realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição Animal da FMVZ-Unesp, Botucatu. Foram determinados os níveis de matéria seca (MS%) e matéria mineral (MM%), segundo metodologia de AOAC, proteína bruta (PB%) pelo método de Kjeldahl.¹⁷

Parâmetros de crescimento e de utilização do alimento

Ao final do ensaio de desempenho foram determinados os seguintes parâmetros de crescimento e de utilização do alimento:

Ganho de peso (mg) = Peso final – peso inicial;

Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) = [(ln (peso final) – ln (peso inicial)) / dias de experimento] x 100;

Sobrevivência (%) = (Nº de peixes final/Nº de peixes inicial) x 100;

Consumo de ração (mg) = (Quantidade ração ofertada aos peixes)/(Nº de animais x aquário);

Eficiência alimentar = Ganho de peso (mg)/Consumo de ração (mg);

Taxa de eficiência proteica = [ganho em peso (mg)/consumo de proteína bruta na matéria seca (mg)];

Peso médio (g) = (peso inicial + peso final) / 2;

Consumo de nitrogênio (mg g peso médio⁻¹ dia⁻¹) = (consumo de proteína na matéria seca (mg peixe⁻¹) / 6,25 x 1000) / (peso médio (mg) x dias de experimento);

Retenção de nitrogênio (mg g peso médio⁻¹ dia⁻¹) = [(peso final (mg) x proteína na carcaça final (%)) – (peso inicial (mg) x proteína na carcaça inicial (%)) / 6,25 x 1000]/(peso médio (mg) x dias de experimento);

Taxa retenção de nitrogênio (% do ingerido) = (retenção de nitrogênio / consumo de nitrogênio) x 100;

Consumo de energia (kcal g peso médio⁻¹ dia⁻¹) = (consumo de energia (kcal mg) x 1000) / (peso médio (mg) x dias de experimento).

Retenção de energia (kcal g peso médio⁻¹ dia⁻¹) = [(peso final (g) x energia na carcaça final (kJ)) – (peso inicial (g) x energia na carcaça inicial (kJ))] x 1000/(peso médio (g) x dias de experimento);

Taxa de retenção de energia (% do ingerido) = (Retenção de energia/consumo de energia) x 100

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade e, quando constatada distribuição normal, procedeu-se à ANOVA e ao teste de comparação de médias de Tukey. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal. O nível de significância foi $p < 0.05$ e $r^2 > 0.70$ para todos os testes estatísticos. Foram feitas análises de regressão para todas variáveis com $r^2 > 0.7$. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico Minitab® 16.1.1.0.¹⁸

Análise Variância Multivariada

Os parâmetros de utilização dos nutrientes e energia e de composição corporal foram avaliados pela análise de variância multivariada (Manova). As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico Minitab® 16.1.1.0.¹⁸

Análise de Componente Principal (PCA)

A análise teve por objetivo simplificar a descrição de um conjunto de variáveis inter-relacionadas (utilização dos nutrientes e composição corporal do zebrafish)⁴⁹ a qual transformou um conjunto original de variáveis em outro de dimensão menor ou equivalente, mantendo o máximo da informação em um menor número de componentes, onde cada componente principal é uma combinação linear das variáveis originais, independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo da informação em termos de variância total contida nos dados originais^{19,20} (Fig. 9 e Fig. 10).

Resultados

Desempenho produtivo

Pode-se observar (Tabela 2) que a dieta contendo 27.6% de proteína proporcionou a melhor ($p<0,01$) taxa de eficiência de utilização da proteína dietaria (Fig 5). Não houve diferença entre tratamento ($p>0.05$) para as variáveis peso final, comprimento final, consumo de ração, eficiência alimentar, taxa de crescimento específico e sobrevivência.

Utilização dos nutrientes

Observou-se (Tabela 3) diferença ($p<0.01$) entre tratamentos para o consumo de nitrogênio, destacando-se que embora os tratamentos 33,2 e 38,2% de PB tenham se apresentado estatisticamente similares, houve aumento no consumo de nitrogênio

com o aumento do teor de proteína bruta da dieta. Além disso, o menor e o maior teor de PB dietaria resultaram, respectivamente, no menor e no maior consumo de nitrogênio dietario. Para a variável retenção de nitrogênio ($\text{mg g ABW}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) houve diferença ($p < 0.01$) entre tratamentos, sendo que com o aumento do teor de PB da dieta observou-se elevação na retenção de nitrogênio pelos peixes. Quanto à taxa de retenção de nitrogênio (% de N ingerido), observou-se diferença significativa ($p < 0.01$) entre tratamentos, com tendência de diminuir a taxa de retenção de nitrogênio (% de N ingerido), em função do aumento do teor de PB da dieta; sendo que os peixes alimentados com a dieta 27.6% de PB apresentaram a melhor retenção em relação ao nitrogênio ingerido.

Quanto a retenção de energia ($\text{mg}^{-1} \text{ g ABW}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (Tabela 3), foi observado que os peixes alimentados com as dietas contendo o maior teor de proteína (49.2% PB) apresentaram a menor retenção ($p < 0.01$). Entretanto, para as variáveis consumo de energia e taxa de retenção de energia (% energia ingerida), não houve diferença estatística ($p > 0.05$) entre tratamentos.

Composição centesimal do peixe

A porcentagem de proteína corporal foi maior ($p < 0.01$) nos peixes alimentados com as dietas 38,2, 43,8 e 49,2% PB quando comparado aos peixes alimentados com a dieta 27.6% PB. Sobre a energia bruta corporal constatou-se diferença ($p < 0.01$) entre tratamentos, sendo que os peixes alimentados com as dietas com menores teores de proteína de (27.6, 33.2 e 38.2% PB) apresentaram maiores valores de energia bruta (kcal g^{-1}) corporal ($p < 0.01$), sendo semelhantes nestes três tratamentos. Os peixes alimentados com dietas com maiores teores de proteína (43.8 e 49.2% PB) apresentaram carcaças com os menores valores de energia bruta (kcal g), quando comparados aos demais. Quanto ao teor de umidade da carcaça, não houve diferença ($p > 0.05$) entre os tratamentos.

Discussão

O nível de proteína dietaria não influenciou o peso e o comprimento final dos peixes. Observa-se que o menor nível de proteína bruta (27,6%) foi suficiente para atender as exigências de desempenho do zebrafish. Faltam pesquisas para determinação das exigências proteicas do zebrafish e, embora Fiogbé & Kestemont (1995)⁹ tenham recomendado para esta espécie dietas contendo de 30 a 53%, as respostas de desempenho no presente estudo mostram que esse peixe pode ser arraçoado com dieta com nível de proteína bruta de 27.6%, nível menor que aqueles propostos por Fiogbé & Kestemont (1995)⁹ o que pode ser atribuído à diferença na qualidade da proteína utilizada na formulação das dietas.

O consumo de ração, neste estudo, foi semelhante para os peixes alimentados com as dietas contendo os diferentes teores de proteína. Isto, provavelmente, devido à baixa variação dos níveis de energia bruta (EB) destas dietas (4100 kcal kg⁻¹), pois como os peixes regulam a ingestão com base em sua necessidade energética^{3,25}, talvez esse nível se aproxime de sua necessidade em energia dietaria. Resultados obtidos por Lochman & Phillips (1994)²¹ e Luchesi et al (2013)²² com outras espécies de ciprinídeos, como o *Carassius auratus*, utilizando dietas práticas, quando concluíram que a exigência de proteína bruta foi de 29 a 32%, dependendo da fase de desenvolvimento. Para outros ciprinídeos como *Labeo fimbriatus* o nível de proteína bruta recomendado por Jena et al. (2012)²³ foi de 30%; para juvenis de Jian carp a exigência estimada foi de 34% de proteína.²⁴ Segundo o NRC (2011)³ para carpa comum (*Cyprinus carpio*), as exigências de proteína bruta variam de acordo com fase de desenvolvimento, sendo de 34 a 37% na fase juvenil e de 28 a 32% na fase adulta.

Os resultados deste estudo corroboram o valor de energia proposto para ciprinídeos por outros autores, entre 4100 e 4200 Kcal kg⁻¹^{26,27, 28}. Essa hipótese ganha consistência pelo fato de não ter ocorrido diferença entre tratamentos para peso, comprimento, consumo de ração, taxa de crescimento específico e sobrevivência dos peixes.

Os peixes alimentados com a dieta com 27.6% de PB apresentaram a melhor taxa de eficiência proteica (Fig. 5), o que mostra que essa quantidade de proteína dietaria atende as necessidades do zebrafish para melhor utilização da proteína. Este

resultado esta de acordo com os resultados de desempenho zootécnico obtidos, que pode ser atribuído ao adequado balanço de aminoácidos e a dieta semipurificada desta pesquisa. Outros autores apresentaram resultados similares quanto à taxa de eficiência proteica, quando utilizaram outros ciprinídeos como modelos de estudo: *Barboles altus* (Elangovan & Shim, 1997)²⁹, *Mystus nemurus* (Ng et al., 2001)³⁰, *Spinibarbus hollandi* (Yang et al., 2003)³¹, *Paralichthys olivaceus* (Kim et al., 2004)³² e Yang et al (2002)³³. Segundo estes autores a TEP foi superior para os peixes alimentados com os menores teores de proteína dietaria devido ao uso de dietas com alta digestibilidade, além de salientarem que o excesso de proteína ofertada aos peixes para a quantidade necessária é catabolizada e utilizada com fonte de energia.

Observou-se que o consumo de nitrogênio pelos peixes foi diretamente proporcional ao aumento do teor proteico nas dietas (Fig. 6). A retenção de nitrogênio ($\text{mg g ABW}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) aumentou de forma similar ao consumo de nitrogênio da dieta (Fig. 7), sendo maiores as retenções nos peixes que receberam os maiores níveis de proteína bruta na dieta (38,2, 43,8 e 49,2%). A taxa de retenção de nitrogênio foi maior para os peixes alimentados com as dietas com 27,6, 33,2 e 38,2% de proteína bruta. Entretanto, observa-se que houve um teor proteico nas dietas comum para retenção e taxa de retenção de nitrogênio, sendo que 38,2% PB mostrou-se como o mais adequado para utilização do nitrogênio pelos zebrafish.

Os resultados de utilização do nitrogênio, também foram utilizados para estimar a exigência proteica com diferentes espécies de peixes; Coutinho et al., (2012)³⁴ recomendaram 42,9% PB para juvenis de *sharpnout sea bream* e Coutinho et al., (2015)³⁵ verificaram que 45% PB na dieta atende a exigência do *zebra sea bream*. Estes autores^{34, 35} e Laeger & Morrison (2013)³⁶ destacaram a importância desta ferramenta na determinação da necessidade proteica dos peixes, além disso, concluíram que a qualidade da proteína dietária pode afetar os parâmetros de utilização do nitrogênio.

Os resultados mostraram (Tabela 3) que não houve diferença entre tratamentos para o consumo energia e a taxa de retenção de energia pelos peixes. Embora os peixes que receberam dieta contendo 27,6; 33,2; 38,2 e 43,8% de PB tenham apresentado similar retenção de energia ($\text{kcal g ABW}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), aqueles arraçados com a dieta de 49,2% de PB apresentaram retenção de energia

significativamente inferior aos demais, o que pode ser explicado pela necessidade de utilizar energia para catabolizar o excesso de proteína da dieta,^{37,38,39} e confirmado pelo fato de que os peixes que consumiram a dieta 49.2% PB apresentaram menor taxa de retenção de nitrogênio, diferentemente daqueles arraçados com as dietas contendo 27.6, 33,2 e 38,2% PB que apresentaram maior taxa de retenção de nitrogênio, ou seja, necessitaram utilizar menos energia para desaminar proteína.

A tendência de aumento no teor de proteína corporal dos peixes em função dos níveis de proteína da dieta pode ser explicado pelo maior consumo (Fig. 6) e retenção de nitrogênio (Fig. 7) pelos peixes. Tal evidência corrobora com os dados de Islam e Tanaka (2004)⁴⁰ que também observaram aumento de proteína corporal do ciprinídeo *Tor putitora* com o aumento da proteína dietética. Resultados semelhantes também foram encontrados, com *Labeo finbriatus* por Jena et al. (2012)⁴¹ e com Jian carp por Liu et al.(2009)⁴². Em relação à quantidade de energia bruta corporal (Tabela 4) a mesma reflete o observado para a retenção de energia pelo zebrafish (Fig. 8). Pode-se destacar (Tabela 4) que houve menor quantidade de energia bruta corporal (kcal g^{-1}) quando os peixes foram arraçados com as dietas contendo os dois maiores teores de proteína bruta na dieta (43,8 e 49,2% de PB). Isto pode ser explicado pelo fato de que o excesso de proteína dietética teve que ser excretado, com custo energético pelos peixes.^{39,3} Resultados estes que confirmam o observado em estudos para determinação da exigência proteica (Kim et al 2005)⁴³ com juvenis de *Paralichthys olivaceus*; *Nibeia miichthioides* (Wang et al., 2006)⁴⁴ e *Puntius gonionotus* (Mohanta et al., 2008)⁴⁵.

Como observado para a retenção e taxa de retenção de nitrogênio, retenção de energia e quantidade de energia corporal, o teor proteico de 38.2% foi o que proporcionou os melhores resultados para o zebrafish. Além disso, quando correlacionados todos os dados de utilização dos nutrientes e composição corporal dos peixes, pode-se observar pela análise de componente principal (PCA) que o teor proteico de 38.2% PB foi o mais adequado para atender a exigência proteica desta espécie (Fig. 10).

A necessidade de proteína dietética pode variar entre as espécies tendo em vista o tamanho dos peixes, a formulação da dieta, a condição de ambiente entre outros fatores⁴⁶ e a qualidade da proteína utilizada na dieta.⁴⁷ Destaca-se que no presente estudo utilizou-se dieta semipurificada com excelente valor biológico. Se a

dieta pode ser considerada responsável pela homeostase dos peixes ^{48,49,50,51} e, considerando, que o zebrafish tem sido modelo biológico para pesquisas em diferentes áreas, recomenda-se mais estudos a fim de que a dieta não interfira nas conclusões destes testes. Portanto, novos estudos com dietas práticas devem ser realizados para obtenção de maiores informações que permitam a recomendação de uma “dieta modelo” para estudos biológicos com este peixe.

Os resultados do presente estudo com o zebrafish, em que se utilizou dieta de alto valor biológico, indicam que 27,6% de proteína bruta foi adequado para obtenção da melhor taxa de eficiência proteica e desempenho zootécnico.

Conclusão

O nível de 38,2% de proteína bruta proporcionou a melhor retenção e taxa de retenção de nitrogênio, retenção de energia e quantidade de energia corporal para essa espécie.

TABELA 1. FORMULATION (%) AND ANALYZED COMPOSITION OF EXPERIMENTAL DIETS.

<i>Item</i>	Crude protein level (%)				
	27.6	33.2	38.2	43.8	49.2
<i>Ingredients (g kg⁻¹ diet)</i>					
Albumin	21.56	29.39	37.23	45.06	52.89
Fish meal	10	10	10	10	10
Gelatin	5	5	5	5	5
Corn starch	47.8	41.46	35.3	29.29	22.5
Soybean oil	6	4.75	3.31	1.77	1
Cellulose	4.9	4.71	4.52	4.34	4.15
Dicalcium phosphate	3.05	3	2.95	2.87	2.8
BHT ^a	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Salt	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Vitamin C ^b	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Vitamin and mineral premix ^c	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
L-lysine	0.02	0.02	0.01	0.1	0
<i>Analyzed composition (% dry matter)</i>					
Dry matter	90.78	89.8	88.8	88.94	89.26
Gross energy, Kcal / kg ⁻¹	4163	4186	4197	4204	4137
Crude protein	27.65	33.27	38.25	43.8	49.21
Crude fat	7.79	9.15	7.21	6.32	6.29

^a Butylated hydroxytoluene;

^b Vitamin C Rovimix@ Stay-35 DMS Nutritional Products, Switzerland,

^c Vitamin and mineral supplement (levels per kg of product): vitamin A = 1,200,000 IU; vitamin D3 = 200,000 IU; vitamin E = 12,000 mg; vitamin K3 = 2,400 mg; vitamin B1 = 4,800 mg; vitamin B2 = 4,800 mg; vitamin B6 = 4,000 mg; vitamin B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate= 12,000 mg; vitamin C = 48,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; nicotinic acid= 24,000 mg; Mn = 4.000 mg; Zn = 6.000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Cu = 4 mg e Se = 20 mg.

1

TABELA 2. GROWTH PERFORMANCE OF ZEBRAFISH FED EXPERIMENTAL DIETS FOR 62 DAYS ⁽¹⁾.

Diets (%PB)	27.6	33.2	38.2	43.8	49.2	p-Value
Initial length	12.95 ± 1,91	12.95 ± 1,91	12.95 ± 1,91	12.95 ± 1,91	12.95 ± 1,91	
Initial body weight (mg)	25.2 ± 1,98	25.2 ± 1,98	25.2 ± 1,98	25.2 ± 1,98	25.2 ± 1,98	
Final body weight (mg)	139.35 (±42.98)	139.74 (±47.37)	140.06 (±40.85)	146.23 (±49.49)	138.73 (±46.20)	0.527
Final Length (mm)	18.38 (±1.74)	18.30 (±1.88)	18.62 (±1.65)	18.77 (±1.83)	18.45 (±1.76)	0.083
Feed intake (mg)	449.00 (±15.4)	450.10 (±20.8)	438.80 (±17.8)	479.50 (±32.3)	453.60 (±11.4)	0.092
Feed efficiency ^a	0.24 (±0.03)	0.24 (±0.01)	0.25 (±0.03)	0.23 (±0.02)	0.24 (±0.02)	0.667
Specific growth rate (% day ⁻¹) ^b	2.68 (±0.18)	2.71 (±0.10)	2.73 (±0.10)	2.75 (±0.07)	2.69 (±0.08)	0.857
Protein efficiency ratio ^c	2.94 (±0.43) a	2.48 (±0.13) b	2.25 (±0.26) bc	1.86 (±0.12) cd	1.63 (±0.11) d	0.001
Survival (%)^d	99.44 (±1.36)	98.89 (±1.72)	99.44 (±1.36)	97.22 (±3.27)	99.44 (±1.36)	0.249

2 ¹ Values presented as means ± standard deviation for data normally distributed. Means in the same row with different letters differ (P<0.05)
3 by Tukey test, n=6.

4 ^a Feed efficiency: [weight gain (mg)/dry matter feed intake (mg fish⁻¹)];

5 ^b Specific growth rate: [(ln(final weight) – ln(initial weight))/(number of days)]*100;

6 ^c Protein efficiency ratio: [weigh gain (mg)/(dry matter crude protein intake (mg))];

7 ^d Survival: [(number of final fish/number of initial fish)]*100

1

TABELA 3. NUTRIENT AND ENERGY UTILIZATION OF ZEBRAFISH FED EXPERIMENTAL DIETS FOR 62 DAYS¹.

Diets	Crude protein level (%)					p-value
	27.6	33.2	38.2	43.8	49.2	
<i>Nitrogen</i>						
Intake (mg g ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^a	3.54 (±0.34) d	4.21 (±0.33) c	4.66 (±0.30) c	5.63 (±0.41) b	6.33 (±0.42) a	0.001
Retention (mg g ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^b	1.49 (±0.17) b	1.48 (±0.07) b	1.68 (±0.10) ab	1.74 (±0.13) a	1.78 (±0.10) a	0.001
Nitrogen retention rate (% nitrogen intake) ^c	42.84 (±9.17) a	35.2 (±3.38) ab	36.2 (±3.85) ab	31.18 (±4.38) b	28.23 (±2.78) b	0.001
<i>Energy</i>						
Intake (kcal g ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^d	1435 (±134)	1380 (±72)	1345 (±80)	1425 (±84)	1388 (±80)	0.471
Retention (kcal g ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^e	600 (±22) a	606 (±19) a	597 (±18) a	580 (±13) a	544 (±18) b	0.001
Energy retention rate (% energy intake)^f	42.26(±5.21)	44.09(±3.40)	44.61(±4.25)	40.81(±2.58)	39.33(±2.77)	0.117

2 ¹Values presented as means ± standard deviation for data normally distributed. Means in the same row with different letters differ (P<0.05) by
3 Tukey test, n=6.

4 ^aNitrogen intake: [dry matter protein intake (g)/(6.25x1000)] / (average body weight x number of days);

5 ^b Nitrogen retention: [(final body weight x final body protein (%))-(initial body weight x initial body protein (%))/6.25 x 1000]/average body
6 weight x number of days;

7 ^c Nitrogen retention (% Nitrogen intake): (Nitrogen retention/Nitrogen intake) x 100;

8 ^d Energy intake: (energy ingested (kcal) x 1000)/(average body weight x number of days);

9 ^e Energy retention: [(final weight x final energy)-(initial weight x initial energy) x 1000]/(average body weight x number of days);

10 ^f Energy retention (% Energy intake): (Energy retention / Energy intake) x 100 ;

11 *ABW: average body weight: (initial body weight + final body weight)/2

1 TABELA 4. WHOLE-BODY COMPOSITION (WET WEIGHT BASIS) OF ZEBRAFISH FED EXPERIMENTAL DIETS FOR 62 DAYS¹.

Diets	Crude protein level (%)						p-value
	Initial	27.6	33.2	38.2	43.8	49.2	
Protein (%)	50.52	43.16 (± 3.10) bc	42.97 (± 1.35) c	47.49 (± 2.43) ab	48.28 (± 3.12) a	49.93 (± 2.34) a	0.001
Gross energy (kcal g ⁻¹)	5061	6168 (± 98) a	6233 (± 110) a	6133 (± 122) a	5911 (± 107) b	5690 (± 149) c	0.001
Moisture	90.24	89.06 (± 2.03)	88.93 (± 2.09)	91.10 (± 0.81)	90.63 (± 0.64)	89.68 (± 1.04)	0.063

2 ¹Values presented as means \pm standard deviation for data normally distributed. Means in the same row with different letters differ
3 (P<0.05) by Tukey test, n=6.

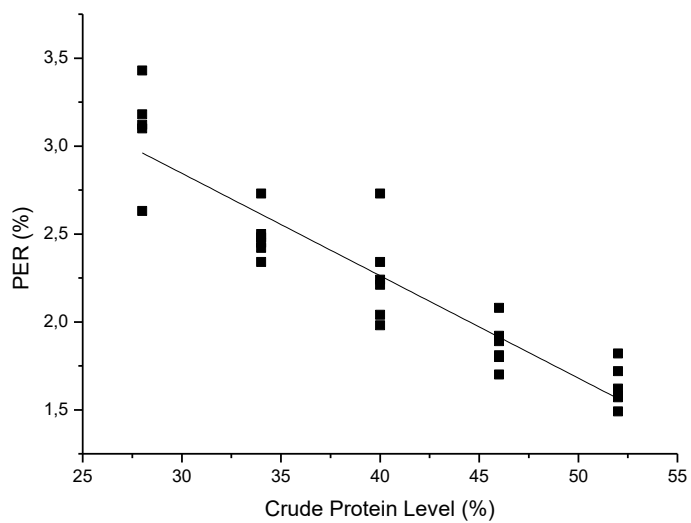


Figure 5. Linear model of protein efficiency ratio.

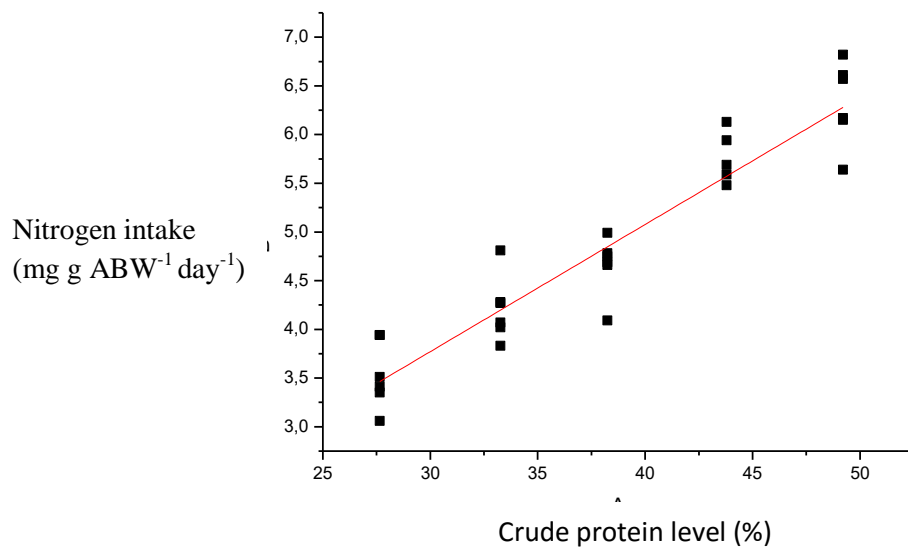


Figure 6. Linear model of Nitrogen intake..

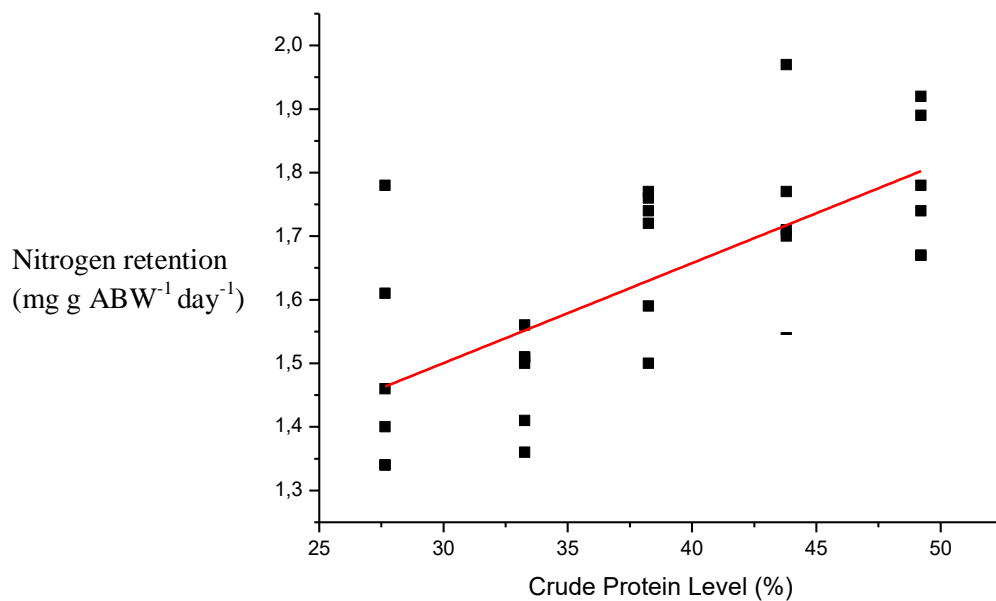


Figura 7. Linear model of Nitrogen retention (mg g ABW⁻¹ day⁻¹).

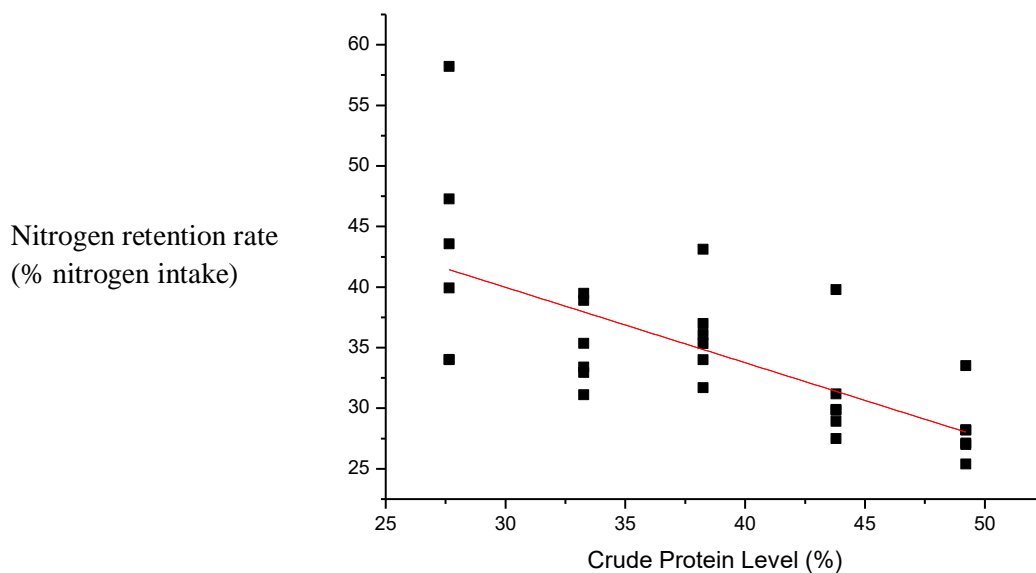


Figura 8. Linear modelo of nitrogen retention (% nitrogen intake).

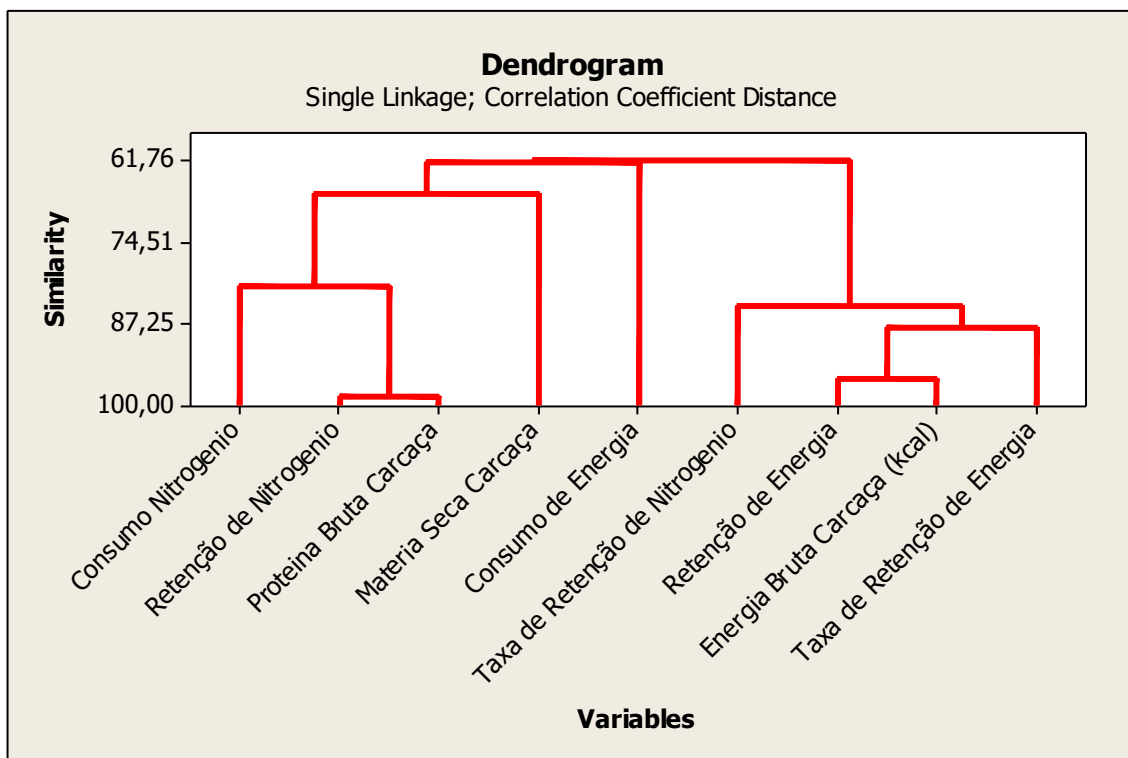


Figura 9. Cluster Analysis Dendrogram, Based Nutriente and Energy Utilization and Whole-Body Composition.

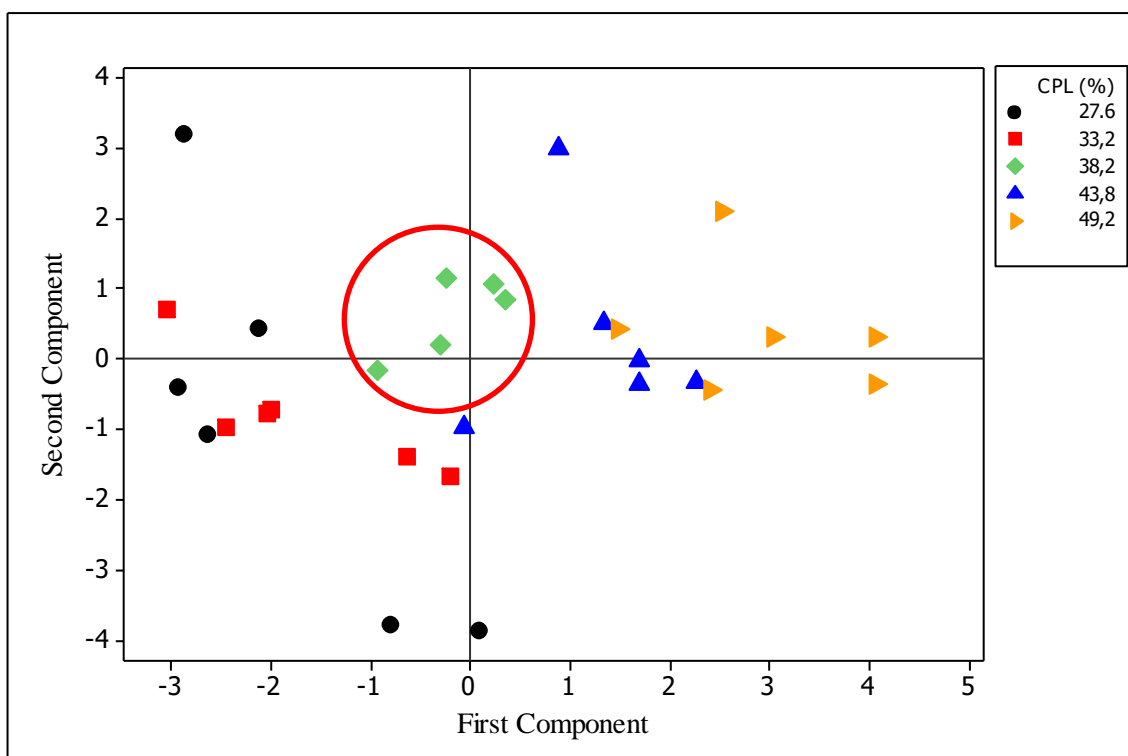


Figura 10. Principal Component Analysis (PCA) - Loading Plot of Nutrient Utilization and energy and Whole-Body Composition; CPL –Crude Protein Level (%); The symbols represent diferentes tratamentos.

Referências

- ¹Jones R. "Let Sleeping Zebrafish Lie: A New Model for Sleep Studies". *PLoS Biology*. 2007; v 5; p 281.
- ²Ulloa PE, Iturra P, Neira R, Araneda C. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2011; v 21, p 649-666.
- ³NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient Requirements of Fishes and Shrimp, Washington: DC. National Academies Press, 2011.
- ⁴Nelson DL, Cox MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed. 2011; 5v, p 1274.
- ⁵Wilson RP. Aminoacids and Proteins. In J. E. Halver, & R. W. Hardy, *Fish Nutrition*. 2002; v 3, p 143 – 179.
- ⁶Matthews M, Trevarrow B, Matthews J. 'A virtual tour of the Guide for zebrafish users' *Lab Animal*. 2002; v 3, p 34-40.
- ⁷Robison B, Drew R, Murdoch G, Powell M, Rodnick K, Settles M, Stone D, Churchill E, Hill R, Papasani M, Lewis S, Hardy R. Sexual dimorphism in hepatic gene expression and the response to dietary carbohydrate manipulation in the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol*. 2008; v 2, p 141–154.
- ⁸Westerfield, M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press, Eugene, Oregon USA. 2000; p 385.
- ⁹Fiogbé E, Kestemont P. (1995) An assessment of the protein and amino acid requirement in goldfish (*Carassius auratus*) larvae. *J Appl Ichthyol*. 1995; v 11, p 282–289.
- ¹⁰Sales J, Janssens GPJ. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquat. Living Res.*, New York, 2003; v 16, p 533–540.
- ¹¹Dabrowski K, Hliwa P, Gomulka P, Sienicki M, Carvalho AP, Ostaszewska T, Terjesen B. Studies on the utilization of free amino acid, casein-based, or commercial diets in rearing common carp larvae. *Abstr of Aquac Am*. 2005; p 344.

- ¹²Lawrence, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquacultur.* 2007; v 269, p 1-20.
- ¹³Siccardi III AJ, Garris HW, Jones WT, Moseley DB, D'Abramo LR, Watts SA. Growth and survival of zebrafish (*Danio rerio*) fed different commercial and laboratory diets. *Zebrafish* 2009; v 6, p 275–280.
- ¹⁴INA. Report of the american institute of nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, Ottawa, 1977; v107, p 1340-1348.
- ¹⁵Singleman C, Holtzman NG. Growth and maturation in the zebrafish *Danio rerio*: a staging tool for teaching and research. *Zebrafish*, 2014; v 11, p 1-11.
- ¹⁶Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2009;48:785–789
- ¹⁷AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists. 17. ed. Arlington: Inc, 2000.
- ¹⁸Minitab, Inc: Minitab: Data Analysis Software, release 16.1.1.0. State College, Pa, Minitab Inc, 2010.
- ¹⁹Ferreira DF. Estatística multivariada. Lavras: UFLA, 2011; ed 2, p 676.
- ²⁰Cruz CD, Ferreira FM, Pessoni LA. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011; 620 p.
- ²¹Lochmann RT & Phillips H. Dietary protein requirement of juvenile golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*) and goldfish (*Carassius auratus*) in aquaria. *Aquaculture*, 1994; v.128, p.277-285.
- ²²Luchesi JD, Neu DH, Costa JM, Fries EM, Boscolo WR, Feiden A. Proteína bruta na dieta de alevinos de quinguio (*Carassius auratus*). *Revista Agrarian*, 2014; v.7, n.23, p.101-106.
- ²³Jena J K, Mitra G, Biswal S. Effect of dietary protein levels on growth and nutrient utilization of fringe-lipped carp, *Labeo fimbriatus* (Bloch) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 2012; v. 18, p. 628-639.
- ²⁴Liu Y, Feng L, Jiang J, Liu Y, Zhou XQ. Effects of dietary protein levels on the growth performance, digestive capacity and amino acid metabolism of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Research*, 2009; v. 40, p. 1073-1082.

- ²⁵Kaushik S, Georga, I, Koumoundouros G. Growth and body composition of Zebrafish (*Danio rerio*) larvae fed a compound feed from first feeding onward: toward implications on nutrient requirements. *Zebrafish*, 2011; v.8, p.87-95.
- ²⁶Zeitler MH, Kirchgessner M, Schwarz FJ. Effects of different protein and energy supplies on carcass composition of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*; 1984; v 36, p 37-48.
- ²⁷Pei J, Wang Q, Zhou J, Lai L. Estimating protein–ligand binding free energy: atomic solvation parameters for partition coefficient and solvation free energy calculation. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2004; v 57(4), p 651-664.
- ²⁸Yun B, Yu X, Xue M, Liu Y, Wang J, Wu X, Liang X. Effects of dietary protein levels on the long-term growth response and fitting growth models of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Animal Nutrition*, 2015; v1(2), p 70-76.
- ²⁹Elangovan A, Shim KF. Growth response of juvenile *Barbodes altus* fed isocaloric diets with variable protein levels. *Aquaculture*, 1997; v 158, p 321- 329.
- ³⁰Ng WK, Soon SC, Hashim R. The dietary protein requirement of a bagrid catfish, *Mystus nemurus* (Cuvier & Valenciennes), determined using semipurified diets of varying protein level. *Aquaculture Nutrition*, 2001. v 7(1), p 45-51.
- ³¹Yang SD., Lin TS, Liou CH, Peng HK. Influence of dietary protein levels on growth performance, carcass composition and lipid classes of juvenile *Spinibarbus hollandi* (Oshima). *Aquac. Res*, 2003; v 34, p 661-666.
- ³²Kim KW, Wang X, Choi SM, Park GJ, Bai SC. Evaluation of dietary protein-to-energy ratio in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceous* (Temminck et Schlegel). *Aquac. Res.*, 2004; v 35, p 250-255.
- ³³Yang SD, Liou CH, Liu FG. Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 2002; v 213, p 363-372.
- ³⁴Coutinho F, Peres H, Guerreiro I, Pousão-Ferreira P, Oliva-Teles A. Dietary protein requirement of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) juveniles. *Aquaculture*, 2012; v 356, p 391-397.
- ³⁵Coutinho F, Peres H, Castro C, Pérez-Jiménez A, Pousão-Ferreira P, Oliva-Teles A, Enes P. Metabolic responses to dietary protein/carbohydrate ratios in zebra

- sea bream (*Diplodus cervinus*, Lowe, 1838) juveniles. *Fish physiology and biochemistry*, 2015; v 42, p 1-10.
- ³⁶Laeger T, Morrison CD. Amino acid-dependent regulation of food intake: is protein more than the sum of its parts? *The Journal of Physiology*, 2013; v 591, p 5417-5418.
- ³⁷Cho CY, Kaushik SJ. Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World review of nutrition and dietetics*, 1990; v 61, p 132-172.
- ³⁸Kaushik SJ, Cowey CB. Ammonio genesis and dietary factors affecting nitrogen excretion. University of Guelph, Guelph, Canada. In: *Nutritional Strategies & Aquaculture Waste*, 1991; p. 3-19
- ³⁹Cho CY, Bureau DP. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquatic Research*, 2001; v 32, p 349-360.
- ⁴⁰Islam MS, Tanaka M. Optimization of dietary protein requirement for pond-reared mahseer *Tor putitora* Hamilton (Cypriniformes: Cyprinidae). *Aquaculture Research*, 2004; v 35, p 1270-1276.
- ⁴¹Jena, JK, Mitra G, Biswal S. Effect of dietary protein levels on growth and nutrient utilization of fringe-lipped carp, *Labeo fimbriatus* (Bloch) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 2012; v 18, p 628-639.
- ⁴²Liu Y, Feng L, Jiang J, Liu Y, Zhou XG. Effects of dietary protein levels on the growth performance, digestive capacity and amino acid metabolism of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Research*, 2009; v 40, p 1073-1082.
- ⁴³Kim SK, Takeuchi T, Yokoyama M, Murata Y, Kaneniwa M, Sakakura Y. Effect of dietary taurine levels on growth and feeding behavior of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 2005; v 250(3), p 765-774.
- ⁴⁴Wang Y, Guo JL, Bureau DP, Cui ZH. Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients in feeds for cuneate drum (*Nibea miichthioides*). *Aquaculture*, 2006; v 252(2), p 476-483.
- ⁴⁵Mohanta KN, Mohanty SN, Jena JK, Sahu NP. Protein requirement of silver barb, *Puntius gonionotus* fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 2008; v 14(2), p 143-152.

- ⁴⁶Elangovan A, Shim KF. Growth response of juvenile *Barbodes altus* fed isocaloric diets with variable protein levels. *Aquaculture*, 1997; v 158, p 321-329.
- ⁴⁷Garling DLJr, Wilson RP. Optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.*, 1976; v 106, p 1368 - 1375.
- ⁴⁸Tort L, Blasch J, Mackenzie S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive response. *Imunologia*, 2003; v 22, p 277-286.
- ⁴⁹Wu G. *Aminoacids: biochemistry and nutrition*. Boca Raton: CRC Press, 2013; p 481.
- ⁵⁰Pohlenz C, Gatlin III DM. Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*, 2014; v 431, p 111-117.
- ⁵¹Barros MM, Falcon DR, Orsi RO, Pezzato LE, Fernandes Junior AC, Junior AR, Carvalho PLPF, Padovani CR, Guimarães IG, Sartori MN. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014; v39, p 188-195.

IMPLICAÇÕES

Apesar da importância do zebrafish como modelo biológico para estudos na área da medicina quanto na nutrição de peixes, o mesmo não possui dieta modelo para o uso nessas pesquisas, o que pode interferir nas conclusões, visto que peixes alimentados com dietas deficientes em nutrientes podem afetar, não somente o crescimento, quanto o metabolismo.

Considerando a proteína o nutriente mais importante que compõe uma dieta, e essencial para o funcionamento do organismo, desvendar a exigência proteica do zebrafish se tornou essencial. O presente estudo utilizou dieta semipurificada de excelente valor biológico para evitar qualquer interferência de fatores antinutricionais que pudessem afetar os resultados, além de realizar a reprodução dos mesmos para obter os alevinos de mesma idade.

Apesar da falta de informação e das dificuldades obtidas para reproduzir e manter os alevinos de zebrafish, esta não foi uma barreira para a realização do experimento, pois foram criados “métodos e maneiras” que facilitassem essas etapas.

Sendo assim, ficou evidente que os diferentes níveis de proteína na dieta, influenciaram nos resultados de desempenho zootécnicos, composição de carcaça e de utilização da proteína e energia dos peixes. E que o melhor nível proteico descrito, pode auxiliar nas futuras pesquisas com zebrafish.

Porém novos estudos com dietas práticas devem ser realizados a fim de se obter dieta modelo para ser utilizadas em estudos biológicos com este peixe.