

Vitor Augusto Giatti Fernandes

**AVALIAÇÃO DA INCLUSÃO DIETÉTICA DE *Schizochytrium*
sp., RICA EM ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO, PARA
TILÁPIA-DO-NILO**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutor em
Aquicultura e Recursos Pesqueiros

Orientadora: Débora Machado Fracalossi

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fernandes, Vitor Augusto Giatti

Avaliação da inclusão dietética de *Schizochytrium*
sp. rica em ácido docosahexaenóico, para tilápia-do
Nilo / Vitor Augusto Giatti Fernandes ;
orientadora, Débora Machado Fracalossi, 2017.

87 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. ácidos graxos. 3. DHA. 4.
digestibilidade. 5. carbonilação de proteínas. I.
Fracalossi, Débora Machado . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Aquicultura. III. Título.

Avaliação da inclusão dietética de *Schizochytrium* sp. rica em ácido docosahexaenóico, para tilápia-do-Nilo

Por

VITOR AUGUSTO GIATTI FERNANDES

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



Prof.a. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura

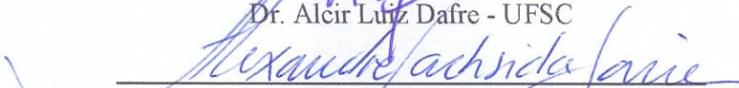
Banca Examinadora:



Dra. Débora Machado Fracalossi – *Orientadora*



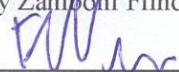
Dr. Alcir Luiz Dafre - UFSC



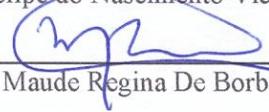
Dr. Alexandre Sachsida Garcia - UFPR



Dr. Evoy Zaniboni Filho - UFSC



Dr. Felipe do Nascimento Vieira - UFSC



Dr. Maude Regina De Borba - UFFS

Este trabalho é dedicado a toda minha família, amigos e colegas.
Também aos sobreviventes e a todos que os ajudam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, incansáveis apoiadores e investidores do meu esforço na vida, não apenas acadêmica, mas em cada aspecto dela.

Agradeço a minha namorada, companheira Pâmela Assmus dos Santos, pela compreensão, incentivo e também por adicionar uma grande dose de equilíbrio para minha vida.

Agradeço aos meus companheiros acadêmicos, em especial aos do LABNUTRI e do LAPAD. Cada dia que passou nesses quase 13 anos de convivência me fizeram ter cada vez mais orgulho de fazer parte desta equipe, para a qual eu espero também ter contribuído.

Agradeço em especial a alguns colegas que estiveram mais próximos, principalmente nos experimentos: Fernando, Renata, Bruna, Bruno, Allan, Flávio, Penélope, Rosana, Liziane, Sônia, Janice, Amarilis e Maria Fernanda. À equipe do Laboratório de Defesas Celulares do Departamento de Bioquímica da UFSC, sob supervisão do Professor Alcir Luiz Dafre. Aos estagiários do LABNUTRI: Douglas, Lucas e Michele, por serem extremamente confiáveis e estarem sempre dispostos a enfrentar dias de biometrias, coletas e análises com muita tenacidade e bom humor.

Agradeço a todos os integrantes do Departamento de Aquicultura, em especial aos coordenadores da pós-graduação e ao secretário, Carlito Aloísio Klunk, que se dedicam para manter o programa ao patamar de excelência que está hoje. Em especial, a minha orientadora e “mãe científica”, Débora Machado Fracalossi. Se fui capaz de chegar onde estou, ela foi a principal contribuinte para minha formação e até hoje me inspira, também por compartilharmos um caminho que poucos terão a infelicidade de atravessar e a felicidade de vencer.

Por fim, e mais importante, reforço meu agradecimento a todos que eu já citei acima no momento mais difícil que passei na minha vida até agora. De uma hora pra outra minha vida passou de salas de aula, correção de provas e sistemas de recirculação para visitas a médicos, exames e muitas incertezas. Todos que eu citei acima contribuíram de alguma maneira para tornar este infeliz período muito mais fácil para atravessar. Agradeço do fundo do meu existir a compreensão, o apoio, as palavras, as atitudes de todos no departamento e a maneira como todos se dedicaram e me estenderam a mão, sem questionar. Se existe algo que estes meses de dificuldade me mostraram é a grande quantidade de pessoas generosas que me cercam, bem como aquelas que conheci durante esta difícil jornada (equipe médica). Muito obrigado.

RESUMO

Este estudo avaliou a inclusão de ALL-G-RICH[®], fonte de ácido docosaenoico (22:6 n-3, DHA), na dieta de tilápia-do-Nilo e seu efeito sobre índices de desempenho, acúmulo de ácidos graxos corporais e potencial dano oxidativo à biomoléculas. Um ensaio alimentar com juvenis (peso médio inicial 8,35 g) avaliou níveis de inclusão de ALL-G-RICH[®], a saber: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0%. Foi também avaliada uma dieta controle, contendo óleo de fígado de bacalhau (OFB), com nível de DHA comparável à inclusão de 1% de ALL-G-RICH[®]. A inclusão de ALL-G-RICH[®] na dieta de tilápia-do-Nilo, apesar de não influenciar o ganho em peso, taxa de crescimento específico, conversão alimentar e taxa de retenção proteica, influenciou o perfil de ácidos graxos corporais, promovendo o acúmulo de DHA. Houve acúmulo significativamente maior de DHA nos peixes alimentados com OFB, em comparação com aqueles alimentados com conteúdo similar de DHA na forma de ALL-G-RICH[®]. Também foi realizado ensaio de digestibilidade alguns dos nutrientes presentes no ALL-G-RICH[®], utilizando-se óxido de ítrio como marcador (0,1% da dieta referência), coleta de fezes por sedimentação e peixes com 65,86 g de peso médio inicial. A digestibilidade foi alta para o DHA (96,10%), entretanto foi baixa para ácido palmítico (70,81%), outro ácido graxo presente em grande quantidade no referido aditivo. Foram testados seis índices para avaliar se as altas inclusões dietéticas de DHA ou OFB causariam dano oxidativo à biomoléculas na tilápia, sendo eles o ensaio cometa, TBARS, detecção de malondialdeído por HPLC, detecção de adutos de proteína (*dot blot*) de malondialdeído e 4-hidroxinonenal e carbonilação de proteínas. Não foram encontradas evidências que a inclusão de ALL-G-RICH[®] causa dano oxidativo à biomoléculas. Os resultados mostram que a inclusão de ALL-G-RICH[®] até 4% na dieta não prejudicou o desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo e se mostrou eficiente para promover o acúmulo de DHA corporal, sem provocar dano oxidativo à biomoléculas.

Palavras-chave: aquicultura, ácidos graxos, DHA, digestibilidade, carbonilação de proteínas.

ABSTRACT

This study evaluated the inclusion of ALL-G-RICH[®], a source of docosahexaenoic acid (22: 6 n-3, DHA) in the diet of Nile tilapia and its effect on growth, feed conversion, body accumulation of fatty acids, and potential cellular oxidative stress. A feeding trial with juvenile tilapia (mean initial weight 8.35 g) evaluated different inclusions of ALL-G-RICH[®]: 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 %. A control diet was also evaluated, containing cod liver oil (OFB), whose DHA level was comparable to the diet 1% ALL-G-RICH[®]. The inclusion of ALL-G-RICH[®] did not affect weight gain, specific growth rate, feed conversion and protein retention rate, but influenced body fatty-acid profile, promoting the accumulation of DHA. There was a significantly higher accumulation of DHA in OFB-fed fish compared to those fed similar DHA content in the form of ALL-G-RICH[®]. Selected nutrient digestibilities were also performed with ALL-G-RICH[®], using yttrium oxide as an inert marker (0.1% reference diet), collection of feces by sedimentation, and fish with 65.86 g initial weight. The apparent coefficient digestibility was high for DHA (96.10%), however it was low for palmitic acid (70.81%), another fatty acid found in considerable amount in the referred additive. Six indexes were tested to evaluate if high inclusions of DHA as ALL-G-RICH[®] or OFB could promote cellular oxidative stress, such as comet assay, TBARS, malondialdehyde detection by HPLC, detection of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal protein adducts (*dot blot*) and protein carbonylation. No evidence was found that inclusion of ALL-G-RICH[®] causes oxidative stress. The results show that the inclusion of up to 4% ALL-G-RICH in the diet did not affect performance of Nile tilapia juveniles and was very efficient to further accumulation of body DHA, without promoting cellular oxidative stress.

Keywords: aquaculture, fatty acids, DHA, digestibility, protein carbonylation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Produção mundial de pescado, tanto oriundo de capturas quanto da aquicultura e suprimento de pescado *per capita*..... 22
- Figura 2 - Vias de biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ($\geq C_{20}$) a partir de ácidos α -linolênico (18:3 n-3) e linoleico (18:2 n-6), descritas para teleósteos. As atividades enzimáticas mostradas no diagrama são preditas a partir de expressão heteróloga em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) de acil-dessaturase-2 de peixe (Fads2) e elongase de ácidos graxos de cadeia longa (Elovl). β -ox = β -oxidação. 26
- Figura 3 - Regressão linear da quantidade de ácido docosaenoico (DHA) corporal após 57 dias de alimentação com dietas contendo doses crescentes de ALL-G-RICH®..... 46
- Figura 4 - (A) Quantidade de alguns ácidos graxos nas dietas com 1% de inclusão de ALL-G-RICH® e a composição corporal final, após 57 de alimentação. (B) Quantidade de alguns ácidos graxos nas dietas OFB e a composição corporal final, após 57 de alimentação. EPA = 20:5 n-3, DPA = 22:5 n-3 e DHA = 22:6 n-3 47
- Figura 5 - Exemplos de mensuração de danos ao DNA por meio do ensaio cometa. A = escore 0, ausência de cauda; B = cauda pequena, menor que a cabeça; C = escore 2, cauda comparável ao tamanho da cabeça; D = escore 3, cauda maior que a cabeça e E = escore 4, cabeça pequena e cauda grande com várias vezes o tamanho da cabeça..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da farinha de alga <i>Schizochitryum</i> sp. (ALL-G-RICH®).....	38
Tabela 2 - Formulação, composição centesimal e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais	39
Tabela 3 - Composição e perfil de ácidos graxos das dietas utilizadas no ensaio de digestibilidade	43
Tabela 4 - Desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo com cinco níveis de inclusão dietética de ALL-G-RICH® por 57 dias.....	47
Tabela 5 - Composição e perfil de ácidos graxos corporais de juvenis de tilápia-do-Nilo com cinco níveis de inclusão dietética de ALL-G-RICH® por 57 dias	48
Tabela 6 - Composição corporal e perfil de ácidos graxos em juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com duas fontes de DHA na dieta, ALL-G-RICH® ou óleo de fígado de bacalhau, por 57 dias.....	49
Tabela 7 - Composição corporal e perfil de ácidos graxos em juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com duas fontes de DHA na dieta, ALL-G-RICH® ou óleo de fígado de bacalhau, por 57 dias.....	50
Tabela 8 - Formulação, composição centesimal e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais	64
Tabela 9 - Dano oxidativo à biomoléculas em tilápias-do-Nilo após inclusão dietética de ALL-G-RICH® em vários níveis	71
Tabela 10 - Dano oxidativo à biomoléculas em tilápias-do-Nilo, comparando-se a inclusão dietética de 1% ALL-G-RICH® e 1,7 % de óleo de fígado de bacalhau (OFB).....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LOA.....	ácido graxo linoleico (18:2n-6)
α -LNA.....	ácido graxo alfa-linolênico (18:3n-3)
ARA.....	ácido graxo araquidônico (20:4n-6)
EPA.....	ácido graxo eicosapentaenoico (20:5n-3)
DHA.....	ácido graxo docosaenoico (22:6n-3)
SFA.....	ácidos graxos saturados
MUFA.....	ácidos graxos monoinsaturados
PUFA.....	ácidos graxos poli-insaturados
LC-PUFA....	PUFA de cadeia longa (≥ 20 carbonos)
n-3.....	série n-3 (ômega-3)
n-6.....	série n-6 (ômega-6)
AOAC.....	Association of Official Analytical Chemists
CEUA.....	Comissão de Ética no Uso de Animais
FAO.....	Food and Agriculture Organization of United Nations
IBGE.....	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NRC.....	National Research Council
GIFT.....	Genetically Improved Farmed Tilapia
g.....	grama
mg.....	miligrama
mm.....	milímetro
L.....	litro
mL.....	mililitro
h.....	hora
min.....	minuto
MNA.....	malondialdeído
4-HNE.....	4-hidroxinonal
DNA.....	ácido desoxirribonucleico
HPLC.....	cromatografia líquida de alta eficiência
FL-HPLC.....	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fluorimétrica
DNPB.....	2,4-dinitrofenil-hidrazina
TBARS.....	Substâncias reativas ao ácido til-barbitúrico
TBS-T.....	Solução salina tamponada com 0,05% de Tween 20
HEPES.....	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico

LISTA DE SÍMBOLOS

α	letra grega alfa
Δ	letra grega delta
β	letra grega beta
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
\pm	mais ou menos
$\%$	porcentagem
\geq	maior ou igual
$\text{\textcircled{R}}$	marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	A AQUICULTURA E A TILÁPIA-DO-NILO.....	23
1.2	EXIGÊNCIA DIETÉTICA E ACÚMULO CORPORAL DE ÁCIDOS GRAXOS NA TILÁPIA-DO-NILO.....	24
1.3	DHA NA NUTRIÇÃO HUMANA	26
1.4	FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS n-3	28
1.5	ALGAS NA DIETA DE PEIXES	28
1.6	A FARINHA DA ALGA <i>Schizochytrium</i> sp. (ALL-G-RICH®) 29	
1.7	DANO OXIDATIVO À BIOMOLÉCULAS	30
1.8	OBJETIVOS.....	31
1.8.1	Objetivo geral.....	31
1.8.2	Objetivos específicos	31
2	Artigo 1.....	33
2.1	RESUMO	34
2.2	DESTAQUES DO ARTIGO	35
2.3	INTRODUÇÃO.....	35
2.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.4.1	Delineamento e dietas experimentais.....	37
2.4.1.1	Ensaio alimentar de desempenho	37
2.4.1.2	Ensaio alimentar de digestibilidade.....	38
2.4.2	Peixes e procedimentos experimentais	41
2.4.2.1	Ensaio alimentar de desempenho	41
2.4.2.2	Ensaio alimentar de digestibilidade.....	42
2.4.3	Análises químicas	42
2.4.4	Variáveis mensuradas.....	44
2.4.5	Análises estatísticas	45
2.5	RESULTADOS	45
2.5.1	Ensaio alimentar de desempenho	45
2.5.2	Ensaio alimentar de digestibilidade.....	46

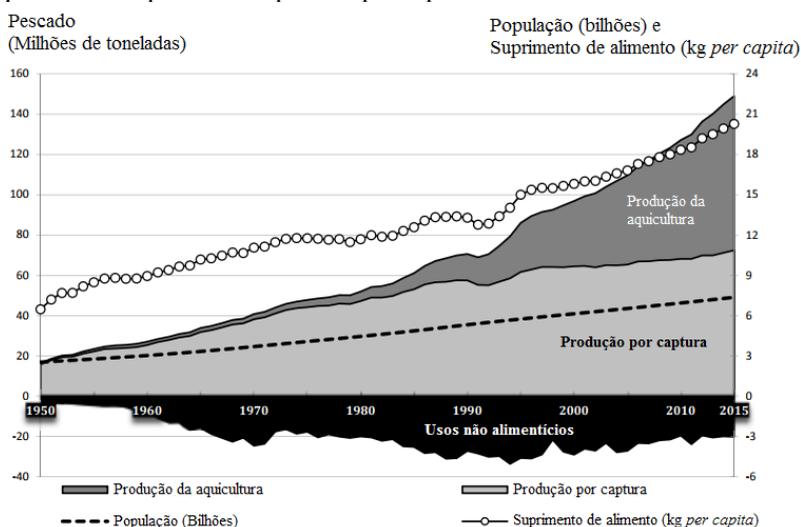
2.6	DISCUSSÃO.....	49
2.7	AGRADECIMENTOS.....	53
2.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	53
3	Artigo 2.....	59
3.1	RESUMO.....	60
3.2	INTRODUÇÃO.....	61
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
3.3.1	Ensaio alimentar.....	63
3.3.2	Peixes e procedimentos experimentais.....	66
3.3.3	Ensaio Cometa.....	66
3.3.4	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)...	67
3.3.5	Deteção de MDA por HPLC com deteção fluorimétrica (FL-HPLC).....	68
3.3.6	<i>Dot blot</i> para 4-HNE, MDA e carbonilação de proteínas	68
3.3.7	Análises estatísticas.....	69
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
4	CONCLUSÕES GERAIS.....	79
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 A AQUICULTURA E A TILÁPIA-DO-NILO

A produção mundial de pescado cresce a uma taxa mais rápida que a população humana, contribuindo, portanto, para melhorar a oferta de proteína animal (FAO, 2017a). O pescado é oriundo de duas fontes: captura e criação. Nos últimos anos, o pescado obtido por captura está estagnado, enquanto que a aceleração na disponibilidade é sustentada pela aquicultura (Figura 1).

Figura 1: Produção mundial de pescado, tanto oriundo de capturas quanto da aquicultura e suprimento de pescado *per capita*.



Fonte: Adaptado de FAO, 2017b.

As tilápias representam um vasto grupo de espécies da família dos ciclídeos, sendo originárias de regiões africanas, Israel e Jordânia. A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de tilápia mais criada no mundo, representando cerca de 80% da produção mundial de tilápias (MORO et al., 2013). Vale ressaltar que as tilápias são superadas em produção apenas pelas carpas (FAO, 2017a).

A produção aquícola de tilápia-do-Nilo está se expandindo rapidamente em todo o mundo. Segundo dados da FAO (2017a), mais de 3,93 milhões de toneladas foram produzidas em 2015. Além disso, há

uma projeção de que este montante aumente até 8,89 milhões de toneladas em 2020 (TACON E METIAN, 2008). A criação de tilápia-do-Nilo representa 40,9% do valor monetário total da piscicultura brasileira, chegando a 239 mil toneladas em 2016. Isto representa 47,1% de toda a produção piscícola nacional (IBGE, 2016).

Esta pujança da tilápia-no-Nilo sobre outras espécies deve-se a sua rusticidade, adaptabilidade a vários sistemas de criação e clima, possuir programa de melhoramento e tecnologias de produção bem definidas, além de excelente aceitação pelo mercado consumidor (MORO et al., 2013).

1.2 EXIGÊNCIA DIETÉTICA E ACÚMULO CORPORAL DE ÁCIDOS GRAXOS NA TILÁPIA-DO-NILO

Os ácidos graxos essenciais para peixes são conhecidos por estimular o crescimento ou qualquer outro tipo de resposta biológica, sendo que não são sintetizados *de novo* ou o são, mas em taxas que não permitem um rápido crescimento, sendo necessária sua inclusão na dieta (GLENCROSS, 2009). Cinco ácidos graxos são considerados essenciais para a maioria das espécies de peixes: ácido linoleico (LOA, 18:2 n-6), ácido araquidônico (ARA, 20:4 n-6), ácido alfa-linolênico (α -LNA, 18:3 n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) e ácido docosaexaenoico (DHA, 22:6 n-3).

Em geral, as espécies de peixes de água doce possuem enzimas chamadas dessaturases e alongases, que são responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de cadeia longa (LC-PUFA, ≥ 20 carbonos em sua cadeia), a partir dos seus precursores (LOA e α -LNA) presentes na dieta (GLENCROSS, 2009). No entanto, a eficiência deste mecanismo pode variar com a fase de vida (GLENCROSS, 2009), temperatura (SELLNER & HAZEL, 1982) e salinidade (FONSECA-MADRIGAL et al., 2012), entre outros.

A exigência em ácidos graxos na dieta da tilápia-do-Nilo ainda não é bem compreendida. Na última compilação sobre exigências nutricionais de peixes (NRC, 2011), os ácidos graxos da série n-3 aparecem como necessários para tilápias, mas a quantidade é desconhecida. Em estudo recente, foi demonstrado que a tilápia-do-Nilo exige, pelo menos, 0,45% de α -LNA para crescimento adequado a 27,5°C (CHEN et al., 2013), enquanto que, a 22°C, esta exigência seria de 0,70% (NOBREGA et al., 2017). A temperatura da água tem provavelmente um impacto importante na exigência em ácidos graxos para a tilápia-do-Nilo, sendo que estudos sobre este assunto se

encontram em fase inicial de desenvolvimento (CORREA et al. 2017; NOBREGA et al., 2017).

A tilápia híbrida não tem capacidade de sintetizar ácidos graxos essenciais n-6 ou n-3 (CHOU e SHIAU, 1999), mas pode obtê-los a partir de alguns precursores, quando presentes na dieta (KANAZAWA et al, 1980; CHOU et al., 2001). Estudos recentes (LI et al., 2013) sugerem que a tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) só exige LOA (1,14% da dieta), quando criada a 27°C. No entanto, dessaturação e alongamento de ácidos graxos precursores, provenientes da dieta, parece ser menos eficiente para incorporação de EPA e DHA, quando comparada à adição direta destes na ração (CORREA et al., 2017).

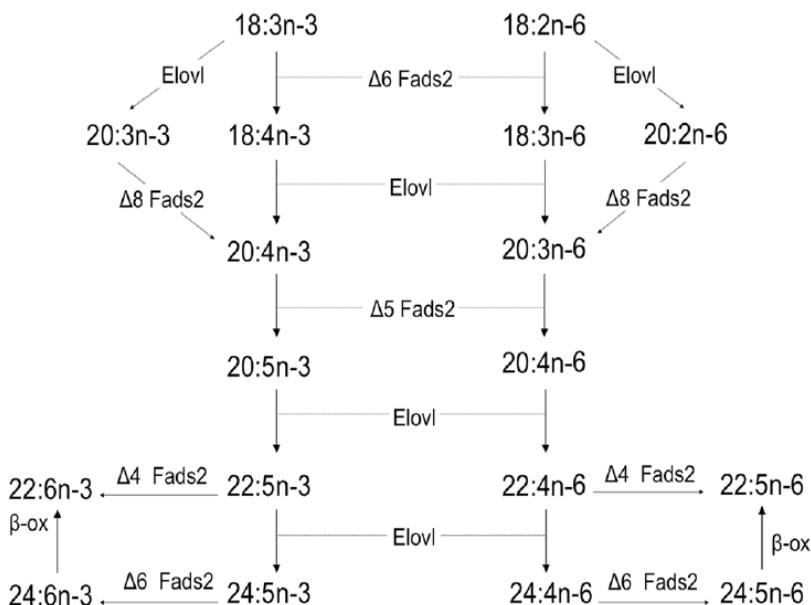
A exigência nutricional de uma espécie de peixe é determinada em relação as suas necessidades fisiológicas e não sob o ponto de vista do que seria desejável para a nutrição humana (TOCHER, 2010). Além de fornecer uma dieta que supra às exigências em ácidos graxos da tilápia, o pescado resultante poderia trazer benefícios à saúde humana, aumentando a ingestão de ácidos graxos da série n-3. Existe a possibilidade de acrescentar ácidos graxos n-3 no corpo da tilápia-do-Nilo, se este for fornecido em boas quantidades na dieta (SOUZA et al., 2007). Juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados apenas com óleos vegetais, pobres em EPA e DHA, mostraram redução destes ácidos graxos no músculo, além de menor relação n-3/n-6 (GRIGORAKIS, 2007; CORREA et al., 2017). No entanto, após apenas 30 dias de substituição de óleo de girassol (fonte de LOA n-6) por óleo de linhaça (fonte de α -LNA n-3) na dieta, houve aumento na relação n-3/n-6 no músculo de 0,09 para 0,23 nesta mesma espécie (JUSTI et al., 2003).

A biossíntese de DHA em vertebrados, a partir de seus precursores α -LNA e EPA possui diversas vias. O α -LNA pode ser transformado em EPA através de duas vias (incluindo as dessaturases $\Delta 8$ ou $\Delta 6$) e, posteriormente, o EPA pode ser transformado em DHA por meio de duas vias (dessaturases $\Delta 4$ ou $\Delta 6$) (OBOH et al., 2017). A transformação através da dessaturase $\Delta 4$, converte o EPA em ácido docosapentaenoico (22:5 n-3, DPA) e depois em DHA. Já a via $\Delta 6$, transforma o EPA em DPA, em ácido tetracosapentaenoico (24:5 n-3, TPA), em ácido tetracosaeixoenoico (24:6 n-3, THA) e, por fim, ocorre uma β -oxidação, originando DHA (Figura 2). Em alguns peixes, incluindo a tilápia-do-Nilo, ambas as vias foram identificadas (OBOH, et al., 2017).

No entanto, o perfil de ácidos graxos no músculo dos peixes também depende de muitos outros fatores, como o catabolismo

oxidativo, cinética de reações de dessaturação e alongamento, incorporação e retroconversão competitiva (LIE, 2001; GLENCROSS, 2009).

Figura 2: Vias de biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ($\geq C20$) a partir de ácidos α -linolênico (18:3 n-3) e linoleico (18:2 n-6), descritas para teleósteos. As atividades enzimáticas mostradas no diagrama são previstas a partir de expressão heteróloga em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) de acil-dessaturase-2 de peixe (Fads2) e elongase de ácidos graxos de cadeia longa (Elovl). β -ox = β -oxidação.



Fonte: Adaptado de OBOH et al. (2017).

1.3 DHA NA NUTRIÇÃO HUMANA

Já há algum tempo, existe relevante discussão acerca do papel dos ácidos graxos na nutrição humana, principalmente quanto à necessidade de maior ingestão de ácidos PUFA e LC-PUFA, tanto da série n-3 quanto n-6 (NETTLETON, 1994; SIMOPOULOS, 1999; SIMOPOULOS, 2002; APPOLINÁRIO et al., 2011; SERHAN et al., 2014). Os LC-PUFA n-3, principalmente o EPA e o DHA, parecem ter importante relação com a redução de riscos de doenças crônicas,

principalmente cardiovasculares e neurológicas, como a doença de Alzheimer. Esses ácidos graxos também possuem direta relação com processos inflamatórios em vertebrados. Algumas doenças inflamatórias como artrite reumatoide podem ter seus efeitos minimizados grandemente com aumento da ingestão de LC-PUFA n-3 (MILES E CALDER, 2012). Apesar da inclusão de LC-PUFA n-3 na dieta humana apresentar efeitos benéficos contra várias doenças inflamatórias, os resultados ainda não são conclusivos (TOCHER, 2015).

Os mecanismos de ação são bastante estudados. Resumidamente, o ácido graxo ARA n-6, que é o maior responsável pela resposta pró-inflamatória, compete com o EPA n-3, principalmente pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX) e lipo-oxigenase (LOX), sendo que o ARA, em geral, resulta na produção de substâncias pró-inflamatórias e o EPA, em geral, em produção de substâncias com efeito inflamatório mais brando (CALDER, 2007). Recentemente, mais mecanismos foram investigados com relação a esta competição n-6 e n-3 com processos inflamatórios, relacionando os ácidos graxos n-3 não apenas com processos inflamatórios mais brandos (efeito anti-inflamatório), mas também com processos resolutivos da inflamação como a produção de substâncias bioativas que atuam diretamente nos processos inflamatórios, atenuando seus efeitos negativos e agilizando a resolução desses processos, chamadas resolvinas, protectinas e maresinas (SERHAN, 2007; SERHAN, 2014). De uma maneira geral, nas dietas humanas ocidentais há um desequilíbrio na ingestão de n-3 e n-6, sendo que os ácidos graxos da série n-6 são consumidos em excesso, em detrimento dos n-3 (SIMOPOULOS, 2002; ERKKILA et al., 2008; PATTERSON et al., 2012). Em dietas humanas do passado, a relação n-3:n-6 era 1:1 (SIMOPOULOS, 2006), mas atualmente gira em torno de 0,05:1, sendo que o ideal para a manutenção saudável do organismo gira em torno de 0,25:1 até 1:1 (PATTERSON et al., 2012). É justamente este desequilíbrio que pode causar prejuízos à saúde humana.

Peixes de água doce tropicais, como a tilápia-do-Nilo, não representam uma fonte destes ácidos graxos EPA e DHA para consumo humano, quando comparados com peixes marinhos. No entanto, como visto anteriormente, há capacidade de acúmulo desses ácidos graxos no músculo e/ou corpo, quando uma quantidade suficiente destes está presente na dieta (JUSTI et al, 2003; SOUZA et al, 2007).

1.4 FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS n-3

Atualmente, a principal fonte dietética de ácidos graxos n-3 para rações animais, o óleo de peixe, é obtido através da exploração de recursos pesqueiros, já bastante limitados (NAYLOR et al., 2009). Desta maneira, há uma grande pressão na aquicultura pela busca de insumos mais sustentáveis, o que leva ao uso de ingredientes vegetais terrestres como fontes de energia, proteína e lipídios. É imprescindível que estas fontes sustentáveis possuam boa composição nutricional, para garantir crescimento adequado dos peixes e também a boa qualidade do pescado para o consumo humano (GATLIN et al., 2007).

Em geral, peixes alimentados com derivados de plantas terrestres (soja, milho, arroz) possuem um teor de ácidos graxos n-3 menor do que aqueles alimentados com óleo de peixe. Adicionalmente, existe a crescente preocupação com o uso de defensivos agrícolas, muitas vezes utilizados em excesso para a produção de grãos (GATLIN et al., 2007). Desta forma, o uso de algas marinhas como aditivos alimentares, tem sido investigado como uma alternativa ainda mais sustentável, por não sofrer as limitações dos atuais ingredientes em uso na indústria da nutrição animal.

1.5 ALGAS NA DIETA DE PEIXES

Existem relatos na literatura que a adição de algumas algas na alimentação de peixes melhora índices de desempenho, afeta composição corporal (LI et al., 2009), metabolismo de lipídios (NAKAGAWA, 1997) e resposta a agentes estressores (SABOYA et al., 2012), podendo aumentar a atividade fagocítica e produção do ânion superóxido (WATANUKI et al., 2006). Portanto, algas podem melhorar o desempenho dos peixes não apenas por fornecer nutrientes essenciais ao crescimento, mas também por incluir componentes com propriedades imunomoduladoras.

Schizochytrium é um gênero de micro-organismos marinhos unicelulares esféricos e heterotróficos. Originalmente foi classificado como um fungo, entretanto, foi reclassificado dentro da subclasse Thraustochytridae, junto à algas heterocontes. São capazes de produzir grande quantidade de biomassa em ambiente confinado e produzir grandes quantidades de lipídios (LEWIS et al., 1999). A *Schizochytrium* sp. é um organismo particularmente interessante, pois possui um aparato enzimático complexo, com diversas alongases e dessaturases, que os permitem alta produção de LC-PUFA (TOCHER, 2015).

1.6 A FARINHA DA ALGA *Schizochytrium* sp. (ALL-G-RICH®)

A farinha de algas *Schizochytrium* sp. é produzida pela empresa Alltech (sediada nos Estados Unidos da América) e distribuída pela Alltech do Brasil sob o nome comercial de ALL-G-RICH® e é considerada uma fonte de ácidos graxos para a nutrição animal, especialmente de DHA.

Em estudos anteriores com Salmão do Atlântico (*Salmo salar*), a *Schizochytrium* sp. se mostrou eficiente em substituir o óleo de peixe sem comprometer nenhum parâmetro produtivo, tampouco a qualidade do pescado, entretanto o salmão mostrou baixa digestibilidade para o ácido palmítico (16:0) (KOUSOULAKI et al., 2016).

A farinha do micro-organismo *Schizochytrium* sp. (rica em DHA) promoveu melhora no ganho em peso (12%) e na eficiência alimentar (5%) do bagre americano (*Ictalurus punctatus*), sendo que também promoveu acúmulo de DHA no músculo. Esta melhora no desempenho pode ser explicada pelo aumento no fornecimento de ácidos graxos de cadeia longa da série n-3, que são exigidos por esta espécie (LI et al., 2009), mas também de algum outro fator de crescimento desconhecido.

Já em estudo com tilápia-do-Nilo, a substituição do óleo de peixe por *Schizochytrium* sp. resultou em melhora no ganho em peso e conversão alimentar (SARKER et al., 2016). Entretanto, as dietas do referido estudo incluíam farinha de peixe e óleo de peixe em sua composição, os quais contêm quantidade considerável de DHA, além destes insumos normalmente não serem utilizados na elaboração de dietas comerciais para tilápia-do-Nilo.

Outras espécies de peixes que foram alimentadas com *Schizochytrium* sp. também apresentaram aumento do DHA corporal, por exemplo a tilápia Zanzibar, *Oreochromis honorum* (WATTERS et al., 2013) e a perca-de-jade, *Scortum barcoo* (HOESTENBERGHE et al., 2016).

ALL-G-RICH® contém pelo menos 12% de DHA em sua composição no total de sua matéria seca, portanto, poderia ser adicionado em dietas para tilápia-do-Nilo, especialmente em estágios finais da engorda, para melhorar o perfil de ácidos graxos desta espécie para consumo humano, bem como para melhorar o desempenho dos peixes, como crescimento e conversão alimentar.

1.7 DANO OXIDATIVO À BIOMOLÉCULAS

O dano oxidativo à biomoléculas é provocado quando há aumento na produção de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ERO), que supera mecanismos antioxidantes e resulta em danos nas células e tecidos (KOHEN e NYSKA, 2002). Estas ERO podem danificar os componentes celulares como lipídios, carboidratos, proteínas e DNA (FINKEL E HOLBROOK, 2000).

É sabido que um maior aporte de ácidos graxos de cadeia longa (≥ 20 carbonos) e poli-insaturados (duas ou mais ligações duplas, PUFA) pode impactar negativamente o aparato antioxidante de vertebrados (GARRIDO et al. 1989; HUANG et al. 1998; OLSEN et al., 1999). Essas consequências negativas estão relacionadas à facilidade de oxidação dos PUFA (LU e LU, 2002), o que potencializa os processos que podem levar ao dano oxidativo em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos.

Existem vários marcadores de dano oxidativo à biomoléculas, os quais frequentemente avaliam danos aos lipídios, proteínas e DNA. Os métodos mais utilizados para detecção de danos aos lipídios são os que medem os produtos finais da peroxidação lipídica, tais como: o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (FORMAN et al, 2015; CALAMARAS et al. 2015), como é o caso da análise de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Além disso, o MDA e o 4-HNE podem formar adutos de proteínas que também podem ser usados como marcadores de dano oxidativo à biomoléculas (BRADLEY-WHITMAN E LOVELL, 2015). Existem anticorpos específicos para esses adutos, o que permite o uso de metodologia *dot blot* para complementar os resultados das análises de TBARS. Os danos às proteínas podem ser medidos pela carbonilação de proteínas, que em geral aumenta em condições de pró-oxidantes (DOWLING et al, 2006). A eletroforese de uma única célula, também chamado de ensaio cometa, é o método mais utilizado para mensuração de dano ao DNA. Este método identifica sítios lábeis em meio alcalino no DNA. O dano causado por agentes clastogênicos leva a quebra das cadeias de DNA de animais e plantas e pode ser identificado. Este método foi adaptado para eritrócitos de peixes com sucesso (SINGH et al., 1988).

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da inclusão dietética, em vários níveis, do aditivo ALL-G-RICH® (farinha da alga *Schizochytrium* sp.) no desempenho, composição corporal e dano oxidativo à biomoléculas em juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

1.8.2 Objetivos específicos

-Avaliar o ganho em peso, a taxa de retenção proteica, a taxa de conversão alimentar e a taxa de crescimento específico de tilápia-do-Nilo, após inclusão dietética de vários níveis de ALL-G-RICH®.

- Avaliar o perfil de ácidos graxos corporais em juvenis de tilápia-do-Nilo, após inclusão dietética de vários níveis de ALL-G-RICH®.

-Avaliar o ganho em peso, a taxa de retenção proteica, a taxa de conversão alimentar e a taxa de crescimento específico de tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas contendo DHA, comparando duas fontes: ALL-G-RICH® e óleo de fígado de bacalhau.

-Avaliar o perfil de ácidos graxos corporais de tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas contendo DHA, comparando duas fontes: ALL-G-RICH® e óleo de fígado de bacalhau.

-Avaliar a digestibilidade de proteína bruta, extrato etéreo, DHA, e PAL do ALL-G-RICH® para a tilápia-do-Nilo.

-Avaliar parâmetros indicadores de dano oxidativo (danos ao DNA, danos à lipídeos e danos à proteínas) em tilápias-do-Nilo, após a inclusão dietética de vários níveis de ALL-G-RICH®.

-Avaliar parâmetros indicadores de dano oxidativo (danos ao DNA, danos à lipídeos e danos à proteínas) em tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas contendo DHA, comparando duas fontes: ALL-G-RICH® e óleo de fígado de bacalhau.

Os artigos foram formatados de acordo com as normas das seguintes revistas: artigo 1, Aquaculture e artigo 2, Fish Physiology and Biochemistry.

2 Artigo 1

Avaliação da inclusão dietética de ALL-G-RICH[®], rico em ácido docosahexaenoico, para tilápia-do-Nilo: desempenho e composição corporal

Vitor Augusto Giatti Fernandes, Fernando Dutra Brignol, Débora Machado Fracalossi*

Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis, SC, Brasil.

*Autor para correspondência: Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP: 88034- 001 Florianópolis, SC, Brazil. E-mail address: debora.fracalossi@ufsc.br (D.M. Fracalossi). Tel/Fax: +55 48 3721 6300.

2.1 RESUMO

Este estudo avaliou a inclusão de ALL-G-RICH[®], fonte de ácido docosaenoico (22:6 n-3, DHA), na dieta de tilápia-do-Nilo e seu efeito sobre índices de desempenho e acúmulo de DHA corporal. Um ensaio alimentar com juvenis (peso médio inicial $8,35 \pm 0,80$ g) testaram-se diferentes níveis de inclusão dietética de ALL-G-RICH[®]: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0% e também testada uma dieta controle, com óleo de fígado de bacalhau (OFB), contendo concentração de DHA comparável à inclusão de 1% de ALL-G-RICH[®]. Apesar de não influenciar o ganho em peso, taxa de crescimento específico, conversão alimentar, taxa de retenção proteica e a composição corporal centesimal, a inclusão de ALL-G-RICH[®] na dieta de tilápia-do-Nilo influenciou o perfil de ácidos graxos corporais, promovendo acúmulo de DHA. Da mesma maneira, houve maior acúmulo significativo de DHA nos peixes alimentados com OFB, em comparação com aqueles alimentados com conteúdo similar de DHA na forma de ALL-G-RICH[®]. Também foi realizado ensaio de digestibilidade dos nutrientes presentes no ALL-G-RICH[®], utilizando-se óxido de ítrio como marcador (0,1% da dieta referência), coleta de fezes por sedimentação e peixes com 65,86 g de peso médio inicial. A digestibilidade foi alta para o DHA (96,10%), entretanto foi baixa para ácido palmítico (70,81%). Os resultados mostram que a inclusão de ALL-G-RICH[®] até 4% na dieta não prejudicou o desempenho da tilápia-do-Nilo e se mostrou muito eficiente para promover o acúmulo de DHA corporal.

Palavras-chave: aquicultura, ácidos graxos, desempenho, DHA, digestibilidade, *Schizochytrium* sp.

2.2 DESTAQUES DO ARTIGO

1- O ALL-G-RICH® é eficiente em aumentar a quantidade de DHA corporal em juvenis de tilápia-do-Nilo, sendo que seu acúmulo é dose-dependente.

2- O ALL-G-RICH® pode ser usado para aumentar a ingestão de ácidos graxos n-3 por humanos, usando o pescado de tilápia-do-Nilo como veículo.

3- O ALL-G-RICH® possui alta digestibilidade do ácido docosaheptaenoico para tilápia-do-Nilo, entretanto o ácido palmítico, outro componente abundante no produto, não possui.

4- A inclusão dietética de ALL-G-RICH® não prejudica o desempenho de tilápias-do-Nilo.

2.3 INTRODUÇÃO

A importância da tilápia-do-Nilo para a piscicultura mundial é amplamente conhecida, sendo atualmente uma das principais espécies da aquicultura (FAO, 2017). Apesar de possuir tecnologias de produção relativamente bem desenvolvidas, ainda existem áreas que necessitam maior compreensão. Um exemplo é a exigência dietética e metabolismo dos ácidos graxos (Teoh et al., 2011; Nobrega et al., 2017; Corrêa et al., 2017). Os ácidos graxos exigidos *via* dieta são chamados de ácidos graxos essenciais. A tilápia-do-Nilo exige apenas ácidos graxos com 18 carbonos na cadeia em sua dieta, tais como o ácido α -linolênico (18:3 n-3, α -LNA) e o linoleico (18:2 n-6, LOA) (Takeuchi et al., 1983; Chen et al., 2013). Entretanto, esta informação está sendo desafiada, principalmente em situações de baixa temperatura da água, onde os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (≥ 20 carbonos, LC-PUFA) apresentam maior importância (Corrêa, 2015; Corrêa et al., 2017; Nobrega et al., 2017).

A exigência nutricional de uma espécie aquícola normalmente é determinada em relação as suas necessidades fisiológicas e não sob o ponto de vista do desejável para a nutrição humana (Tocher, 2010). Há algum tempo ocorre discussão relevante acerca do papel dos ácidos graxos na nutrição humana no que diz respeito a ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA), tanto da série n-3, quanto n-6 (Nettleton, 1994; Simopoulos, 1999; Simopoulos, 2002; Appolinário et al., 2011; Serhan et al., 2014). Os LC-PUFA n-3 parecem ter importante relação com a redução de riscos de doenças crônicas, principalmente cardiovasculares

e neurológicas como a doença de Alzheimer. Esses ácidos graxos também possuem direta relação com processos inflamatórios em vertebrados, sendo que os n-6, em geral, são relacionados com processos pró-inflamatórios e, os n-3, em geral, relacionados com processos resolutivos da inflamação, como a produção substâncias bioativas como resolvinas, protectinas e maresinas (Serhan, 2007; Serhan, 2014). De uma maneira geral, nas dietas humanas ocidentais há um desequilíbrio na ingestão de n-3 e n-6, sendo que os ácidos graxos da série n-6 são consumidos em excesso, em detrimento dos n-3 (Simopoulos, 2002; Erkkila et al., 2008; Patterson et al., 2012). Em dietas humanas do passado, a relação n-3:n-6 era 1:1 (Simopoulos, 2006), mas atualmente gira em torno de 0,05:1, sendo que o ideal para a manutenção saudável do organismo gira em torno de 0,25:1 até 1:1 (Patterson et al., 2012). É justamente este desequilíbrio que podem causar prejuízos à saúde humana.

Portanto, além de se fornecer uma dieta que supra às exigências em ácidos graxos da tilápia, o pescado resultante poderá trazer benefícios à saúde humana, aumentando a ingestão de ácidos graxos n-3. A possibilidade de se acrescentar ácidos graxos n-3 no corpo e no músculo da tilápia-do-Nilo, se este for fornecido na dieta, já foi relatada (Souza et al., 2007; Corrêa, 2015). Atualmente, a principal fonte dietética de ácidos graxos n-3, o óleo de peixe, é obtido através da exploração de recursos pesqueiros, já bastante limitados (Naylor et al., 2009). Entretanto, o uso de algas marinhas se mostra como uma alternativa mais sustentável.

O produto comercial ALL-G-RICH® é a farinha de *Schizochytrium* sp., a qual contém pelo menos 12% de ácido graxo docosaenoico (DHA, 22:6 n-3) em sua composição total expressa na matéria seca do produto, portanto com potencial para aumentar a ingestão de n-3 na nutrição humana, utilizando a produção de tilápia como veículo.

Portanto, o presente estudo objetiva verificar se a inclusão de ALL-G-RICH® em dietas para tilápia-do-Nilo influencia seu desempenho produtivo e sua composição corporal, em temperatura ideal de criação, além de investigar a digestibilidade de nutrientes contidos neste produto.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, pertencente ao Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (48° 32' 57''W, 27°35' 48''S, elevação 3 m).

2.4.1 Delineamento e dietas experimentais

2.4.1.1 Ensaio alimentar de desempenho

Foram testadas dietas com inclusões crescentes de ALL-G-RICH® (Tabela 1 e Tabela 2) para a tilápia-do-Nilo, como fonte de DHA, além de uma dieta contendo óleo de fígado de bacalhau (OFB) (1,7% da dieta, expresso na matéria seca), como controle. O aditivo ALL-G-RICH® foi testado em cinco níveis: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0% da dieta, expresso na matéria seca, em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições para cada tratamento. Os resultados obtidos tratamento com a dieta contendo OFB foram comparados apenas com o tratamento contendo ALL-G-RICH® a 1% da dieta, também com cinco repetições.

O objetivo da inclusão desta dieta controle foi comparar o efeito do ALL-G-RICH® com àquele de uma fonte tradicional de DHA, ou seja, o OFB. Foram mantidas proporções semelhantes dos ácidos graxos LOA, α -LNA e PUFA n-6 entre as dietas ao se substituir a banha suína pelo ALL-G-RICH® e óleo de milho (Tabela 2).

As seis dietas (isonitrogenadas, isoenergéticas e isolipídicas (Tabela 2) foram formuladas com ingredientes práticos para atender às exigências nutricionais de juvenis de tilápia-do-Nilo (NRC, 2011; FURUYA et al., 2012).

Os ingredientes foram moídos em moinho de martelo e peneirados manualmente com malha de 30 mesh, pesados em balança semi-analítica e homogeneizados em misturador horizontal por 15 min. Após, os óleos foram adicionados, a umidade foi corrigida para 230 g kg⁻¹ com a adição de água destilada, sendo a mistura homogeneizada por mais 15 min. As dietas passaram por processo de extrusão à 100°C, resultando em péletes de 2 a 3 mm, os quais foram secos à 50°C até atingir 920 g kg⁻¹ de matéria seca. As dietas, após a secagem, foram estocadas em unidades hermeticamente fechadas, protegidas da luz, a uma temperatura de 4°C.

Tabela 1. Composição analisada da farinha de alga *Schizochitryum* sp.(ALL-G-RICH®)¹.

Composição	ALL-G-RICH®
Proximal (% matéria seca)	
Matéria seca	98,65
Proteína bruta	11,18
Extrato etéreo	44,67
Matéria mineral	3,25
Ácidos graxos selecionados² e grupos³ de ácidos graxos (% do total ácidos graxos) e (mg g lípidios⁻¹, entre parênteses)	
18:2 n-6 LOA	ND ⁴
18:3 n-3 α -LNA	ND
20:4 n-6 ARA	ND
20:5 n-3 EPA	0,28 (2,04)
22:5 n-3 DPA	0,41 (2,99)
22:6 n-3 DHA	23,98 (72,72)
SFA ³	66,63 (271,13)
MUFA ³	1,07 (7,91)
PUFA ³	30,82 (227,6)
PUFA n-6	5,75 (42,5)
PUFA n-3	25,06 (185,1)
LC-PUFA ³	30,59 (225,93)
LC PUFA n-6	5,53 (40,83)
LC PUFA n-3	25,06 (185,1)
n-3/n-6	4,36

¹ Produzido por Alltech Inc. (Kentucky, EUA) e importado por Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA (Araucária, Brasil).

² Ácidos graxos detectados e totalizados: 10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 22:0, 16:1n-7, 22:1n-11, 18:3n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-3, 22:6n-3.

³ Grupos de ácidos graxos: SFA= saturados, MUFA= monoinsaturados, PUFA= poli-insaturados, LC-PUFA= poli-insaturados de cadeia longa (20 a 22 carbonos).

⁴ ND = Não detectado (<0,05%).

2.4.1.2 Ensaio alimentar de digestibilidade

Foram medidas a digestibilidade da proteína bruta, da matéria seca, do extrato etéreo, do DHA e do ácido palmítico (16:0, PAL) do aditivo ALL-G-RICH®. Utilizou-se uma dieta referência (0,1% de óxido de ítrio como marcador inerte) com ingredientes semi-purificados, formulada com base na exigência da tilápia-do-Nilo, e uma dieta teste, composta de 900 g kg⁻¹ da dieta referência e 100 g kg⁻¹ de ALL-G-RICH® (Tabela 3). Foram utilizados oito tanques especiais cilindro-cônicos que permitiam a coleta das fezes. Cada tanque consistia numa unidade experimental, totalizando quatro repetições por dieta. O procedimento de preparação das dietas foi o mesmo adotado no ensaio alimentar de desempenho.

Tabela 2. Formulação, composição centesimal e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais.

Ingredientes (% matéria seca)	Inclusão de All-G-Rich [®] na dieta (%)					Óleo de fígado de bacalhau
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
Farelo de soja ¹	48,10	47,85	47,60	47,10	46,10	47,60
Milho ¹	32,00	31,91	31,83	31,65	31,30	32,25
Farinha de vísceras de aves ²	16,90	16,90	16,90	16,90	16,90	16,90
Premix vitamínico-mineral ³	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Banha suina ⁴	2,00	1,75	1,50	1,00	-	-
ALL-G-RICH ^{®5}	-	0,50	1,00	2,00	4,00	-
Óleo de milho ⁶	-	0,09	0,17	0,35	0,70	0,55
Óleo de fígado de bacalhau ⁷	-	-	-	-	-	1,70
Composição proximal (% matéria seca)						
Matéria seca	91,95	90,49	90,52	90,97	90,53	90,14
Proteína bruta	37,39	37,85	37,54	37,67	37,37	37,62
Lipídios	7,08	7,2	7,56	7,58	8,01	6,19
Matéria mineral	6,32	6,23	6,39	6,12	6,11	6,47
Energia bruta (kcal/kg ¹)	4931	5144	5139	5160	5259	5178
Ácidos graxos selecionados⁸ e grupos⁹ de ácidos graxos (% do total ácidos graxos) ou (mg g lipídios⁻¹, entre parênteses)						
18:2 n-6 LOA	27,76 (265,47)	26,95 (257,2)	26,68 (248,99)	25,17 (227,37)	24,03 (213,67)	27,22 (211,64)
18:3 n-3 α-LNA	1,38 (13,22)	1,37 (13,03)	1,32 (12,3)	1,21 (10,93)	1,14 (10,13)	1,47 (11,41)
20:4 n-6 ARA	ND ¹⁰	ND	ND	ND	ND	ND
20:5 n-3 EPA	ND	ND	ND	0,07 (0,51)	0,12 (1,10)	1,80 (14,01)
22:5 n-3 DPA	ND	ND	ND	0,10 (0,92)	0,23 (2,03)	0,29 (2,23)
22:6 n-3 DHA	ND	1,08 (10,34)	2,15 (20,10)	4,08 (36,89)	7,89 (70,05)	2,53 (19,68)
SFA	28,52 (273,87)	29,62 (286,05)	30,37 (286,59)	35,60 (324,38)	37,78 (337,35)	20,17 (156,84)
MUFA	37,52 (358,84)	35,33 (337,17)	33,71 (314,61)	30,14 (324,38)	23,77 (211,11)	38,40 (298,52)
PUFA	29,75 (284,57)	30,35 (289,70)	31,30 (292,06)	32,19 (290,75)	35,90 (319,29)	35,06 (272,50)
PUFA n-6	28,37 (271,35)	27,91 (266,33)	27,82 (259,67)	26,73 (241,43)	26,35 (234,52)	27,81 (216,22)
PUFA n-3	1,46 (13,99)	2,58 (24,63)	3,57 (33,31)	5,58 (50,43)	9,65 (85,97)	7,05 (54,83)
LC-PUFA ¹¹	0,39 (3,75)	1,81 (17,26)	3,05 (28,51)	5,59 (50,46)	10,50 (93,48)	5,26 (40,89)
LC PUFA n-6	0,39 (3,75)	0,73 (6,92)	0,90 (8,41)	1,34 (12,07)	2,09 (18,84)	0,39 (3,05)
LC PUFA n-3	ND	1,08 (10,34)	2,15 (20,10)	4,25 (38,40)	8,41 (74,64)	4,87 (37,84)
n-3/n-6	0,05	0,09	0,13	0,21	0,37	0,25

¹Fornevido por Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Brasil).² Produzido por Kabisa S.A. (Porto Alegre, Brasil).

³ Produzido por Poli-Nutri (Trece Tílias, Brasil), composição por kg de produto: vit. (vitamina) A 1.000.000 UI, vit. D3 500.000 UI, vit. E 20.000 UI, vit. K3 500 mg, vit. B1 500 mg, vit. B2 1.750 mg, vit. B6 1.125 mg, vit. B12 3.750 mg, niacina 5.000 mg, pantoténato de cálcio 5.000mg, ácido fólico 250 mg, biotina 50 mg, ferro 13,75 g, cobre 2.000 mg, manganês 3.750 mg, zinco 25 g, cobalto 25 mg, iodo 100 mg, selênio 75 mg.

⁴ Produzido por Seara alimentos S.A.(Itajai, Brasil).

⁵ Produzido por Alltech Inc. (Kentucky, EUA) e importado por Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA (Araucária, Brasil).

⁶ Suavit, produzido por Cocamar LTDA (Maringá, Brasil).

⁷ Möllers Tran, produzido por Orkla Health (Oslo, Noruega)

⁸ Ácidos graxos detectados e totalizados: 10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 18:1n-7, 22:1n-7, 22:1n-11, 18:3n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-3, 22:6n-3.

⁹ Grupos de ácidos graxos: SFA= saturados, MUFA= monoinsaturados, PUFA= poli-insaturados, LC-PUFA= poli-insaturados de cadeia longa (20 a 22 carbonos).

¹⁰ Não detectado (<0,05%)

2.4.2 Peixes e procedimentos experimentais

2.4.2.1 Ensaio alimentar de desempenho

Trinta grupos de 25 juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT foram obtidos da empresa ACQUA SUL (Ilhota, Santa Catarina, Brasil), após a masculinização do lote (>99%). O manejo dos animais em ambos ensaios alimentares (desempenho e digestibilidade) seguiu o protocolo n° PP00815, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC).

Os peixes foram aclimatados às condições experimentais por 14 dias. Nos primeiros sete dias, foram estocados em dois tanques de 1000 L e, depois, por mais sete dias, nas 30 unidades experimentais definitivas, que consistiam em tanques de 100 L acoplados ao mesmo sistema de recirculação. Neste período de aclimação, os peixes foram alimentados diariamente às 9 h e às 16 h, até a saciedade aparente, com a dieta 0% de inclusão de ALL-G-RICH®. Foram coletados 15 peixes para análise de composição corporal inicial.

Durante o período experimental, que durou 57 dias, os peixes com peso médio inicial (\pm desvio padrão) de $8,35 \pm 0,80$ g, foram alimentados adotando-se o mesmo procedimento da aclimação. As variáveis indicadoras da qualidade da água foram medidas diariamente, sendo elas: temperatura $27,84 \pm 0,36^\circ\text{C}$, oxigênio dissolvido $5,19 \pm 0,57$ mg L⁻¹ e pH $6,98 \pm 0,22$. Amônia total $0,65 \pm 0,10$ mg L⁻¹ e nitrito $0,01$ mg L⁻¹ foram medidos semanalmente. Todas as variáveis medidas mantiveram-se dentro da faixa de conforto para a espécie (Popma & Lovshin, 1995). A vazão de entrada de água em cada unidade experimental foi de 540 mL min⁻¹, o fotoperíodo 12 h de luz, sendo que a intensidade luminosa média, em cada tanque, foi de 9 ± 2 lux.

Mediu-se o consumo de ração pelos peixes de cada unidade experimental, por meio da pesagem diária dos respectivos potes de armazenamento, ao final da segunda alimentação. A cada 14 dias, foi realizada biometria para acompanhamento do ganho em peso e, ao final dos 57 dias, realizou-se também a coleta de três peixes por tanque para análise corporal. Os peixes foram sacrificados por meio de aprofundamento anestésico (200 mg L⁻¹ Eugenol®, Biodinâmica, Ibioporã, Paraná), seguido por secção da coluna vertebral.

2.4.2.2 Ensaio alimentar de digestibilidade

Os oito grupos de 39 juvenis de tilápia-do-Nilo do mesmo lote e fornecedor, foram mantidos no mesmo sistema de recirculação em tanques de 1000 L e alimentados com dieta extrudada comercial (320 g kg⁻¹ de proteína bruta), até atingir peso médio de 65,86 ± 0,88 g. Posteriormente, foram transferidos para tanques cilindro-cônicos com 200 L de capacidade útil, que continham um tubo de 50 mL para coleta de fezes por sedimentação (método indireto), os quais ficavam imersos em recipientes isotérmicos, com gelo, para evitar degradação microbiana. Os procedimentos foram os mesmos utilizados por RODRIGUES et al. (2011).

Os animais foram aclimatados às condições ambientais (inclusive recebendo as dietas experimentais) por 10 dias. As variáveis indicadoras da qualidade de água foram medidas diariamente, sendo suas médias ± desvio padrão: temperatura, 27,86 ± 0,05°C, oxigênio dissolvido, 4,94 ± 0,30 mg L⁻¹, pH, 6,58 ± 0,10. A vazão de entrada de água em cada tanque foi 3 L min⁻¹.

A alimentação ocorreu duas vezes ao dia (6 h e 12 h), até a saciedade aparente. Antes da coleta das fezes, aproximadamente uma hora após cada alimentação, as paredes dos tanques eram vigorosamente limpas e cerca de 70% da água era trocada. Este procedimento evita a contaminação das fezes com ração e, por ser feito uma hora após a alimentação, previne que se colete qualquer pélete regurgitado. As coletas de fezes eram feitas dentre 8 h e 12 h e entre 14 h e 18 h.

2.4.3 Análises químicas

A composição centesimal corporal, dos ingredientes e dietas foram determinadas de acordo com métodos da AOAC (1999): proteína bruta (Kjeldahl, método 945.01), lipídeos (Soxhlet, método 920.39C), matéria mineral (mufla a 550 °C, método 942.05) e matéria seca (estufa 105°C, método 950.01). A energia bruta foi determinada em bomba calorimétrica (marca PARR, modelo ASSY 6200, PARR Instrument Company, Moline, Illinois, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

As análises de ácidos graxos foram conduzidas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquícolas (LABNUTRI, UFSC) em parceria com o Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV, UFSC). Brevemente, os lipídios das amostras (ingredientes, dietas e corpo dos peixes) foram extraídos a frio e quantificados pelo método de

FOLCH et al. (1957), modificado por WAYS E HANAHAN (1964). Em seguida, os ácidos graxos foram esterificados, usando-se o método de O'FALLON et al. (2007) e separados em cromatógrafo de gás (GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado com coluna capilar (RTX® 2330, 105 m × 0.25 mm ID, 0.20 µm; Restek®, Bellefont, EUA). O fluxo da coluna foi 1 mL min⁻¹, o gás de arraste, H₂, e o gás de *make up*, N₂. Os demais parâmetros operacionais foram os mesmos descritos por CORRÊA et al. (2017).

Tabela 3. Composição e perfil de ácidos graxos das dietas utilizadas no ensaio de digestibilidade.

Ingrediente (% matéria seca)	Dietas	
	Referência	Teste
Amido de milho ¹	44,30	39,87
Caseína ¹	28,30	25,47
ALL-G-RICH ^{®2}	0,00	10,00
Gelatina ¹	8,80	7,92
Celulose microfina ¹	6,80	6,12
Premix macromineral ³	3,00	2,70
Banha de suínos ⁴	2,90	2,61
Fosfato bicálcico ¹	2,50	2,25
Óleo de milho ⁵	2,00	1,80
Premix vitamínico ⁶	1,20	1,08
Cloreto de colina ¹	0,10	0,09
Óxido de ítrio ⁷	0,10	0,09
Composição proximal (% matéria seca)		
Matéria seca	96,60	87,88
Proteína bruta	33,85	34,39
Extrato etéreo	4,52	10,75
Matéria mineral	4,67	4,34
Ácidos graxos selecionados⁸ e grupos⁹ de ácidos graxos (% do total ácidos graxos) e (mg g lipídios⁻¹, entre parênteses)		
18:2 n-6 LOA	30,97 (301,18)	12,98 (110,42)
18:3 n-3 α-LNA	1,06 (10,31)	0,45 (3,86)
20:4 n-6 ARA	ND ¹⁰	ND
20:5 n-3 EPA	ND	ND
22:5 n-3 DPA	ND	0,23 (1,99)
22:6 n-3 DHA	ND	13,47 (114,56)
SFA	28,29 (275,05)	51,97 (442,09)
MUFA	38,78 (377,09)	16,06 (136,64)
PUFA	32,03 (311,50)	30,79 (261,96)
PUFA n-6	30,97 (301,18)	16,40 (139,48)
PUFA n-3	1,06 (10,31)	14,40 (122,49)
LC-PUFA	ND	17,11 (145,52)
LC-PUFA n-6	ND	3,16 (26,89)
LC-PUFA n-3	ND	13,95 (118,63)
n-3/n-6	0,03	0,88

¹Produzido por Rhooster (Araçoiaba da Serra, Brasil).

²Produzido por Alltech Inc. (Kentucky, EUA) e importado por Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA (Araucária, Brasil).

³CaHPO₄ (454g kg⁻¹), K₂SO₄ (297 g kg⁻¹), NaCl (174 g kg⁻¹), MgSO₄ (75 g kg⁻¹).

⁴ Produzido por Seara Alimentos S.A. (Itajaí, Brasil).

⁵ Suavit, produzido por Cocamar LTDA, (Maringá, Brasil).

⁶ Premix vitamínico-mineral Poli-Nutri (Trece Tílias, Brasil), composição por kg produto: vit. (vitamina) A 1.000.000 UI, vit. D3 500.000 UI, vit. E 20.000 UI, vit. K3 500 mg, vit. B₁ 500 mg, vit. B₂ 1.750 mg, vit. B₆ 1.125 mg, vit. B₁₂ 3.750 mg, niacina 5.000 mg, pantotenato de cálcio 5.000mg, ácido fólico 250 mg, biotina 50 mg, ferro 13,75 g, cobre 2.000 mg, manganês 3.750 mg, zinco 25 g, cobalto 25 mg, iodo 100 mg, selênio 75 mg.

⁷ Produzido por Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

⁸ Ácidos graxos detectados e totalizados: 10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 22:0, 16:1n-7, 22:1n-11, 18:3n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-3, 22:6n-3.

⁹ Grupos de ácidos graxos: SFA= saturados, MUFA= monoinsaturados, PUFA= poli-insaturados, LC-PUFA= poli-insaturados de cadeia longa (20 a 22 carbonos).

¹⁰ Não detectado (<0,05%).

Para a identificação e quantificação dos ácidos graxos, os tempos de retenção e áreas sob o pico de cada ácidos graxos foram comparados com padrões externos (37 Component FAME Mix e PUFA No.3: menhaden oil, Supelco, Bellefonte, EUA) e o padrão interno 23:0 (Tricosanoic acid, Sigma, Saint Louis, EUA). As áreas dos picos foram corrigidas pelo fator de correção teórico do detector de ionização em chama (Visentainer & Franco, 2006).

2.4.4 Variáveis mensuradas

As variáveis de crescimento, eficiência alimentar, utilização dos nutrientes e coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\text{Ganho em Peso (g)} = \text{Peso}_f(\text{g}) - \text{Peso}_i(\text{g})$$

Onde: i = inicial e f = final.

$$\text{TRP, \%} = \frac{\text{BM}_i(\text{kg}) \times \text{PBCorp}_i(\text{g kg}^{-1}) - \text{BM}_f(\text{kg}) \times \text{PBCorp}_f(\text{g kg}^{-1})}{\text{Consumo de PB}(\text{kg})} \times 100$$

Onde: TRP = Taxa de retenção proteica, BM = Biomassa, PB = proteína bruta, Corp = corporal.

$$\text{Conversão Alimentar} = \frac{\text{Consumo (g)}}{\text{BM}_f(\text{g}) - \text{BM}_i(\text{g})}$$

$$\text{TCE, \%} = \frac{\ln \text{Peso}_f - \ln \text{Peso}_i}{\text{Período (dias)}} \times 100$$

Onde: TCE = Taxa de crescimento específico.

$$\text{CDA}(\%) = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\text{Marcador}_{\text{Dieta}}}{\text{Marcador}_{\text{Fezes}}} \right) \times \left(\frac{\text{Nutriente}_{\text{Fezes}}}{\text{Nutriente}_{\text{Dieta}}} \right) \right]$$

Onde: CDA = Coeficiente de digestibilidade aparente.

$$CDA_{ing}(\%) = CDA_{dt} + \left[(CDA_{dt} - CDA_{ref}) \times \left(\frac{0,9 \times Nutriente_{ref}}{0,1 \times Nutriente_{ing}} \right) \right] \text{Onde: } ing = \text{ingrediente, } dt = \text{dieta teste e } ref = \text{dieta referência.}$$

2.4.5 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram testados quanto à normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos (teste de Durbin-Watson). Para avaliar a inclusão de ALL-G-RICH® na dieta sobre as variáveis de desempenho e perfil de ácidos graxos, os dados foram submetidos à análise de regressão linear. Os dados dos peixes alimentados com a dieta contendo OFB foram comparados com a dieta contendo 1,0 % ALL-G-RICH®, utilizando-se o teste t de Student. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Ensaio alimentar de desempenho

As diferentes inclusões de ALL-G-RICH® não afetaram o ganho em peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico e taxa de retenção proteica (Tabela 4). Do mesmo modo, a inclusão também não afetou a composição proximal corporal, em termos de proteína bruta, matéria seca, extrato etéreo e matéria mineral (Tabela 5). Entretanto, o perfil de ácidos graxos corporal foi influenciado pela inclusão de ALL-G-RICH®. A concentração corporal do ácido araquidônico (20:4 n-6, ARA), considerado um LC-PUFA, assim como dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) diminuíram significativamente com o aumento da inclusão de ALL-G-RICH® (Tabela 5). Por outro lado, houve aumento significativo da concentração de outros ácidos graxos, sendo eles o EPA, o LOA, e o DHA (DHA pode ser observado na Figura 3). Do mesmo modo, alguns grupos de ácidos graxos aumentaram, tais como PUFA, PUFA n-3, LC-PUFA e LC-PUFA n-3. Ainda, a relação n-3:n-6 na composição corporal aumentou significativamente com o aumento na inclusão do produto.

Quando as variáveis de desempenho (ganho em peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico), de utilização dos nutrientes (taxa de retenção proteica) foram comparadas somente entre os peixes alimentados com as dietas com OFB e a inclusão de ALL-G-RICH® a

1%, percebeu-se que também não houve efeito no desempenho, retenção (Tabela 6), mas sim na composição corporal e perfil de ácidos graxos corporais (Tabela 7). Nesta comparação, peixes alimentados com a dieta OFB aumentaram significativamente seu conteúdo corporal de proteína bruta, ácidos graxos EPA, DPA e DHA (Figura 4), além do LOA e do α -LNA. Também houve aumento significativo nos grupos de ácidos graxos MUFA, PUFA, PUFA n-6, PUFA n-3, LC-PUFA e LC-PUFA n-3, além de uma maior relação n-3/n-6. Inversamente, a quantidade de lipídios e os grupos SFA e LC-PUFA n-6 diminuíram significativamente em peixes alimentados com a dieta OFB (Tabela 7).

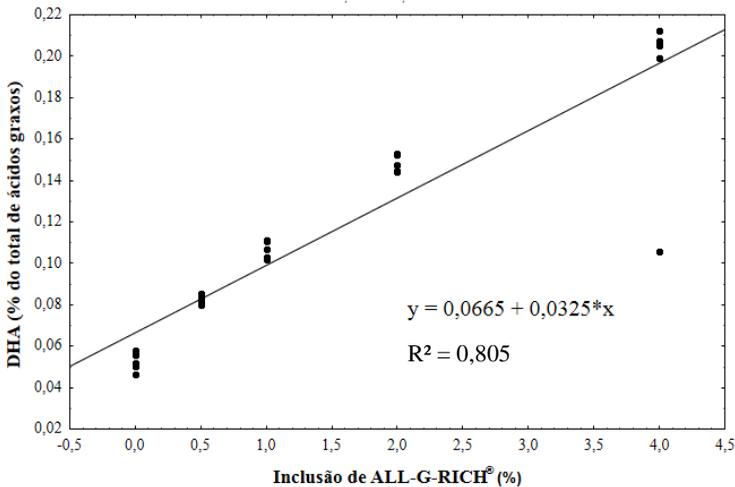


Figura 3. Regressão linear da quantidade de ácido docosaenoico (DHA) corporal de juvenis de tilápia-do-Nilo após 57 dias de alimentação com dietas contendo doses crescentes de ALL-G-RICH®.

2.5.2 Ensaio alimentar de digestibilidade

A digestibilidade dos nutrientes contidos no ALL-G-RICH® foram 82,80% para a proteína bruta, 83,63% para o extrato etéreo, 77,91% para matéria seca, 96,10% para o DHA e 70,81% para o ácido palmítico (PAL, 16:0).

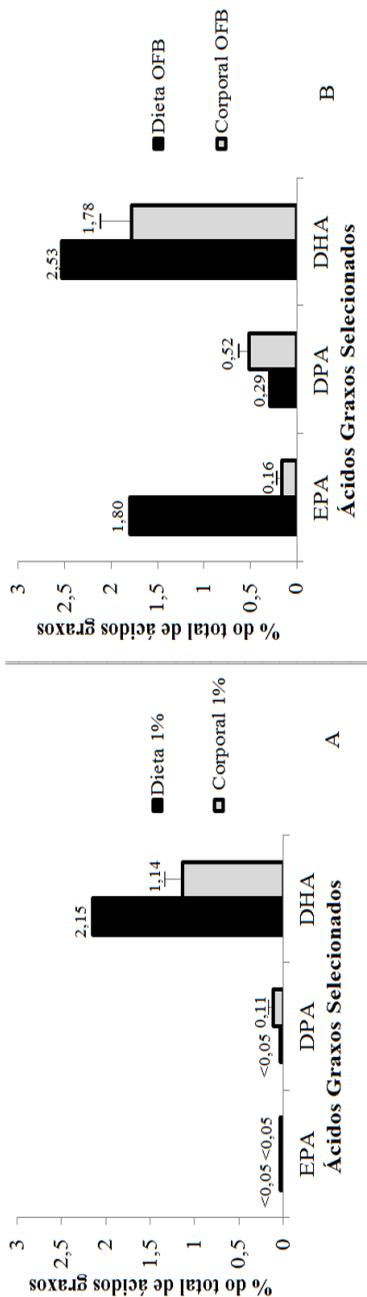


Figura 4. (A) Quantidade de alguns ácidos graxos nas dietas com 1% de inclusão de ALL-G-RICH® e a composição corporal final, após 57 de alimentação. (B) Quantidade de alguns ácidos graxos nas dietas com óleo de fígado de bacalhau (OFB) e a composição corporal final, após 57 de alimentação. EPA = 20:5 n-3, DPA = 22:5 n-3 e DHA = 22:6 n-3

Tabela 4. Desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo com cinco níveis de inclusão dietética de ALL-G-RICH® por 57 dias.

Variáveis	Inclusão de All-G-Rich® na dieta (%)					Pooled SEM	R ²	P-Value
	0	0,5	1	2	4			
Ganho em peso (g)	86,22	87,87	87,79	87,37	86,34	6,55	0,001	NS
Taxa de crescimento específico (%)	4,34	4,35	4,38	4,32	4,36	0,13	0,001	NS
Conversão alimentar	1,10	1,12	1,10	1,11	1,09	0,03	0,069	NS
Taxa de retenção proteica (%)	38,36	38,25	37,72	38,16	39,16	3,88	0,032	NS

¹ Produzido por Alltech Inc. (Kentucky, EUA) e importado por Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA (Araucária, Brasil).

Tabela 5. Composição e perfil de ácidos graxos corporais de juvenis de tilápia-do-Nilo com cinco níveis de inclusão dietética de ALL-G-RICH® por 57 dias.

Composição, % matéria natural	Inclusão de All-G-Rich® na dieta,						Pooled SEM	R ²	P-Value
	0	0,5	1	2	4	4			
Matéria seca	29,40	29,97	29,90	29,98	29,42	29,42	0,70	0,007	NS
Proteína bruta	15,61	16,14	15,30	15,78	15,71	15,71	0,36	<0,001	NS
Lípidios	9,83	10,02	10,54	10,27	10,15	10,15	0,75	0,007	NS
Matéria mineral	4,58	4,57	4,75	4,42	3,85	3,85	1,25	0,136	NS
Ácidos graxos selecionados¹ e grupos² de ácidos graxos (% do total ácidos graxos) e (mg g lípidios¹, entre parênteses)									
18:2 n-6	11,34 (86,78)	12,32 (97,78)	12,83 (97,42)	13,01 (98,80)	13,36 (100,99)	13,36 (100,99)	0,02	0,196	0,026
18:3 n-3	0,53 (4,05)	0,58 (4,44)	0,67 (5,06)	0,63 (4,79)	0,63 (4,79)	0,63 (4,79)	0,00	0,083	NS
20:4 n-6	1,32 (9,95)	1,11 (8,91)	1,03 (7,84)	1,07 (8,16)	0,78 (5,82)	0,78 (5,82)	1,12	0,607	<0,001
20:5 n-3	ND	ND	ND	ND	0,04 (0,31)	0,04 (0,31)	0,01	0,592	<0,001
22:5 n-3	0,10 (0,75)	0,10 (0,72)	0,11 (0,82)	0,12 (0,89)	0,14 (1,03)	0,14 (1,03)	0,01	0,461	<0,001
22:6 n-3	0,28 (2,05)	0,68 (5,37)	1,14 (8,67)	2,19 (16,64)	3,57 (26,81)	3,57 (26,81)	0,39	0,805	<0,001
SFA	37,57 (288,52)	36,82 (284,03)	36,91 (280,91)	37,80 (288,44)	38,27 (289,17)	38,27 (289,17)	1,63	0,015	NS
MUFA	41,95 (321,13)	41,61 (321,47)	40,33 (306,17)	38,31 (291,30)	36,10 (272,51)	36,10 (272,51)	1,17	0,795	<0,001
PUFA	20,36 (155,63)	21,46 (165,73)	22,66 (172,11)	23,77 (180,61)	25,63 (193,45)	25,63 (193,45)	3,38	0,457	<0,001
PUFA n-6	14,36 (109,77)	15,20 (117,45)	15,63 (118,71)	15,96 (121,24)	16,10 (121,68)	16,10 (121,68)	0,90	0,104	NS
PUFA n-3	0,88 (6,70)	1,33 (10,44)	1,91 (14,55)	2,93 (22,27)	4,41 (33,15)	4,41 (33,15)	0,09	0,781	<0,001
LC-PUFA	3,22 (24,41)	3,47 (27,33)	3,86 (29,42)	5,07 (38,56)	6,35 (47,73)	6,35 (47,73)	0,43	0,621	<0,001
LC PUFA n-6	2,86 (21,76)	2,71 (21,34)	2,62 (19,93)	2,77 (21,09)	2,57 (19,37)	2,57 (19,37)	1,69	0,095	NS
LC PUFA ⁴ n-3	0,36 (2,65)	0,76 (6,00)	1,25 (9,49)	2,30 (17,47)	3,78 (28,36)	3,78 (28,36)	0,50	0,801	<0,001
n-3/n-6	0,06	0,09	0,12	0,18	0,26	0,26	0,00	0,838	<0,001

¹Produzido por Alltech Inc. (Kentucky, EUA) e importado por Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA (Araucária, Brasil).²Ácidos graxos detectados e totalizados: 10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 18:1n-7, 22:1n-11, 18:3n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3. ³Grupos de ácidos graxos: SFA= saturados, MUFA= monoinsaturados, PUFA= poli-insaturados, LC-PUFA= poli-insaturados de cadeia longa (20 a 22 carbonos). ⁴Não detectado (<0,05%).

Tabela 6. Desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com duas fontes de DHA na dieta, ALL-G-RICH® ou óleo de fígado de bacalhau, por 57 dias.

Variáveis	Dietas		Pooled SEM	P-Value
	1% ALL-G-RICH®	Óleo de fígado de Bacalhau		
Ganho em peso (g)	87,79	82,38	11,47	NS
Taxa de crescimento específico (%)	4,38	4,25	0,00	NS
Conversão alimentar	1,10	1,09	0,00	NS
Taxa de retenção proteica (%)	37,72	38,92	1,11	NS

¹Produzido por Alltech Inc. (Kentucky, EUA) e importado por Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA (Araucária, Brasil).

2.6 DISCUSSÃO

A dieta é o principal fator determinante da composição lipídica corporal em peixes (Tocher, 2015). Já foi relatado que a diferença nas proporções dos ácidos graxos dietéticos influencia diretamente no perfil de ácidos graxos corporal da tilápia-do-Nilo (Corrêa et al., 2017). Similarmente, neste estudo, a inclusão de ALL-G-RICH®, rico em DHA, influenciou positivamente a concentração corporal deste ácido graxo em juvenis de tilápia-do-Nilo. Apesar da quantidade de DHA aumentar na dieta a uma taxa média de 1,95 vezes a cada nível de inclusão na dieta, a quantidade de DHA corporal aumentou na proporção de 1,74 (Tabelas 2 e 5). Isto era esperado, já que, quanto maior a concentração de um ácido graxo na dieta, menor sua eficiência na deposição corporal (Glencross et al., 2014).

Aliado a isso, possivelmente, parte do DHA pode ter entrado na rota metabólica de β -oxidação (Obloh et al., 2017) ou formação de compostos bioativos como protectinas, resolvinas e maresinas, que possuem efeito pró-resolução de processos inflamatórios, além de ser utilizado para deposição corporal (Serhan 2007; Serhan et al., 2008; Serhan, 2014).

A quantidade corporal de ARA diminuiu, enquanto que a de LOA aumentou (Tabela 5). Isto se deve, provavelmente a menor conversão de LOA em ARA, pois as enzimas responsáveis pelo alongamento e dessaturação possuem afinidade maior por ácidos graxos LC-PUFA do que com LOA (Glencross, 2009), nos quais a quantidade de LC-PUFA foi aumentando com a inclusão da alga.

Tabela 7. Composição corporal e perfil de ácidos graxos em juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com duas fontes de DHA na dieta, ALL-G-RICH^{®1} ou óleo de fígado de bacalhau, por 57 dias.

	Dieta			
	1% ALL-G-RICH [®]	Óleo de fígado de Bacalhau	Pooled SEM	P-Value
Composição, % matéria natural				
Matéria seca	29,90	29,00	0,28	NS
Proteína bruta	15,30	15,99	0,07	0,030
Lipídios	10,54	8,96	0,16	0,004
Matéria mineral	4,75	3,82	0,39	NS
Ácidos graxos selecionados² e grupos³ de ácidos graxos (% do total ácidos graxos) e (mg g lipídios⁻¹, entre parênteses)				
18:2 n-6 LOA	12,83 (97,42)	13,90 (107,88)	6,57	0,003
18:3 n-3 α -LNA	0,67 (5,06)	0,71 (5,60)	0,04	0,023
20:4 n-6 ARA	1,03 (7,84)	1,04 (8,19)	0,06	NS
20:5 n-3 EPA	ND	0,16 (1,21)	0,00	<0,001
22:5 n-3 DPA	0,11 (0,82)	0,52 (4,00)	0,07	<0,001
22:6 n-3 DHA	1,14 (8,67)	1,78 (14,12)	0,25	<0,001
SFA	36,91 (280,91)	34,32 (261,56)	40,98	0,016
MUFA	40,33 (306,17)	40,38 (307,00)	18,13	NS
PUFA	22,66 (172,11)	25,34 (195,76)	7,70	<0,001
PUFA n-6	15,63 (118,71)	16,21 (125,67)	1,28	<0,001
PUFA n-3	1,91 (14,55)	3,31 (25,66)	0,37	<0,001
LC-PUFA	3,86 (29,42)	4,62 (36,06)	0,38	<0,001
LC PUFA n-6	2,62 (19,93)	2,16 (16,61)	8,79	0,047
LC PUFA n-3	1,25 (9,49)	2,47 (19,45)	0,60	<0,001
n-3/n-6	0,12	0,20	0,00	<0,001

¹Produzido por Alltech Inc. (Kentucky, EUA) e importado por Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA (Araucária, Brasil).

²Ácidos graxos detectados e totalizados: 10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 22:0, 16:1n-7, 22:1n-11, 18:3n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-3, 22:6n-3.

³Grupos de ácidos graxos: SFA= saturados, MUFA= monoinsaturados, PUFA= poli-insaturados, LC-PUFA= poli-insaturados de cadeia longa (20 a 22 carbonos).

⁴Não detectado (<0,05%).

Já ao comparar a composição corporal em termos de proteína bruta e lipídios corporais de juvenis de tilápia nilótica alimentados com 1% de ALL-G-RICH[®] com aqueles alimentados com OFB observa-se maior concentração de proteína bruta e menor concentração lipídica nos animais que estavam no tratamento com OFB. Provavelmente esta diferença ocorreu por causa da concentração lipídica nas dietas, que foi menor no tratamento com OFB (Tabela 2) ou ainda pela maior eficiência energética e de deposição de lipídios do grupo SFA, que foi maior na dieta com 1% de ALL-G-RICH[®] em comparação à dieta com OFB (Baillie et al., 1999). Também, o DHA corporal dos juvenis de

tilápia nilótica alimentados com 1% de ALL-G-RICH® com àqueles alimentados com OFB observa-se uma quantidade de DHA corporal maior no segundo grupo, por volta de 56%, sendo que nas dietas a diferença na concentração deste ácido graxo era de apenas 18%.

Provavelmente esta diferença decorreu das variação no conteúdo de EPA entre as dietas. O conteúdo de EPA na dieta OFB era 15 vezes maior do que aquele da dieta que possuía a maior inclusão de ALL-G-RICH® (4%). Apesar disso, a concentração de EPA corporal foi apenas quatro vezes maior, levando à hipótese de que parte do EPA oriundo da dieta OFB foi transformado em DHA.

A biossíntese de DHA em vertebrados através de seus precursores (α -LNA e EPA) ocorre por diferentes vias. O α -LNA pode ser transformado em EPA através de duas vias (que incluem dessaturases $\Delta 8$ ou $\Delta 6$) e, posteriormente, o EPA pode ser transformado em DHA por meio de duas outras vias (dessaturases $\Delta 4$ ou $\Delta 6$) (Oboh et al., 2017). A biossíntese por meio da dessaturase $\Delta 4$, converte o EPA em ácido docosapentaenoico (22:5 n-3, DPA) e depois em DHA. Já a via $\Delta 6$, transforma o EPA em DPA, em ácido tetracosapentaenoico (24:5 n-3, TPA), em ácido tetracosaenoico (24:6 n-3, THA) e, por fim, ocorre uma β -oxidação, originando DHA. Em alguns peixes, incluindo a tilápia-do-Nilo, ambas as vias foram identificadas (Oboh, et al., 2017). Outro fato importante que corrobora a hipótese de que o EPA foi convertido em DHA no presente estudo, é a quantidade de DPA, que é um intermediário entre o EPA e o DHA (Tocher, 2015), o qual foi encontrado em maior quantidade no corpo dos peixes alimentados com OFB. A quantidade de DPA teve pouca variação nas dietas (Tabela 2). Entretanto, apresentou grande variação no perfil de ácidos graxos corporais (Tabelas 5 e 7).

Assim, se a dieta é o principal fator modulante do perfil de ácidos graxos corporais em peixes, não se esperaria diferença na quantidade de DHA no corpo dos animais alimentados com 1% e OFB (Tabela 7), já que estas dietas contêm concentrações similares de DHA. Adicionalmente, quando se compara as dietas 4% e OFB, as quais possuem conteúdo semelhante de DPA, o conteúdo corporal de DPA foi muito maior nos peixes alimentados com OFB, o que sugere que DPA e DHA corporais, acima do esperado, são oriundos do EPA que sofreu alongação e dessaturação. Além da tilápia-do-Nilo, outros teleósteos possuem capacidade de alongação de EPA para DPA, de DPA para TPA (Elovl2, Elovl4, Elovl5), além de dessaturação de DPA para DHA ($\Delta 4$) e de TPA para THA ($\Delta 6$) (Monroig et al., 2014; Morais et al., 2012; Castro et al., 2016).

A inclusão da alga não influenciou em nenhuma variável de desempenho medida, ficando claro que a tilápia-do-Nilo não exige LC-PUFA em condições ótimas de criação, a 28°C (Tabela 4). Por outro lado, o excesso de LC-PUFA, dado sua vulnerabilidade à oxidação, poderia causar um desequilíbrio no sistema antioxidante dos peixes, o que desencadearia um processo de peroxidação lipídica nos tecidos, levando ao estresse oxidativo (Garrido et al., 1989; Van der Berg et al., 1991; Stéphan et al., 1994) e prejudicando o crescimento dos peixes (Gao et al., 2013), o que não aconteceu.

O DHA apresentou alta digestibilidade (96,10%), muito próxima à relatada em outro estudo com tilápia-do-Nilo (Sarker et al., 2016), enquanto que o PAL, apresentou baixa digestibilidade (70,81%). Estes são os ácidos graxos encontrados em maior quantidade no ALL-G-RICH® (Tabela 1). Baixa digestibilidade de PAL também foi relatada para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), quando alimentado com o mesmo aditivo (Kousoulaki et al., 2016). Outro estudo com tilápia-do-Nilo alimentada com *Schizochytrium* sp., também relatou baixa digestibilidade do grupo de ácidos graxos saturados, que inclui o PAL (Sarker et al., 2016). Estes resultados podem ter ocorrido devido à posição em que os ácidos graxos estão dispostos nos triacilgliceróis encontrados em *Schizochytrium* sp.. As lipases, principalmente as pancreáticas, possuem preferência para hidrolizar os ácidos graxos posicionados na posição sn1 e sn3 dos triacilgliceróis (Cristophe, 2005). Portanto, sugere-se que *Schizochytrium* sp. armazene preferencialmente DHA nas posições sn1 e sn3 e PAL na posição sn2.

Concluindo, a inclusão dietética de até 4% de ALL-G-RICH® não prejudicou o desempenho de tilápias-do-Nilo e pode ser usada como estratégia para aumentar o teor final de DHA em juvenis de tilápia-do-nylo para até 3,57% do total de ácidos graxos ou 26,81 mg g lipídio⁻¹ na composição corporal. A inclusão dietética de outros ácidos graxos, mais especificamente o EPA, aumenta o acúmulo de DHA corporal, provavelmente se valendo de uma eficiente via de biossíntese. Entretanto, esta estratégia necessita o uso de óleo de peixe, que é um ingrediente escasso e caro. Por fim, a digestibilidade de DHA do ALL-G-RICH® é alta, entretanto, outro ácido graxo encontrado em grade quantidade neste aditivo, o PAL, possui baixa digestibilidade.

2.7 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Alltech pelo financiamento do estudo e ao coordenador do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC, Professor Marcelo Maraschin, pelo compartilhamento de equipamentos na análise de ácidos graxos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pelo fornecimento de bolsa de estudo para o primeiro autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fornecimento de bolsas para o segundo e terceiro autores.

Também agradecem à Nicoluzzi Rações LTDA e a Kabsa S.A. pela doação dos ingredientes utilizados para fabricação das dietas utilizadas neste estudo.

2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C., 1999. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

Appolinário, P.P.; Derogis, P.B.M.C.; Yamaguti, T.H. and Miyamoto, S., 2011. Metabolism, oxidation and biological implications of docosahexaenoic acid in neurodegenerative diseases. *Química Nova*. 34(8), 1409-1416. Doi: 10.1590/S0100-40422011000800021.

Baillie, R.A.; Takada, R.; Nakamura, M. and Clarke, S.D., 1999. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil" a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins, Leukotenes and Essential Fatty acids*. 60(5&6), 351-356.

Castro, L.F.C.; Tocher, D.R. and Monroig, O., 2016. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Progress in Lipid Research*. 62, 25–40. Doi: doi.org/10.1016/j.plipres.2016.01.001.

Chen, C.; Sun, B.; Li, X.; Li, P.; Wutai, G.; Bi, Y. and Pan, Q., 2013. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: quantification of optimum requirement of dietary linolenic acid in

juvenile fish. *Aquaculture*, 417, 99–104. Doi: doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.003.

Corrêa, C.F. Fontes de ácidos graxos da dieta no desempenho da tilápia-do-nylo em temperatura ótima e subótima. 2015. 106p. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2015.

Corrêa, C.F.; Nobrega, R.O.; Mattioni, B.; Block, J. M. and Fracalossi, D. M., 2017. Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. *Aquaculture Nutrition*, 23(5), 1016-1026. Doi: 10.1111/anu.12469.

Cristophe, A.B. Structural Effects on Absorption, Metabolism, and Health Effects of Lipids. In: Fereidoon Shahidi (Ed), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 6th ed. Wiley, Hoboken, pp. 535-553.

Erkkila, A.; Mello.; V.D.F.; de Risérus, U. and Laaksonen, D.E., 2008. Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. *Progress in Lipid Research*, 47, 172–187. Doi: [10.1016/j.plipres.2008.01.004](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.01.004).

FAO, 2017. Fisheries Statistics. <http://www.fao.org/fishery/statistics> (acessado: 29 de Setembro de 2017).

Folch, J.; Lees, M. and Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Furuya, W.M.; Barros, M.M.; Pezzato, L.E.; Cyrino, J.E.P. 2012. Exigências nutricionais e alimentação da tilápia. In: Fracalossi, D.M., Possebon, J.E.C. (Eds). *Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*, Florianópolis, pp. 255-268.

Gao, J.; Ishikawa, M.; Yokoyama, S.; Nguyen, B.T. and Mamauag, R.E., 2013. Effect of dietary oxidized fish oil and vitamin C supplementation on growth performance and reduction of oxidative stress in Red Sea Bream *Pagrus major*. *Aquaculture Nutrition*, 19, 35-44. Doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00921.x.

Garrido, A.; Garrido, F.; Guerra, R. and Valenzuela, A. 1989. Ingestion of high doses of fish oil increases the susceptibility of cellular

membranes to the induction of oxidative stress. *Lipids*, 24(9): 833-835. Doi: [10.1007/BF02544593](https://doi.org/10.1007/BF02544593).

Glencross, B.D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquac.* 1, 71-124.

Glencross, B.D.; Tocher, D.R.; Matthew, C. and Bell, J.G., 2014. Interactions between dietary docosahexaenoic acid and other long-chain polyunsaturated fatty acids on performance and fatty acid retention in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40, 1213-1227. Doi: [10.1007/s10695-014-9917-8](https://doi.org/10.1007/s10695-014-9917-8).

Kousoulaki, K.; Mørkøre, T.; Nengas, I.; Berge, R.K. and Sweetman, J., 2016. Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 451: 47-57. 2016. Doi: [10.1016/j.aquaculture.2015.08.027](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.027).

Li, E.; Lim, C.; Klesius, P.H. and Welker, T.L., 2013. Growth, body fatty acid composition, immune response, and resistance to *Streptococcus iniae* of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*, fed diets containing various levels of linoleic and linolenic acids. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44, 42–55. Doi: [10.1111/jwas.12014](https://doi.org/10.1111/jwas.12014).

Monroig, Ó.; Navarro, J.C.; Hontoria, F.; Tocher, D.R.; Martínez-Palacios, C. and Fonseca-Madrigal, J., 2014. Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2 fatty acyl desaturases: cloning and functional characterisation of $\Delta 4$ and bifunctional $\Delta 6\Delta 5$ desaturases in the freshwater atherinopsid *Chirostoma estor*. *Journal of Lipid Research*, 55, 1408–1419. Doi: [10.1194/jlr.M049791](https://doi.org/10.1194/jlr.M049791).

Morais, S.; Castanheira, F.; Martínez-Rubio, L.; Conceição, L.E.C. and Tocher, D.R., 2012. Longchain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821, 660–671. Doi: [10.1016/j.bbali.2011.12.011](https://doi.org/10.1016/j.bbali.2011.12.011).

Naylor, R.L.; Hardy, R.W.; Bureau, D.P.; Chiu, A.; Elliott, M.; Farrell, A.P.; Forster, I.; Gatlin, D.M.; Goldburg, R.J.; Hua, K. and Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 106, 15103-15110. Doi: 10.1073/pnas.0905235106.

Nettleton, J. A., 1994. Omega-3 Fatty Acids and Health. Institute of Food Technologists, Chapman and Hall. New York, NY, USA.

Nobrega, R.O.; Corrêa, C.F.; Mationi, B. and Fracalossi, D.M., 2017. Dietary α -linolenic for juvenile Nile tilapia at cold suboptimal temperature. *Aquaculture*, 471, 66-71. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.12.026.

NRC (Nacional Research Council), 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Research Council. National Academic Press, Washington, DC.

Oboh, A.; Kabeya, N.; Carmona-Antoñanzas, G.; Castro, L.F.C.; Dick, J.R.; Tocher, D.R. and Monroig, O., 2017. Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish. *Nature*, 7,3889. Doi: 10.1038/s41598-017-04288-2.

O'Fallon, J.V.; Busboom, J.R.; Nelson, M.L. and Gaskins, C.T., 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *Journal of Animal Science*, 85, 1511-1521. Doi: [10.2527/jas.2006-491](https://doi.org/10.2527/jas.2006-491).

Patterson, E.; Wall, R.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P. and Staton, C., 2012. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012. Doi: 10.1155/2012/539426.

Popma, T.J. and Lovshin, L.L., 1995. Worldwide prospects of commercial production of tilapia. Auburn University, AL, USA.

Rodrigues, A.P.O.; Gominho-Rosa, M.D.C.; Cargnin-Ferreira, E.; de Francisco, A. and Fracalossi D.M., 2011. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 18, 65-72. Doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00877.x.

Sarker, P.K.; Gamble, M.M.; Kelson, S. and Kapuscinski, A.R., 2016. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium sp.* and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina sp.* feed ingredients. *Aquaculture Nutrition*, 22, 109:119. Doi: 10.1111/anu.12230.

Serhan, C.N., 2007. Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. *Annual Review of Immunology.*, 2007. 25, 101–37. Doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647.

Serhan, C.N.; Chiang, N. and Van Dyke, T.E., 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology.*, 8(5), 349–361. Doi: [10.1038/nri2294](https://doi.org/10.1038/nri2294).

Serhan, C.N., 2014. Novel pro-resolving lipid mediators in inflammation are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503), 92–101. Doi: 10.1038/nature13479.

Simopoulos, A.P., 1999. Leaf, A. and Salem, N., Essentiality and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 43, 127–130. Doi: 10.1159/000012777.

Simopoulos, A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 365–379. Doi: [10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6).

Simopoulos, A.P., 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy.*, 60, 502–507. Doi: doi.org/10.1016/j.biopha.2006.07.080.

Souza, N.E.; Matsushita, M.; Oliveira, C.C.; Franco, M.R.B. and Visentainer, J.V., 2007. Manipulation of fatty acid composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets with flaxseed oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 1677–1681. Doi: 10.1002/jsfa.2877.

Stéphan, G.; Guillaume, J. and Lamoura, F., 1994. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 130, 251-268.

Takeuchi, T.; Satoh, S. and Watanabe, T., 1983. Requirement of *Tilapia nilotica* for essential fatty acids. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish.*, 49, 1127–1134. Doi: 10.2331/suisan.49.1127.

Teoh, C.Y.; Turchini, G.M. and Ng, W.K., 2011. Erratum to “Genetically improved farmed Nile tilapia and red hybrid tilapia showed differences in fatty acid metabolism when fed diets with added fish oil or a vegetable oil blend”. *Aquaculture*, 316, 144-154. Doi: [10.1016/j.aquaculture.2011.03.021](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.021).

Tocher, D.R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41, 717-732. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x.

Tocher, D.R., 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449, 94-107. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.01.010.

Ways, P. and Hanahan, D.J., 1964. Characterization and quantification of red cell lipids in normal man. *Journal of Lipid Research*, 5, 318-328.

Van Den Berg, J.J.M.; de Fouw, N.J.; Kuypers, F.A.; Roelofsen, B.; Houtsmoller, U.M.T. and Den Kamp, J.A.F.O., 1991. Increased n-3 polyunsaturated fatty acid content of red blood cells from fish oil-fed rabbits increases in vitro lipid peroxidation, but decreases hemolysis. *Free Radical Biology & Medicine.*, 11, 393-399. Doi: [10.1016/0891-5849\(91\)90156-W](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90156-W).

Visentainer, J.V. and Franco, M.R.B. 2006. Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação. Varela, São Paulo, Brasil.

3 Artigo 2

Inclusão dietética de ALL-G-RICH® para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): altas doses de ácido docosaexaenóico induzem dano oxidativo a biomoléculas?

Vitor Augusto Giatti Fernandes¹, Débora Machado Fracalossi¹, Naissa M. Danielli¹, Fernando Dutra Brignol¹ e Alcir Luiz Dafre^{1*}

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima Trindade – Florianópolis/SC – Brasil – CEP 88040-900

*Autor para correspondência: Alcir Luiz Dafre, alcir.dafre@ufsc.br.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Alltech (Brasil e EUA) pelo financiamento deste estudo e também à FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) pelo fornecimento da bolsa de estudos do primeiro autor. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsas aos autores Débora Machado Fracalossi e Alcir Luiz Dafre. Também agradecem à Nicoluzzi Rações LTDA e a Kasa S.A. pela doação dos ingredientes utilizados para fabricação das dietas utilizadas neste estudo.

Este estudo foi financiado pela empresa Alltech (EUA), que comercializa a farinha de *Schizochytrium* sp. sob o nome comercial de ALL-G-RICH®, objeto deste estudo.

3.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar se a inclusão dietética de ALL-G-RICH[®], aditivo rico em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da série n-3, pode causar dano oxidativo à biomoléculas na tilápia-do-Nilo. Foi realizado um ensaio alimentar com inclusão de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 % de ALL-G-RICH[®], além de um tratamento controle, contendo óleo de fígado de bacalhau (OFB), o qual possuía nível de ácido docosaenoico (22:6 n-3, DHA) comparável àquele na inclusão de 1% de ALL-G-RICH[®]. Após 57 dias de alimentação, foram avaliados: danos ao DNA (ensaio cometa), danos à proteínas (carbonilação de proteínas) e índices de peroxidação lipídica, por meio dos níveis de malondialdeído (MDA, TBARS e FL-HPLC), adutos de 4-hidroxinonal e MDA à proteínas. A crescente inclusão de ALL-G-RICH[®] na dieta não afetou as variáveis analisadas. Em comparação com a dieta controle, com OFB, a dieta contendo 1% ALL-G-RICH[®] apresentou menores níveis de MDA; entretanto, não houve alteração nos outros parâmetros analisados. Os dados obtidos neste estudo deixam claro que o aumento da ingestão de PUFA n-3 pela tilápia-do-Nilo, propiciado pela inclusão de ALL-G-RICH[®], não causa danos ao DNA, lipídios e proteína nos peixes.

Palavras-chave: lipoperoxidação, 4-HNE, dano oxidativo, ensaio cometa, carbonilação de proteínas, tilápia, dieta com ácidos graxos poli-insaturados.

3.2 INTRODUÇÃO

A importância da tilápia-do-Nilo para a piscicultura mundial é amplamente conhecida, sendo hoje uma das principais espécies criadas em confinamento (FAO 2017). Apesar de já existir um pacote tecnológico relativamente bem desenvolvido para esta espécie, a compreensão do metabolismo de ácidos graxos ainda está em fase de consolidação (Teoh et al. 2011; Nobrega et al. 2017; Corrêa et al. 2017).

A exigência nutricional de uma determinada espécie de peixe está relacionada às suas necessidades fisiológicas, o que nem sempre coincide com a quantidade desejável do nutriente no pescado para beneficiar a nutrição humana (Tocher 2010). A nutrição animal pode contribuir para o fornecimento de uma dieta que supra às exigências em ácidos graxos de peixes, com potenciais benefícios à saúde humana.

De uma maneira geral, nas dietas humanas ocidentais há um desequilíbrio na relação de ácidos graxos n-3:n-6. Em geral, ácidos graxos da série n-6, relacionados a processos pró-inflamatórios, são consumido em excesso. Por outro lado, as dietas humanas são deficientes em ácidos graxos n-3, relacionados a processos resolutivos da inflamação, responsáveis pela menor incidência de doenças cardiovasculares e neurológicas (; Nettleton 1994; Simopoulos et al. 1999; Simopoulos et al. 2002; Serhan 2007, Erkkila et al. 2008; Serhan, 2014). Em dietas humanas do passado, a relação n-3:n-6 era 1:1, mas atualmente gira em torno de 0,06:1, sendo que o ideal para uma manutenção saudável do organismo seria de 0,25:1 (Simopoulos, 2006).

Existe a possibilidade de aumentar a proporção de ácidos graxos n-3 no corpo da tilápia-do-Nilo por meio do aumento desta proporção na dieta dos peixes (Souza et al. 2007). Porém, é sabido que um maior aporte de ácidos graxos de cadeia longa (≥ 20 carbonos) e poli-insaturados (duas ou mais ligações duplas, PUFA) pode impactar negativamente o aparato antioxidante de vertebrados (Garrido et al. 1989; Huang et al. 1998). Essas consequências negativas, em geral, estão relacionadas à facilidade de oxidação dos PUFA (Lu and Lu 2002), potencializando processos que podem levar a danos oxidativos em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos.

Os danos oxidativos à biomoléculas ocorrem quando há uma mudança no equilíbrio oxidante/antioxidante em prol dos oxidantes, o que provoca mudanças significativas em suas funções e pode levar a várias patologias (Birben et al. 2012).

Existem vários marcadores de dano oxidativo à biomoléculas, os quais frequentemente avaliam danos aos lipídios, proteínas e DNA. Os

métodos mais utilizados para detecção de danos aos lipídios são os que medem os produtos finais da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Forman et al, 2015; Calamaras et al. 2015). Uma das técnicas mais empregadas para detectar MDA é a análise de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), a qual não é muito específica. Os métodos mais indicados para a análise de MDA são aqueles que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Recentemente foi descrito um método que emprega HPLC com detector de fluorescência (FL-HPLC), o qual é específico para detecção de MDA (Domijan et al. 2015). Além disso, o MDA e o 4-HNE podem formar adutos com proteínas, os quais também podem ser usados como marcadores de dano oxidativo (Bradley-Whitman e Lovell 2015). A disponibilidade de anticorpos específicos para esses adutos permite uma análise complementar de danos oxidativos por *Western blot* ou por *dot blot*. Os danos às proteínas também podem ser medidos pela carbonilação de proteínas, que em geral aumenta em condições pró-oxidativas (Dowling et al, 2006). A eletroforese de uma única célula, também chamada de ensaio cometa, é o método mais utilizado para mensuração de danos ao DNA (Singh et al. 1988). Este método identifica, em meio alcalino, sítios lábeis no DNA. O dano causado por agentes clastogênicos leva a quebra das cadeias de DNA e pode ser identificado pelo ensaio cometa. Este método foi adaptado para eritrócitos de peixes com sucesso (Lemos et al, 2005).

Atualmente, a principal fonte dietética de n-3, o óleo de peixe, que é obtido através da exploração dos limitados recursos pesqueiros (Naylor et al. 2009). A farinha de *Schizochytrium* sp. possui pelo menos 12% de sua composição constituída de ácido docosaenoico (DHA, 22:6 n-3), expresso na matéria seca total do produto e se apresenta como fonte alternativa de suprimento de ácidos graxos da série n-3 na ração. A empresa Norte Americana Alltech produz farinha de *Schizochytrium* sp. sob o nome comercial de ALL-G-RICH®. No presente estudo, ALL-G-RICH® foi adicionado à dieta de tilápias-do-Nilo com o objetivo de verificar se esta inclusão leva a danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e DNA.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Ensaio alimentar

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, pertencente ao Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (48° 32' 57''W, 27°35' 48''S, elevação 3 m). No ensaio alimentar foram testadas inclusões crescentes de ALL-G-RICH® na dieta de tilápia-do-Nilo como fonte de ácido graxo docosaenoico (22:6 n-3, DHA) (Tabela 8). A dieta com óleo de fígado de bacalhau (OFB) (1,7% da dieta na matéria seca) foi considerada como dieta controle positivo, incluindo DHA, entretanto, de outra fonte mais tradicional. O ALL-G-RICH® foi testado em cinco níveis (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0% da dieta na matéria seca), em delineamento inteiramente ao acaso, com cinco repetições para cada tratamento. O tratamento OFB foi comparado apenas com a inclusão de 1% de ALL-G-RICH®, também com cinco repetições. Foram mantidas proporções semelhantes dos ácidos graxos linoleico (18:2 n-6, LOA), alfa linolênico (18:3 n-3, α -LNA) e poli-insaturados (duas ou mais insaturações, PUFA) n-6 entre as dietas ao se substituir a banha suína pelo ALL-G-RICH® e óleo de milho (Tabela 8).

As seis dietas foram isonitrogenadas, isoenergéticas, isolipídicas (Tabela 8) e formuladas com ingredientes práticos para atender às exigências nutricionais de juvenis de tilápia-do-Nilo (NRC 2011; Furuya et al. 2012). Os ingredientes foram moídos em moinho de martelo e peneirados manualmente com malha de 30 mesh, pesados em balança semi-analítica e homogeneizados em misturador horizontal por 15 min. Após, os óleos foram adicionados, a umidade foi corrigida para 230 g kg⁻¹ com a adição de água destilada, sendo a mistura homogeneizada por mais 15 min. As dietas passaram por processo de extrusão à 100°C, resultando em péletes de 2 a 3 mm, os quais foram secos à 50°C até atingir 920 g kg⁻¹ de matéria seca. As dietas, após a secagem, foram estocadas em unidades hermeticamente fechadas, protegidas da luz, a uma temperatura de 4°C.

Tabela 8. Formulação, composição centesimal e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais.

Ingredientes (% Matéria Seca)	Inclusão de All-G-Rich ³ na dieta,					OFB
	0	0,5	1	2	4	
Farelo de soja ¹	48,1	47,85	47,6	47,1	46,1	47,6
Milho ¹	32	31,91	31,83	31,65	31,3	32,25
Farinha de vísceras de aves ²	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9
Premix vitamínico-mineral ³	1	1	1	1	1	1
Banha suína ⁴	2	1,75	1,5	1	-	-
All-G-Rich ³	-	0,5	1	2	4	-
Óleo de milho ⁶	-	0,09	0,17	0,35	0,7	0,55
Óleo de fígado de bacalhau ⁷	-	-	-	-	-	1,7
Composição, %, matéria seca						
Matéria seca	91,95	90,49	90,52	90,97	90,53	90,14
Proteína bruta	37,39	37,85	37,54	37,67	37,37	37,62
Lípidios	7,08	7,2	7,56	7,58	8,01	6,19
Matéria mineral	6,32	6,23	6,39	6,12	6,11	6,47
Energia bruta (kcal/kg)	4931	5144	5139	5160	5259	5178
Ácidos graxos selecionados⁸ e grupos⁹ de ácidos graxos (% do total ácidos graxos) ou (mg g lipídios⁻¹, entre parênteses)						
18:2 n-6 LOA	27,76 (265,47)	26,95 (257,2)	26,68 (248,99)	25,17 (227,37)	24,03 (213,67)	27,22 (211,64)
18:3 n-3 <i>n</i> -LNA	1,38 (13,22)	1,37 (13,03)	1,32 (12,3)	1,21 (10,93)	1,14 (10,13)	1,47 (11,41)
20:4 n-6 ARA	ND ¹⁰	ND	ND	ND	ND	ND
20:5 n-3 EPA	ND	ND	ND	0,07 (0,51)	0,12 (1,10)	1,8 (14,01)
22:5 n-3 DPA	ND	ND	ND	0,1 (0,92)	0,23 (2,03)	0,29 (2,23)
22:6 n-3 DHA	ND	1,08 (10,34)	2,15 (20,10)	4,08 (36,89)	7,89 (70,05)	2,53 (19,68)
SFA ^b	28,52 (273,87)	29,62 (286,05)	30,37 (286,59)	35,60 (324,38)	37,78 (337,35)	20,17 (156,84)
MUFA ^b	37,52 (358,84)	35,33 (337,17)	33,71 (314,61)	30,14 (324,38)	23,77 (211,11)	38,40 (298,52)
PUFA ^b	29,75 (284,57)	30,35 (289,70)	31,30 (292,06)	32,19 (290,75)	35,90 (319,29)	35,06 (272,50)
PUFA n-6 ^b	28,37 (271,35)	27,91 (266,33)	27,82 (259,67)	26,73 (241,43)	26,35 (234,52)	27,81 (216,22)
PUFA n-3 ^b	1,46 (13,99)	2,58 (24,63)	3,57 (33,31)	5,58 (50,43)	9,65 (85,97)	7,05 (54,83)
LC-PUFA ^b	0,39 (3,75)	1,81 (17,26)	3,05 (28,51)	5,59 (50,46)	10,50 (93,48)	5,26 (40,89)
LC PUFA n-6 ^b	0,39 (3,75)	0,73 (6,92)	0,90 (8,41)	1,34 (12,07)	2,09 (18,84)	0,39 (3,05)
LC PUFA n-3 ^b	ND	1,08 (10,34)	2,15 (20,10)	4,25 (38,40)	8,41 (74,64)	4,87 (37,84)
n-3/n-6	0,05	0,09	0,13	0,21	0,37	0,25

¹Fornecido por Nicoluzzi Rações LTDA (Penha, Brasil); ²Produzido por Kabisa S.A. (Porto Alegre, Brasil).

³Premix vitamínico-mineral Poli-Nutri (Trece Tílias, Brasil), composição por kg: vit. (vitamina) A 1.000.000 UI, vit. D3 500.000 UI, vit. E 20.000 UI, vit. K3 500 mg, vit. B1

500 mg, vit. B2 1.750 mg, vit. B6 1.125 mg, vit. B12 3.750 mg, niacina 5.000 mg, pantotênato de cálcio 5.000mg, ácido fólico 250 mg, biotina 50 mg, ferro 13,75 g, cobre

2.000 mg, manganês 3.750 mg, zinco 25 g, cobalto 25 mg, todo 100 mg, selênio 75 mg.

⁴Produzido por Seara alimentos S.A. (Itajaí, Brasil).

⁵ Produzido por Alltech Inc. (Kentucky, EUA) e importado por Alltech do Brasil Agroindustrial LTDA (Araucária, Brasil).

⁶ Snavit, produzido por Cocamar LTDA (Maringá, Brasil).

⁷ Möllers Tran, produzido por Orkla Health (Oslo, Noruega).

⁸ Ácidos graxos detectados e totalizados: 10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 22:0, 16:1n-7, 22:1n-11, 18:3n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-3, 22:6n-3.

⁹ Grupos de ácidos graxos: SFA = saturados, MUFA = monoinsaturados, PUFA = poli-insaturados, LC-PUFA = poli-insaturados de cadeia longa (20 a 22 carbonos).

¹⁰ ND = Não Detectado (<0,05%).

3.3.2 Peixes e procedimentos experimentais

Os 750 juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, $8,35 \pm 0,80$ g), da linhagem GIFT, foram obtidos da empresa ACQUA SUL, Ilhota, Santa Catarina, após a masculinização do lote (>99%). O manejo dos peixes seguiu o protocolo n° PP00815, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC).

Os peixes foram aclimatados às condições experimentais por 14 dias. Nos primeiros sete dias, foram estocados em dois tanques de 1000 L e, por mais sete dias, nas 30 unidades experimentais definitivas de 100 L (25 peixes por unidade experimental), acopladas ao mesmo sistema de recirculação. Neste período de aclimação, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, até a saciedade aparente, com a dieta sem inclusão de ALL-G-RICH. Os horários de alimentação diária foram 9 h e às 16 h.

Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais durante 57 dias, utilizando-se o mesmo procedimento da aclimação. As variáveis indicadoras da qualidade da água foram medidas diariamente, resultando nas seguintes médias: temperatura $27,84 \pm 0,36^\circ\text{C}$, oxigênio dissolvido $5,19 \pm 0,57$ mg L⁻¹, pH $6,98 \pm 0,22$. Semanalmente foram medidos a amônia total $0,65 \pm 0,10$ mg L⁻¹ e nitrito $0,01$ mg L⁻¹. Todas estas variáveis mantiveram-se dentro da faixa de conforto para a espécie (Popma & Lovshin, 1995). A vazão de entrada de água em cada unidade experimental foi de 540 mL min⁻¹ e o fotoperíodo, 12 h claro:12 h escuro, sendo que intensidade luminosa foi 9 ± 2 lux.

Ao final do ensaio alimentar, os peixes foram sacrificados com aprofundamento anestésico (200 mg L⁻¹ Eugenol®, Biodinâmica, Ibiporã, Paraná) seguido por secção da coluna vertebral e amostrados aleatoriamente para coleta de tecidos (fígado e sangue), os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados à -80°C até as análises bioquímicas.

3.3.3 Ensaio Cometa

O ensaio cometa (ou eletroforese de célula única) foi realizado de acordo com Singh e colaboradores (1988), com pequenas modificações. O dano ao DNA foi medido nos glóbulos vermelhos da tilápia-do-Nilo. Após a coleta de sangue em seringas heparinizadas, uma alíquota foi diluída em agarose de baixo ponto de fusão (0,75% em tampão PBS a 37°C), e distribuídas em lâminas histológicas pré-revestidas com agarose. Cinquenta células foram avaliadas em cada uma das duas

lâminas. O grau de dano foi ranqueado em cinco classes (0, 1, 2, 3 e 4), de acordo com o tamanho/intensidade da cauda (Figura 5). A classe zero corresponde ao DNA não danificado e, a classe quatro, às células com o dano máximo no DNA (Singh et al. 1988). O dano ao DNA foi expresso como índice de dano. O índice de dano foi calculado como o número de células encontradas para cada classe de dano (0-4), multiplicado pelo número de classe respectivo (0-4), o que resulta um valor entre 0 e 400.

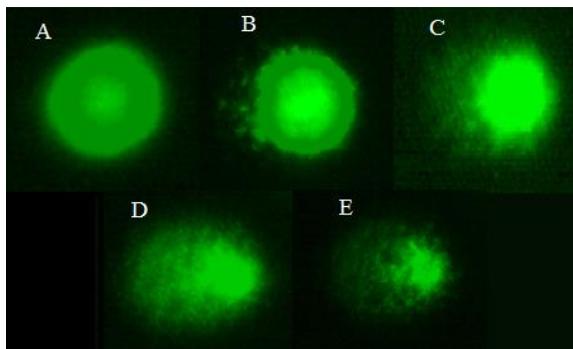


Figura 5: Exemplos de mensuração de danos ao DNA por meio do ensaio cometa. A = escore 0, ausência de cauda; B = cauda pequena, menor que a cabeça; C = escore 2, cauda comparável ao tamanho da cabeça; D = escore 3, cauda maior que a cabeça e E = escore 4, cabeça pequena e cauda grande com várias vezes o tamanho da cabeça.

3.3.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método clássico determina o produto final da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), que reage com o ácido tiobarbitúrico, gerando um cromóforo com alta absorvidade ($\epsilon_{532} = 140000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), após uma reação em temperatura relativamente alta, a 90°C (Ohkawa et al. 1979). Para esta análise, 70 mg de tecido foram homogeneizado em 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0). Em seguida, dissolveu-se 40 mg de TBA em 10 mL de HCl 0,2 M e adicionou-se 0,3 mL desta solução a cada amostra. Esta mistura foi aquecida a 90°C , durante 30 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $15000 \times g$, durante 3 min. A leitura das absorvâncias foi feita em 600 nm e 532 nm. Foi utilizado uma correção de linha de base, onde a absorvância a 600 nm foi subtraída da absorvância a 532 nm. Esta correção elimina a interferência da dispersão da luz, proporcionando uma leitura mais confiável, com menor variabilidade.

A proteína foi detectada pelo método de Bradford, usando-se albumina de soro bovino como padrão (Bradford 1976), a qual foi usada para a normalização dos dados.

3.3.5 Detecção de MDA por HPLC com detecção fluorimétrica (FL-HPLC)

As amostras preparadas para o método de TBARS também foram utilizadas para a detecção do aduto de MDA-TBA, por HPLC acoplado a um detector de fluorescência (Domijan et al. 2015). Foi utilizado um aparelho Jasco LC-2000 Plus System (Easton, EUA), usando-se excitação a 527 nm e emissão a 551 nm. A amostra foi diluída ~100 vezes e filtrada com membranas com poros de 10 kDa antes de aplicação a uma coluna ACE[®] C18 Ultra-Inert, com um fluxo de 0,6 mL min⁻¹. Uma curva de calibração padrão de malondialdeído (MDA) foi construída, usando-se o mesmo procedimento para a preparação da amostra (Agarwal 2008).

3.3.6 Dot blot para 4-HNE, MDA e carbonilação de proteínas

O 4-HNE e MDA formam adutos com proteínas e podem ser detectados por anticorpos específicos. Para esta finalidade, o *dot blot* foi realizado aplicando-se 3 µg de proteína, num volume de 1-5 µL, diretamente sobre uma membrana de PVDF, a qual foi deixada secar ao ar. As membranas foram embebidas em metanol e lavadas em seguida com solução salina tamponada com 0,05% de Tween 20 (TBS-T).

Proteínas carboniladas foram detectadas também por *dot blot*. As amostras foram homogeneizadas em HEPES 20 mM pH 7,0 e derivadas com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), como descrito anteriormente (Levine et al. 1994). Resumidamente, as proteínas foram desnaturadas com SDS (6%) e derivadas com DNPH 20 mM em HC1 2 N, durante 1 h à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram neutralizadas com Tris 2 M/Glicerol 30%, seguida da adição de β-mercaptoetanol (5%). Uma alíquota de 2 µl (1 µg de proteína) foi pipetada em uma membrana PVDF e deixada secar ao ar. O excesso de DNPH foi removido com ácido acético.

As membranas foram bloqueadas durante 1 h com uma solução de 5% de leite desnatado em TBS-T e lavadas por mais três vezes. Em seguida, as membranas foram incubadas, durante a noite, a 4°C, com anticorpo anti-HNE (1: 2000) ou anti-DNP (1: 10000, Abcam,

Cambridge, EUA); anti-MDA (1: 3000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA).

Após três lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários apropriados, conjugados com peroxidase, lavados três vezes com TBS-T e visualizadas por meio de um *kit* de detecção ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). As imagens foram obtidas em um aparelho ChemiDoc (BioRad Lab, La Jolla, EUA).

Para correção da aplicação de proteína, as membranas foram coradas com Ponceau S e a intensidade das bandas registradas com ImageDoc (BioRad Lab, La Jolla, EUA). A análise densitométrica foi realizada usando-se o software Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

3.3.7 Análises estatísticas

Para avaliar o efeito da inclusão de ALL-G-RICH[®] na dieta sobre o parâmetro dano oxidativo, os dados foram submetidos à análise de regressão linear simples. Os dados dos peixes alimentados com a dieta contendo óleo de fígado de bacalhau foram comparados com o tratamento 1% ALL-G-RICH[®], utilizando-se o teste “t” de Student. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inclusão de ALL-G-RICH[®] a 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0% não causou danos ao DNA, como avaliado pelo índice de dano no teste do cometa (Tabela 9). O produto final da peroxidação lipídica, avaliado pelo método TBARS e por FL-HPLC, não foi alterado pela inclusão de ALL-G-RICH[®] (Tabela 9). O dano a proteínas, avaliado pela detecção do produto da reação de anticorpo específico com carbonilas de proteínas, também não foi alterado pela inclusão de ALL-G-RICH[®] (Tabela 9). Produtos finais da peroxidação lipídica MDA e 4-HNE também não foram alterados pela inclusão de ALL-G-RICH[®] (Tabela 9).

Para testar se a dieta com 1% ALL-G-RICH se compara à dieta controle, que utiliza o enriquecimento de DHA mais comum, que é o uso de OFB, os mesmos parâmetros foram avaliados. Como demonstrado na Tabela 10, não houve diferença entre estes tratamentos, equivalentes em DHA (1% de inclusão de ALL-G-RICH e 1,7% de inclusão de OFB), exceto pelo MDA. Neste caso, o MDA medido pelo por FL-HPLC foi mais elevado no tratamento com OFB.

Quando se compara a uma dieta com uma fonte clássica de DHA (1,7% OFB), percebe-se que apenas um dos parâmetros analisados (MDA por FL-HPLC) apontou menor peroxidação lipídica na dieta contendo 1% ALL-G-RICH® (Tabela 10). Este dado poderia ser explicado pela quantidade de LC-PUFA n-3 ser maior na dieta OFB, o que poderia favorecer a peroxidação lipídica. Entretanto, estudos complementares são necessários para comprovar esta possibilidade. Da mesma forma, estes dados estariam de acordo com a literatura, indicando que o óleo de peixe com alta quantidade de LC-PUFA n-3, pode aumentar a peroxidação lipídica (Stéphan et al. 1995). Também adiciona-se a este cenário que a detecção de MDA por HPLC é mais sensível que a detecção do MDA por TBARS (método colorimétrico). Entretanto, dos seis parâmetros analisados, somente o MDA (FL-HPLC) apresentou esta diferença, o que impede uma conclusão segura a respeito, uma vez que nos outros cinco parâmetros de danos oxidativos não houve diferenças.

Apesar da tilápia-do-Nilo não exigir DHA do ponto de vista fisiológico, nem uma grande quantidade de PUFA, este pode ser adicionado em sua composição corporal se fornecido na dieta (Souza et al., 2007). Entretanto, o DHA é um ácido graxo altamente suscetível à peroxidação. Deste modo, sua ingestão em grandes quantidades poderia induzir à uma peroxidação lipídica e aumentar os danos oxidativos (Garrido et al. 1989; Van der Berg et al. 1991; Stéphan et al. 1995).

A maioria dos estudos neste tema contemplam a inclusão de lipídios oxidados na dieta como mecanismo de indução à peroxidação lipídica nos tecidos de peixes (Mourente et al. 2002; Huang and Huang 2004; Peng et al. 2009; Gao et al. 2012). Nestes estudos, os processos de peroxidação lipídica são bastante favorecidos. Também há relatos sugerindo que a inclusão de óleos não oxidados também podem induzir ao dano oxidativo (Huang et al. 1998; Lu e Lu, 2002). Estes estudos utilizam, em geral, a análise de TBARS e vitamina E (α -tocoferol) no fígado dos peixes, após a inclusão de óleo de peixe oxidado. Como esperado, em processos de dano oxidativo, a quantidade de TBARS aumenta, enquanto que a quantidade de α -tocoferol diminui. Para contrabalançar estes efeitos, a inclusão de α -tocoferol na dieta poderia minimizar os efeitos pró-oxidativos causados pela ingestão de lipídios oxidados (Gao et al. 2012).

Tabela 9. Dano oxidativo à biomoléculas em tilápias-do-Nilo após inclusão dietética de ALL-G-RICH em vários níveis.

Parâmetro ¹	Método	Inclusão de ALL-G-Rich ² na dieta (%)						EPM ⁶ combinado	R ²	Valor de “p” ³
		0	0,5	1	2	4	4			
Índice de danos ao DNA ²	Ensaio do cometa	17,17 (12)	24 (12)	25,17 (12)	20,58 (12)	20,00 (12)	20,00 (12)	10,49	<0,01	NS ⁵
TBARS ³	Colorimétrico	2,26 (11)	1,75 (11)	1,57 (11)	1,79 (11)	1,96 (11)	1,96 (11)	0,45	<0,01	NS
MDA ⁴	FL-HPLC	100 (11)	110 (10)	75 (12)	90 (11)	88 (10)	88 (10)	15,54	0,029	NS
Adutos de MDA à proteínas ⁴	<i>Dot blot</i>	100 (12)	97 (12)	79 (11)	111 (12)	85 (9)	85 (9)	18,35	0,006	NS
Adutos de 4-HNE à proteínas ⁴	<i>Dot blot</i>	100 (12)	106 (12)	107 (12)	97 (12)	90 (11)	90 (11)	19,59	0,031	NS
Carbonilação de proteína ⁴	<i>Dot blot</i>	100 (11)	103 (11)	89 (9)	128 (10)	106 (11)	106 (11)	26,95	0,012	NS

¹Valores são apresentados, seguidos pelo número amostral (n);

²Índice de dano;

³nmol x mg proteína⁻¹;

⁴Porcentagem do grupo controle, sem inclusão de ALL-G-RICH;

⁵NS – não significativo

⁶Erro padrão da média

Tabela 10. Dano oxidativo à biomoléculas em tilápias-do-Nilo, comparando-se a inclusão dietética de 1% ALL-G-RICH® e 1,7 % de óleo de fígado de bacalhau (OFB).

Parâmetro ¹	Método	Dieta		EPM ⁶ Combinado	Valor de “p”
		ALL-G- RICH	OFB		
Índice de danos ao DNA	Ensaio Cometa	25,17 (12)	21,00 (10)	5,83	NS ⁵
TBARS ³	Colorimétrico	1,57 (11)	1,86 (12)	0,19	NS
MDA ⁴	FL-HPLC	73 (12)	100 (12)	12,86	*0,039
Adutos de MDA à proteínas ⁴	<i>Dot blot</i>	91 (11)	100 (12)	8,56	NS
Adutos de 4-HNE à proteínas ⁴	<i>Dot blot</i>	123 (12)	100 (12)	10,86	NS
Carbonilação de proteína ⁴	<i>Dot blot</i>	83 (9)	100 (11)	16,89	NS

¹Valores são apresentados, seguidos pelo número amostral (n).

² Índice de dano.

³ nmol x mg proteína⁻¹.

⁴Porcentagem do grupo controle, sem inclusão de ALL-G-RICH.

⁵NS – não significativo. ⁶Erro padrão da média.

Entretanto, de uma maneira geral, os seis parâmetros analisados neste estudo (ensaio cometa, TBARS, MDA por FL-HPLC, aduto 4-HNE, aduto MDA e carbonilação de proteínas) mostraram que o tratamento com ALL-G-RICH® não aumenta o dano oxidativo ao DNA, proteínas ou lipídeos.

Como foram analisados seis parâmetros, é bastante razoável se concluir que a dieta com inclusão de ALL-G-RICH® até 4% não aumenta os danos oxidativos, quando comparada com uma dieta com um nível inferior de PUFA (0% inclusão de ALL-G-RICH®).

Os dados apontam que a inclusão de 0,5 a 4% de ALL-G-RICH® é segura, pois não alterou os danos oxidativos basais, verificados pelo uso de seis técnicas complementares. A grande quantidade de DHA presente em ALL-G-RICH pode ser uma alternativa para o aumento na concentração de DHA na tilápia-do-Nilo sem causar danos oxidativo adicionais aos animais, sendo uma alternativa para o fornecimento de DHA para a população humana através do consumo de tilápia alimentadas com a farinha de algas.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal R (2008) Temperature sensitivity and fluorescence detection. *J Sep Sci* 31:128–132. Doi: 10.1002/jssc.200700415

Birben E, Sahiner UM, Sackensen C, Erzurum S, Kalayci, O (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J* 5(1):9-19. Doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. Doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Bradley-Whitman MA, Lovell MA (2015) Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update. *Arch Toxicol* 89:1035–1044. Doi: 10.1007/s00204-015-1517-6

Calamaras TD, Lee C, Lan F, et al (2015) The lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes protein synthesis in cardiac myocytes via activated mTORC1–p70S6K–RPS6 signaling. *Free Radic Biol Med* 82:137–146. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.007

Corrêa CF, Nobrega RO, Mattioni B, Block JM, and Fracalossi DM (2017). Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. *Aquac Nutr* 23(5):1016-1026. Doi: 10.1111/anu.12469

Domijan AM, Ralić J, Radić Brkanac S, et al (2015) Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL – application to various biological samples. *Biomed Chromatogr* 29:41–46. Doi: 10.1002/bmc.3361

Dowling V, Hoarau PC, Romeo M, et al (2006) Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: A proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquat Toxicol* 77:11–18. Doi: 10.1016/j.aquatox.2005.10.011

Erkkila A, Mello. VDF, de Risérus U, and Laaksonen DE (2008) Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. *Prog in Lipid Res* 47, 172–187. Doi: 10.1016/j.plipres.2008.01.004

Food And Agricultural Organization (FAO). 2017. Fisheries Statistics. <http://www.fao.org/fishery/statistics>. acessado: 29 de Setembro de 2017

Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, et al (2015) Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic Biol Med* 78:233–235. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504

Furuya WM, Barros MM, Pezzato LE, Cyrino JEP (2012) Exigências nutricionais e alimentação da tilápia. In: Fracalossi DM, Cyrino JEP (ed) *Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura*. 1st edn. Aquabio, Florianópolis, pp 255-268

Gao J, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Mamaug REP, Han Y (2012) Effects of dietary oxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance and reduction of lipid peroxidation in tissues and blood of red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 356-357:73-79. Doi:10.1016/j.aquaculture.2012.05.034

Garrido A, Garrido F, Guerra R and Valenzuela A (1989) Ingestion of High Doses of Fish Oil Increases the Susceptibility of Cellular Membranes to the Induction of Oxidative Stress. *Lipids* 24(9):833-835

Huang CH, Huang MC, Hou, PC (1998) Effect of dietary lipids on fatty acid composition and lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Comp Biochem And Physiol* B120:331-336

Huang CH and Huang SL (2004) Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, fed oxidized oil. *Aquac* 237:381-389. Doi:10.1016/j.aquaculture.2004.04.002

- Lemos NG, Dias AL, Silva-Souza AT, Mantovani MS (2005) Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. Environ Toxicol Pharmacol 19(2):197-201. Doi: 10.1016/j.etap.2004.03.011
- Lu Y, Lu S (2002) Influence of dietary fat saturation on lipid peroxidation of serum and low density lipoprotein in rats. Nutr Res 22:463-472. Doi: [10.1016/S0271-5317\(01\)00404-3](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(01)00404-3)
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods Enzymol 233:346-357
- Mourente G, Díaz-Salvago E, Bell JG, Tocher DR (2002) Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. Aquac 214:343-361
- Naylor RL, Hardy RW, Bureau DP, Chiu A, Elliott M, Farrell AP, Forster I, Gatlin DM, Goldberg RJ, Hua K and Nichols PD (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. Proc. Natl. Acad. Sci 106, 15103-15110. Doi: 10.1073/pnas.0905235106
- Nettleton JA (1994) Omega-3 Fatty Acids and Health. Institute of Food Technologists/Chapman and Hall. New York
- Nobrega RO, Corrêa CF, Mationi B and Fracalossi DM (2017). Dietary α -linolenic for juvenile Nile tilapia at cold suboptimal temperature. Aquac 471:66-71. Doi:10.1016/j.aquaculture.2016.12.026
- NRC (Nacional Research Council) (2011) Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academic Press, Washington
- Nunes B, Pinho C, Sousa C, Melo, AR, Bandarra N and Silva MC (2017) Relevance of Omega-3 and Omega-6 / Omega-3 Ratio in Preventing Cognitive Impairment. Acta Med Port 30(3):213-223. Doi:10.20344/amp.7970

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358. Doi: [10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

Peng S, Chen L, Qin JG, Hou J, Yu N, Long Z, Li E, Ye J (2009) Effects of dietary vitamin E supplementation on growth performance, lipid peroxidation and tissue fatty acid composition of black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) fed oxidized fish oil. *Aquac Nutr* 15:329–337. Doi: [10.1111/j.1365-2095.2009.00657.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00657.x)

Popma TJ and Lovshin LL (1995) Worldwide prospects of commercial production of tilapia. Auburn University, Auburn

Serhan CN (2007) Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. *Annu Rev Immunol* 25:101–37. Doi: [10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647)

Serhan CN (2014) Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation Are Leads for Resolution Physiology. *Nature* 510(7503): 92–101. Doi: [10.1038/nature13479](https://doi.org/10.1038/nature13479)

Simopoulos AP, Leaf A and Salem N (1999) Essentiality and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann of Nutr and Metab* 43:127–130. Doi: [10.1159/000012777](https://doi.org/10.1159/000012777)

Simopoulos AP (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 56:365–379. Doi: [10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6)

Simopoulos, A.P., 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60, 502–507. Doi: doi.org/10.1016/j.biopha.2006.07.080

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191. Doi: [10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

Souza NE, Matsushita M, Oliveira CC, Franco MRB and

Visentainer, JV (2007) Manipulation of fatty acid composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets with flaxseed oil. *J Sci Food Agric* 87:1677–1681. Doi:10.1002/jsfa.2877

Stéphan G, Guillaume J and Lamoura F (1995) Lipid peroxidation in turbot (*Scophthamus maximus*) tissue: effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquac* 130:251-268

Teoh CY, Turchini GM and Ng WK (2011) Erratum to “Genetically improved farmed Nile tilapia and red hybrid tilapia showed differences in fatty acid metabolism when fed diets with added fish oil or a vegetable oil blend”. *Aquac* 316:144-154. Doi: [10.1016/j.aquaculture.2011.03.021](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.021)

Tocher DR (2010) Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res* 41:717-732. Doi:10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x

Van Den Berg JJM, de Fouw NJ, Kuypers FA, Roelofsen B, Houtsmoller UMT and Den Kamp JAFO (1991) Increased n-3 polyunsaturated fatty acid content of red blood cells from fish oil-fed rabbits increases in vitro lipid peroxidation, but decreases hemolysis. *Free Radic Biol & Med* 11:393-399

4 CONCLUSÕES GERAIS

A inclusão dietética de até 4% de ALL-G-RICH® não prejudica o desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo e pode ser usada como estratégia para aumentar o teor final de DHA em juvenis de tilápia-do-Nilo para até 3,57% do total de ácidos graxos ou 26,81 mg g⁻¹ lipídio, na composição corporal. Comparando com a dieta sem a alga, foi um incremento de mais de 12 vezes.

Com relação ao consumo humano de LC-PUFA n-3 há divergência sobre a recomendação diária de ingestão. Por exemplo, a American Heart Association (Associação Americana do Coração) recomenda que a população adulta consuma pelo menos 500 mg de LC-PUFA n-3 (EPA + DHA) combinados. Isto equivale a um consumo de aproximadamente 170 g de tilápias alimentadas com 4% de ALL-G-RICH® por dia. Entretanto cabe ressaltar que os peixes usados no presente estudo são juvenis e podem diferir na capacidade de armazenar esses ácidos graxos.

A inclusão dietética de outros ácidos graxos, mais especificamente o EPA, aumenta o acúmulo de DHA corporal na tilápia-do-Nilo, provavelmente se valendo de uma eficiente via de biossíntese. Entretanto, esta estratégia necessita o uso de óleo de peixe, que é um ingrediente escasso, caro e com várias restrições do ponto de vista ambiental.

A digestibilidade do DHA presente no ALL-G-RICH® é alta (96,10%), entretanto, outro ácido graxo encontrado em grande quantidade neste aditivo, o PAL, possui baixa digestibilidade (70,81%).

A inclusão de 0,5 a 4% de ALL-G-RICH® em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo é segura, pois não alterou os danos oxidativos basais, avaliados por seis técnicas complementares.

A grande quantidade de DHA presente no ALL-G-RICH® pode ser uma alternativa para melhoria no fornecimento de DHA para a população humana via pescado, sem causar danos oxidativos à tilápia-do-Nilo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

APPOLINÁRIO, P. P.; DEROGIS, P. B. M. C.; YAMAGUTI, T. H.; MIYAMOTO, S. Metabolism, oxidation and biological implications of docosahexaenoic acid in neurodegenerative diseases. **Química Nova**, v. 34(8), p. 1409-1416, 2011.

BRADLEY-WHITMAN, M. A.; LOVELL, M. A. Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update. **Archives of Toxicology**, v. 89, p. 1035–1044, 2015.

CALAMARAS, T. D.; LEE, C.; LAN, F.; IDO, Y.; SIWIK, D. A.; COLUCCI, W. S. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes protein synthesis in cardiac myocytes via activated mTORC1–p70S6K–RPS6 signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 82, p. 137–146, 2015.

CALDER, P. C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids **Prostaglandins leukotrienes and essential fatty acids**, v. 77, p. 327-335, 2007.

CHEN, C.; SUNA, B.; LI, X.; LI, P.; GUANA, W.; BI, Y.; PANA, Q. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Quantification of optimum requirement of dietary linolenic acid in juvenile fish. **Aquaculture**, v. 416-417, p. 99-104, 2013.

CHOU, B-S; SHIAU, S-Y. Both n-6 and n-3 fatty acids are required for maximal growth of juvenile hybrid tilapia. **North American Journal of Aquaculture**, v. 61, p. 13-20, 1999.

CHOU, B. S.; SHIAU, S. Y.; HUNG, S. S. O. Effect of dietary cod liver oil on growth and fatty acids of juvenile hybrid tilapia. **North American Journal of Aquaculture**, v. 63, p. 277-284, 2001.

CORRÊA, C. F.; NOBREGA, R. O.; MATTIONI, B.; BLOCK, J. M.; FRACALOSSO, D. M. Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. **Aquaculture Nutrition**, v. 23(5), p. 1016-1026, 2017.

DOWLING, V.; HOARAU, P. C.; ROMEO, M.; O'HALLORAN, J.; VAN PELT, F.; O'BRIEN, N.; SHEEHAN, D. (2006) Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: A proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 77, p. 11–18, 2006.

ERKKILA, A.; MELLO.; V. D. F.; DE RISÉRUS, U.; LAAKSONEN, D.E. Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 172–187, 2008.

FAO, 2017a. Fisheries Statistics. <<http://www.fao.org/fishery/statistics>> (acessado: 29 de Setembro de 2017).

FAO, 2017b. **FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. 2015**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2017, 78 p.

FINKEL, T., HOLBROOK, N. J., Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p. 239–247, 2000.

FONSECA-MADRIGAL, J., PINEDA-DELGADO, D., MARTÍNEZ-PALACIOS, C., RODRÍGUEZ, C.; TOCHER, D. R. Effect of salinity on the biosynthesis of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in silverside *Chirostoma estor*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.38, p. 1047-1057, 2012.

FORMAN, H. J.; AUGUSTO, O.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; DENNERY, P.A.; KALYANARAMAN, B.; ISCHIROPOULOS, H.; MANN, G. E.; RADI, R.; ROBERTS, L. J. 2nd; VINA, J.; DAVIES, K. J. Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 78, p. 233–235, 2015.

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

GARRIDO, A.; GARRIDO, F.; GUERRA, R.; VALENZUELA, A. Ingestion of High Doses of Fish Oil Increases the Susceptibility of Cellular Membranes to the Induction of Oxidative Stress. **Lipids**, v. 24(9): 833-835, 1989.

GLENCROSS, B. D. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, p.71-124, 2009.

GRIGORAKIS, K. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. **Aquaculture**, v. 272(1-4), p.55-75, 2007.

HOESTENBERGHE, S. V.; FRANSMAN, C. A.; LUYTEN, T.; VERMEULEN, D.; ROELANTS, I.; BUYSSENS, S., GODDEERIS, B.M. *Schizochytrium* as a replacement for fish oil in a fishmeal free diet for jade perch, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite). **Aquaculture Research**, v. 47, p. 1747-1760, 2016.

HUANG, C. H.; HUANG, M. C.; HOU, P. C. Effect of dietary lipids on fatty acid composition and lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Comparative Biochemistry And Physiology**, v. B120, p. 331-336, 1998.

IBGE. INSTITUTO NACIONAL DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (Brasil). **Produção da pecuária municipal 2016**. Rio de Janeiro, 2016, v. 44.

JUSTI, K.C.; HAYASHI, C.; VISENTAINER, J. V.; De Souza, N. E.; MATSUSHITA, M. The influence of feed supply time on the fatty acid profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on a diet enriched with n-3 fatty acids. **Food Chemistry**, v. 80, p. 489-493, 2003.

KANAZAWA, A.; TESHIMA, S.; SAKAMOTO, M. Requirements of *Tilapia zillii* for essential fatty acids. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 46, n. 11, p. 1353-1356, 1980.

KOUSOULAKI, K.; MØRKØRE, T.; NENGAS, I.; BERGE, R. K.; SWEETMAN, J. Microalgae and organic minerals enhance lipid

retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 451, p. 47-57, 2016.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**. v. 30, p. 1164–1169, 2002.

LEWIS, T. E., NICHOLS, P. T., MCMEEKIN, T. A. The Biotechnological Potential of Thraustochytrids. **Marine Biotechnology**, v.1, p. 580-587, 1999.

LI, M. H.; ROBINSON, E. H.; TUCKER, C. S.; MANNING, B. B.; KHOO, L. Effects of dried algae *Schizochytrium* sp., a rich source of docosahexaenoic acid, on growth, fatty acid composition, and sensory quality of channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 292, p. 232-236, 2009.

LIE, Ø. Flesh quality - the role of nutrition. **Aquaculture Research**, v.32(1), p. 341-348, 2001.

LU, Y.; LU, S. Influence of dietary fat saturation on lipid peroxidation of serum and low density lipoprotein in rats. **Nutrition Research**, v. 22, p. 463-472, 2002.

MILES, E.; CALDER, P. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. **British Journal of Nutrition**, v. 107(S2), p. 171-S184, 2012.

MORO, G. V.; REZENDE, F. P.; ALVES, A. L.; HASHIMOTO, D. T.; VARELA, E. S.; TORATI, L. S. Espécies de peixes para piscicultura. In: RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; SANTOS, V. R. V. (Eds). **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília, DF: Embrapa, 2013, p. 29-70.

NAKAGAWA, H. Effect of dietary algae on improvement of lipid metabolism in fish. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, p. 345-348. 1997.

NAYLOR, R. L.; HARDY, R. W.; BUREAU, D. P.; CHIU, A.; ELLIOTT, M.; FARRELL, A. P.; FORSTER, I.; GATLIN, D. M.;

GOLDBURG, R. J.; HUA, K.; NICHOLS, P. D. Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 15103-15110, 2009.

NETTLETON, J. A. **Omega-3 Fatty Acids and Health**. Institute of Food Technologists/Chapman and Hall. New York, NY, 361 pp. 1994.

NOBREGA, R. O.; CORRÊA, C. F.; MATIONI, B. FRACALOSSO, D. M. Dietary α -linolenic for juvenile Nile tilapia at cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 471, p. 66-71, 2017.

OBOH, A.; KABEYA, N.; CARMONA-ANTOÑANZAS, G.; CASTRO, L. F. C.; DICK, J. R.; TOCHER, D. R.; MONROIG, O. Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish. **Scientific Reports**, v. 7, art. 3889, 2017.

OLSEN, R. E., LØVAAS, E., LIE, Ø. The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids, α -tocoferol and spermine on fatty acids composition and indices of oxidative stress in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 20 p. 13-29, 1999.

PATTERSON, E., WALL, R., FITZGERALD, G. F., ROSS, R.P.; STATON, C. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012. Doi: 10.1155/2012/539426.

SABOYA, J. P. S., ARAUJO, G. S., SILVA, J. W. A., SOUSA-JUNIOR, J., MACIEL, R. L., FARIAS, W. R. L. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Kappaphycus alvarezii* em pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a situações de estresse. **Acta Scientiarum**. v. 34(3), p. 215-221, 2012.

SARKER, P. K.; KAPUSCINSKI, A. R.; LANOIS, A. J.; LIVESEY, E. D.; BERNHARD, K.P.; COLEY, M.L. Towards Sustainable Aquafeeds: Complete Substitution of Fish Oil with Marine Microalga *Schizochytrium* sp. Improves Growth and Fatty Acid Deposition in Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1-17, 2016.

SELLNER, P.A., & HAZEL, J. R.; Desaturation and elongation of unsaturated fatty acids in hepatocytes from thermally acclimated rainbow trout. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 1, p. 58-66, 1982.

SERHAN, C. N. Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 101–37, 2007.

SERHAN, C. N. Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation Are Leads for Resolution Physiology. **Nature**, v. 510(7503), p. 92-101, 2014.

SIMOPOULOS, A. P.; LEAF, A.; SALEM, N. Essentiality and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 43, p. 127–130, 1999.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365–379, 2002.

SIMOPOULOS, A. P. 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, p. 502–507, 2006.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191. 1988.

SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; OLIVEIRA, C. C.; FRANCO, M. R. B.; VISENTAINER, J. V. Manipulation of fatty acid composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets with flaxseed oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 87, p. 1677-1682, 2007.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, v. 285, p. 146–158, 2008.

TOCHER, D. R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 717-732, 2010.

TOCHER, D.R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. **Aquaculture**, v. 449, p. 94-107, 2015.

WATANUKI, H.; WATANUKI, H.; OTA, K.; TASSAKKA, A. C. M. A. R.; KATO, T.; SAKAI, M. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 157-163, 2006.

WATTERS, C. A.; ROSNER, L. S.; ADRIAN, A. F.; DOMINY, W. G.; KLINGERBOWEN, R.; TAMARU, C. S. Nutritional Enhancement of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids in Tilapia (*Oreochromis honorum*).