

Liziane Maciel Mufatto

**RELAÇÃO DIETÉTICA DOS ÁCIDOS GRAXOS N-3/N-6 PARA  
TILÁPIA-DO-NILO, EM TEMPERATURA ÓTIMA E EM  
SIMULAÇÃO DE ENTRADA DE INVERNO**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós Graduação em Aquicultura da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Mestre em  
Aquicultura

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.

Mufatto, Liziane Maciel

Relação dietética dos ácidos graxos n-3/n-6 para tilápia-do-Nilo, em temperatura ótima e em simulação de entrada de inverno / Liziane Maciel Mufatto ; orientadora, Débora Machado Fracalossi, 2017.

67 p.

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

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. O. niloticus. 3. nutrição. 4. PUFA. 5. RT-PCR. I. Fracalossi, Débora Machado . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Relação dietética dos ácidos graxos n-3/n-6 para tilápia-do-Nilo, em temperatura ótima e em simulação de entrada de inverno**

Por

LIZIANE MACIEL MUFATTO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

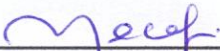
e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



---

Profª. Leila Hayashi, Dra.  
Coordenadora do PPG em Aquicultura

Banca Examinadora:



---

Dra. Debora Machado Fracalossi – *Orientadora*




---

Dr. Alex Pires de Oliveira Nuner - UFSC



---

Dr. Alexandre Sachsida Garcia - UFPR



---

Dra. Maude Regina De Borba - UFFS



Dedico,  
Àqueles que nos convidam a voar em sua  
sabedoria, mesmo sabendo que este voar  
depende das asas de cada um de nós,  
Aos professores.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pela vida e valores que me passaram durante toda minha vida, a minha irmã que mesmo de longe me incentiva e me dá forças. À minha sogra, que acompanhou de perto essa jornada, pela alegria e vibração com minhas conquistas.

Ao meu querido namorado Victor, por sempre me apoiar e estar ao meu lado, sempre com muito carinho e amor em todas as etapas deste trabalho.

À professora Débora agradeço imensamente não só pela orientação e confiança na realização deste trabalho, mas também por repassar seu conhecimento e experiências de uma maneira que demonstra arduamente sua paixão pela profissão que empenha, e que assim inspira à todos. Muito mais que uma orientadora, uma grande amiga.

A todos os professores do Departamento de Aquicultura, pelos ensinamentos e apoio, dentro e fora das salas de aula e laboratórios.

Ao Professor Marcelo Maraschin que possibilitou a finalização das análises de ácidos graxos ao abrir as portas de seu laboratório.

Agradeço ao professor David Menoyo Luque por me receber tão bem na Universidade Politécnica de Madri, Espanha, por toda paciência em função da língua e por me ensinar desde os princípios à análise de expressão gênica, ceder seu laboratório para que a análise fosse realizada. Por toda sua equipe do laboratório de produção animal, em especial: Javi, Rebecca, Laura e Núria que além dos ensinamentos valiosos, tornaram meus dias em Madri divertidos, amigos que levarei para o resto da vida.

A toda família LABNUTRI, pessoas com quem tive e tenho privilégio de trabalhar, que tornaram meus dias muito mais divertidos, e me ajudaram em cada etapa, desde as metodologias e análises de laboratório, preparação dos ingredientes para ração, extrusão das rações semi-purificadas, montagem dos tanques, alimentação dos peixes e biometrias: Bruna, Amarilis, Janice, Vitor, Fernando, Penélope, Bruno, Allan, Lucas, Douglas, Marieta, Sônia, Jhonis e Marcos. E em especial:

À minha amiga Renata, pela amizade que ultrapassa as portas do laboratório, por sua alegria, paciência, ensinamentos e pela imensa ajuda na realização deste trabalho do começo ao fim.

À Michele e Rosa, pela amizade, confiança, parceria, choros, risos e danças ao longo do experimento, na certeza que estes bons momentos irão se estender para a vida.

À Maria Fernanda não só pela amizade e paciência, mas por todo apoio, empenho e ajuda num dos momentos mais delicados com as amostras.

Aos que um dia foram abençoados como membros da família LABNUTRI, e contribuíram de alguma forma com este trabalho: Flávio, Camila, Yuri, Tatiana, Jorge, Adriano, Lula, Natyta, Ana Paula e Ana Clara.

A todos os colegas e amigos do LAPAD, em especial aqueles que sempre estavam prontos para ajudar: Renata, Claudinha, Ronaldo, Pedro, Maurício, Luciano e Vinícius, pela ajuda mesmo em feriados, finais de semana e durante a noite: Douglas, Felipe, Edson e Deni.

Ao Carlito por toda sua dedicação, paciência e por sempre estar disposto a ajudar nós alunos com as normas e prazos da pós-graduação.

Às grandes amizades feitas durante esses anos, que me proporcionaram dias alegres e muito companheirismo: Vanessa, Emília e Diogo, Susan, Jade, Jamily, Elenice, Alécia e Orbino.

À Cargill Nutrição Animal no Brasil – Nutron pelo fornecimento do premix mineral e vitamínico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da minha bolsa de mestrado.

Agradeço a grande oportunidade de aprender e compartilhar experiências durante esses anos de estudo, e a todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho.



“O que prevemos raramente ocorre; o que menos  
esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)



## RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar a melhor relação de ácidos dietéticos da série n-3/n-6 para juvenis de tilápia-do-Nilo. Os peixes ( $70,49 \pm 1,43$  g) foram alimentados com dietas contendo 1,3% de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), mas com diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6: 2,9; 1,3; 0,8; 0,5 e 0,2 durante 56 dias a 28 °C. Posteriormente, os peixes foram submetidos a uma simulação de entrada de inverno (22 °C) durante 33 dias. A dieta basal, formulada com ingredientes semi-purificados, continha 5% de lípidio. Diferentes quantidades de óleo de fígado de bacalhau e quatro óleos vegetais: linhaça, soja, canola e palma foram misturados para atingir os diferentes índices n-3/n-6. As diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6 não afetaram o crescimento dos peixes. No entanto, a 28 °C, o teor de gordura corporal aumentou à medida que diminuiu a relação de PUFA n-3/n-6 na dieta. A simulação de entrada de inverno promoveu regressão significativa na ingestão de ração entre os tratamentos alimentares: houve maior ingestão de ração nos peixes alimentados com a menor relação n-3/n-6. Como esperado, concentrações corporais de ácido linolênico ( $\alpha$ -LNA, 18:3 n-3), docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3), ácido eicosatrienóico (20:3 n-3) e ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5 n-3) diminuíram à medida que a relação dietética n-3/n-6 diminuiu. No entanto, o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3) corporal aumentou conforme sua concentração reduzia nas dietas. Os ácidos graxos da série n-6 com maior acumulação corporal foram o linoleico (LOA, 18:2 n-6) e o ácido araquidônico (ARA, 20:4 n-6). O conteúdo corporal de ARA diminuiu à medida que aumentou a relação dietética de n-3/n-6, com maior acúmulo corporal nos peixes alimentados com a dieta contendo a menor relação n-3/n-6. A expressão do gene FAD6, associada à enzima  $\Delta 6$  dessaturase, variou entre as temperaturas para peixes alimentados com a menor relação dietética n-3/n-6. A 28 °C, a SREBP1, envolvida na síntese de ácidos graxos, foi mais expressiva em peixes alimentados com a dieta com a menor relação n-3/n-6, quando comparada àqueles alimentados com a dieta com a maior relação n-3/n-6. Em conclusão, este estudo mostra que as dietas contendo 1,3% de PUFA, independentemente da proporção n-3/n-6, não afetaram o desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo à temperatura ideal, bem como quando submetidos a uma simulação de entrada de inverno. Além disso, a gordura corporal e o EPA corporal diminuíram conforme aumentava a relação n-3/n-6 da dieta.

**Palavras-chave:** Aquicultura, *O. niloticus*, nutrição, PUFA, RT-PCR.



## ABSTRACT

This study aimed at determining the optimal dietary n-3/n-6 fatty acids for Nile tilapia juveniles. Fish ( $70,49 \pm 1,43$  g) were fed diets containing 1.3% polyunsaturated fatty acids (PUFA), but different n-3/n-6 dietary ratios: 2.9; 1.3; 0.8; 0.5 and 0.2 for 56 days at 28 °C. Afterwards, fish were submitted to a winter-onset simulation (22 °C) for 33 days. Basal diet was formulated with semipurified ingredients and contained 5% lipid. Different amounts of cod liver oil and four vegetable oils: linseed, soybean, canola, and palm were mixed to reach the different n-3/n-6 ratios. Different PUFA n-3/n-6 dietary ratios did not affect fish growth. However, at 28 °C, body fat content increased as dietary PUFA n-3/n-6 decreased. Winter-onset simulation promoted a significant difference in feed intake among dietary treatments: fish fed the lowest n-3/n-6 ratio showed the highest feed intake. As expected, body concentrations of linolenic acid ( $\alpha$ -LNA, 18:3 n-3), docosahexaenoic (DHA, 22:6 n-3), eicosatrienoic acid (20:3 n-3) and docosapentaenoic acid (DPA, 22:5 n-3) decreased as dietary n-3/n-6 decreased. On the other hand, body acid eicosapentaenoic (EPA, 20:5 n-3) increased as its concentration reduced in the diets. The n-6-series fatty acids with the highest body accumulation were both linoleic (LOA, 18:2 n-6) and arachidonic acids (ARA, 20:4 n-6). The body content of ARA decreased as dietary n-3/n-6 ratio increased, with higher body accumulation in fish fed diet containing the lower n-3/n-6. FAD6 gene expression, associated with the enzyme  $\Delta$ 6 desaturase, varied between temperatures for fish fed the lowest n-3/n-6 ratio. At 28 °C, SREBP1, involved in fatty acids synthesis, was up-regulated in fish fed the diet with the lowest n-3/n-6, when compared to those fed the diet containing the highest n-3/n-6 ratio. In conclusion, our findings show that diets containing 1.3% PUFA, independent of the n-3/n-6 ratio, did not affect the productive performance in Nile tilapia at optimal temperature as well as when submitted to a simulation of onset of winter. In addition, body fat and body EPA decreased as dietary n-3/n-6 increased.

**Keywords:** Aquaculture, *O. niloticus*, nutrition, PUFA, RT-PCR.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Regressão linear do extrato etéreo (% da matéria úmida) de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6 durante 56 dias a 28 °C e 33 dias a 22 °C. Para 28°C  $p < 0,05$  ..... 46
- Figura 2. Porcentagem de PUFA n-3 e PUFA n-6 nas dietas e no perfil de ácidos graxos corporal de juvenis de tilápia-do-Nilo, alimentados com diferentes relações n-3/n-6 a 28 °C e 22 °C por 56 e 33 dias, respectivamente ..... 51
- Figura 3. Efeito das diferentes relações de PUFA n-3/n-6 dietéticas e das temperaturas (28 e 22 °C) na expressão do gene FAD6 em *O. niloticus* no tecido hepático. Os asteriscos indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as temperaturas para a dieta com relação de PUFA n-3/n-6 de 0,2. Ct = *threshold cycle* ..... 52
- Figura 4. Efeito das diferentes relações de PUFA n-3/n-6 dietéticas e das temperaturas (28 e 22 °C) na expressão do gene SREBP1 no tecido hepático de *O. niloticus*. Os asteriscos indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas com diferentes relações n-3/n-6, a 28 °C. Ct = *threshold cycle* ..... 53





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação e composição das dietas experimentais (% , considerando-se 100% de matéria seca).....	36
Tabela 2. Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais (% total de ácidos graxos e g 100 g <sup>-1</sup> de matéria seca) .....	37
Tabela 3. Programação da amplificação da reação de transcrição reversa .....	42
Tabela 4. Sequência dos <i>primers housekeeping</i> (EF1 $\alpha$ ) e genes alvo (FAD6 e SREBP1) .....	42
Tabela 5. Concentração dos <i>primers</i> , condições de amplificação e eficiência dos genes.....	43
Tabela 6. Desempenho e sobrevivência de juvenis de tilápia-do-Nilo, mantidos a 28 °C e 22 °C, quando alimentados com diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6 durante 56 e 33 dias, respectivamente .....	45
Tabela 7. Composição corporal final (% na matéria úmida) de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6 durante 56 dias a 28 °C e 33 dias a 22 °C respectivamente .....	46
Tabela 8. Perfil de ácidos graxos corporal de juvenis de tilápia-do-Nilo, quando criadas a 28 °C (% total de ácidos graxos e g 100 g <sup>-1</sup> de matéria seca).....	48
Tabela 9. Perfil de ácidos graxos corporal de juvenis de tilápia-do-Nilo, quando mantidas a 22 °C (% total de ácidos graxos e g 100 g <sup>-1</sup> de matéria seca).....	50



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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  
SFA = ácidos graxos saturados  
MUFA = ácidos graxos monoinsaturados  
PUFA = ácidos graxos poli-insaturados  
LC-PUFA = ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa  
OLA (18:1n-9) = ácido oleico  
LOA (18:2n-6) = ácido linoleico  
 $\alpha$ -LNA (18:3n-3) = ácido  $\alpha$ -linolênico  
ARA (20:4n-3) = ácido araquidônico  
EPA (20:5n-3) = ácido eicosapentaenóico  
DPA (22:5n-3) = ácido docosapentaenóico  
DHA (22:6n-3) = ácido docosaheptaenóico  
n-3 = ácidos graxos da série n-3  
n-6 = ácidos graxos da série n-6  
GIFT = Genetically Improved Farmed Tilapia  
vs. = versus  
RT-qPCR = Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real  
RNA = ácido ribonucleico  
DNA = ácido desoxirribonucleico  
cDNA = DNA codificante  
EF1 $\alpha$  = *elongation factor 1 alpha*  
SREBP1 = *sterol regulatory element binding protein*  
FADs2 = enzimas *fatty acid desaturase*  
FAD6 = enzima *fatty acid desaturase 6*  
On\_FAD6 = gene de *O. niloticus* indentificado para FAD6  
Acetil-CoA = acetilcoenzima A



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  = letra grega alfa

$\Delta$  = letra grega delta

$\infty$  = infinito

$^{\circ}\text{C}$  = graus Celsius

$\pm$  = mais ou menos

% = porcentagem

$<$  = menor

® = marca registrada

™ = marca registrada



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	25
<b>1.1 Tilapicultura na aquicultura mundial e brasileira</b> .....	25
<b>1.2 Desafios climáticos na tilapicultura</b> .....	25
<b>1.3 Consumo de pescado: uma fonte de ácidos graxos insaturados na nutrição humana</b> .....	26
<b>1.4 Ácidos graxos na nutrição de peixes</b> .....	26
<b>1.5 Exigência de ácidos graxos essenciais para tilápia</b> .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	31
<b>3.1 RESUMO</b> .....	32
<b>3.2 Introdução</b> .....	33
<b>3.3 Materiais e métodos</b> .....	35
3.3.1 Dietas Experimentais.....	35
3.3.2 Peixes e Condições Experimentais.....	38
3.3.3 Coleta de Amostras e Análises.....	39
3.3.4 Análise de Expressão Gênica.....	41
3.3.4.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA).....	41
3.3.4.2 Reação de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	41
3.3.5 Variáveis mensuradas.....	45
3.3.6 Análise estatística.....	45
<b>3.4 Resultados</b> .....	44
3.4.1 Desempenho Zootécnico.....	44
3.4.2 Composição corporal e perfil de ácidos graxos.....	45
3.4.3 Expressão de genes envolvidos na dessaturação de ácidos graxos e de fatores de transcrição nucleares.....	52
<b>3.5 Discussão</b> .....	53
<b>3.6 Agradecimentos</b> .....	57
<b>3.7 Referências</b> .....	58
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	64





## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Tilapicultura na aquicultura mundial e brasileira

Em 2014, a produção da aquicultura no mundo alcançou 73,8 milhões de toneladas (FAO, 2016) e, dos grupos de peixes cultivados, as tilápias se destacam, pois formam o segundo grupo mais produzido (135 países) atrás somente das carpas (FAO, 2014, 2017). A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie tropical e contribui com a aquicultura mundial com 3,93 milhões de toneladas de peixes (FAO, 2015). No Brasil, é a principal espécie aquícola cultivada, com a produção de 239,09 mil toneladas em 2016, o que representa 47,1% do total da despesa nacional e um aumento de 9,3% da produção em relação a 2015 (IBGE, 2016). Este aumento na produtividade se deve à capacidade de adaptação da tilápia aos diversos sistemas de produção e aos diferentes níveis de salinidade na água de criação, além da boa aceitabilidade pelo mercado e tecnologias de produção aplicadas (MORO et al., 2013). Dentre os estados quem mais produzem tilápia, destacam-se o estado do Paraná ocupando o primeiro lugar, com 28,8% do total da produção, seguido por São Paulo com 13,2%, Ceará com 12,7% e Santa Catarina com 11,4% (IBGE, 2015).

### 1.2 Desafios climáticos na tilapicultura

Os estados da região Sul e o Sudeste do estado de São Paulo apresentam características que os classificam como regiões de clima subtropical, estando abaixo do Trópico de Capricórnio e apresentando grande oscilação de temperatura entre o verão e o inverno (IBGE, 2013). Este clima também é encontrado em outras regiões produtoras de tilápia, como o sudeste da China, Tailândia e norte de Taiwan. Regiões com o inverno mais rigoroso enfrentam um desafio para manter a alta produtividade na tilapicultura. De acordo com Azaza, Dhraief e Kraiem (2008) a tilápia, espécie de peixe tropical, reduz consumo de alimento em temperaturas abaixo de 22 °C.

Uma estratégia para manter o alto desempenho zootécnico em condições de temperatura subótima é a adequada nutrição (CHARO-KARISA et al., 2005), estabelecida com a formulação de rações específicas. As exigências nutricionais da maioria dos nutrientes para tilápias já são conhecidas (FURUYA, 2010; NRC, 2011; FURUYA et al., 2012), mas em relação à exigência em ácidos graxos essenciais ainda há lacunas (GLENCROSS, 2009; TURCHINI, TORSTENSEN e NG,

2009; TOCHER, 2010), especificamente em temperatura subótima.

### **1.3 Consumo de pescado: uma fonte de ácidos graxos insaturados na nutrição humana**

O crescimento da produção pesqueira e da aquicultura nas últimas décadas facilitou o aumento do consumo médio de pescados e subprodutos em nível global. O consumo aparente de pescado *per capita* vem aumentando ao longo dos anos. Em 1960, o consumo médio era de 9,9 kg, já em 2013 a média foi de 19,7 kg, sugerindo que nos próximos anos seja acima de 20 kg (FAO, 2016). A ingestão regular de pescado pode ter efeitos nutricionais positivos: 1) é uma fonte rica em nutrientes essenciais; 2) contém proteína de alta qualidade e digestibilidade; 3) é rico em diversas vitaminas como a D, A e vitaminas do complexo B, além de ser uma fonte de ácidos graxos insaturados, [como os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA - do inglês: *long chain polyunsaturated fatty acids*) da série n-3 como o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) e o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3)]. Há evidências que estes ácidos graxos trazem muitos benefícios para a saúde humana, tais como a diminuição da incidência de doenças cardiovasculares e propriedades anti-inflamatórias (SISCOVICK et al., 2000; RUXTON et al., 2005; NRC, 2011; FAO, 2016). Estudos relatam que uma dieta balanceada que contenha ácidos graxos diminui a incidência de doenças crônicas e melhoram a saúde mental. Além do mais, em bebês prematuros, o DHA é essencial para o desenvolvimento da retina e do cérebro (SIMOPOULOS, 2000).

### **1.4 Ácidos graxos na nutrição de peixes**

Os peixes são ectotérmicos e, para manter a homeostase fisiológica do organismo em temperatura ambiente desfavorável, desenvolveram mecanismos específicos de adaptação (WEBER e BOSWORTH, 2005). Uma das principais respostas do organismo ectotérmico à baixa temperatura é o aumento dos níveis de insaturação dos ácidos graxos dos fosfolipídios que compõem as membranas celulares. O aumento na quantidade de ácidos graxos insaturados em temperatura mais baixa está relacionado à manutenção da permeabilidade, fluidez e plasticidade das membranas das células, devido ao menor ponto de fusão destes compostos.

Os ácidos graxos são compostos que possuem um grupamento carboxila terminal (polar) ligado a uma cadeia de hidrocarbonetos

(cauda apolar) que varia em tamanho e em número de insaturação (NRC, 2011). Os ácidos graxos considerados essenciais não são sintetizados pelos peixes ou são em quantidade insuficiente para sustentar um crescimento adequado e, quando adicionados à dieta, estimulam o crescimento e/ou outras respostas biológicas do animal (GLENCROSS, 2009). São considerados essenciais para a maioria dos peixes continentais, o ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\alpha$ -LNA, 18:3n-3) e o ácido linoleico (LOA, 18:2n-6) e, para peixes marinhos, o ácido araquidônico (ARA, 20:4n-6), o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) (GLENCROSS, 2009). Esses ácidos pertencem ao grupo dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA – do inglês: *polyunsaturated fatty acids*) e possuem duas ou mais ligações duplas chamadas de insaturações (GLENCROSS, 2009).

A exigência em ácidos graxos essenciais na dieta irá variar não só entre as espécies, mas com a fase de desenvolvimento, nível trófico, como também em função da temperatura da água e relação entre os ácidos graxos na dieta (TURCHINI, NG e TOCHER, 2010). Em águas continentais, há pouca disponibilidade de LC-PUFA no alimento e a capacidade de alongar e dessaturar PUFA foram mais conservadas (TOCHER, 2003; GLENCROSS, 2009).

As vias metabólicas dos PUFA da série n-3 e n-6 compartilham as mesmas enzimas, o que pode favorecer a síntese de um ou de outro produto, ou até inibir uma das vias (SARGENT, TOCHER e BELL, 2002; NRC, 2011). A primeira etapa da síntese de conversão de PUFA (LOA e  $\alpha$ -LNA) em LC-PUFA (ácidos graxos com 20 a 22 carbonos, como o ARA, EPA e DHA) é catalisada pela enzima  $\Delta 6$  dessaturase. Enzimas alongases adicionam dois carbonos nos substratos gerados que passam por mais uma dessaturação mediada pela enzima  $\Delta 5$  dessaturase formando o EPA pela via de síntese de ácido graxos da série n-3, ou o ARA pela síntese de ácidos graxos da série n-6. O EPA pode sofrer mais algumas etapas de elongação e dessaturação e uma reação de encurtamento de cadeia gerando o DHA (GLENCROSS, 2009; TOCHER, 2010).

Alguns estudos demonstram que a enzima  $\Delta 6$  dessaturase opera em ambos os substratos de ácidos graxos de 18 carbonos e 24 carbonos (TOCHER, 2010). Tocher (2003) e Glencross (2009) observaram que a ausência na especificidade da enzima  $\Delta 6$  dessaturase, assim como outras enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos, gera competição entre os substratos. Independente da atividade, todas as dessaturase ( $\Delta 6$   $\Delta 5$  e  $\Delta 4$ ) para teleósteos são enzimas FADs2 (do inglês, *fatty acid desaturase*) (TOCHER e GLENCROSS, 2015). O gene da enzima  $\Delta 6$

dessaturase (FADs2) da *O. niloticus* foi caracterizado e nomeado como Oni-FAD2 ou On-FAD6, que mostrou maior atividade da  $\Delta 6$  dessaturase em direção a 18:2n-6 (TANOMMAN et al., 2013).

A resposta do organismo ao metabolismo dos ácidos graxos da série n-3 é influenciada pelo conteúdo de ácidos graxos da série n-6 e vice-versa (BLANCHARD, MAKOMBU e KESTEMONT, 2008). Assim, é evidente a importância do fornecimento de PUFA da série n-3 e n-6 numa proporção adequada.

A lipogênese no fígado da tilápia-do-Nilo foi aumentada quando a ingestão lipídica foi limitada (HE et al., 2015). Adicionalmente, no fígado de peixes alimentados com dieta com baixo teor lipídico, a glicólise é acelerada e fornece mais substrato (acetil-CoA) para síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis. O processo é regulado positivamente pela proteína SREBP1 (HE et al., 2015). O SREBP1 (do inglês, *sterol regulatory element binding protein 1*) é um gene regulador mestre da lipogênese, é uma das três proteínas (SREBP1a, SREBP1c e SREBP2) produzidas pelo fator de transcrição SREBP (EBERLÉ et al., 2004). O SREBP participa diretamente da expressão e regulação de genes envolvidos no metabolismo da glicose, ácidos graxos, triacilgliceróis e fosfolipídios e as proteínas codificadas especificamente por SREBP1 se ligam a uma sequência de diferentes genes necessários para o metabolismo da glicose e produção de ácidos graxos (EBERLÉ et al., 2004). O caminho metabólico dos lipídios pode ser regulado pelo colesterol, PUFAs e pelo SREBP1 (TOCHER e GLENCROSS, 2015).

### 1.5 Exigência de ácidos graxos essenciais para tilápia

As tilápias não têm capacidade de sintetizar *de novo* LOA e  $\alpha$ -LNA (CHOU e SHIAU, 1999). Tocher (2010) classificou as tilápias como espécies de água quente, que exigem principalmente LOA na dieta para crescimento adequado. Já o NRC (2011) relata exigência dietética para tilápia de 0,5 a 1% de LOA e exigência em ácidos graxos de cadeia longa da série n-3 (n-3 LC-PUFA), mas sem definição quantitativa dessa exigência. Chou e Shiau (1999) demonstraram que tanto ácidos graxos da série n-3 quanto da série n-6 são necessários para um bom crescimento de juvenis de tilápia híbrida (*O. niloticus* x *O. aureus*). Lim et al. (2011) sugerem que o nível dietético ótimo de n-6 PUFA para tilápia vermelha (*Tilapia zillii*) é de 1% da dieta seca e de 0,5% para tilápia-do-Nilo (*O. Niloticus*). Segundo Chen et al. (2013), a tilápia-do-Nilo apresenta exigência de  $\alpha$ -LNA de 0,45 a 0,64% da dieta seca. Níveis moderados de  $\alpha$ -LNA na dieta aumentam a imunidade e melhoram a resposta anti-

inflamatória em juvenis de tilápia (CHEN et al., 2016).

Estudo com juvenis de tilápia-do-Nilo criados a 22 °C, detectaram exigência de  $\alpha$ -LNA de 0,70% da dieta (NOBREGA et al., 2017). Comparando desempenho da tilápia nilótica em duas temperaturas (28 e 22 °C), Corrêa et al. (2017) observaram melhora no desempenho quando os peixes foram alimentados com maior quantidade de PUFA em relação aos ácidos graxos saturados (SFA), em temperatura subótima.

Assim, fica evidente que a exigência dietética em ácidos graxos para tilápia ainda não é totalmente conhecida e serão necessários muitos estudos para elucidar, entre outras dúvidas: 1) a exigência em ácidos graxos poderá ser atingida tanto com PUFA da série n-3 como da série n-6? 2) qual a melhor proporção entre os ácidos graxos n-3/n-6 na dieta? 3) qual a influência da temperatura na exigência em ácidos graxos?

Portanto, com a finalidade de aprimorar a tecnologia de produção da tilápia-do-Nilo para regiões de clima subtropical, propõe-se um teste de dietas com diferentes relações entre os ácidos graxos da série n-3/n-6, com foco no metabolismo dos peixes em temperaturas ótima (28 °C) e subótima (22 °C).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar a melhor relação de ácidos graxos da série n-3/n-6 na dieta de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em temperatura ótima (28°C) e quando submetidos à simulação de entrada de inverno (22°C).

#### **2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar o desempenho zootécnico de juvenis de tilápia-do-Nilo, quando alimentados com dietas semi-purificadas com diferentes relações de ácidos graxos da série n-3 e n-6.

- Determinar o perfil de ácidos graxos e composição centesimal corporal de juvenis de tilápia-do-Nilo, quando alimentados com diferentes relações de ácidos graxos da série n-3 e n-6.

- Investigar o metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados na tilápia-do-Nilo, quando submetidas à simulação de entrada de inverno, por meio de estudo da expressão gênica de algumas enzimas envolvidas.



### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

\*Este artigo será submetido à revista *Aquaculture*

#### **Relação dietética dos ácidos graxos n-3/n-6 para tilápia-do-Nilo, em temperatura ótima e em simulação da entrada do inverno**

Liziane Maciel Mufatto<sup>1</sup>, Renata Oselame Nobrega<sup>1</sup>, David Menoyo Luque<sup>2</sup>, Débora Machado Fracalossi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Produção Animal, Escola Técnica Superior de Engenheiros Agrônomos, Universidade Politécnica de Madrid (UPM), Cidade Universitária, Madrid, Espanha.

\*Autor correspondente: Débora Machado Fracalossi, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, UFSC. Rodovia Ademar Gonzaga, 1346, CEP 88034001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Tel./fax: +55 48 3721 -6300. E-mail: debora.fracalossi@ufsc.br

### 3.1 RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar a melhor relação de ácidos dietéticos da série n-3/n-6 para juvenis de tilápia-do-Nilo. Os peixes ( $70,49 \pm 1,43$  g) foram alimentados com dietas contendo 1,3% de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), mas com diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6: 2,9; 1,3; 0,8; 0,5 e 0,2 durante 56 dias a 28 °C. Posteriormente, os peixes foram submetidos a uma simulação de entrada de inverno (22 °C) durante 33 dias. A dieta basal, formulada com ingredientes semi-purificados, continha 5% de lípidio. Diferentes quantidades de óleo de fígado de bacalhau e quatro óleos vegetais: linhaça, soja, canola e palma foram misturados para atingir os diferentes índices n-3/n-6. As diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6 não afetaram o crescimento dos peixes. No entanto, a 28 °C, o teor de gordura corporal aumentou à medida que diminuiu a relação de PUFA n-3/n-6 na dieta. A simulação de entrada de inverno promoveu regressão significativa na ingestão de ração entre os tratamentos alimentares: houve maior ingestão de ração nos peixes alimentados com a menor relação n-3/n-6. Como esperado, concentrações corporais de ácido linolênico ( $\alpha$ -LNA, 18:3 n-3), docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3), ácido eicosatrienóico (20:3 n-3) e ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5 n-3) diminuíram à medida que a relação dietética n-3/n-6 diminuiu. No entanto, o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3) corporal aumentou conforme sua concentração reduzia nas dietas. Os ácidos graxos da série n-6 com maior acumulação corporal foram o linoleico (LOA, 18:2 n-6) e o ácido araquidônico (ARA, 20:4 n-6). O conteúdo corporal de ARA diminuiu à medida que aumentou a relação dietética de n-3/n-6, com maior acúmulo corporal nos peixes alimentados com a dieta contendo a menor relação n-3/n-6. A expressão do gene FAD6, associada à enzima  $\Delta 6$  dessaturase, variou entre as temperaturas para peixes alimentados com a menor relação dietética n-3/n-6. A 28 °C, a SREBP1, envolvida na síntese de ácidos graxos, foi mais expressiva em peixes alimentados com a dieta com a menor relação n-3/n-6, quando comparada àqueles alimentados com a dieta com a maior relação n-3/n-6. Em conclusão, este estudo mostra que as dietas contendo 1,3% de PUFA, independentemente da proporção n-3/n-6, não afetaram o desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo à temperatura ideal, bem como quando submetidos a uma simulação de entrada de inverno. Além disso, a gordura corporal e o EPA corporal diminuíram conforme aumentava a relação n-3/n-6 da dieta.

**Palavras-chaves:** *O. niloticus*, nutrição, lipídios, PUFA, RT-PCR.



## 3.2 Introdução

Em 2014, a produção da aquicultura no mundo alcançou 73,8 milhões de toneladas (FAO, 2016) e, dos grupos de peixes cultivados, as tilápias se destacam, pois formam o segundo grupo mais produzido (135 países) atrás somente das carpas (FAO, 2014, 2017). A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie tropical e contribui com a aquicultura mundial com 3,93 milhões de toneladas de peixes (FAO, 2015). No Brasil, é a principal espécie aquícola cultivada, com a produção de 239,09 mil toneladas em 2016, o que representa 47,1% do total da despesa nacional e um aumento de 9,3% da produção em relação a 2015 (IBGE, 2016). Este aumento na produtividade se deve à capacidade de adaptação da tilápia aos diversos sistemas de produção e aos diferentes níveis de salinidade na água de criação, além da boa aceitabilidade pelo mercado e tecnologias de produção aplicadas (MORO et al., 2013). Dentre os estados maiores produtores de tilápia, destacam-se o estado do Paraná ocupando o primeiro lugar, com 28,8% do total da produção, seguido por São Paulo com 13,2%, Ceará com 12,7% e Santa Catarina com 11,4% (IBGE, 2015).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie tropical e dos grupos de peixes cultivados, as tilápias se destacam, pois formam o segundo grupo mais produzido no mundo, atrás somente das carpas (FAO, 2016). No Brasil, é a principal espécie aquícola cultivada, com a produção de 239,09 mil toneladas em 2016 (IBGE, 2016). Entre os estados de maior produção de tilápia, destacam-se o estado do Paraná, como maior produtor, com 28,8% do total da produção, seguido por São Paulo com 13,2%, Ceará com 12,7% e Santa Catarina com 11,4% (IBGE, 2015).

Os estados localizados abaixo do Trópico de Capricórnio (região sul e o sudeste do estado de São Paulo) são classificados como regiões de clima subtropical, apresentando grande oscilação de temperatura entre o verão e o inverno (IBGE, 2013). O sudeste da China, Tailândia e norte de Taiwan, regiões produtoras de tilápia, apresentam a mesma classificação climática.

Uma nutrição adequada é essencial para a manutenção do desempenho zootécnico em qualquer situação e em especial em condições de oscilação de temperatura (Charo-Karisa et al., 2005). No entanto, para esta espécie ainda existem lacunas de conhecimento da exigência nutricional em ácidos graxos e da relação do total de ácidos graxos poli-insaturados da série n-3/n-6 (PUFA n-3/n-6) para tilápia-do-Nilo cultivadas em resposta a entrada do inverno.

Em virtude do crescimento da produção da aquicultura nas últimas décadas, o consumo médio de pescados e subprodutos aumentou (FAO, 2016). A ingestão regular de pescado, por ser uma fonte de ácidos graxos insaturados, traz muitos benefícios para a saúde humana, tais como a diminuição da incidência de doenças cardiovasculares e propriedades anti-inflamatórias (Sisvovick et al., 2000; Ruxton et al., 2005; NRC, 2011; FAO, 2016).

Quando os peixes se encontram em condições de baixa temperatura, aumentam os níveis de insaturação dos ácidos graxos dos fosfolipídios que compõem as membranas celulares, o que mantém a permeabilidade e fluidez das membranas devido ao menor ponto de fusão destes compostos (Sargent et al., 2002; Hsieh et al., 2007).

O excesso de ácidos graxos da série n-3 e/ou n-6 na dieta para tilápias pode suprir a necessidade um do outro (Lim et al., 2011; Li et al. 2013). Além disso, as vias metabólicas dos PUFA da série n-3 e n-6 compartilham as mesmas enzimas, como as dessaturase e elongases, o que pode favorecer a síntese de um ou de outro produto, ou até inibir uma das vias (Sargent et al., 2002; NRC, 2011). Fatos que mostram a importância do conhecimento da relação n-3/n-6 necessária para o ótimo desempenho de crescimento.

A enzima  $\Delta 6$  dessaturase, envolvida no metabolismo de ácidos graxos, apresenta atividade em ambos os substratos, ácido linoleico (LOA, 18:2n-6) e ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\alpha$ -LNA, 18:3n-3) (Tocher, 2010). Para tilápia-do-Nilo, o gene da enzima  $\Delta 6$  dessaturase foi caracterizado e nomeado como On-FAD6, que mostrou uma maior atividade da  $\Delta 6$  dessaturase em direção a 18:2n-6 (Tanomman et al., 2013).

O caminho metabólico dos lipídios pode ser regulado pelo colesterol, PUFAs e pelo SREBP1 (*sterol regulatory element binding protein 1*) (TOCHER e GLENCROSS, 2015). Sendo que a enzima SREBP1 é a principal reguladora da lipogênese participando diretamente na expressão e regulação de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos (Eberlé et al., 2004).

Pelo fato dessas enzimas estarem envolvidas no metabolismo de ácidos graxos da série n-3 e n-6 é evidente a importância do fornecimento de PUFA da série n-3 e n-6 numa proporção adequada.

Nobrega et al. (2017), relataram que uma relação n-3/n-6 igual a 1,22 proporcionou os melhores resultados de crescimento para tilápia-do-Nilo criadas a 22°C. Em um estudo com a mesma espécie, peixes alimentados com uma dieta contendo 0,63% de  $\alpha$ -LNA mais 0,62% de LOA, com total de PUFA de 1,02%, apresentaram o melhor desempenho produtivo (Chen et al., 2013). Chou e Shiau (1999)

relataram que para um bom crescimento de juvenis de tilápia híbrida (*O. niloticus* x *O. aureus*) é necessário fornecer uma dieta rica tanto em ácidos graxos da série n-3 quanto da série n-6. A imunidade e a resposta anti-inflamatória em juvenis de tilápia melhoram com níveis moderados de  $\alpha$ -LNA na dieta (Chen et al., 2016).

Assim, fica evidente que a exigência dietética em ácidos graxos para tilápia ainda não é totalmente conhecida e serão necessários muitos estudos para elucidar, entre outras dúvidas: 1) a exigência em ácidos graxos poderá ser atingida tanto com PUFAs da série n-3 como da série n-6? 2) qual a melhor proporção entre os ácidos graxos n-3/n-6 na dieta? 3) qual a influência da temperatura na exigência em ácidos graxos?

Portanto, com a finalidade de aprimorar a tecnologia de produção da tilápia-do-Nilo para regiões de clima subtropical, no presente estudo propõe-se um teste com dietas com diferentes relações entre os ácidos graxos da série n-3/n-6, com foco no metabolismo dos peixes em temperaturas ótima (28 °C) e subótima (22 °C).

### **3.3 Materiais e métodos**

#### **3.3.1 Dietas Experimentais**

Atendendo às exigências nutricionais de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (NRC, 2011) foi formulada uma dieta basal com o uso de ingredientes semipurificados (Tabela 1). As dietas experimentais diferiram quanto à fonte lipídica para alcançar cinco relações n-3/n-6, a saber: 2,9; 1,3; 0,8; 0,5 e 0,2, mantendo-se constante o total de PUFA 1,30 % em todas as dietas. Os óleos utilizados para estabelecer essas relações foram o óleo de peixe, linhaça, soja, canola e palma, os quais foram selecionados para manter a mesma proporção de ácidos graxos saturados (SFA) e monoinsaturados (MUFA) entre as dietas e estabelecer as diferentes relações n-3/n-6 PUFA testadas. O óleo de fígado de bacalhau é rico em ácidos graxos n-3 LC-PUFA e também possui alto conteúdo de MUFA, enquanto que o óleo de linhaça é fonte de ácidos graxos n-3 PUFA. Já o óleo de canola é rico em MUFA e n-6 PUFA, enquanto o óleo de soja contém principalmente n-6 PUFA, SFA e MUFA e o óleo de palma é rico em SFA e MUFA.

Tabela 1. Formulação e composição das dietas experimentais (% , considerando-se 100% de matéria seca).

Ingredientes <sup>1,2</sup>	Relação n-3/n-6				
	2,9	1,3	0,8	0,5	0,2
Óleo de peixe	2,78	1,84	1,02	0,53	-
Óleo de linhaça	0,80	0,74	0,65	0,45	0,23
Óleo de soja	-	0,33	0,67	1,08	1,55
Óleo de canola	0,19	0,64	1,10	1,38	1,66
Óleo de palma	1,23	1,45	1,56	1,56	1,56
Outros	95,00	95,00	95,00	95,00	95,00
<b>Composição</b>					
Matéria seca	89,77	89,59	90,10	90,12	89,56
Proteína bruta	38,23	38,75	38,39	38,77	38,41
Extrato etéreo	5,53	5,56	5,52	5,46	5,47
Matéria mineral	3,62	3,91	4,64	4,08	3,65
Σ PUFA n-3	0,96	0,73	0,58	0,43	0,26
Σ PUFA n-6	0,33	0,57	0,72	0,86	1,05
Σ PUFA n-3 e n-6	1,29	1,30	1,30	1,29	1,31
n-3/n-6	2,91	1,28	0,81	0,50	0,25

<sup>1</sup>Óleo de fígado de bacalhau: Berg Lipidtech, Aalesund, Noruega; óleo de linhaça: Vital Atman Ltda, Uchoa, SP, Brasil; óleos de soja e canola: Bunge Alimentos AS, Gaspar, SC, Brasil; óleo de palma: grupo Agropalma, Belém, PA, Brasil.

<sup>2</sup>Dieta basal: caseína 300 mg g<sup>-1</sup>, amido de milho 400 mg g<sup>-1</sup>, celulose 113,5 mg g<sup>-1</sup>, gelatina 80 mg g<sup>-1</sup>, fosfato bicálcico 20 mg g<sup>-1</sup>, premix macro mineral 20 mg g<sup>-1</sup>, premix micromineral e vitamínico 10 mg g<sup>-1</sup>, carboximetilcelulose 5 mg g<sup>-1</sup>, cloreto de colina 0,1 mg g<sup>-1</sup>, butil-hidroxitolueno (BHT) 0,5 mg g<sup>-1</sup>. Composição do premix macromineral (Neon® comercial Ltda. São Paulo, SP, Brasil) por kg de produto: fosfato bicálcico 130 g, cloreto de potássio 120 g, cloreto de sódio 130 g, sulfato de magnésio 620 g. Composição do premix micromineral e vitamínico (Nutron®, distribuído por Cargill, Toledo, PR, Brasil) por kg de produto: ácido fólico 997,5 mg, ácido pantotênico 9.975 mg, biotina 159,6 mg, sulfato de cobalto 39,9 mg, sulfato de cobre 2.000 mg, etoxiquin 24,78 g, sulfato de ferro 19,62 g, inositol 10 g, iodato de cálcio 120 mg, monóxido de manganês 5.200 mg, niacina 19,95 g, selenito de sódio 119,7 mg, vitamina (vit) A 1.995.000 UI, vit B<sub>1</sub> 4.987,5 mg, vitamina B<sub>12</sub> 5.985 µg, vitamina B<sub>2</sub> 4.987,5 mg, vitamina B<sub>6</sub> 4.987,5 mg, vitamina C 70 g, vitamina D<sub>3</sub> 798.000 UI, vitamina E 19.950 UI, vitamina K 997,5 mg, óxido de zinco 28 g.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais (% total de ácidos graxos e g 100 g<sup>-1</sup> de matéria seca).

Ácidos graxos <sup>1</sup>	Relação n-3/n-6				
	2,9	1,3	0,8	0,5	0,2
<b>% total de ácidos graxos</b>					
18:2 n-6	6,05	11,52	16,43	18,74	23,88
18:3 n-6	ND	ND	0,38	0,44	ND
20:2 n-6	0,29	0,12	0,08	ND	0,07
20:3 n-6	ND	ND	0,18	0,25	0,29
20:4 n-6	0,55	0,37	ND	0,19	0,12
22:4 n-6	0,11	0,15	0,05	ND	0,07
18:3 n-3	8,57	8,54	8,37	7,35	5,78
18:4 n-3	1,24	ND	ND	0,30	ND
20:5 n-3	3,90	2,58	1,40	0,70	ND
22:3 n-3	0,18	0,12	ND	ND	0,03
22:5 n-3	0,57	0,37	0,19	0,13	ND
22:6 n-3	5,60	3,65	1,95	1,01	0,11
Σ SFA <sup>2</sup>	28,11	29,07	27,14	25,03	24,68
Σ MUFA	41,55	43,09	42,60	42,11	44,88
Σ PUFA	30,34	27,84	30,26	32,86	30,44
Σ PUFA n-3	20,07	15,48	13,15	9,48	5,92
Σ PUFA n-6	7,00	12,17	17,12	19,62	24,43
Σ PUFA n-3 + n-6	27,07	27,65	30,26	29,10	30,35
Σ LC PUFA n-3	10,26	6,93	4,78	1,84	0,14
Σ LC PUFA n-6	0,95	0,65	0,31	0,43	0,55
n-3/n-6	2,91	1,28	0,81	0,50	0,25
<b>g 100 g<sup>-1</sup> de matéria seca</b>					
18:2 n-6	0,28	0,54	0,69	0,83	1,03
18:3 n-6	ND	ND	0,02	0,02	ND
20:2 n-6	0,01	0,01	ND	ND	ND
20:3 n-6	ND	ND	0,01	0,01	0,01
20:4 n-6	0,03	0,02	ND	0,01	0,01
22:4 n-6	0,01	0,01	ND	ND	ND
18:3 n-3	0,40	0,40	0,37	0,32	0,25
18:4 n-3	0,06	ND	ND	0,01	ND
20:5 n-3	0,18	0,12	0,06	0,03	ND
22:3 n-3	0,01	0,01	ND	ND	ND
22:5 n-3	0,03	0,02	0,01	0,01	ND
22:6 n-3	0,26	0,17	0,09	0,04	ND
Σ SFA <sup>2</sup>	1,31	1,36	1,19	1,10	1,06
Σ MUFA	1,94	2,03	1,88	1,86	1,94
Σ PUFA	1,42	1,31	1,30	1,45	1,32
Σ PUFA n-3	0,94	0,73	0,58	0,42	0,26
Σ PUFA n-6	0,33	0,57	0,72	0,86	1,06
Σ PUFA n-3 e n-6	1,30	1,30	1,30	1,30	1,31
Σ LC PUFA n-3	0,48	0,33	0,21	0,08	0,01
Σ LC PUFA n-6	0,04	0,03	0,01	0,02	0,02
n-3/n-6	2,91	1,28	0,81	0,50	0,25

<sup>1</sup>Ácidos graxos detectados mas não exibidos: 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-9, 20:1n-11, 22:1n-9, 22:1n-11, 24:1n-9, 16:3n-4, 20:3n-3, 20:4n-3.

<sup>2</sup>Grupos de ácidos graxos: SFA= ácidos graxos saturados, MUFA= ácidos graxos monoinsaturados, PUFA n-3= ácidos graxos poli-insaturados da série n-3, PUFA n-6= ácidos graxos poli-insaturados da série n-6.

<sup>3</sup>Não detectados (limite de detecção 0,05%), considerado como “zero”.

Os ingredientes, com exceção dos óleos, foram pesados, corrigidos para 100% de matéria seca, homogeneizados e levados à umidade de 25% para a extrusão. As dietas foram extrusadas em péletes de 4 mm a 100 °C e secas em estufa de circulação forçada de ar, a 55 °C, durante 4 h. Posteriormente, os óleos foram adicionados por aspersão, seguida de vácuo, para evitar perdas de ácidos graxos essenciais. As rações foram conservadas congeladas (-20 °C) até o fornecimento aos peixes.

As dietas foram distribuídas aleatoriamente para três grupos de 25 peixes, os quais estavam estocados em tanques circulares de 100 L de volume útil, sendo que cada um representava uma unidade experimental. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais duas vezes ao dia (8:00 h e 16:00 h), até a saciedade aparente.

### 3.3.2 Peixes e Condições Experimentais

Os juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, da linhagem GIFT, invertidos sexualmente para machos, utilizados neste estudo foram adquiridos da piscicultura ACQUA SUL (Ilhota, SC, Brasil). O ensaio de alimentação foi conduzido no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD-UFSC), onde os peixes foram aclimatados às condições experimentais por duas semanas. Neste período, os peixes foram alimentados com a dieta basal, sem adição de óleo, e mantidos em temperatura ótima de 28 °C.

Após o período de aclimação os peixes, com peso inicial de 70,49 ± 1,43 g (média ± desvio padrão) e comprimento total inicial de 15,34 ± 3,00 cm foram alimentados com as dietas experimentais e mantidos em temperatura ótima (28 °C) por 56 dias. Ao término deste período, foi realizada uma biometria onde foram realizadas amostragens (ver item **3.3.3**) e 12 peixes foram mantidos em cada unidade experimental e submetidos à transição de temperatura, durante 7 dias (-1 °C dia), até atingir a temperatura subótima (22 °C), onde foram mantidos por mais 33 dias, simulando as mudanças de temperaturas que ocorrem em regiões de clima subtropical, com a chegada do outono. O peso inicial médio dos peixes nesta nova etapa do ensaio alimentar era 207,94 ± 9,24 g e o comprimento total médio 21,79 ± 3,8 cm.

As 15 unidades experimentais estavam conectadas a um sistema de recirculação fechado de água doce, com controle de temperatura, aeração e fluxo de água constantes, além de filtragem mecânica e biológica. O fotoperíodo foi ajustado para 12 h. Durante o período experimental, variáveis indicadores da qualidade da água (temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido) foram registradas diariamente, com auxílio de uma sonda multiparâmetros YSI Professional Plus® (Yellow Springs, OH, USA). Já as concentrações de amônia, nitrito e nitrato foram monitorados semanalmente com auxílio de kits colorimétricos. As médias e respectivos desvios-padrão obtidos nas duas etapas (28 °C e 22 °C, respectivamente) do ensaio alimentar para estas variáveis foram: temperatura  $28,0 \pm 0,1$  e  $22,0 \pm 0,1$  °C, pH  $6,99 \pm 0,37$  e  $7,01 \pm 0,43$ , oxigênio dissolvido  $7,00 \pm 0,53$  e  $7,51 \pm 0,18$  mg L<sup>-1</sup>, amônia total  $0,12 \pm 0,03$  e  $0,11 \pm 0,02$  mg L<sup>-1</sup> nitrito  $0,00 \pm 0,01$  e  $0,00 \pm 0,01$  mg L<sup>-1</sup> e nitrato  $0,17 \pm 0,05$  e  $0,19 \pm 0,04$  mg L<sup>-1</sup>. As variáveis indicadoras da qualidade da água, com exceção da temperatura subótima, permaneceram nas faixas de conforto para a espécie (Popma & Lovshin, 1995) e não diferiram significativamente entre as unidades experimentais.

### 3.3.3 Coleta de Amostras e Análises

As biometrias foram realizadas a cada 20 dias para acompanhamento do crescimento e avaliação do desempenho. Os peixes foram mantidos em jejum por 24 h antes de cada biometria, e então anestesiados com 100 mg L<sup>-1</sup> de Eugenol® (Asfer Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil) previamente ao manejo. O comprimento total individual foi determinado com ictiômetro (precisão 0,1 cm) e o peso individual, em balança semianalítica (precisão 0,01 g). Também foram realizados registros diários de mortalidade e consumo das dietas.

Para análise da composição centesimal e perfil de ácidos graxos, os peixes foram coletados em três tempos diferentes: 1) 20 peixes no início do experimento, 2) três peixes por unidade experimental, após 56 dias de experimento em temperatura ótima e 3) três peixes por unidade experimental, após 33 dias em temperatura subótima. Após os períodos de 56 e 33 dias, foram coletados três peixes de cada unidade experimental para o cálculo dos índices vicerossomático (IVS) e hepatossomático (IHS). Já, para análise da expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos, foram coletados os fígados de três peixes de cada unidade experimental, mas somente

aqueles alimentados com dietas contendo relação n-3/n-6 extremas (2,9 e 0,20). As amostragens foram realizadas após 56 dias a 28 °C, e após 33 dias a 22 °C, resultando em 36 amostras de fígado coletadas. Os peixes animais foram sacrificados por meio de overdose do anestésico (200 mg L<sup>-1</sup> Eugenol® (Asfer Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil), seguido por secção da coluna vertebral.

Todas as amostras de peixe inteiro foram moídas, homogeneizadas e conservadas a -20 °C até as análises laboratoriais. As análises de composição centesimal das rações e dos peixes foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI-UFSC), de acordo com métodos padronizados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1999): teor de umidade (secagem em estufa 105 °C até peso constante, método 950.01), matéria mineral (incineração em mufla a 550 °C, método 942.05), proteína bruta (método de Kjeldahl, método 945.01) e extrato etéreo (método de Soxhlet, método 920.39C).

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), onde 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<sup>-1</sup>, o gás de arraste, H<sub>2</sub>, e o gás de *make up*, N<sub>2</sub>. Os demais parâmetros operacionais foram os mesmos descritos por Corrêa et al. (2017). 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 e Franco, 2006).

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).



### 3.3.4 Análise de Expressão Gênica

As análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Produção Animal da Universidade Politécnica de Madri, Espanha.

#### 3.3.4.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA)

Trinta e seis amostras de aproximadamente 1 g de fígado foram coletadas e conservadas em tubos eppendorf de 2,5 mL, contendo solução estabilizante RNALater® (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) durante 12 h a temperatura ambiente e posteriormente congeladas a -20 °C até a extração de RNA total.

Do tecido conservado a -20 °C, pesou-se entre 0,04 a 0,05 mg de tecido homogeneizado em Trizol (ThermoFisher, catálogo número 15596026), utilizando-se um moinho misturador (MM-400 Restch, Stuttgart, Alemanha). Para extrair o RNA total foram seguidas as instruções e recomendações do fabricante do kit de Extração GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha). Durante o protocolo de isolamento do RNA total foi realizado um tratamento com DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen catálogo número/ID:79254) para eliminar a maior parte do DNA genômico. As amostras de RNA extraído foram armazenadas a -80 °C.

A integridade do RNA extraído foi analisada mediante a determinação do número RIN (RNA Integrity Number) com auxílio de um bioanalisador (Agilent 2100), a integridade do RNA extraído está diretamente relacionada com o rendimento da extração. A quantidade de RNA foi quantificada através de espectrofotometria por absorvância para obter a concentração de cada amostra de DNA/RNA na relação  $A_{280}/A_{260}$  com um espectrofotômetro Epoch™ (BioteK®, programa Gen 5™ versão 1.11).

#### 3.3.4.2 Reação de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

A partir do RNA extraído previamente, realizou-se a reação de transcrição reversa do RNA para síntese de cDNA (DNA codificante) de cadeia simples, a partir de 16 µl de RNA, mediante as indicações do Kit SuperScript® VILO™ Master Mix (ThermoFisher). A programação de amplificação realizada no termociclador de tempo final está detalhada na Tabela 3.

Tabela 3. Programação da amplificação da reação de transcrição reversa.

Temperatura (°C)	Tempo (min)
25	10
42	60
82	5
4	∞

Uma vez obtido o cDNA, realizou-se a amplificação dos fragmentos, mediante a Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*, PCR) em tempo real, com auxílio do PCR quantitativo em tempo real de Applied Biosystems (7300 Real Time PCR System com 7300 System SDS Software RQ Study Application, versão 1.4.0.25). Foi utilizado o reagente Fast SYBR® Green Master Mix de Applied Biosystem como agente intercalante de fluorescência. Como gene de referência (do inglês, *housekeeping*), utilizado para normalização dos valores de expressão *elongation factor 1 alpha* (EF1 $\alpha$ ), adotou-se a validação realizada por Ingerslev et al. (2006), que demonstra que este gene é estável e, assim sendo, apropriado como gene de referência em estudos de expressão gênica.

Os *primers* para as análises da expressão do SREBP1 e FAD6 se projetaram a partir das sequências descritas na tabela 4.

Tabela 4. Sequência dos *primers housekeeping* (EF1 $\alpha$ ) e genes alvo (FAD6 e SREBP1).

Primer	Sequência do primer
On_EF1	<sup>1</sup> Fw 5'- CTA CGT GAC CAT CAT TGA TGC C-3' Rv 5'- AAC ACC AGC AGC AAC GAT CA -3'
On_FAD6	Fw 5'- CTA TGC TGG AGA GGA TGC CAC GG -3' Rv 5' - CAG CAG GAT GTG ACT GAG GTG GAG -3'
On_SREBP1	Fw 5'- TGC AGC AGA GAG ACT GTA TCC GA -3' Rv 5' - ACT GCC CTG AAT GTG TTC AGA CA -3'

<sup>1</sup>Fw: primer *forward* no sentido da fita senso e Rv: primer *reverse* no sentido reverso complementar da fita senso.

As condições de temperatura, concentração dos *primers* e tempo de anelamento foram ajustadas para cada um dos genes estudados: *housekeeping* (do inglês: *elongation factor 1*, EF1 $\alpha$ ) e genes alvo (*fatty acid desaturase*, FAD6 e *sterol regulatory element binding*, SREBP1).

Posteriormente, foram calculadas as eficiências da expressão de cada gene por meio das curvas padrão usando diluições seriadas de cDNA. As condições definitivas do teste e os valores de eficiência estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Concentração dos *primers*, condições de amplificação e eficiência dos genes.

<i>Primers</i>	Concentração do <i>primer</i> (µM)	Volume do <i>primer</i> na reação (µL)	Condições de amplificação			Eficiência
			Temperatura de anelamento (°C)	Tempo (segundos)	Número de ciclos	
EF1α	0,1	0,8	60	27	40	1,96
FAD6	0,1	0,8	60	27	40	1,96
SREBP1	0,1	1	60	27	40	2,04

Foi utilizado o método de quantificação relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para avaliar a expressão dos genes. A metodologia de análise dos dados está descrita em Livak e Schmittgen (2001).

### 3.3.5 Variáveis mensuradas

Com os dados obtidos durante os ensaios experimentais, nas biometrias, foram calculadas as seguintes variáveis:

Ganho de peso diário (GPD), g dia<sup>-1</sup> peixe = [(peso final - peso inicial) x dias<sup>-1</sup>]

Conversão alimentar (CA) = [ (peso final - peso inicial) x consumo<sup>-1</sup>]

Taxa de crescimento específico (TCE), % dia<sup>-1</sup> = [ $\ln$  (peso final) -  $\ln$  (peso inicial) x tempo<sup>-1</sup>] x 100

Índice viscerossomático (IVS), % = (peso das vísceras x peso corporal<sup>-1</sup>) x 100

Índice hepatossomático (IHS), % = (peso do fígado x peso corporal<sup>-1</sup>) x 100

Sobrevivência, % = (número final de peixes x número inicial de peixes<sup>-1</sup>) x 100

### 3.3.6 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade.

Para avaliar o efeito das diferentes relações dietéticas de ácidos graxos da série n-3/n-6 a 28 °C e a 22 °C sobre o GPD, CA, TCE, IVS, IHS, composição corporal e perfil corporal de ácidos graxos, os dados foram submetidos à regressão linear simples, ao nível de 5% de significância, com auxílio do programa estatístico Statistica® versão 7.0.

Os dados obtidos na análise de expressão gênica foram analisados por meio do Modelo Linear Misto ou *Proc Mixed* do programa

estatístico SAS (*Statistical Analysis System*), versão 9.0 (SAS Institute, 2002), seguindo as recomendações de Steibel et al. (2009). As eficiências dos genes foram utilizadas para transformar os valores de  $C_t$  (Ciclo limiar; do inglês, *cycle threshold*) correspondentes, seguindo o modelo proposto por Steibel et al. (2009). Para normalização dos valores da expressão gênica, foram utilizadas as médias geométricas do gene de referência EF1 $\alpha$ . As interações entre as variáveis gene e tratamento foram analisadas. As variações da expressão são resultado da comparação entre: 28 °C vs. 22 °C, 2,9 n-3/n-6 28 °C vs. 2,9 n-3/n-6 22 °C, 0,2 n-3/n-6 28 °C vs. 0,2 n-3/n-6 22 °C e entre 2,9 n-3/n-6 vs. 0,2 n-3/n-6.

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 Desempenho Zootécnico

As diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6 não afetaram significativamente o crescimento dos juvenis de tilápia-do-Nilo quando submetidos a 28 °C, o mesmo ocorreu quando submetidos a 22 °C (Tabela 6). A conversão alimentar das tilápias mantidas a 28 °C foi melhor em relação àquelas mantidas a 22 °C, porém, não houve regressão significativa entre os tratamentos para esta variável em nenhuma das temperaturas. A 22 °C, o consumo foi maior no grupo de peixes que recebeu a dieta com relação n-3/n-6 de 0,2 (menor relação de PUFA n-3/n-6), o mesmo não ocorreu a 28 °C, onde o consumo foi similar entre os peixes alimentados com todas as relações n-3/n-6. A sobrevivência dos juvenis de tilápia-do-Nilo nos dois ensaios alimentares foi elevada e não foi influenciada pelas dietas, com variação de 97,33 a 100% a 28 °C e mantendo-se em 100% em todos os tratamentos a 22 °C. Os índices IVH e HSI também não foram afetados significativamente pelas dietas experimentais, em nenhuma das temperaturas de criação.

Tabela 6. Desempenho e sobrevivência de juvenis de tilápia-do-Nilo, mantidos a 28 °C e 22 °C, quando alimentados com diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6 durante 56 e 33 dias, respectivamente <sup>1</sup>.

Variáveis	Relação n-3/n-6					pooled SEM <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	P
	2,9	1,3	0,8	0,5	0,25			
<b>28°C</b>								
Peso final, g	224,7	212,8	218,1	219,6	220,3	15,72	0,02	0,615
Consumo, g dia peixe <sup>-1</sup>	2,85	2,70	2,90	2,81	2,84	0,20	0,00	0,942
Ganho de peso diário, g	2,76	2,54	2,63	2,66	2,68	0,28	0,02	0,571
Conversão alimentar	1,03	1,07	1,12	1,05	1,06	0,05	0,01	0,374
Taxa crescimento específico, % dia <sup>-1</sup>	2,08	1,97	2,00	2,03	2,04	0,13	0,03	0,545
Índice viscerossomático, %	7,12	7,35	7,52	7,27	7,14	0,91	0,00	0,799
Índice hepatossomático, %	2,01	2,13	1,91	1,90	2,03	0,28	0,01	0,706
Sobrevivência, %	100	98,67	97,33	98,67	97,33	2,67	0,19	0,106
<b>22°C</b>								
Peso final <sup>1</sup> , g	287,6	292,8	293,6	274,1	283,2	16,60	0,04	0,493
Consumo, g dia peixe <sup>-1</sup>	3,70	3,43	3,38	3,23	3,29	0,25	0,47	0,005 <sup>3</sup>
Ganho de peso diário, g	2,39	2,71	2,46	1,99	2,20	0,40	0,08	0,319
Conversão alimentar	1,55	1,27	1,40	1,66	1,50	0,19	0,00	0,930
Taxa crescimento específico, % dia <sup>-1</sup>	0,97	1,10	0,97	0,83	0,89	0,13	0,09	0,269
Índice viscerossomático, %	6,79	6,57	6,79	7,08	6,30	1,11	0,00	0,809
Índice hepatossomático, %	1,89	1,74	1,87	2,08	1,82	0,37	0,00	0,832
Sobrevivência, %	100	100	100	100	100	-	-	-

<sup>1</sup> Peso inicial (média ±SEM) 70,49 ± 0,86 g e 207,94 ± 7,25 g a 28 °C e 22 °C, respectivamente.

<sup>2</sup> Erro padrão da média combinado.

<sup>3</sup> A regressão linear foi significativa para o consumo a 22 °C e gerou a seguinte equação:  $y = 0,161x + 3,222$ .

### 3.4.2 Composição corporal e perfil de ácidos graxos

Com a diminuição da relação de PUFA n-3/n-6 na dieta, o conteúdo de gordura corporal dos peixes aumentou significativamente a 28 °C (Figura 1), mas o mesmo não ocorreu quando os peixes foram submetidos a 22 °C. Já o conteúdo corporal em termos de umidade, proteína e matéria mineral não foram afetados significativamente em ambas as temperaturas (Tabela 7).

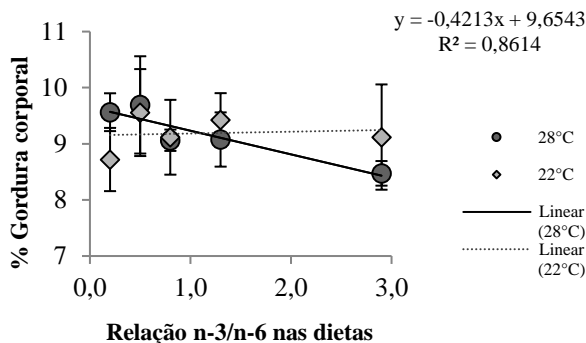


Figura 1. Regressão linear do teor de gordura corporal (% da matéria úmida) de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6 durante 56 dias a 28 °C e 33 dias a 22 °C. Para 28 °C  $p < 0,05$ .

Tabela 7. Composição corporal final (% na matéria úmida) de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6 durante 56 dias a 28 °C e 33 dias a 22 °C respectivamente.

Variáveis	Peixe Inicial	Relação n-3/n-6					pooled SEM <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	P
		2,9	1,3	0,8	0,5	0,2			
<b>28 °C</b>									
Umidade	74,92	71,29	70,44	70,57	70,17	70,25	1,06	0,24	0,066
Proteína	13,51	15,93	15,76	15,97	16,27	15,87	0,49	0,02	0,652
Matéria mineral	3,55	3,63	4,19	3,98	3,53	3,51	0,89	0,00	0,858
<b>22 °C</b>									
Umidade	-	70,01	69,37	70,06	69,32	71,72	0,74	0,08	0,323
Proteína	-	16,32	16,62	16,36	16,28	14,98	0,60	0,08	0,295
Matéria mineral	-	4,02	4,13	3,40	3,91	3,25	0,56	0,19	0,106

<sup>1</sup> Erro padrão da média combinado.

De maneira geral, o perfil de ácidos graxos corporal seguiu a composição das dietas em ambas as temperaturas (Tabelas 8 e 9, Figura 2), não havendo relação significativa entre as dietas e a composição corporal para o total de SFA, MUFA e PUFA.

Registrou-se maior acúmulo corporal de PUFA, para os totais de PUFA n-3 e PUFA n-6, quando se compara o perfil corporal de ácidos graxos dos peixes mantidos a 28 °C com os àqueles mantidos a 22 °C (Figura 2). Já, para os MUFA, os valores a 22 °C foram maiores do que

àqueles a 28 °C. Os valores do total de n-3 LC PUFA e n-6 LC PUFA registrados a 22 °C foram similares àqueles a 28 °C.

As diferentes relações n-3/n-6 nas dietas influenciaram significativamente o perfil corporal de ácidos graxos da série n-6 a 28 °C, sendo que a dieta que continha a menor relação n3/n-6 promoveu a maior concentração de ácidos graxos da série n-6 e menor concentração de ácidos graxos da série n-3. Esta mesma tendência ocorreu quando os peixes foram submetidos a 22 °C. Os ácidos graxos da série n-6 com maior acúmulo significativo foram o LOA (18:2 n-6) e o ARA (20:4 n-6), variando de 4,46 a 6,60 e 0,55 a 0,78 a 28 °C e 3,15 a 6,24 e 0,53 a 0,73 a 22 °C, respectivamente. Foi observado que enquanto as quantidades do ácido araquidônico (ARA, 20:4 n-6) nas dietas diminuía conforme aumentava a relação n-3/n-6, houve maior acúmulo corporal deste ácido graxo quando a relação n-3/n-6 era maior.

Nas duas temperaturas de criação, os n-3 PUFA encontrados em maiores quantidades no perfil de ácidos graxos corporal das tilápias foram o  $\alpha$ -LNA, com 18 carbonos, e os LC PUFA DHA (22:6 n-3), seguido do 20:3 n-3 e do DPA (22:5 n-3). A concentração destes ácidos graxos diminuiu significativamente, de forma linear, à redução da relação n-3/n-6 das dietas. Entretanto, independente da temperatura em que os peixes foram mantidos, a concentração do ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3), encontrado em menor quantidade que todos os outros n-3 PUFA detectados, aumentou significativamente, conforme reduzia sua concentração na dieta, enquanto as concentrações dos ácidos graxos da série n-6 aumentaram significativamente.

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos corporal de juvenis de tilápia-do-Nilo, quando criadas a 28 °C (% total de ácidos graxos e g 100 g<sup>-1</sup> de matéria seca).

Ácidos graxos <sup>1</sup>	Peixe Inicial	Relação n-3/n-6					pooled SEM <sup>4</sup>	R <sup>2</sup>	P
		2,9	1,3	0,8	0,5	0,2			
<b>% total de ácidos graxos</b>									
18:2 n-6	10,17	4,43	5,13	5,62	6,17	6,60	0,43	0,86	0,008 <sup>5</sup>
18:3 n-6	0,27	0,15	ND <sup>2</sup>	0,18	ND	0,23	0,06	0,23	0,337
20:2 n-6	0,52	0,25	0,24	0,27	0,27	0,33	0,03	0,84	0,010
20:3 n-6	0,28	0,36	0,37	0,40	0,42	0,45	0,04	0,93	0,002
20:4 n-6	0,98	0,54	0,53	0,62	0,63	0,78	0,04	0,77	0,021
22:4 n-6	0,59	0,31	0,31	0,34	0,36	0,55	0,07	0,64	0,055
18:3 n-3	0,49	1,54	1,33	1,23	1,11	0,91	0,11	0,92	0,002
18:4 n-3	0,41	0,39	0,37	0,44	0,41	0,44	0,05	0,76	0,024
20:3 n-3	0,20	0,78	0,43	0,39	0,18	0,16	0,05	0,95	<0,001
20:5 n-3	0,22	0,22	0,25	0,28	0,31	0,36	0,06	0,88	0,005
22:5 n-3	0,81	1,01	0,68	0,52	0,38	0,31	0,08	0,99	<0,001
22:6 n-3	2,13	2,49	1,86	1,34	1,09	0,86	0,22	0,97	<0,001
Σ SFA <sup>3</sup>	37,48	39,27	39,44	38,26	38,65	36,93	1,61	0,33	0,232
Σ MUFA	45,32	47,95	48,92	49,87	49,79	50,85	1,61	0,57	0,082
Σ PUFA	17,19	12,78	11,64	11,87	11,56	12,22	0,61	0,40	0,181
Σ PUFA n-3	4,29	6,50	4,92	4,21	3,48	3,04	0,33	0,97	<0,001
Σ PUFA n-6	12,81	6,04	6,57	7,43	7,85	8,95	0,43	0,86	0,007
Σ n-3 + n-6	17,10	12,54	11,49	11,65	11,33	11,98	0,60	0,37	0,197
Σ LC PUFA n-3	3,39	4,57	3,22	2,54	1,96	1,68	0,29	0,98	<0,001
Σ LC PUFA n-6	2,37	1,46	1,44	1,63	1,68	2,12	0,14	0,79	0,018
n-3/n-6	0,34	1,08	0,75	0,57	0,44	0,34	0,06	0,97	<0,001
<b>g 100 g<sup>-1</sup> de matéria seca</b>									
18:2 n-6	2,10	0,46	0,78	1,18	1,57	1,53	0,13	0,94	<0,001
18:3 n-6	0,05	0,03	ND	0,04	ND	0,05	0,01	0,37	0,197
20:2 n-6	0,12	0,05	0,05	0,06	0,07	0,08	0,01	0,63	0,059
20:3 n-6	0,06	0,08	0,08	0,08	0,11	0,10	0,01	0,76	0,024
20:4 n-6	0,20	0,12	0,12	0,13	0,16	0,18	0,01	0,68	0,044
22:4 n-6	0,13	0,07	0,07	0,07	0,09	0,13	0,02	0,62	0,062
18:3 n-3	0,11	0,33	0,30	0,26	0,28	0,21	0,03	0,82	0,013
18:4 n-3	0,08	0,08	0,08	0,09	0,10	0,10	0,02	0,70	0,038
20:3 n-3	0,04	0,17	0,10	0,08	0,05	0,04	0,01	0,96	<0,001
20:5 n-3	0,05	0,05	0,06	0,06	0,08	0,08	0,02	0,89	0,005
22:5 n-3	0,18	0,22	0,15	0,11	0,10	0,07	0,02	0,98	<0,001
22:6 n-3	0,49	0,54	0,42	0,28	0,28	0,20	0,05	0,96	<0,001
Σ SFA	8,33	8,45	8,81	7,99	9,82	8,45	0,84	0,01	0,846
Σ MUFA	10,34	10,50	11,03	10,49	12,65	11,76	1,23	0,31	0,251
Σ PUFA	3,65	2,26	2,25	2,50	2,94	2,83	0,25	0,58	0,079
Σ PUFA n-3	0,96	1,40	1,11	0,89	0,89	0,70	0,11	0,95	<0,001
Σ PUFA n-6	2,67	0,80	1,11	1,56	2,00	2,07	0,17	0,92	0,003
Σ n-3 + n-6	3,65	2,26	2,25	2,50	2,94	2,83	0,25	0,58	0,079
Σ LC PUFA n-3	0,77	0,99	0,73	0,53	0,50	0,39	0,08	0,96	<0,001
Σ LC PUFA n-6	0,51	0,31	0,33	0,34	0,43	0,49	0,05	0,69	0,041
n-3/n-6	0,36	1,08	0,75	0,57	0,44	0,34	0,09	0,98	<0,001

<sup>1</sup>Ácidos graxos detectados mas não exibidos: 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0, 14:1n-5, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-11 20:1n-9, 22:1n-9, 24:1n-9, 16:3n-4, 20:4n-3.



<sup>2</sup>Não detectados (limite de detecção = 0,05%), considerado como “zero”.

<sup>3</sup>Grupos de ácidos graxos: SFA = ácidos graxos saturados, MUFA = ácidos graxos monoinsaturados, PUFA n-3 = ácidos graxos poli-insaturados da série n-3, PUFA n-6 = ácidos graxos poli-insaturados da série n-6.

<sup>4</sup> Erro padrão da média combinado.

<sup>5</sup>As regressões lineares das médias dos tratamentos geraram as seguintes equações: % total de ácidos graxos: 18:2n-6 =  $-0,800x + 6,581$ , 20:2n6 =  $-0,023x + 0,299$ , 20:3n6 =  $-0,028x + 0,427$ , 20:4n6 =  $-0,069x + 0,705$ , 18:3n3 =  $0,204x + 1,008$ , 18:4n3 =  $-0,012x + 0,414$ , 20:3n3 =  $0,228x + 0,131$ , 20:5n3 =  $-0,041x + 0,322$ , 22:5n3 =  $0,263x + 0,284$ , 22:6n3 =  $0,592x + 0,880$ , PUFA n-3 =  $1,265x + 3,020$ , PUFA n-6 =  $-0,979x + 8,564$ , LC PUFA n-3 =  $1,073x + 1,598$ , LC PUFA n-6 =  $-0,178x + 1,870$ , n-3/n-6 =  $0,271x + 0,326$ . g 100g-1 de matéria seca: 18:2n6 =  $-0,408x + 1,548$ , 20:3n6 =  $-0,008x + 0,097$ , 20:4n6 =  $-0,018x + 0,160$ , 18:3n3 =  $0,0393x + 0,229$ , 18:4n3 =  $-0,005x + 0,094$ , 20:3n3 =  $0,048x + 0,030$ , 20:5n3 =  $-0,010x + 0,073$ , 22:5n3 =  $0,055x + 0,065$ , 22:6n3 =  $0,123x + 0,201$ , PUFA n-3 =  $0,257x + 0,688$ , PUFA n-6 =  $-0,457x + 1,998$ , LC PUFA n-3 =  $0,223x + 0,366$ , LC PUFA n-6 =  $-0,048x + 0,425$ , n-3/n-6 =  $0,539x + 0,204$ .

Tabela 9. Perfil de ácidos graxos corporal de juvenis de tilápia-do-Nilo, quando mantidas a 22 °C (% total de ácidos graxos e g 100 g<sup>-1</sup> de matéria seca).

Ácidos graxos <sup>1</sup>	Relação n-3/n-6					<i>pooled</i> SEM <sup>3</sup>	R <sup>2</sup>	P
	2,9	1,3	0,8	0,5	0,2			
<b>% total de ácidos graxos</b>								
18:2 n-6	3,26	4,02	4,88	5,22	6,24	0,50	0,92	<0,001 <sup>4</sup>
18:3 n-6	0,19	0,14	0,22	0,15	0,17	0,04	0,47	0,042
20:2 n-6	0,20	0,21	0,21	0,24	0,31	0,04	0,58	0,016
20:3 n-6	0,57	0,41	0,56	0,61	0,54	0,14	0,11	0,387
20:4 n-6	0,53	0,45	0,57	0,68	0,73	0,16	0,42	0,059
22:4 n-6	0,26	0,21	0,33	0,46	0,59	0,15	0,68	0,006
18:3 n-3	1,26	1,08	1,20	1,03	0,95	0,25	0,61	0,013
18:4 n-3	0,61	0,50	0,57	0,56	0,55	0,08	0,05	0,580
20:3 n-3	0,91	0,46	0,44	0,27	0,15	0,23	0,89	<0,001
20:5 n-3	0,35	0,28	0,42	0,45	0,41	0,14	0,51	0,031
22:5 n-3	0,85	0,49	0,41	0,33	0,23	0,17	0,90	<0,001
22:6 n-3	2,10	1,32	1,09	1,06	0,67	0,58	0,81	<0,001
Σ SFA <sup>2</sup>	37,10	39,33	37,41	37,92	36,89	1,80	0,19	0,244
Σ MUFA	51,56	50,86	51,59	50,80	51,34	1,82	0,03	0,678
Σ PUFA	11,34	9,81	11,01	11,28	11,77	1,86	0,07	0,489
Σ PUFA n-3	6,11	4,19	4,12	3,70	2,97	1,12	0,82	<0,001
Σ PUFA n-6	5,02	5,44	6,70	7,37	8,59	0,86	0,88	<0,001
Σ n-3 + n-6	11,13	9,63	10,82	11,06	11,56	1,85	0,07	0,497
Σ LC PUFA n-3	4,24	2,60	2,35	2,10	1,46	4,24	0,84	<0,001
Σ LC PUFA n-6	1,57	1,28	1,67	1,99	2,18	1,57	0,57	0,019
n-3/n-6	1,22	0,76	0,62	0,50	0,35	0,14	0,95	<0,001
<b>g 100g<sup>-1</sup> de matéria seca</b>								
18:2 n-6	0,69	0,92	1,04	1,17	1,43	0,14	0,85	<0,001
18:3 n-6	0,04	0,03	0,05	0,03	0,04	0,01	0,40	0,067
20:2 n-6	0,04	0,05	0,05	0,05	0,07	0,01	0,53	0,025
20:3 n-6	0,12	0,10	0,12	0,14	0,12	0,03	0,19	0,239
20:4 n-6	0,11	0,10	0,12	0,15	0,17	0,03	0,46	0,045
22:4 n-6	0,05	0,05	0,07	0,10	0,14	0,02	0,69	0,006
18:3 n-3	0,27	0,25	0,25	0,23	0,22	0,05	0,46	0,043
18:4 n-3	0,13	0,12	0,12	0,13	0,13	0,01	0,00	0,932
20:3 n-3	0,19	0,11	0,09	0,06	0,03	0,05	0,89	<0,001
20:5 n-3	0,07	0,06	0,09	0,10	0,09	0,03	0,57	0,019
22:5 n-3	0,18	0,11	0,09	0,07	0,05	0,04	0,90	<0,001
22:6 n-3	0,44	0,30	0,23	0,24	0,15	0,12	0,81	<0,001
Σ SFA	7,92	8,90	7,94	8,40	8,42	0,87	0,01	0,846
Σ MUFA	10,90	11,78	10,94	11,41	11,76	1,13	0,11	0,382
Σ PUFA	2,39	2,25	2,34	2,54	2,69	0,36	0,15	0,304
Σ PUFA n-3	1,29	0,96	0,87	0,83	0,68	0,23	0,81	<0,001
Σ PUFA n-6	1,06	1,25	1,42	1,66	1,97	0,18	0,82	<0,001
Σ n-3 + n-6	2,35	2,21	2,30	2,49	2,65	0,36	0,15	0,304
Σ LC PUFA n-3	0,89	0,59	0,50	0,47	0,33	0,18	0,84	0,000
Σ LC PUFA n-6	0,33	0,29	0,36	0,45	0,50	0,06	0,60	0,014
n-3/n-6	1,22	0,76	0,62	0,50	0,35	0,14	0,95	<0,001

<sup>1</sup>Ácidos graxos detectados mas não exibidos: 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0, 14:1n-5, 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-11, 20:1n-9 22:1n-9, 24:1n-9, 16:3n-4, 20:4n-3.

<sup>2</sup>Grupos de ácidos graxos: SFA = ácidos graxos saturados, MUFA = ácidos graxos monoinsaturados, PUFA n-3 = ácidos graxos poli-insaturados da série n-3, PUFA n-6 = ácidos graxos poli-insaturados da série n-6.

<sup>3</sup> Erro padrão da média combinado.

<sup>4</sup> As regressões lineares das médias dos tratamentos geraram as seguintes equações: % total de ácidos graxos: 18:2n6 =  $-0,995x + 5,817$ , 18:3n6 =  $0,022x + 0,146$ , 20:2n6 =  $-0,029x + 0,2667$ , 22:4n6 =  $-0,098x + 0,451$ , 18:3n3 =  $0,101x + 0,966$ , 20:3n3 =  $0,324x + 0,083$ , 20:5n3 =  $-0,050x + 0,398$ , 22:5n3 =  $0,227x + 0,179$ , 22:6n3 =  $0,450x + 0,603$ , PUFA n-3 =  $1,084x + 2,742$ , PUFA n-6 =  $-1,160x + 7,793$ , LC PUFA n-3 =  $0,971x + 1,255$ , LC PUFA n-6 =  $-0,192x + 1,852$ , Relação n-3/n-6 =  $0,319x + 0,299$ . g 100g<sup>-1</sup> de matéria seca: 18:2n6 =  $-0,235x + 1,317$ , 20:2n6 =  $-0,007x + 0,061$ , 20:4n6 =  $-0,013x + 0,140$ , 22:4n6 =  $-0,027x + 0,113$ , 18:3n3 =  $0,020x + 0,218$ , 20:3n3 =  $0,070x + 0,020$ , 20:5n3 =  $-0,012x + 0,090$ , 22:5n3 =  $0,049x + 0,041$ , 22:6n3 =  $0,097x + 0,140$ , PUFA n-3 =  $0,229x + 0,621$ , PUFA n-6 =  $-0,282x + 1,776$ , LC PUFA n-3 =  $0,208x + 0,290$ , LC PUFA n-6 =  $-0,052x + 0,430$ , Relação n-3/n-6 =  $0,321x + 0,296$ .

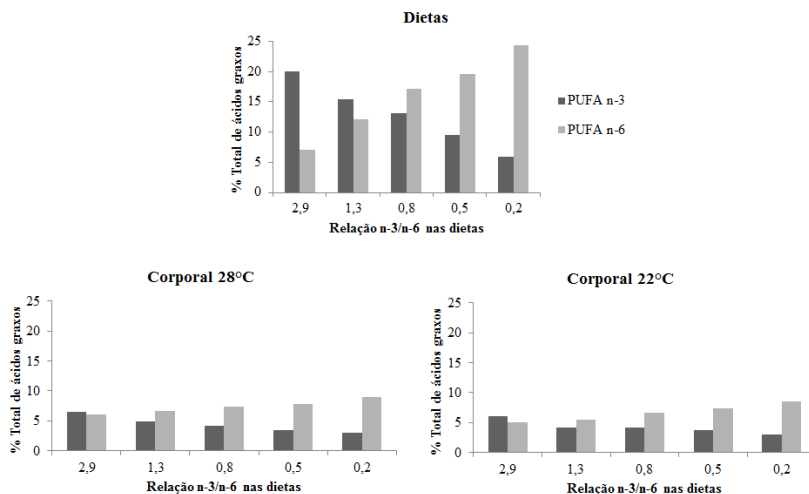


Figura 2. Porcentagem de PUFA n-3 e PUFA n-6 nas dietas e no perfil de ácidos graxos corporal de juvenis de tilápia-do-Nilo, alimentados com diferentes relações n-3/n-6 a 28 °C e 22 °C por 56 e 33 dias, respectivamente.

### 3.4.3 Expressão de genes envolvidos na dessaturação de ácidos graxos e de fatores de transcrição nucleares

A expressão do gene da enzima  $\Delta 6$  dessaturase (Figura 3) no fígado dos peixes que receberam a dieta com relação n-3/n-6 de 0,2, mostrou variação entre as temperaturas, sendo mais expressivo a 22 °C. No entanto, não ocorreu o mesmo com a dieta com relação n-3/n-6 de 2,9. Não houve diferença significativa entre as duas dietas na expressão do gene FAD6 no fígado de tilápias.

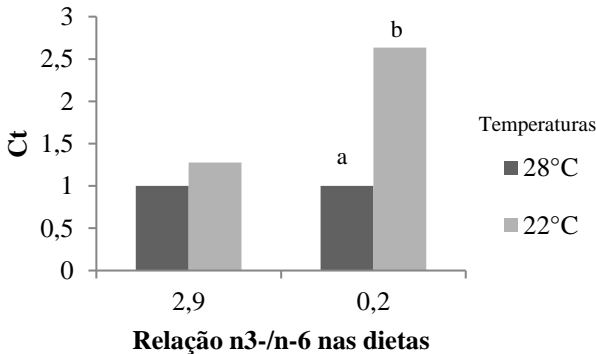


Figura 3. Efeito das diferentes relações de PUFA n-3/n-6 dietéticas e das temperaturas (28 e 22 °C) na expressão do gene FAD6 em *O. niloticus* no tecido hepático. As letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as temperaturas para a dieta com relação de PUFA n-3/n-6 de 0,2. Ct = *threshold cycle*.

O comportamento do fator de transcrição nuclear para o gene SREBP 1 mostrou uma variação significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparado àquele apresentado pelos peixes alimentados com dietas com relação n-3/n-6 2,9 e 0,2 a 28 °C, com maior expressão no fígado dos peixes que receberam a dieta com relação n-3/n-6 de 0,2. Não foi detectada variação significativa entre as dietas a 22 °C, nem entre as temperaturas.

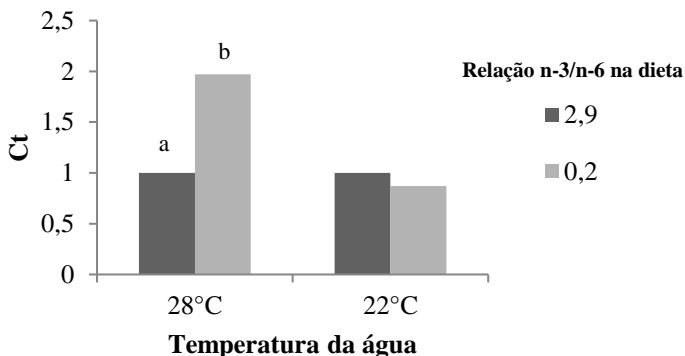


Figura 4. Efeito das diferentes relações de PUFA n-3/n-6 dietéticas e das temperaturas (28 e 22 °C) na expressão do gene SREBP1 no tecido hepático de *O. niloticus*. As letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas com diferentes relações n-3/n-6, a 28 °C. Ct = *threshold cycle*.

### 3.5 Discussão

O crescimento de juvenis de tilápia-do-Nilo não apresentou regressão significativa quando estes foram alimentados com diferentes relações dietéticas de PUFA n-3/n-6, tanto em temperatura ótima, como na simulação de entrada do inverno. Isto sugere que a série dos ácidos graxos (posição da primeira ligação dupla na cadeia) que compõem a dieta não afeta o crescimento, considerando-se que uma concentração de PUFA de aproximadamente 1,3% do total de ácidos graxos foi mantida em todas as dietas.

Resultado similar foi relatado por Bozaoglu e Bilguven (2012), onde o crescimento de juvenis de *Oreochromis niloticus* não sofreu alterações, quando estes foram alimentados por 14 semanas a 22 °C com diferentes fontes lipídicas. Isso também foi registrado para a tilápia híbrida vermelha (*Oreochromis sp.*), quando se avaliou a substituição do óleo de peixe por vários óleos vegetais, com relações n-3/n-6 variando de 5,35 a 0,02 nas dietas (Teoh e Ng, 2016).

Entretanto, estes resultados diferem daqueles relatados por Nobrega et al. (2017), que testaram níveis crescentes de  $\alpha$  LNA (18:3 n-3) e, conseqüentemente, níveis crescentes da relação n-3/n-6, para juvenis de tilápia-do-Nilo, em temperatura subótima, a 22 °C. Neste

caso, houve diferença no crescimento, sendo que a dieta que continha relação n-3/n-6 igual a 1,22 (variando de 0,57 a 1,51%) proporcionou os melhores resultados.

Chen et al. (2013), testaram diferentes quantidades de LOA e  $\alpha$ -LNA para tilápia-do-Nilo em temperatura ótima (28 °C) e registraram que, peixes alimentados com a dieta contendo 0,63% de  $\alpha$ -LNA mais 0,62% de LOA – perfazendo um total de PUFA na dieta de 1,02%, – apresentaram o melhor desempenho produtivo. Corrêa et al. (2017) mantiveram o somatório de PUFA entre 1,13 e 1,24% do peso seco de dietas com diferentes fontes lipídicas, e também relataram que essa variação não alterou o desempenho da tilápia-do-Nilo a 28° C. Já, Li e colaboradores (2013) afirmaram que valores próximos a 1,14% para total de PUFA, são necessários para atender a exigência em ácidos graxos essenciais da tilápia híbrida (*O. niloticus* x *O. aureus*), em temperatura ótima.

Portanto, apesar de algumas discrepâncias entre os resultados destes estudos, todos encontraram que a concentração dietética total de PUFA de 1,0 a 1,3% do total de ácidos graxos é importante para o crescimento adequado das tilápias, quando em temperatura ótima de criação.

A conversão alimentar da tilápia foi melhor a 28 °C do que a 22 °C. Resultado esperado, pois a temperatura da água determina o consumo de alimento (Jobling, 1997; Bowyer et al., 2012). Juvenis de tilápia-do-Nilo apresentam melhor crescimento e aproveitamento do alimento entre 26 e 30 °C, enquanto que, nas temperaturas extremas de 22 e 34 °C há queda no desempenho (Azaza et al., 2008). Entretanto, no presente estudo não houve diferenças significativas no crescimento dos peixes alimentados com as diferentes relações n-3/n-6, diferente do relatado por Sarker et al. (2016), cujo estudo mostrou que a maior relação n-3/n-6 afetou negativamente a conversão alimentar de tilápia-do-Nilo, quando criada em temperatura ótima.

No presente estudo, foi registrado maior consumo de alimento a 22 °C para os peixes alimentados com a dieta com a menor relação (0,2) de PUFA n-3/n-6. Semelhante a este resultado, Nobrega et al. (2017) registraram maior consumo de alimento em peixes alimentados com o menor nível de inclusão de  $\alpha$ -LNA (n-3/n-6 igual a 0,05). O maior consumo alimentar provavelmente ocorreu na tentativa de compensar a deficiência em PUFA n-3 ou  $\alpha$ -LNA, respectivamente, nas dietas com menor relação n-3/n-6, em ambos os estudos.

A diminuição dietética da relação de PUFA n-3/n-6, resultou no aumento do conteúdo de gordura corporal nos peixes, a 28 °C.

Resultado semelhante foi relatado quando se testaram diferentes fontes de lipídios na dieta de tilápia-do-Nilo, a 25 °C e 28°C, e a maior deposição de gordura no músculo ocorreu nos peixes que receberam dietas ricas em n-6 (menor relação n-3/n-6) (Ribeiro, et al. 2008; Chen et al., 2013). A maior atividade das enzimas lipogênicas é favorecida pela composição dos ácidos graxos presentes nas dietas ricas em PUFA n-6, aumentando a deposição lipídica (Ribeiro et al., 2008). Provavelmente, este acúmulo de lipídio corporal nos peixes que receberam dietas ricas em n-6 (menor relação PUFA n-3/n-6), se deve ao fato da tilápia ser uma espécie de água quente, que necessita principalmente de PUFA n-6 na dieta (Tocher, 2010).

De modo geral, a composição do perfil de ácidos graxos de juvenis de tilápia-do-Nilo criados em temperatura ótima e subótima, seguiram a composição das dietas, as quais possuíam quantidades similares de SFA, MUFA e PUFA, diferindo apenas nas proporções de PUFA n-3 e n-6. Resultados similares foram relatados por Justi et al. (2005), onde os totais de SFA, MUFA e PUFA no perfil corporal da tilápia-do-Nilo permaneceram inalterados, independente das temperaturas testadas (23 a 32°C).

Os ácidos graxos da série n-6 com maior acúmulo corporal significativo foram o LOA (18:2 n-6) e o ARA (20:4 n-6), variando de (em porcentagem do total de ácidos graxos) 4,46 a 6,60 e 0,55 a 0,78 a 28 °C e 3,15 a 6,24 e 0,53 a 0,73 a 22 °C, respectivamente. Isso sugere que 33 dias em temperatura subótima (simulação de entrada de inverno) não é tempo suficiente para alterar significativamente a composição corporal de ácidos graxos.

O ARA apresentou quantidades decrescentes nas dietas à medida que a relação n-3/n-6 diminuiu, mas aumentou no perfil de ácidos graxos corporal. Provavelmente, o acúmulo corporal do ARA é proveniente de biossíntese, pela presença na dieta do seu precursor, o LOA (18:2n-6). Da mesma forma, os outros LC-PUFA acumulados no corpo podem ser obtidos através da dessaturação e alongação de PUFAs como o  $\alpha$ -LNA e LOA (Tocher, 2010).

A concentração dos n-3 PUFA encontrados em maiores quantidades no perfil de ácidos graxos corporal das tilápias ( $\alpha$ -LNA, DHA, 20:3 n-3 e DPA) diminuiu, de forma linear, com a redução da relação n-3/n-6 nas dietas, em ambas as temperaturas. A concentração dos n-3 PUFA encontrados em maiores quantidades no perfil de ácidos graxos corporal das tilápias ( $\alpha$ -LNA, DHA, 20:3 n-3 e DPA) diminuiu, de forma linear, com a redução da relação n-3/n-6 nas dietas, em ambas as temperaturas. Resultados similares foram relatados por outros autores

(Chen et al., 2016; Li et al., 2016), quando tilápia foi criada em temperatura ótima.

Entretanto, conforme diminuiu a concentração do ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3) nas dietas, houve aumento no EPA corporal de 39,00% e 14,64% (a 28 °C e 22 °C, respectivamente). Essa maior e rápida retenção do EPA sugere que esse ácido graxo tenha uma grande importância para a tilápia. Uma maior retenção de EPA já foi relacionada com o uso de óleo de soja, rico em ácidos graxos da série n-6, como fonte lipídica na dieta de pargo (*Pagrus auratus*) (Glencross et al., 2003), peixe marinho com maior exigência que a tilápia, para ácidos graxos da série n-3.

A retenção corporal de EPA também foi significativamente afetada pelo aumento do nível de inclusão de DHA na dieta juvenis de barramundi (*Lates calcarifer*) (Glencross e Rutherford, 2011). Neste mesmo estudo, a adição de ARA à dieta estimulou ainda mais a retenção de EPA. Isto demonstra a importância da relação entre os ácidos graxos na dieta com o metabolismo nos peixes (Bell e Sargent, 2003). Alguns ácidos graxos podem ser retidos no corpo preferencialmente em relação a outros, dependendo da sua oferta na dieta e importância no metabolismo da espécie, conforme observado no presente estudo.

A enzima  $\Delta 6$  dessaturase está envolvida na biossíntese de LC-PUFA a partir de ácidos graxos precursores de 18 carbonos como o LOA e o  $\alpha$ -LNA (Glencross, 2009) um dos mecanismos de adaptação específicos dos peixes para manter a homeostase fisiológica do organismo em temperatura ambiente mais baixa do que o adequado para a espécie (Weber e Bosworth, 2005) é o aumento dos níveis de insaturação dos ácidos graxos presentes nos fosfolipídios que compõe as membranas celulares, pois quanto maior o número de insaturações, menor será o ponto de fusão, mantendo a funcionalidade das membranas mesmo em baixas temperaturas (Turchini et al., 2010).

Em estudo com a espécie tropical herbívora *Scatophagus argus*, sobre a regulação nutricional da  $\Delta 6$  dessaturase, quando alimentadas com dietas que continham óleo de peixe e dois óleos vegetais, observou-se que o excesso de 18:3 n-3 poderia bloquear a transcrição do gene FAD6 (Xie et al., 2014). Isto sugere a importância da manutenção de uma proporção adequada entre LNA/LOA em dietas para atender às exigências de ácidos graxos essenciais para um desenvolvimento normal dessa espécie (Xie et al., 2014). Portanto, talvez tenha ocorrido um mecanismo similar no presente estudo com a tilápia nilótica, onde a expressão do gene da enzima  $\Delta 6$  dessaturase no fígado dos peixes que receberam a dieta com relação n-3/n-6 de 0,2, mostrou variação entre as



temperaturas, sendo mais expressivo a 22°C. Estudo sobre os diferentes genes envolvidos nos mecanismos de adaptação ao estresse térmico em tilápia-do-Nilo mostrou que a expressão da FAD2 (gene funcionalmente similar ao FAD6) é inibida em temperatura subótima alta (37,5°C) de criação em relação a 28°C (Quiang et al., 2017). Já foi relatado, em tilápia nilótica, maior atividade da enzima  $\Delta 6$  dessaturase, na conversão biológica dos ácidos graxos da série n-6 em comparação aos ácidos graxos da série n-3 (Tanomman et al., 2013).

Houve também variação significativa na expressão do gene SREBP1, com maior expressão no fígado dos peixes que receberam a dieta com menor relação n-3/n-6, a 28°C. Esse gene pertence a uma família de fatores de transcrição, que funciona como um regulador da síntese e transporte de colesterol e ácidos graxos no corpo e fígado de mamíferos e peixes (Leaver et al., 2011; Minghetti et al., 2011; Jump et al., 2013). Neste estudo, constatou-se que a diminuição da quantidade de DHA na dieta é seguida pelo aumento da expressão do gene SREBP1, o que já era esperado, pois o DHA é reconhecido como um regulador deste gene: quanto menor os níveis de DHA corporal maior a expressão do gene SREBP1 (Jump et al., 2013).

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que uma dieta com total de PUFA de 1,30 (g 100g<sup>-1</sup> de matéria seca) independente da relação n-3/n-6 não afeta o desempenho produtivo de juvenis de tilápia-do-Nilo, quando mantidos em temperatura ótima (28 °C) e em simulação da entrada de inverno (22 °C). Também observamos que a atividade da enzima  $\Delta 6$  dessaturase é afetada com a mudança de temperatura quando a tilápia é alimentada com dieta rica em ácidos graxos da série n-6. Em temperatura ótima, a síntese de ácidos graxos (expressão do gene SREBP1) foi maior quando as tilápias foram alimentadas com a dieta rica em n-6. Estudos adicionais são necessários para um melhor entendimento da síntese e metabolismo dos ácidos graxos da série-n-3 e da série n-6 na tilápia-do-Nilo.

### 3.6 Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida à primeira autora. À Cargill Nutrição Animal no Brasil - Nutron por contribuir com o premix mineral e vitamínico para as dietas experimentais. Agradecimento também são devidos ao Dr. Marcelo Maraschin, coordenador do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC, pelo compartilhamento de

equipamentos na análise de ácidos graxos. Agradecemos especialmente ao Dr. David Menoyo Luque (Departamento de Produção Animal da Universidade Politécnica de Madri, Espanha) pela colaboração nas análises de expressão gênica.

### 3.7 Referências

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1997. In: Cunniff, P.A. (E.), Official Methods of Analysis of the AOAC International, 17th edn. AOAC International, Arlington, VA, USA.

Azaza, M. S., Dhraïef, M. N., Kraïem, M. M., 2008. Effects of water temperature on growth, sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *Journal of Theoretical Biology* 33, 98-105.

Bell, J. G., Sargent J. R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status, future opportunities. *Aquaculture* 218, 491-499.

Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., Stone, D. A. J., 2012. Replacement of fish oil by poultry oil, canola oil yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at optimal , suboptimal temperatures. *Aquaculture* 356-357, 211-222.

Bozaoglu, S. A., Bilguven, M., 2012. The effects of diferente oils sources on the growth performance, body compstion of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) *Journal of Animal , Veterinary Advances* 11, 853-857.

Charo-Karisa, H., Rezk, M. A., Bovenhuis, H., Komen, H., 2005. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. *Aquaculture* 249, 115-123.

Chen, C., Sun, B., Li, X., Li, P., Wutai, G., Bi, Y., 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.

Chen, C., Sun, B., Guan, W., Bi, Y., Li, P., Ma, J., Chen, F., Pan, Q., Xie, Q., 2016. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis*

*niloticus*: Effects of linolenic acid on non-specific immunity, anti-inflammatory responses in juvenile fish. *Aquaculture* 450, 250-257.

Chou, B. S., Shiau, S. Y., 1999. Both n-6, n-3 fatty acids are required for maximal growth of juvenile hybrid tilapia. *North American Journal of Aquaculture* 61, 13-20.

Corrêa, C. F., Nobrega, R. O., Mattioni, B., Block, J. M., Fracalossi, D. M., 2017. Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal, cold, suboptimal temperatures. *Aquaculture Nutrition* 1-11.

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., Fougère, F., 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839-848.

FAO, 2017. *Fisheries and Aquaculture Statistics 2015*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, (104 p).

FAO, 2016. *The State of World Fisheries, Aquaculture 2016*. Food, Agriculture Organization of the United Nations, Rome (224 p).

FAO, 2015. *Fishery Statistical Collections: Global Aquaculture Production*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en> (acessado em: 06/12/2017).

FAO, 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture: 2014*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, (223 p).

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

Glencross, B. D., Hawkins, W. E., Curnow, J. G., 2003. Restoration of the fatty acid composition of red seabream (*Pagrus auratus*) after grow-out on plant oil based diets. *Aquaculture Nutrition* 9, 409-418.

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

Glencroos, B., Rutherford N., 2011. A determination of the quantitative requirements for docosahexaenoic acid for juvenile barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition* 17, 536-548.

Hsieh, S. L., Hu, C. Y., Hsu, Y. T., Hsieh, T. J., 2007. Influence of dietary lipids on the fatty acid composition, stearoyl-CoA desaturase expression in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) under cold shock. *Comparative Biochemistry, Physiology Part B: Biochemistry*, *Molecular Biology* 147, 438-444.

IBGE, 2013. Produção da pecuária municipal 2013. Instituto Nacional De Geografia e Estatística (Brasil), Rio de Janeiro (103 pp).

IBGE, 2015. Produção da pecuária municipal 2015. Instituto Nacional De Geografia E Estatística (Brasil), Rio de Janeiro (47 pp).

IBGE, 2016. Produção da pecuária municipal 2016. Instituto Nacional De Geografia E Estatística (Brasil), Rio de Janeiro, (28 pp).

Ingerslev H. C., Pettersen E. F., Jakobsen R. A., Petersen C.B., Wergel, H.I., 2006. Expression profiling, validation of reference gene c, idates in immune relevant tissues , cells from Atlantic salmon (*Salmo salar L*). *Molecular Immunology* 43, 1194-1201.

Jobling, M., 1997. Temperature, growth: modulation of growth rate via temperature change. In: Wood, C.M., McDonald, D.G. (Eds.), *Global Warming: Implications for Freshwater, Marine Fish*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 225–253.

Jump, D. B., Tripathy, S., Depner, C. M., 2013. Fatty acid–regulated transcription factors in the liver. *Annual Review of Nutrition* 33, 249-269.

Justi, K. C., Padre, R. G., Hayashi, C., Soares, C. M., Visentainer, J. V., Souza, N. E., Matsushita, M., 2005. Efeito da temperatura da agua sobre desempenho e perfil de ácidos graxos de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum Animal Sciences* 27, 529-534.

Leaver, M. J., Taggart J. B., Villeneuve, L., Bron, J. E., Guy, D. R., Bishop, S. C., Houston, R. D., Matika, O., Tocher, D. R., 2011. Heritability, mechanisms of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid

deposition in the flesh of Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry , Physiology* 6, 62-69.

Li, E., Lim, C., Klesius, P. H., Welker, T. L., 2013. Growth, body fatty acid composition, immune response, resistance to *Streptococcus iniae* of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*, fed diets containing various levels of linoleic, linolenic acids. *Journal of the World Aquaculture Society* 44, 42-55.

Li, F. J., Lin, X., Lin, S. M., Chen, W. Y., Guan, Y., 2016. Effects of dietary fish oil substitution with linseed oil on growth, muscle fatty acid, metabolism of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition* 22, 499-508.

Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P., 2011. Lipid, fatty acid requirements of tilapias. *North American Journal of Aquaculture* 73, 188-193.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression. Data using real-time quantitative PCR , the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25, 402-408.

Minghetti, M., Leaver, M. J., Tocher, D. R., 2011. Transcriptional control mechanisms of genes of lipid, fatty acid metabolism in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) established cell line, SHK-1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811, 194-202.

Moro, G. V.; Rezende, F. P.; Alves, A. L.; Hashimoto, D. T.; Varela, E. S.; Torati, L. S., 2013. Espécies de peixes para piscicultura. In: *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos*. Ana Paula Oedes Rodrigues, Adriana Ferreira Lima, Anderson Luís Alves, Daniele Kloppel Rosa, Lucas Simon Torati e Viviane Rodrigues Verdolin dos Santos (Editores), Brasília, DF: Embrapa, p.29-70, 2013.

Nobrega, R. O., Corrêa, C. F, Mationi, B., Fracalossi, D. M., 2017. Dietary  $\alpha$ -linolenic for juvenile Nile tilapia at cold suboptimal temperature. *Aquaculture* 471, 66-71.

NRC (National Research Council), 2011. *Nutrient Requirements of Fish, Shrimp*. National Academic Press, Washington, DC (360p).

O'Fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L., Gaskins, C. T. A., 2007. Direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, feedstuffs. *Journal of Animal Science* 85, 1511-1521.

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

Qiang, J., Bao, W. J., Tao, F. Y., He, J., Li, X. H., Xu, P., Sun, L.Y., 2017. The expression profiles of miRNA–mRNA of early response in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver by acute heat stress. *Scientific Reports* 7, e8705.

Ribeiro, P. A. P., Logato, P. V. R., Paula, D. A. J., Costa, A. C., Murgas, L. D. S., Freitas, R. T. F., 2008. Effect of different oils in the diet on lipogenesis , the lipid profile of Nile tilapias. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37, 1331-1337.

Ruxton, C. H. S., Calder, P. C., Reed, S. C., Simpson, M. J. A., 2005. The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutrition Research Reviews* 18, 113-129.

Sargent, J. R., Tocher, D. R., Bell, J. G., 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, third ed. Academic Press, San Diego, pp. 181-257.

Sarker, P. K., Kapuscinski, A. R., Lanois, A. J., Livesey, E. D., Bernhard, K.P., Coley, M. L. 2016. Towards Sustainable Aquafeeds: Complete Substitution of Fish Oil with Marine Microalga *Schizochytrium* sp. Improves Growth, Fatty Acid Deposition in Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One* 11, e0156684.

Siscovick, D. S., Raghunathan, T., King, I., Weinmann, S., Bovbjerg V. E., Kushi L., Cobb L. A., Copass M., Psaty, B. M., Lemaitre, R., Retzlaff, B., Knopp, R. H., 2000. Dietary intake of long-chain n–3 polyunsaturated fatty acids , the risk of primary cardiac arrest. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71, 208-212.

Steibel, J. P., Poletto, R., Coussens, P. M., Rosa, G. J. M., 2009. A powerful, flexible linear model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 94, 146-152.

Tanomman, S., Cairns, M. K., Jangprai, A., Boonanuntasarn, S., 2013. Characterization of fatty acid delta-6 desaturase gene in Nile tilapia, heterogenous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative Biochemistry, Physiology* 166, 148-156.

Teoh, C. Y., Ng W. K., 2016. The implications of substituting dietary fish oil with vegetable oils on the growth performance, fillet fatty acid profile, modulation of the fatty acid elongase, desaturase, oxidation activities of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.* *Aquaculture* 465, 311-322.

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

Tocher, D. R. and Glencross, B. D., 2015. Lipids and Fatty Acids. In: *Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health*, Cheng-Sheng Lee, Chhorn Lim, Delbert. M. Gatlin and Carl D. Weebster (Editors). John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, p.47- 94, 2015.

Turchini, G. M., Ng, W. K., Tocher, D. R. (Eds.), 2010. *Fish Oil Replacement, Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*. 1. Ed. New York: CRC Press, 2010, 551p.

Visentainer, J.V., Franco, M.R.B., 2006. In: Visentainer, J.V., Franco, M.R.B. (Eds.), *Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação*. Varela, São Paulo (120 p).

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

Weber, T.E., Bosworth, B.G., 2005. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, expression of genes related to muscle growth, metabolism in channel catfish. *Aquaculture* 246, 483-492.

Xie, D., Chen, F., Lin, S., Wang, S., You, C., Monroig, O., Tocher, D. R., Li, Y., 2014. Cloning, Functional Characterization, Nutritional Regulation of D6 Fatty Acyl Desaturase in the Herbivorous Euryhaline Teleost *Scatophagus Argus*. *PLoS One* 9, e90200.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AZAZA, M. S.; DHRAÏEF, M. N.; KRAÏEM, M. M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal Of Thermal Biology**, v. 33, p.98-105, 2008.

BLANCHARD, G.; MAKOMBU, J. G.; KESTEMONT, P. Influence of different dietary 18:3n 3/18:2n-6 ratio on growth performance, fatty acid composition and hepatic ultrastructure in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. **Aquaculture**, v. 284, p.144-150, 2008.

CHARO-KARISA, H.; REZK, M. A.; BOVENHUIS, H.; KOMEN, H. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. **Aquaculture**, v. 249, p.115-123, 2005.

CHEN, C.; SUN, B.; LI, X.; LI, P.; WUTAI, G.; BI, Y.; PAN, Q. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: quantification of optimum requirement of dietary linolenic acid in juvenile fish. **Aquaculture**, v.417, p.99-104, 2013.

CHEN, C.; SUN, B.; GUAN, W.; BI, Y.; LI, P.; MA, J.; CHEN, F.; PAN, Q.; XIE, Q. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Effects of linolenic acid on non-specific immunity and anti-inflammatory responses in juvenile fish. **Aquaculture**, v.450, p. 250-257, 2016.

CHOU, B. S. e 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.

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**, p.1-11, 2017.

EBERLÉ, D.; HEGARTY, B.; BOSSARD, P.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, p.839-848, 2004.



FAO, 2017. **Fisheries and Aquaculture Statistics 2015**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2017, 104 p.

FAO, 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture: 2016**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2016, 224 p.

FAO, 2015. **Fishery Statistical Collections: Global Aquaculture Production**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en> (acessado em: 06/12/2017).

FAO, 2014. **The State of World Fisheries and Aquaculture: 2014**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2014, 223 p.

FURUYA, W. M., 2010. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Furuya W. M. (Ed.), Toledo, 2010, 100 p.

FURUYA, W. M.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; CYRINO, J. E. P., 2012. Exigências nutricionais e alimentação da tilápia. In: Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura. Débora Machado Fracalossi e José Eurico Possebon Cyrino (Editores), Florianópolis: Aquabio, p.255-268, 2012.

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

HE, A. Y.; NING, L. J.; CHEN, L. Q.; CHEN, Y. L.; XING, Q.; LI, J. M.; QIAO, F.; LI, D. L.; ZHANG, M. L.; DU, Z. Y. Systemic adaptation of lipid metabolism in response to low- and high-fat diet in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) **Physiological Reports**, v. 3, 18 p, 2015.

IBGE, 2013 Instituto Nacional De Geografia e Estatística (Brasil). **Produção da pecuária municipal 2013**. IBGE, Rio de Janeiro, 2015, v. 41, 103 p.

IBGE, 2015 Instituto Nacional De Geografia E Estatística (Brasil). **Produção da pecuária municipal 2015**. IBGE, Rio de Janeiro, 2015, v. 43, 47 p.

IBGE, 2016 Instituto Nacional De Geografia E Estatística (Brasil). **Produção da pecuária municipal 2016**. IBGE, Rio de Janeiro, 2015, v. 44, 28 p.

LIM, C.; YLDIRIM-AKSOY, M. and KLESIUS P. Lipid and fatty acid requirements of Tilapias. **North American Journal of Aquaculture**. v.73, p. 188-193, 2011.

MORO, G. V.; REZENDE, F. P.; ALVES, A. L.; HASHIMOTO, D. T.; VARELA, E. S.; TORATI, L. S., 2013. Espécies de peixes para piscicultura. **In:** Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos. Ana Paula Oedes Rodrigues, Adriana Ferreira Lima, Anderson Luís Alves, Daniele Kloppel Rosa, Lucas Simon Torati e Viviane Rodrigues Verdolin dos Santos (Editores), Brasília, DF: Embrapa, p.29-70, 2013.

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

NRC (National Research Council). **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, DC.: National Academic Press, 2011, 360 p.

RUXTON, C. H. S.; CALDER, P. C.; REED, S. C.; SIMPSON, M. J. A. The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. **Nutrition Research Reviews**. v. 18, p.113-129, 2005.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G., 2002. The lipids. **In:** Fish Nutrition. Halver, J. E., Hardy, R.W. (Editors), 3 ed. Elsevier: Academic Press, San Diego, California, USA. p. 181-257, 2002.

SIMOPOULOS, P. Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. **Poultry Science**, v. 79, p.961-970, 2000.

SISCOVICK, D. S.; RAGHUNATHAN, T.; KING, I.; WEINMANN, S.; BOVBJERG V. E.; KUSHI L.; COBB L. A.; COPASS M.; PSATY, B. M.; LEMAITRE, R.; RETZLAFF, B.; KNOPP, R. H. Dietary intake of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p.208-212, 2000.

TANOMMAN, S.; CAIRNS, M. K.; JANGPRAI, A.; BOONANUNTANASARN, S. Characterization of fatty acid delta-6 desaturase gene in Nile tilapia and heterogenous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 166, p.148-156, 2013.

TOCHER, D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science**, v. 11, p.107-184, 2003.

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

TOCHER, D. R. and GLENCROSS, B. D., 2015. Lipids and Fatty Acids. **In: Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health**, Cheng-Sheng Lee, Chhorn Lim, Delbert. M. Gatlin and Carl D. WEebster (Editors). John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, p.47- 94, 2015.

TURCHINI, G. M.; TORSTENSEN, B. E.; NG, W. K. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, p.10-57, 2009.

TURCHINI, G. M.; NG, W. K.; TOCHER, D. R. **Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds**. 1. Ed. New York: CRC Press, 2010, 551p.

WEBER, T. E. and BOSWORTH, B. G. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. **Aquaculture**, v. 246, p. 483-492, 2005.