



UNIVERSIDADE  
Nilton Lins

UNIVERSIDADE NILTON LINS  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**FARINHA DE MICROALGA EM DIETAS PARA TAMBAQUI COMO  
ESTRATÉGIA PARA INCREMENTAR O TEOR DO ÁCIDO  
DOCOSAHEXAENOICO**

CARLOS ANDRE AMARINGO CORTEGANO

Manaus, Amazonas  
Junho, 2016

CARLOS ANDRE AMARINGO CORTEGANO

**FARINHA DE MICROALGA EM DIETAS PARA TAMBAQUI COMO  
ESTRATÉGIA PARA INCREMENTAR O TEOR DO ÁCIDO  
DOCOSAHEXAENOICO**

ORIENTADOR: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. LIGIA URIBE GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Nilton Lins e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obter o título de Mestre em Aquicultura.

Manaus, Amazonas  
Junho, 2016

## **BANCA JULGADORA**

Membros titulares:

---

Dr. Rogério Souza de Jesus - INPA  
Presidente da banca julgadora

---

Dr.<sup>a</sup>. Alzira Miranda de Oliveira - INPA/UNINILTONLINS  
Membro da banca julgadora

---

Dr. Antonio José Inhamuns da Silva - UFAM  
Membro da banca julgadora

Membro suplente:

---

Dr. Jony Koji Dairiki - EMBRAPA

## Ficha catalográfica

C827f Cortegano, Carlos Andre Amaringo

Farinha de microalga em dietas para tambaqui como estratégia para incrementar o teor do ácido Docosaheptaenoico. / Carlos Andre Amaringo Cortegano. - Manaus: UNL, 2016.

33f.; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Nilton Lins, Manaus, 2016.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ligia Uribe Gonçalves.

1. *Colossoma Macropomum*. 2. *Shizochytrium* sp. 3. Nutracêutico. 4. n-3:n-6. I. Título. II. Universidade Nilton Lins.

CDU 639.3

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária: Pollyanna Batalha da Rocha – CRB 11/759 - Biblioteca Central Universidade Nilton Lins.

### **Sinopse:**

Estudou-se o efeito da inclusão da farinha de microalga, derivada de *Shizochytrium* sp. e rica em ácido docosaheptaenoico, na dieta de tambaqui sobre o crescimento dos peixes e o perfil de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa no filé, estabelecendo-se o prazo mínimo de fornecimento da dieta que promova o incremento no teor desses ácidos graxos no filé de tambaqui e, conseqüentemente, melhore a qualidade nutricional do peixe.

**Palavras-chave:** *Colossoma macropomum*, *Shizochytrium* sp., nutracêutico, n-3:n-6.

## **DEDICATÓRIA**

*À minha mãe: Betsabeth Cortegano Chota. A  
pessoa que acreditou, acredita e sempre  
acreditará em mim.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Nilton Lins em ampla associação com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pela oportunidade.

Ao INPA por abrir suas portas e permitir desenvolver o meu trabalho de pesquisa nas suas instalações.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ligia Uribe Gonçalves, pela orientação, ensinamentos e, sobretudo, por ter acreditado em mim.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Gusmão Affonso, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, pelo apoio e confiança durante o mestrado.

À Alltech pela doação da farinha de microalga utilizada neste experimento, em especial a Mariana Nagata, gerente de vendas em aquicultura da Alltech no Brasil.

Ao Prof. Dr. Rogério Souza de Jesus por ter disponibilizado as instalações do Laboratório de Tecnologia de Pescado do INPA para o processamento e obtenção dos filés dos peixes.

Ao Sr. Ribamar Benício Castro por ter me auxiliado exaustivamente na filetagem dos peixes durante todo o experimento.

Aos docentes do curso, em especial aos professores Dr. Leandro Cesar de Godoy e Dr<sup>a</sup>. Gabriela Tomas Jerônimo, pelo apoio em algumas fases do mestrado.

Ao Prof. Dr. Jesuí Virgílio Visentainer e à Vanessa Jorge dos Santos, por terem feito as análises de ácidos graxos.

Ao César Oishi, pelo apoio no manejo da máquina de extrusão para a elaboração das dietas experimentais.

Aos funcionários do INPA do setor COTI/CPAQ, em especial ao Daniel Locatelli Santos, Maria Inez de Oliveira Pereira, Yoshiko Otsuka Kawashima, Gabriel da Rocha Filho e Atilio Storti Filho, pela colaboração durante o mestrado.

À Allana Feitoza da Silva, aluna de iniciação científica e minha grande parceira no experimento, pelo apoio no cuidado e alimentação dos peixes, assim como na limpeza das caixas d'água e coletas de filé.

Ao Dr. Janilson Felix da Silva, pela amizade, ensinamentos e apoio durante o mestrado.

Aos membros do Laboratório de Nutrição de Peixes e do Grupo de Pesquisas Aquicultura na Amazônia Ocidental do INPA, pelo apoio nas coletas e biometrias durante o experimento, em especial à Cláudia Maiza Fernandes Epifânio, Sunique Poá Cordeiro Bentes, Melquisedeque da Silva Ribeiro, Ícaro Nascimento Lima, Ana Beatriz de Sena Farias e Flávio Augusto Leão da Fonseca.

Aos meus amigos Mariluce dos Reis Ferreira, Kaila de Assis Cerdeira e Jefferson Barros Ferreira pela parceria e por estar ao meu lado durante todas as dificuldades.

À Ruby Vargas-Isla e ao João Bosco, pelo apoio brindado sempre.

À minha família e amigos, que estiveram do meu lado me apoiando de forma incondicional durante o mestrado.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

*Muito obrigado!*

*“Caminante, son tus huellas  
el camino y nada más;  
Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.  
Al andar se hace el camino,  
y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca  
se ha de volver a pisar.  
Caminante no hay camino  
sino estelas en la mar.”*

**Antonio Machado**

## RESUMO

Os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) são ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da série n-3 (AGPI-CL n-3) que apresentam importância para a saúde humana, contribuindo na prevenção de doenças cardiovasculares, mentais e da retina, além de potencializar a capacidade cognitiva. Os peixes são considerados a principal fonte de AGPI-CL n-3 na dieta dos humanos. No entanto, o uso de dietas vegetais para peixes de criação, principalmente onívoros, provoca mudanças no perfil de ácidos graxos, aumentando os níveis de linoleico e diminuindo os de EPA e DHA, reduzindo assim, o valor nutracêutico da carne de peixes provenientes da piscicultura. Sendo assim, é preciso desenvolver alternativas para melhorar o perfil de AGPI-CL n-3 em peixes de criação, sobretudo, aqueles de importância comercial e que se alimentam de dietas elaboradas com ingredientes vegetais, como é o caso do tambaqui *Collossoma macropomum*. Com isso, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de 5% da farinha de microalga (derivada de *Schizochytrium* sp.) em dietas para o tambaqui sobre o crescimento dos peixes e o perfil de AGPI-CL do filé. Para isso, foram elaboradas duas dietas isoproteicas (300 g de proteína bruta kg<sup>-1</sup>) e isocalóricas (4600 kcal de energia bruta kg<sup>-1</sup>): a dieta controle (sem suplementação de farinha de microalga) e a dieta suplementada com 5% de farinha de microalga. O experimento seguiu um desenho experimental inteiramente casualizado com esquema fatorial 2 × 7 (2 dietas e 7 tempos de amostragem), e três repetições. Tambaquis curumin (489,60±28,53 g; 28,55±0,30 cm) foram distribuídos em seis tanques de 2000 L (27 peixes por tanque) e alimentados com as duas dietas experimentais durante 90 dias. No 0, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup>, 60<sup>o</sup>, 75<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> dia, três peixes por tanque foram eutanasiados com dose letal de anestésico (benzocaína a 500 mg L<sup>-1</sup>) e pesados para acompanhamento do crescimento. Os peixes foram filetados e os filés destinados para análises do conteúdo de lipídeos totais e do perfil de ácidos graxos. A dieta suplementada com farinha de microalga não causou detrimento no crescimento. A inclusão da farinha de microalga em dietas de origem vegetal para tambaqui incrementa os níveis do DHA no filé, o qual foi percebido desde o 15<sup>o</sup> dia passando de 14,74±3,36 (dia 0) para 38,60±3,22 mg de DHA g<sup>-1</sup> do total de lipídeos (90<sup>o</sup> dia) . Além disso, melhora a relação n-3:n-6 e aumenta o valor nutracêutico da carne de peixe proveniente da piscicultura. É recomendada a elaboração de dietas específicas para a fase de terminação, com a inclusão de 5% de farinha de microalga, e seu oferecimento aos peixes antes do abate, por um tempo mínimo de 15 dias para garantir uma relação n-3:n-6 superior ao recomendado pela Organização Mundial da Saúde, ou por um período máximo de 71 dias para garantir a maior deposição de DHA no filé e oferecer peixes de maior valor nutracêutico na dieta dos humanos.

**Palavras-chave:** *Collossoma macropomum*, *Schizochytrium* sp., nutracêutico, n-3:n-6.

## ABSTRACT

### **Microalgae meal in diets for tambaqui as a strategy to increase the docosahexaenoic acid content**

The eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids are highly unsaturated fatty acids (n-3 HUFA) that are important for human health, contributing to the prevention of cardiovascular, mental and retinal diseases, as well as the improvement of the cognitive ability. Fish are considered the main source of n-3 HUFA for human diet. However, the use of plant-diets for farmed fish, especially omnivores, modify the fatty acid composition, increasing linoleic acid and reducing the EPA and DHA levels, and decreasing the nutraceutical value of the fish flesh. It is necessary to develop alternatives to improve the n-3 HUFA profile in farmed fish, especially those of commercial importance and fed with plant-diets, such as tambaqui *Colossoma macropomum*. We aimed to evaluate the effect of 5% microalgae meal supplementation in diets on tambaqui growth and its n-3 HUFA fillet profile. Thus, were prepared two isonitrogenous (300 g crude protein kg<sup>-1</sup>) and isocaloric (4600 kcal of gross energy kg<sup>-1</sup>) diets: a control diet (no microalgae meal supplementation) and a diet supplemented with 5% of microalgae meal. The experiment followed a completely randomized factorial design 2 × 7 (2 diets and 7 sampling times), with three replications. Tambaquis curumin (489.60±28.53 g, 28.55±0.30 cm) were distributed into six 2000 L tanks (27 fish per tank) and fed with the two experimental diets for 90 days. On the 0, 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 45<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup>, 75<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days three fish per tank were euthanized by lethal dose of anesthetic (benzocaine 500 mg L<sup>-1</sup>) and weighted for growth monitoring. Fish were filleted for total lipid content and fatty acid profile analysis. The diet supplemented with microalgae meal caused no detriment on fish growth and increases levels of DHA in the fillet, which were detected from the second sampling (15<sup>th</sup> day) increasing from 14.74±3.36 (day 0) to 38.60±3.22 (90<sup>th</sup> day) of DHA (mg g<sup>-1</sup> of total lipids). It also improves the n-3:n-6 ratio and increases the nutraceutical value of the fish flesh from aquaculture. The development of a finishing diet with addition of 5% of microalgae meal is recommended. Fish should be fed at least for 15 days prior to slaughter, to achieve the minimum n-3:n-6 ratio recommended by the World Human Organization or during 71 days to achieved the maximum deposition of DHA in fillet increasing the nutraceutical value of fish flesh for human diets.

**Keywords:** *Colossoma macropomum*, *Schizochytrium* sp., nutraceutical, n-3-n-6 ratio.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Tabaqui.....	2
2.2. Ingredientes de origem animal versus vegetal .....	2
2.3. AGPI-CL n-3 como nutracêuticos em humanos .....	4
2.4. Farinha de microalga em dietas para aquicultura.....	5
3. HIPÓTESE .....	7
3.1. Hipótese <sub>0</sub> .....	7
3.2. Hipótese <sub>α</sub> .....	7
4. OBJETIVOS.....	8
4.1. Objetivo geral.....	8
4.2. Objetivos específicos.....	8
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
5.1. Elaboração das dietas experimentais.....	9
5.2. Desenho experimental e amostragem.....	11
5.3. Análises de composição proximal e de ácidos graxos .....	13
5.4. Análises dos dados .....	14
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
6.1. Crescimento dos peixes.....	15
6.2. Composição da fracção lipídica dos filés.....	17
6.2.1. Lipídeos totais.....	17
6.2.2. Composição geral dos ácidos graxos .....	19
6.2.3. Ácidos graxos poli-insaturados.....	20
7. CONCLUSÃO .....	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Formulação e composição proximal das dietas experimentais para <i>Colossoma macropomum</i> .....	10
<b>Tabela 2.</b> Perfil de ácidos graxos ( $\text{mg g}^{-1}$ do total de lipídeos) da farinha de microalga derivada de <i>Schizochytrium</i> sp., e das dietas experimentais para <i>Colossoma macropomum</i> .....	11
<b>Tabela 3.</b> Perfil de ácidos graxos ( $\text{mg g}^{-1}$ do total de lipídeos) do filé de tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , alimentado com dietas de origem vegetal, não suplementadas e suplementadas com 5% de farinha de microalga derivada de <i>Schizochytrium</i> sp.....	25

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A) Curumim de tambaqui *Colossoma macropomum*, com  $489,6 \pm 28,53$  g e  $28,55 \pm 0,30$  cm; B) filé esquerdo, vista da parte externa; C) filé direito, vista da parte interna. .... 13
- Figura 2.** Taxa de crescimento específico (TCE %) de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas de origem vegetal, não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. .... 15
- Figura 3.** Ganho de peso (g) de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas de origem vegetal, não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. .... 16
- Figura 4.** Fator de condição alométrico (K) em tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas de origem vegetal, não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. .... 17
- Figura 5.** Conteúdo total de lipídeos (matéria úmida) do filé de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. .... 18
- Figura 6.** Conteúdo de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) no filé tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. .... 20
- Figura 7.** Conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados - AGPI n-3 ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) no filé de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. .... 21
- Figura 8.** Associação entre o nível do ácido docosahexaenoico - DHA ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) e o total de ácidos graxos poli-insaturados da série n-3 - AGPI n-3 ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) no filé de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com

dieta suplementada com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de <i>Schizochytrium</i> sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias.....	21
<b>Figura 9.</b> Conteúdo de ácido docosahexaenoico - DHA (mg g <sup>-1</sup> do total de lipídeos) no filé de subadultos de tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de <i>Schizochytrium</i> sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias.....	23
<b>Figure 10.</b> Efeito do tempo de criação sobre o conteúdo de ácido docosahexaenoico (mg g <sup>-1</sup> do total de lipídeos) do filé de tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de <i>Schizochytrium</i> sp. (All-G Rich™ product/Alltech®).....	24
<b>Figure 11.</b> Relação n-3:n-6 no filé de tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> , alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de <i>Schizochytrium</i> sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. ....	27
<b>Figure 12.</b> Consumo de filé de tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> (g) necessários para prover 200 mg de ácido eicosapentaenoico - EPA + ácido docosahexaenoico – DHA, os quais foram alimentados com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de <i>Schizochytrium</i> sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias.....	28

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial está crescendo, estimando-se que para o ano de 2050 a população chegará a 9 bilhões de pessoas, aumentando assim, a demanda por alimentos de alto valor nutricional. Nesse sentido, a aquicultura, que hoje é responsável pelo abastecimento de mais dos 50% do pescado consumido pelo homem, terá um papel importante no fornecimento de alimentos (Samuel-Fitwi *et al.*, 2012; FAO, 2016).

Para a aquicultura, ainda são utilizados ingredientes como a farinha e o óleo de peixe na formulação das dietas como fontes proteicas e, principalmente, de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL). Esses ingredientes estão cada vez mais escassos no mercado o que vem gerando a pesquisa e utilização de ingredientes de origem vegetal para a elaboração de dietas para aquicultura, principalmente de peixes onívoros. O grande interesse nos ingredientes de origem vegetal está relacionado à alta disponibilidade, baixo custo, adequado perfil aminoacídico e características favoráveis que colaboram no processo de extrusão da ração (Barrows *et al.*, 2008).

A utilização de ingredientes vegetais (ricos em ácidos graxos com 18 carbonos na cadeia) em rações para peixes, pode por consequência produzir peixes de baixo teor de AGPI-CL da série n-3, diminuindo ou perdendo a característica de promoção da saúde humana conferida a carne do peixe; visto que estes ácidos graxos (AGPI-CL n-3) contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares, mentais e da retina, além de potencializar a capacidade cognitiva (Swanson *et al.*, 2012). Nesse contexto, é preciso desenvolver alternativas para melhorar o perfil de AGPI-CL n-3 em peixes de criação, sobretudo, aqueles de importância comercial e que se alimentam de dietas elaboradas principalmente com ingredientes vegetais, como é o caso do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Tambaqui**

O tambaqui é o principal peixe nativo criado na aquicultura nacional, especialmente na Região Norte e especificamente nos estados do Amazonas, Rondônia e Roraima (IBGE, 2013). É nativo da Bacia Amazônica, porém atualmente, é criado em todo o Brasil, mesmo sabendo que temperaturas abaixo de 20 °C limitam seu crescimento. Além disso, é considerado o segundo maior peixe de escama da Amazônia, alcançando até um metro de comprimento e 30 kg de peso durante seu ciclo de vida em ambientes naturais (Goulding e Carvalho, 1998). Em ambientes controlados, apresenta crescimento rápido, atingindo aproximadamente 1,80 kg por ciclo de produção de oito meses (Izel e Melo, 2004).

O sucesso da sua produção na piscicultura deve-se também à capacidade de adaptação aos ambientes de criação; aceitação de rações comerciais; reprodução dominada em laboratório, resistência ao manejo e a condições adversas (Goulding e Carvalho, 1998). Um exemplo disso, é a tolerância a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (OD) assim como pH ácido (Saint-Paul, 1984; Wood *et al.*, 1998), sendo que em níveis baixos de OD na água, aproximadamente a 0,5 mg L<sup>-1</sup>, o peixe desenvolve o lábio inferior, uma adaptação morfológica que permite ao tambaqui explorar a superfície da água na tentativa de captar mais OD e dessa forma, manter o conteúdo de oxigênio no sangue (Val, 1995). Adicionalmente, o tambaqui é valorizado pela sua carne saborosa, que pode ser conservada até 180 dias sob congelamento sem perder suas propriedades (Cartonilho e Jesus, 2011).

Sua condição de onívoro e plasticidade das enzimas digestivas (Corrêa *et al.*, 2007), proporcionam-lhe a capacidade de aproveitar uma maior variedade de itens alimentares como fonte de nutrientes e energia. Isso torna viável a utilização de ingredientes vegetais que possibilitam a elaboração de dietas estáveis devido a presença de amido que confere a aglutinação dos ingredientes no processo de extrusão, garantindo melhor digestibilidade e flutuabilidade da ração, diminuição do custo da ração (Gatlin III *et al.*, 2007), além de ser sucedâneos à farinha e óleo de peixe, contribuindo indiretamente à conservação dos estoques pesqueiros, cuja produção encontra-se estagnada (FAO, 2016).

### **2.2. Ingredientes de origem animal versus vegetal**

Na aquicultura, existe ainda a dependência da farinha e óleo de peixe como ingredientes para a elaboração de dietas para organismos aquáticos (Tacon e Metian, 2008),

pois estes apresentam alto conteúdo de aminoácidos essenciais e AGPI-CL, como ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) e ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), assim como a alta digestibilidade dos nutrientes e a presença reduzida de fatores anti-nutricionais, quando comparados com outros ingredientes (Barrows *et al.*, 2008). O DHA é um ácido graxo importante para o funcionamento da capacidade visual em peixes, pois existem evidências que indicam que a deficiência em DHA resulta no atraso da ontogenia e normal desenvolvimento da capacidade visual (NRC, 2011).

No entanto, com o aumento da demanda e diminuição da oferta destes ingredientes no mercado, os valores comerciais para farinha e óleo de peixe estão em constante ascensão. Além disso, a utilização desses ingredientes produzidos a partir do extrativismo não proporciona a sustentabilidade da aquicultura, uma vez que o setor da pesca se encontra estagnado (Tacon e Metian, 2008; FAO, 2016). Por esse motivo, e na tentativa de tornar a aquicultura ambiental e economicamente mais sustentável, estão sendo pesquisados e utilizados grande quantidade de ingredientes de origem vegetal, principalmente farelos e óleos vegetais em substituição à farinha e óleo de peixe, na formulação de dietas para peixes (Barrows *et al.*, 2008), especialmente para onívoros.

Entre as vantagens dos ingredientes de origem vegetal encontram-se: o baixo custo, disponibilidade, facilidade de transporte e estocagem, bom teor de proteína com perfil adequado de aminoácidos (Gatlin III *et al.*, 2007). Essas características associadas ao não prejuízo no crescimento de peixes onívoros (Lim e Lee, 2009; Lin e Luo, 2011) tornaram os ingredientes vegetais uma alternativa promissora para a aquicultura.

Por outro lado, os farelos e óleos vegetais são fontes ricas em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) com cadeias de 18 carbonos, como o ácido graxo linoleico (LA; 18:2n-6) e linolênico (LNA; 18:3n-3), mas deficientes em AGPI-CL da série n-3, como EPA e DHA (Sargent *et al.*, 2002). Assim, a utilização de ingredientes vegetais nas dietas dos peixes pode provocar aumento dos AGPI de 18 carbonos e diminuição dos AGPI-CL da série n-3 no músculo do peixe, perdendo conseqüentemente, a característica particular de promoção da saúde humana (Almeida e Franco-Bueno, 2006), uma vez que estes ácidos graxos (AGPI-CL n-3) contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares, mentais e da retina, além de potencializar a capacidade cognitiva (Swanson *et al.*, 2012) e, os peixes são considerados a principal fonte de AGPI-CL n-3 na dieta dos humanos (Sargent *et al.*, 2002; Tocher, 2010).

Dessa forma, é necessário formular dietas com ingredientes que possam substituir a farinha e óleo de peixes, que garantam o perfil de AGPI-CL n-3 no músculo dos peixes de criação e que possam contribuir no valor nutricional da dieta dos humanos.

### **2.3. AGPI-CL n-3 como nutracêuticos em humanos**

O EPA e o DHA apresentam importância para a saúde humana e são obtidos maioritariamente através da alimentação (Nelson e Cox, 2011). Entre os benefícios do consumo desses ácidos graxos, destaca-se a produção de eicosanoides a partir do EPA, como a prostaglandina E3 (PGE3), o leucotrieno B5 (LTB5) e o tromboxano 3 (TX3), de função anti-inflamatória. As deficiências nos níveis de EPA promovem a produção de eicosanoides a partir de ácido araquidônico (ARA; 20:4n-6), de potencial pró-inflamatório (Calder, 2004).

O DHA é o principal componente da membrana fosfolipídica dos neurônios e contribui na integridade, desenvolvimento e funcionamento ideal das células nervosas e da retina. Portanto, o *Department of Health and Human Services* dos Estados Unidos recomenda o consumo de 300 a 900 mg de EPA+DHA por dia, a partir do terceiro trimestre da gravidez, momento que começa o desenvolvimento cerebral do feto (Swanson *et al.*, 2012). Essa recomendação tem o intuito de reforçar as capacidades cognitiva, visual, motora, assim como a resistência imunitária de crianças neonatais (Judge *et al.*, 2007), bem como garantir o desenvolvimento gestacional normal devido a redução na produção de eicosanoides sintetizados a partir do ARA, que poderiam provocar inflamação do útero e partos prematuros. Em adultos, a Organização Mundial da Saúde recomenda o consumo mínimo de 200 mg de EPA+DHA por dia (WHO, 2015), uma vez que o EPA promove a produção de eicosanoides anti-inflamatórios e o DHA promove a integridade dos neurônios e reforça o sistema imune, por isso é considerado promissor na prevenção de Alzheimer (Tully *et al.*, 2003).

Adicionalmente, o EPA e o DHA diminuem a expressão de genes relacionados com processos inflamatórios e aterogênicos, por isso esses ácidos graxos têm sido reconhecidos pelos seus efeitos positivos na prevenção e/ou tratamento de doenças como hipertensão, aterosclerose, infartos, trombose, câncer, problemas cardíacos associados à diabetes tipo-2, fibrose quística, adrenoleucodistrofia entre outras doenças (Horrocks e Yeo, 1999).

As doenças humanas relacionadas à deficiência de EPA e DHA estão aumentando no mundo. Atualmente, existem 26,6 milhões de pessoas com Alzheimer e estima-se que em 2050 sejam 106,2 milhões (Gillette-Guyonnet *et al.*, 2008), e ainda as doenças

cardiovasculares são a causa de 38% de mortes nos Estados Unidos (Swanson *et al.*, 2012) e 20% no Brasil (Mansur e Favarato, 2012).

Os peixes são considerados a principal fonte de AGPI-CL n-3 na dieta dos humanos. No entanto, a diminuição de farinha e óleo de peixe e o incremento de ingredientes vegetais na formulação de ração, proporcionam uma baixa relação n-3:n-6 das dietas nos peixes provenientes da aquicultura. Por conseguinte, o desbalanceamento nessa relação refletirá no perfil de ácidos graxos do músculo do peixe, sendo que muitas vezes são encontrados níveis inferiores a 0,20, valor mínimo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (Simopoulos, 2008).

Estudos com tambaqui mostraram que peixes provenientes da piscicultura apresentaram relação n-3:n-6 de 0,18 a 0,10 no filé (Maia e Rodríguez-Amaya, 1992; Almeida *et al.*, 2008), valores inferiores ao mínimo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (Simopoulos, 2008). Diante dessa problemática, são necessários estudos na busca de sucedâneos para a farinha e óleo de peixe nas dietas de organismos aquáticos, que possam proporcionar níveis adequados de EPA e DHA no filé dos peixes, os quais serão destinados ao consumo humano.

#### **2.4. Farinha de microalga em dietas para aquicultura**

Os microrganismos do gênero *Schizochytrium* fazem parte da base da cadeia alimentar em ambientes hídricos marinhos. São protistas heterotróficos de hábito alimentar detritívoro, bacterívoro e/ou parasita (Lewis *et al.*, 1999), localizados na subclasse Thraustochytridea (Chromista: Heterokonta) e emparentados com algas heterocontas como as diatomáceas (Cavalier-Smith *et al.*, 1994). Caracterizam-se pela presença de  $\beta$ -caroteno como único pigmento carotenóide formando células amarelo-pálidas, reprodução por bipartição ou formação de esporas biflageladas (Yokoyama e Honda, 2007), e apresentam elevados teores de AGPI-CL n-3, principalmente DHA (Miller *et al.*, 2007).

Estes microrganismos são capazes de sintetizar altas concentrações de DHA através do complexo enzimático policetídeo-sintase (PKS) utilizando como substrato a malonil-CoA e acetil-CoA (Metz *et al.*, 2001). O conteúdo de DHA em cepas isoladas de *Schizochytrium* spp. compõe entre 24,53% e 39,14% do total de ácidos graxos (Jiang *et al.*, 2004). Porém, a seleção de cepas e condições de cultivo apropriadas tem permitido a produção de células com altos teores de DHA (até 60% dos ácidos graxos) e relações altas de n-3:n-6, assim como baixo teor de AGPI n-6 (Miller *et al.*, 2007).

Embora muitas espécies de microalgas e cianobactérias apresentem altos teores de AGPI-CL n-3 e potencial de industrialização como fontes de EPA e DHA (Chauton *et al.*, 2015); a produção de microalga *Schizochytrium* é menos custosa, devido ao fato de serem organismos heterotróficos e não precisarem de alguns elementos necessários e onerosos relacionados ao cultivo de autotróficos (como a luz e o dióxido de carbono), o que facilita sua produção com fermentadores industriais controlados (Lewis *et al.*, 1999). Essa fermentação catalisa os nutrientes oferecidos (principalmente glicose) em compostos mais simples (entre eles AGPI-CL n-3), libertando energia. Aumentos favoráveis na composição de AGPI-CL n-3, em especial de DHA, foram observados em salmão-do-Atlântico, *Salmo salar*, alimentados com dieta contendo a inclusão de 11% e 13% de farinha de *Schizochytrium* em substituição ao óleo de peixe (Miller *et al.*, 2007; Sprague *et al.*, 2015).

Deste modo, pretende-se incluir 5% de farinha de microalga *Schizochytrium* sp. nas dietas de tambaqui, como estratégia para melhorar o perfil de AGPI-CL n-3 de tambaquis cultivados; assim como, estabelecer o prazo mínimo de fornecimento de farinha de *Schizochytrium* sp. que apresente alteração no perfil de AGPI-CL n-3 no músculo de tambaqui.

### **3. HIPÓTESE**

#### **3.1. Hipótese<sub>0</sub>**

Não há detrimento no crescimento dos peixes nem alteração no perfil de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL) nos filés de tambaquis alimentados com dietas contendo farinha da microalga *Schizochytrium* sp.

#### **3.2. Hipótese<sub>a</sub>**

Há detrimento no crescimento dos peixes e alteração no perfil de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL) nos filés de tambaquis alimentados com dietas contendo farinha da microalga *Schizochytrium* sp.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito da inclusão da farinha da microalga *Schizochytrium* sp. em dietas para o tambaqui sobre o crescimento dos peixes e o perfil de AGPI-LC do filé.

### **4.2. Objetivos específicos**

Determinar o efeito da inclusão de farinha de microalga em dietas para o tambaqui sobre o seu crescimento.

Determinar o efeito da inclusão de farinha de microalga em dietas para o tambaqui sobre a composição lipídica e perfil de ácidos graxos.

Estabelecer o prazo mínimo de fornecimento da dieta contendo farinha de microalga que apresente alteração no perfil de AGPI-CL no filé de tambaqui.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil (Número de Protocolo: 028/2015).

### 5.1. Elaboração das dietas experimentais

Foram elaboradas duas dietas experimentais isoproteicas (300 g de proteína bruta kg<sup>-1</sup>) e isocalóricas (4600 kcal de energia bruta kg<sup>-1</sup>), utilizando-se ingredientes de origem vegetal: a dieta controle sem suplementação de farinha de microalga (CO) e a dieta suplementada com 5% de farinha de microalga (FA), rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich<sup>TM</sup> product/Alltech<sup>®</sup>) (Tabela 1).

As dietas foram formuladas para atingirem as recomendações conhecidas de necessidades nutricionais para o tambaqui (Guimarães e Martins, 2015), extrudadas em 6 mm de diâmetro (Inbramaq MX80), secas em estufa com renovação e circulação de ar (55 °C, 24 h, TE-394/3-MP), acondicionadas em sacos pretos de polietileno para evitar fotoxidação e, estocadas à 16 °C até serem utilizadas.

**Tabela 1.** Formulação e composição proximal das dietas experimentais

	Dietas	
	Controle CO	Farinha de microalga FA
<b>Ingredientes (g kg<sup>-1</sup>)</b>		
Farelo de soja	537,00	530,00
Farinha de trigo	59,00	50,00
Milho moído	360,00	350,00
Óleo de soja	24,00	00,00
Farinha de microalga <sup>a</sup>	00,00	50,00
Premix <sup>b</sup>	20,00	20,00
<b>Composição proximal (baseada na matéria seca)</b>		
Matéria seca (g kg <sup>-1</sup> )	935,00	931,67
Proteína Bruta (g kg <sup>-1</sup> )	299,67	304,00
Lipídeos (g kg <sup>-1</sup> )	44,14	51,47
Carboidratos <sup>c</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	606,19	590,20
Cinzas (g kg <sup>-1</sup> )	50,00	54,33
Energia Bruta <sup>d</sup> (kcal kg <sup>-1</sup> )	4598,28	4626,14

<sup>a</sup>Farinha de microalga da All-G Rich<sup>TM</sup>/Alltech<sup>®</sup>.

<sup>b</sup>Suplemento mineral vitamínico para peixes, valores por kg de ração: ácido fólico (250 mg), ácido pantotênico (5000 mg), antioxidante (600 mg), biotina (125 mg), cobalto (25 mg), cobre (2000 mg), ferro (13.820 mg), iodo (100 mg), manganês (3750 mg), niacina (5000 mg), selênio (75 mg), vitamina A (1.000.000 UI), vitamina B1 (1250 mg), vitamina B12 (3750 mg), vitamina B2 (2500 mg), vitamina B6 (2485 mg), vitamina C (28.000 mg), vitamina D3 (500.000 UI), vitamina E (28.000 UI), vitamina K3 (500 mg), zinco (17.500 mg).

<sup>c</sup>Carboidratos = 100 - (proteína + lipídeos + cinzas).

<sup>d</sup>Energia bruta baseada nos valores calculados para proteína (5,64 kcal g<sup>-1</sup>), lipídeos (9,44 kcal g<sup>-1</sup>), carboidratos (4,11 kcal g<sup>-1</sup>) (NRC, 2011).

**Tabela 2.** Perfil de ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup> do total de lipídeos) da farinha de microalga derivada de *Schizochytrium* sp. e das dietas experimentais

Ácidos graxos <sup>a</sup>	Farinha de microalga <sup>b</sup>	Dietas experimentais	
		Controle CO	Farinha de microalga FA
% Total de lipídeos	76,76±0,08	4,41±0,12	5,15±0,07
∑AGS	442,56±5,45	133,24±5,85	362,79±13,03
14:0	40,16±4,23	0,90±0,06	22,82±2,46
16:0	370,15±10,26	101,21±4,41	305,94±7,41
18:0	14,69±0,47	23,80±1,10	19,55±1,78
∑AGMI	31,96±0,92	183,67±8,40	118,59±10,12
16:1n-7	1,81 ± 0,52	1,69 ± 0,11	1,80 ± 0,14
18:1n-9c	25,58±1,73	170,90±7,83	109,31±9,30
18:1n-7	1,86±0,28	8,68±0,33	4,85±0,41
∑AGPI	309,16±2,28	380,64±16,88	359,87±30,53
18:2n-6	15,62±1,05	351,05±15,47	217,24±18,31
18:3n-6	0,57±0,01	0,16±0,05	0,28±0,01
18:3n-3	2,70±0,03	28,40±1,16	13,59±1,27
20:3n-6	1,41±0,01	0,18±0,04	0,70±0,07
20:4n-6	1,49±0,03	0,25±0,07	0,51±0,01
20:4n-3	n.d	0,15±0,03	0,07±0,01
20:5n-3	2,35±0,16	n.d	1,26±0,10
22:4n-6	0,58±0,06	n.d	n.d
22:5n-6	47,90±2,80	0,15±0,05	23,18±1,96
22:5n-3	0,56±0,04	n.d	0,26±0,02
22:6n-3	236,37±1,09	0,20±0,07	102,71±8,80
∑n-6	67,18±1,05	351,89±15,69	241,99±20,34
∑n-3	241,98±1,24	28,75±1,19	117,88±10,19
n-3:n-6	3,60±0,04	0,08±0,01	0,49±0,01

<sup>a</sup>Resultados em média ± desvio padrão.

<sup>b</sup>Farinha de microalga da All-G Rich™ product/Alltech®.

nd = não detectado.

## 5.2. Desenho experimental e amostragem

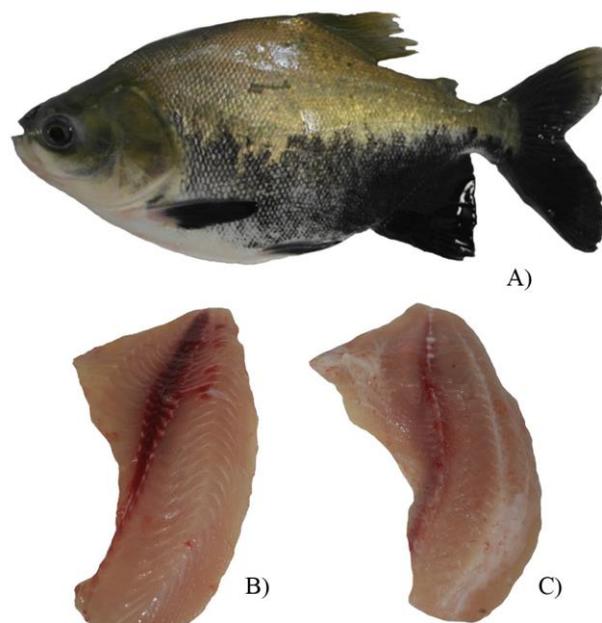
O experimento foi executado na Estação Experimental de Piscicultura do INPA (3°05'26,7"S e 59°59'41,1"W) de Setembro a Dezembro de 2015. Cento e sessenta e dois (162) curumins de tambaqui (489,6±28,53 g; 28,55±0,30 cm) foram distribuídos em seis tanques de fibra de vidro (2000 L; 27 peixes por tanque) e submetidos a um desenho

experimental inteiramente casualizado com esquema fatorial  $2 \times 7$  (2 dietas e 7 tempos de amostragem), e três repetições.

Previamente ao experimento, os peixes foram aclimatados por 20 dias e alimentados com a dieta controle para adaptação às condições experimentais. No período experimental, os peixes foram alimentados três vezes ao dia (8h, 12h e 16h) a uma taxa de alimentação de 3% da biomassa durante 90 dias. No 0, 15<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup>, 60<sup>o</sup>, 75<sup>o</sup> e 90<sup>o</sup> dia do experimento, três peixes por tanque foram aleatoriamente eutanasiados por dose letal de anestésico (benzocaína a 500 mg L<sup>-1</sup>) e pesados. Imediatamente, os peixes foram colocados em uma caixa térmica de 90 L com gelo picado e transportados até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos do INPA para filetagem. No local, foram retirados os filés direito e esquerdo (Figura 1), moídos (moedor de carne CAF 5 Inox), homogeneizados em um único *pool* por tanque e armazenados em ultra freezer a -80 °C. Posteriormente, cada amostra foi liofilizada, empacotada e enviada para o Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (23°31'7,29"S e 52°2'20,80"W) para análises de composição de ácidos graxos.

A taxa de crescimento específico (TCE % =  $100 \times [(\ln \text{Peso final} - \ln \text{Peso inicial}) / \text{dias de alimentação}]$ ); o ganho de peso (GP = peso final – peso inicial); e o fator de condição alométrico de Fulton ( $K = \text{Peso}/\text{Comprimento}^3$ ) foram estimados para avaliar o crescimento dos peixes.

Durante o experimento, as caixas tiveram renovação d'água constante (0,25 L s<sup>-1</sup>) e foram limpas diariamente. Os peixes foram criados sob fotoperíodo natural e os parâmetros de qualidade de água, oxigênio dissolvido (5,23±0,36 mg L<sup>-1</sup>), temperatura (27,79±0,21 °C) e pH (4,90±0,22), foram monitorados diariamente, e mantiveram-se na faixa de conforto para a espécie (Saint-Paul, 1984; Wood *et al.*, 1998).



**Figura 1.** A) Curumim de tambaqui *Colossoma macropomum*, com  $489,6 \pm 28,53$  g e  $28,55 \pm 0,30$  cm; B) filé esquerdo, vista da parte externa; C) filé direito, vista da parte interna.

### 5.3. Análises de composição proximal e de ácidos graxos

As dietas foram analisadas quanto aos teores de umidade, proteína e cinzas, segundo os procedimentos descritos pela AOAC (2005) (Tabela 1).

Os lipídeos da farinha de microalga, das dietas e dos filés foram determinados pelo método de Bligh e Dryer (1959).

Para as análises de ácidos graxos da farinha de microalga, das dietas (Tabela 2) e dos filés (Tabela 3), ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram preparados pelo método de Santos-Júnior *et al.* (2014). Os ésteres metílicos foram separados por cromatografia de gases utilizando o gás cromatógrafo Thermo 3300, fixado a um detector por ionização em chama (FID) e uma coluna capilar ( $100 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm i.d.} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$  de cianopropil polisioxano) de sílica fundida (SELECT FAME). Os parâmetros operacionais foram os seguintes: temperatura do detector,  $240 \text{ }^\circ\text{C}$ ; temperatura do porto do injetor,  $230 \text{ }^\circ\text{C}$ ; temperatura da coluna,  $165 \text{ }^\circ\text{C}$  por 18 min, programada para incrementar  $4 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  até os  $235 \text{ }^\circ\text{C}$ , com tempo de retenção final de 14,5 min; gás carregador, hidrogênio a  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ ; injetor Split a uma proporção de 1:80. Para identificação, os tempos de retenção dos ácidos graxos foram comparados com os ésteres metílicos padrões (Sigma, St. Louis, MO, USA). Os tempos de retenção e as porcentagens da área dos picos foram automaticamente computados com auxílio do Software

Chronquest 5.0. A quantificação dos ácidos graxos foi realizada em comparação ao padrão interno da Sigma C23:0 (Joseph e Ackman, 1992). O fator de correção teórica do detector por ionização em chama foi utilizado para calcular a concentração de ácidos graxos em  $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos (Visentainer, 2012).

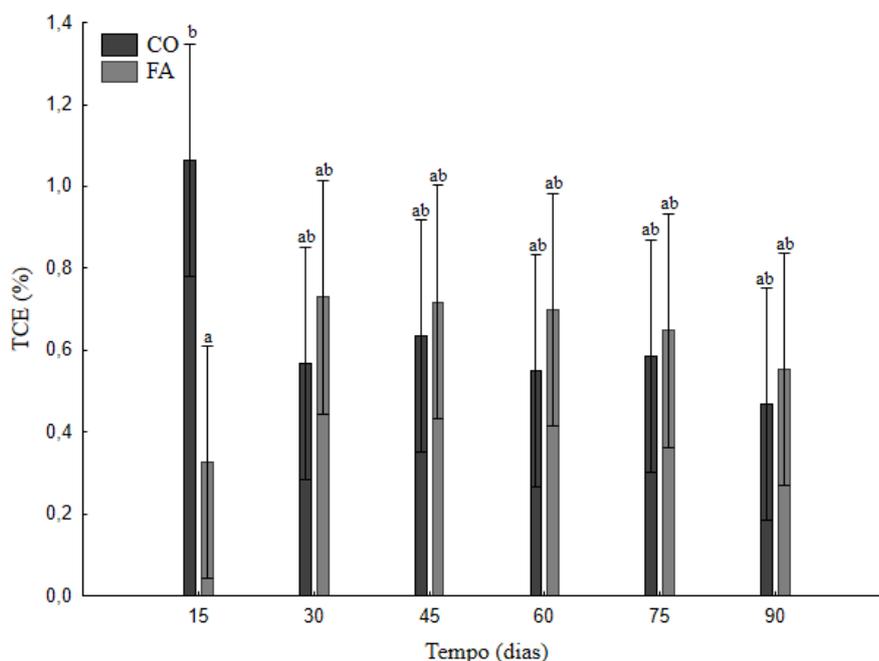
#### **5.4. Análises dos dados**

A homogeneidade inicial do lote por peso total foi afirmada pelo teste de Cochran ( $P < 0,05$ ). O experimento teve um desenho experimental inteiramente casualizado com esquema fatorial  $2 \times 7$  (2 dietas e 7 tempos de amostragem) e três repetições. Dados de crescimento e composição lipídica dos peixes foram submetidos ao teste ANOVA de dois fatores e, quando a interação (dieta  $\times$  tempo de amostragem) foi significativa, foram feitos os desdobramentos e as médias foram comparadas por teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Para avaliar o tempo que maximizou o aumento do DHA, os dados foram avaliados utilizando uma análise de regressão não linear polinomial de função quadrática  $y = ax^2+bx+c$ . Para avaliar se houve associação entre o DHA e o conteúdo de AGPI-CL foi realizado uma correlação linear de Pearson ( $P < 0,05$ ). Os dados foram analisados utilizando o Software Statistica 10.0.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

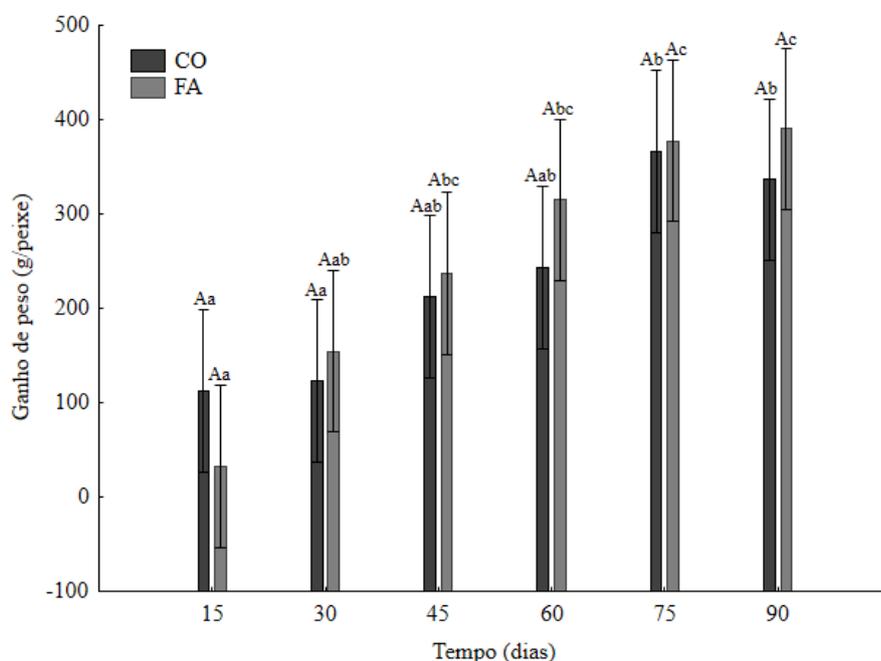
### 6.1. Crescimento dos peixes

No presente estudo, observa-se que em relação a TCE (Figura 2), no 15º dia os peixes alimentados com a dieta contendo farinha de microalga apresentaram menor valor ( $0,33\pm 0,63\%$ ) quando comparados aos peixes alimentados com a dieta controle ( $1,06\pm 0,81\%$ ) ( $P < 0,05$ ). Possivelmente, esse fato está relacionado com a adaptação à mudança da dieta, ou seja, início da alimentação com farinha de microalga que pode ter alterado a palatabilidade da dieta. Não obstante, essa diminuição inicial na TCE não foi suficiente para causar efeito diferencial nos ganhos de peso dos peixes alimentados com as duas dietas avaliadas (Figura 3). Na sequência, observa-se que no 30º dia houve um aumento numérico, mas não significativo, na TCE dos peixes alimentados com a dieta contendo farinha de microalga ( $0,73\pm 0,60\%$ ), em razão da adaptação à dieta, e possivelmente, ao crescimento compensatório e/ou a melhor digestibilidade da fração lipídica devido à presença superior de ácidos graxos insaturados na dieta com farinha de microalga (Gonçalves e Cyrino, 2014). Para ambas as dietas, as TCE foram similares a partir do 30º dia ( $P > 0,05$ ).



**Figura 2.** Taxa de crescimento específico (TCE %) de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas de origem vegetal, não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. As médias representam valores de três peixes por tanque (9 peixes por tratamento dieta × tempo de amostragem). Letras diferentes indicam diferenças significativas na interação dieta × tempo de amostragem ( $P < 0,05$ ) pela ANOVA de dois fatores e teste de Tukey. Barras verticais denotam intervalos de confiança a 0,95.

Por sua vez, o ganho de peso foi similar nos peixes no mesmo dia de coleta independente da dieta ( $P > 0,05$ ) (Figura 3), obtendo-se peixes com peso médio de  $968,56 \pm 144,93$  g ao finalizar o experimento. Com isso, indica-se que a farinha da microalga em estudo pode ser incluída em dietas para tambaqui sem detrimento no crescimento dos peixes. Estes resultados coincidem com a literatura, que relata a inocuidade no desempenho dos animais quando a farinha e/ou o óleo derivados de *Schizochytrium* sp. substituem parcial ou completamente o óleo de peixe em dietas para salmão-do-atlântico *Salmo salar* (Carter *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2007; Sprague *et al.*, 2015) e pargo *Sparus aurata* (Ganuza *et al.*, 2008), ou são incluídas em dietas de origem vegetal para o bagre-americano *Ictalurus punctatus* (Li *et al.*, 2009).

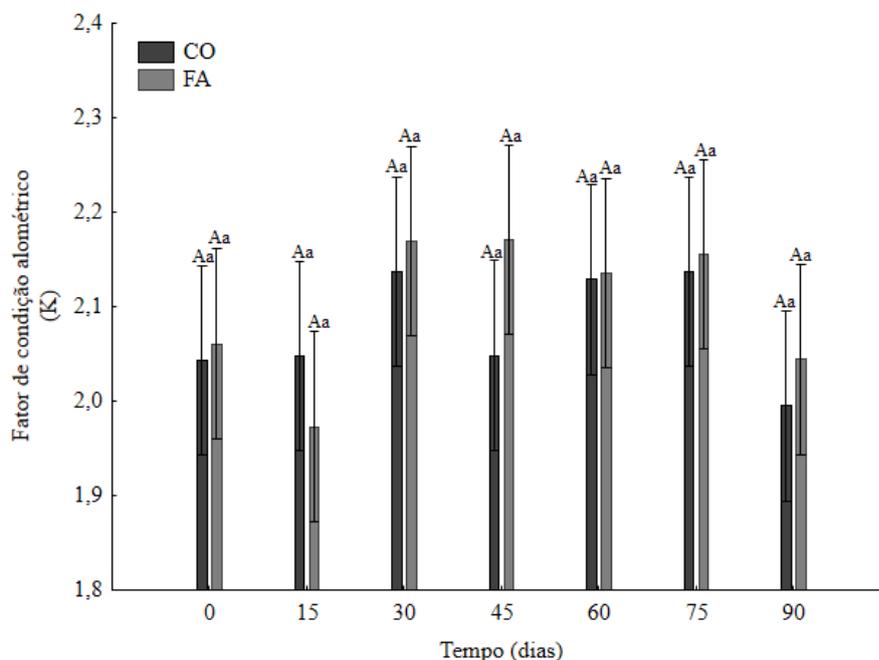


**Figura 3.** Ganho de peso (g) de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas de origem vegetal, não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) (All-G Rich<sup>TM</sup> product/Alltech<sup>®</sup>), durante 90 dias. As médias representam valores de três peixes por tanque (9 peixes por tratamento dieta × tempo de amostragem). A interação dieta × tempo de amostragem não foi significativa ( $P > 0,05$ ), assim os fatores foram avaliados separadamente. Letras maiúsculas representam diferença entre as dietas em cada dia de coleta ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas representam diferença entre os tempos de amostragem por cada tipo de dieta ( $P < 0,05$ ). Barras verticais denotam intervalos de confiança a 0,95.

Além desses resultados, os valores do fator de condição alométrico de Fulton (K) (Figura 4), que estima a condição geral de bem-estar dos peixes em função do peso e comprimento (Lima-Júnior *et al.*, 2002), indicaram que a interação dieta × tempo de amostragem não foi significativa ( $P > 0,05$ ). Desta forma, as análises dos fatores separadamente sugerem que a dieta com farinha de microalga não afetou o bem-estar dos

animais durante o experimento quando comparada com a dieta controle ( $P > 0,05$ ), fato evidenciado pela ausência de mortalidade durante o experimento.

Com isso, afirma-se que dietas de origem vegetal com inclusão de 5% da farinha de *Schizochytrium* sp., não afetam o crescimento nem o estado geral de curumins de tambaqui.



**Figura 4.** Fator de condição alométrico (K) em tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas de origem vegetal, não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) (All-G Rich<sup>TM</sup> product/Alltech<sup>®</sup>), durante 90 dias. As médias representam valores de três peixes por tanque (9 peixes por tratamento dieta × tempo de amostragem). A interação dieta × tempo de amostragem não foi significativa ( $P > 0,05$ ), assim os fatores foram avaliados separadamente. Letras maiúsculas representam diferença entre as dietas em cada dia de coleta ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas representam diferença entre os tempos de amostragem por cada tipo de dieta ( $P < 0,05$ ). Barras verticais denotam intervalos de confiança a 0,95.

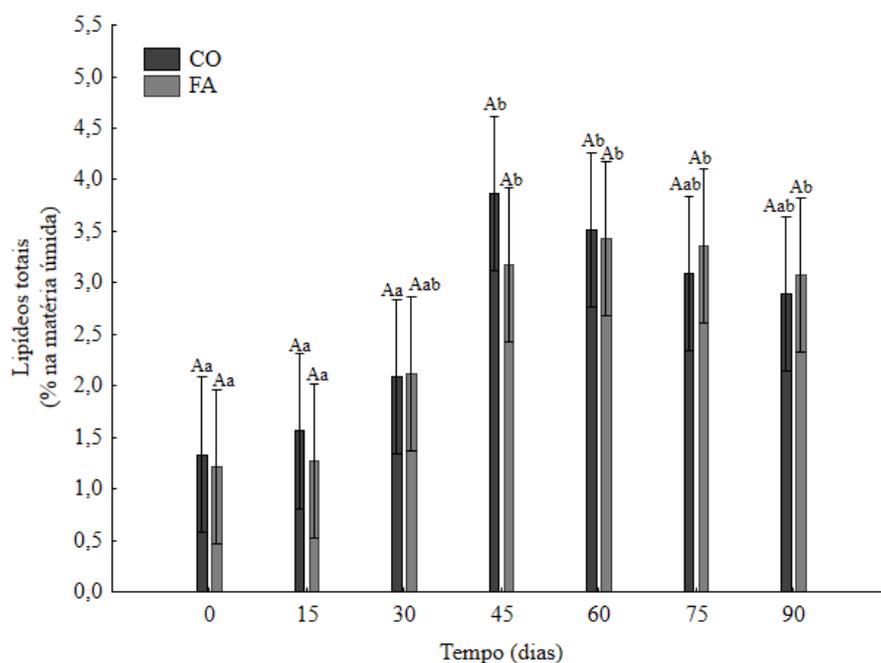
## 6.2. Composição da fração lipídica dos filés

### 6.2.1. Lipídeos totais

A interação dieta × tempo de amostragem não apresentou efeito diferencial na composição dos lipídeos totais no filé dos peixes ( $P > 0,05$ ). No entanto, a análise separada dos fatores permitiu identificar que o conteúdo de lipídeos totais no filé dos peixes foi similar no mesmo dia de coleta independente da dieta ( $P > 0,05$ ), provavelmente em resposta a formulação isocalórica das dietas (Tabela 1). Entretanto, houve um aumento do conteúdo de lipídios do filé em função do tempo ( $P < 0,05$ ), passando de  $1,26 \pm 0,23\%$  (dia 0) para  $3,52 \pm 0,55\%$  (45° dia) (matéria úmida), e se manteve constante a partir do 45° dia ( $P > 0,05$ )

(Figura 5), possivelmente em resposta ao conteúdo de carboidratos digestíveis presentes nas dietas, cujo excesso é direcionado para ser estocado como glicogênio no fígado e principalmente para a síntese lipídica (Corrêa *et al.*, 2007).

Com isso, ao finalizar o experimento o tambaqui foi categorizado como “peixe de baixo teor de gordura”; pois seu conteúdo lipídico encontra-se no intervalo de 2,00 a 4,00% de gordura corporal na classificação descrita por Ackman (1989). Esse resultado é concordante ao reportado para tambaquis criados em sistema semi-intensivo que apresentaram 2,41% de lipídeos totais (Arbeláez-Rojas *et al.*, 2002). No entanto, é diferente ao relatado por Maia e Rodriguez-Amaya (1992) assim como por Almeida e Franco (2006) para tambaquis procedentes de piscicultura, que apresentarem conteúdo lipídico superior de 6,00 e 4,80%, respectivamente. Essas diferenças podem estar relacionadas às diferentes condições de manipulação, criação, idade dos peixes e formulação das dietas.

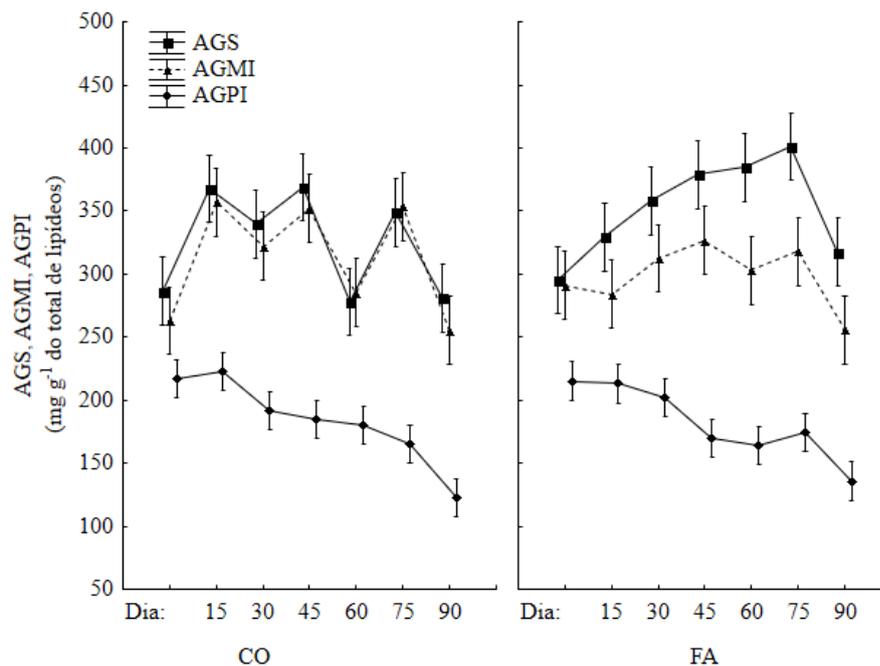


**Figura 5.** Conteúdo total de lipídeos (matéria úmida) do filé de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. Médias representam valores de três peixes por tanque (9 peixes por tratamento dieta× tempo de amostragem). A interação dieta × tempo de amostragem não foi significativa ( $P > 0,05$ ), assim os fatores foram avaliados separadamente. Letras maiúsculas representam diferença entre as dietas em cada dia de coleta ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas representam diferença entre os tempos de amostragem por cada tipo de dieta ( $P < 0,05$ ). Barras verticais denotam intervalos de confiança a 0,95.

### 6.2.2. Composição geral dos ácidos graxos

Foram identificados trinta (30) ácidos graxos no filé de tambaqui, com predominância do grupo dos saturados (AGS), seguido dos monoinsaturados (AGMI), tanto nos peixes alimentados com a dieta controle, quanto nos que receberam a dieta com farinha de microalga (Figura 6). Dentre esses grupos, o ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0) e oleico (18:1n-9) foram os de maior predominância no filé de todos os peixes durante o experimento (Tabela 3). Esses ácidos graxos foram também predominantes em tambaquis procedentes de piscicultura e alimentados com rações comerciais (Almeida *et al.*, 2008; Melo-Filho *et al.*, 2013). Do mesmo modo, foram predominantes em salmão-do-atlântico alimentados com farinha e/ou óleo de *Schizochytrium* sp. em substituição à farinha e/ou óleo de peixe (Carter *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2007; Sprague *et al.*, 2015). Contudo, é possível que o alto conteúdo dos ácidos palmítico e esteárico, no filé dos peixes procedentes do experimento, seja produto da composição da dieta, assim como da biossíntese lipídica em resposta ao possível excedente de carboidratos digestíveis presentes nas rações; uma vez que o excesso de Acetil-CoA produzido pela hidrólise da glicose é direcionado a síntese lipídica (Sargent *et al.*, 2002; Tocher, 2003). Entretanto, o alto conteúdo de ácido oleico no filé dos peixes, provavelmente, é proveniente tanto da deposição a partir da dieta, quanto do processo de dessaturação da cadeia carbonada do ácido esteárico, mediado pela enzima esteroil-CoA- $\Delta^9$  dessaturase, processo comum em peixes (Tocher, 2003).

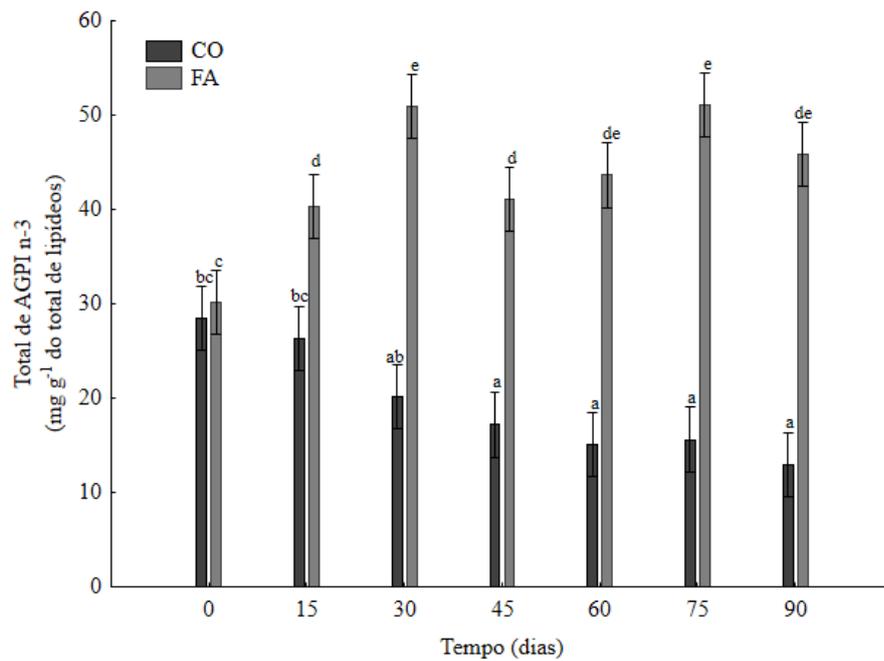
Por outro lado, em todos os pontos de amostragem, os filés apresentaram conteúdo inferior de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) em relação saturados e monoinsaturados (AGS e AGMI). A interação dieta  $\times$  tempo de amostragem não causou efeito diferencial no conteúdo de AGPI no filé dos peixes ( $P > 0,05$ ). Porém, ao analisar os fatores separadamente, identificou-se que o conteúdo de AGPI diminuiu em função do tempo ( $P < 0,05$ ), passando de  $216,02 \pm 24,72$  (dia 0) para  $129 \pm 10,14$  mg de AGPI  $g^{-1}$  do total de lipídeos (90° dia) independente da dieta. Com isso, a dieta contendo 5% de farinha de microalga não tem efeito sobre a somatória de AGPI em relação à dieta controle. Porém, a diminuição dos AGPI em relação ao tempo independente do tratamento é devida, possivelmente, à depleção de alguns tipos de AGPI provenientes da dieta fornecida previamente ao experimento (comercial) e/ou da utilização desses ácidos graxos como fonte de energia.



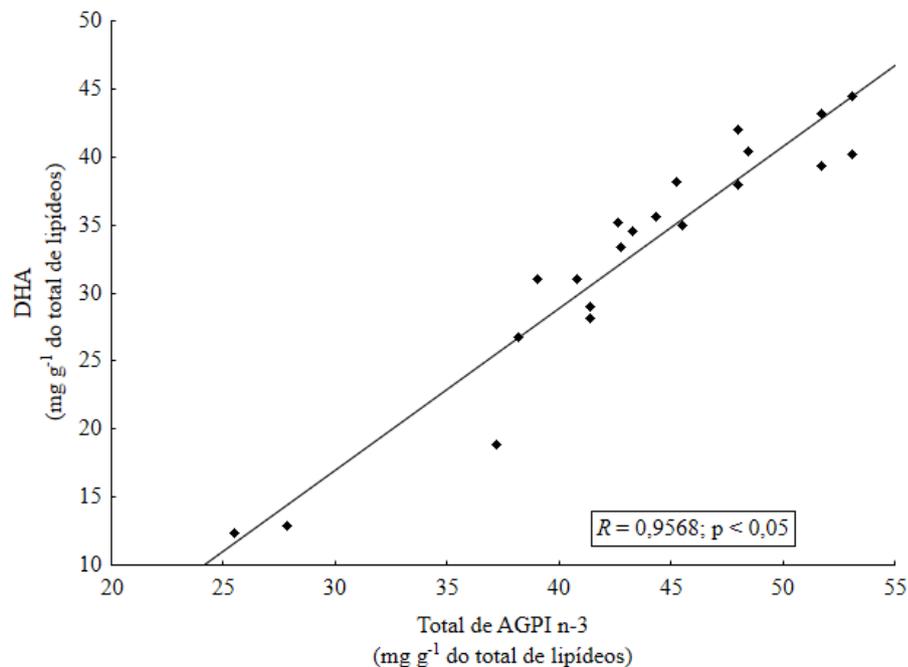
**Figura 6.** Conteúdo de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) no filé de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. Médias representam valores de três peixes por tanque (9 peixes por tratamento dieta  $\times$  tempo de amostragem). Barras verticais denotam intervalos de confiança a 0,95.

### 6.2.3. Ácidos graxos poli-insaturados

No presente estudo, foram identificados doze (12) AGPI no filé de todos os peixes avaliados (Tabela 3) com considerável incremento nos níveis de AGPI da série n-3 no filé dos peixes alimentados com a dieta suplementada com a farinha de microalga (Figura 7), passando de  $30,19 \pm 6,19$  a  $45,87 \pm 1,91$  ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) no 0 e 90° dia, respectivamente. Esse incremento esteve diretamente relacionado ao aumento do DHA (Figura 8), que representou entre 48,82% (dia 0) a 84,15% (90° dia) do conteúdo total de AGPI n-3.



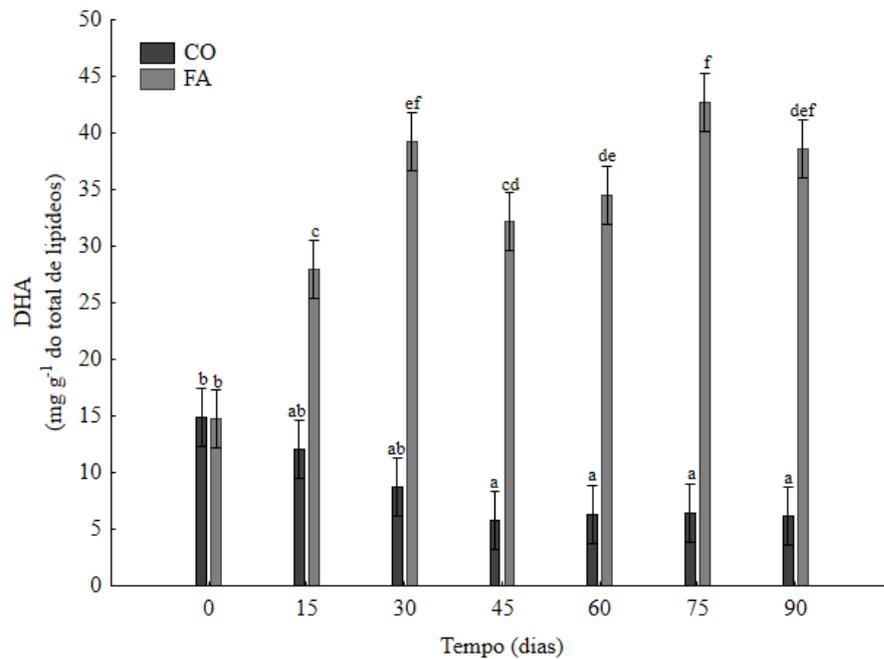
**Figura 7.** Conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados - AGPI n-3 ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) no filé de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. As médias representam valores de três peixes por tanque (9 peixes por tratamento dieta  $\times$  tempo de amostragem). Letras diferentes indicam diferenças significativas na interação dieta  $\times$  tempo de amostragem ( $P < 0,05$ ) pela ANOVA de dois fatores e teste de Tukey. Barras verticais denotam intervalos de confiança a 0,95.



**Figura 8.** Associação entre o nível do ácido docosahexaenoico - DHA ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) e o total de ácidos graxos poli-insaturados da série n-3 - AGPI n-3 ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) no filé de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dieta suplementada com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. Os valores foram analisados pela correlação linear de Pearson.

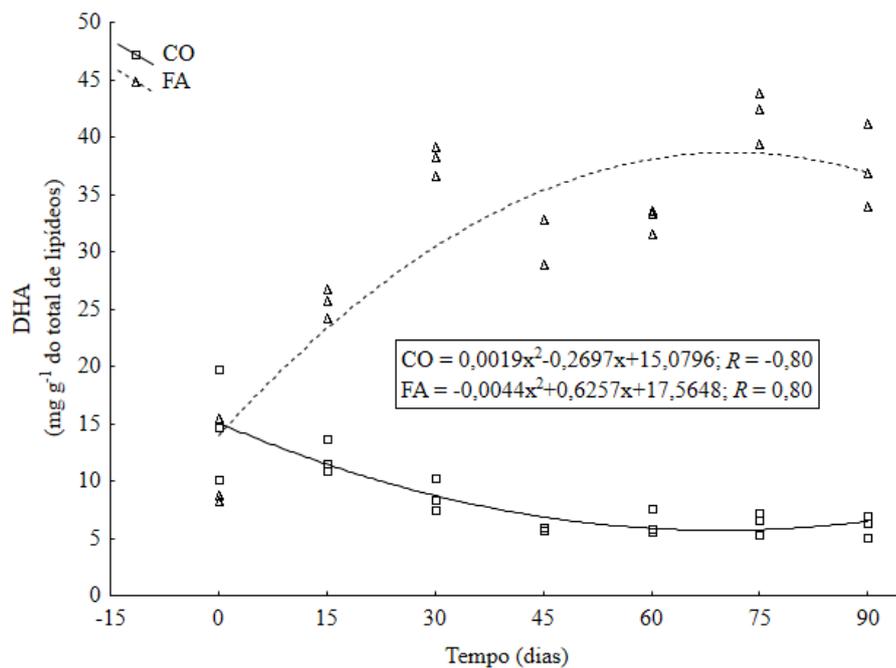
Houve significância da interação dieta  $\times$  tempo de amostragem ( $P < 0,05$ ) para o DHA, com maior conteúdo no filé dos peixes alimentados com a dieta suplementada com farinha de microalga, como reflexo do perfil de ácidos graxos da dieta (Figura 9). Esse incremento foi percebido desde a segunda amostragem (15<sup>o</sup> dia) passando de  $14,74 \pm 3,36$  (dia 0) para  $38,60 \pm 3,22$  (90<sup>o</sup> dia) mg de DHA g<sup>-1</sup> do total de lipídeos. Esse resultado é concordante com outros estudos que avaliaram a substituição parcial ou completa da farinha e/ou óleo de peixe pela farinha e/ou óleo da microalga em dietas para o salmão-do-atlântico (Carter *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2007). Da mesma forma, o nível de DHA do filé do bagre-americano pode ser incrementado utilizando-se dietas de origem vegetal com inclusão da farinha da microalga *Schizochytrium* sp. (0,5 a 2,00% da dieta) (Li *et al.*, 2009). Sendo assim, estes resultados são alentadores, uma vez que o perfil de ácidos graxos de tambaqui procedentes de pisciculturas de quatro localidades do Estado de Roraima e alimentados com dietas comerciais não apresentaram níveis detectáveis de DHA no filé (Melo-Filho *et al.* 2013).

Um fator que favoreceu o aumento do teor de DHA é o fato dele ser o ácido graxo de maior capacidade de retenção nos tecidos dos peixes, pois ele tende a ser conservado por ser um substrato relativamente pobre para a  $\beta$ -oxidação mitocondrial e, conseqüentemente, para produção energética (NRC, 2011). No entanto, não está claro o incremento de DHA no 30<sup>o</sup> dia e sua diminuição no 45<sup>o</sup> dia, para novamente aumentar a partir do 60<sup>o</sup> dia (Figura 9). Possivelmente, isso se deve a mobilização desse ácido graxo para outros tecidos; uma vez que, o DHA apresenta importantes funções como componentes das membranas celulares do sistema nervoso (Feller, 2008) e da retina (NRC, 2011).



**Figura 9.** Conteúdo de ácido docosahexaenoico - DHA ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) no filé de subadultos de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. As médias representam valores de três peixes por tanque (9 peixes por tratamento dieta  $\times$  tempo de amostragem). Letras diferentes indicam diferenças significativas na interação dieta  $\times$  tempo de amostragem ( $P < 0,05$ ) pela ANOVA de dois fatores e teste de Tukey. Barras verticais denotam intervalos de confiança a 0,95.

Os dados do conteúdo de DHA no filé dos peixes se enquadram em uma equação quadrática representada por  $y = -0,0044x^2 + 0,6257x + 17,5648$  para os peixes alimentados com a dieta contendo farinha de microalga. Ao derivar a equação, indica-se que 71 dias é o período mínimo para maximizar o conteúdo de DHA no filé dos peixes que recebem a dieta suplementada (Figura 10).



**Figure 10.** Efeito do tempo de criação sobre o conteúdo de ácido docosahexaenoico ( $\text{mg g}^{-1}$  do total de lipídeos) do filé de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®). O efeito quadrático das curvas é explicado por  $y = ax^2 + bx + c$ , onde: Y = lipídeos totais (%); X = tempo (dias); a, b, c = coeficientes. Os dados foram analisados com  $P < 0,05$  e a nuvem de pontos representam três repetições por tratamento

Adicionalmente, o DHA promoveu o incremento na proporção n-3:n-6 (Figura 11). Essa relação é importante, uma vez que um desequilíbrio na proporção n-3:n-6 na dieta está associado a um risco aumentado de doenças cardiovasculares, processos de inflamação pronunciado e deficiência patológicas (Nelson e Cox, 2011). Nesse sentido, a relação n-3:n-6 encontrada para filés dos peixes que foram alimentados com a dieta suplementada, foi superior (a partir do 15 ° dia) à recomendação de 0,20, que é a relação mínima necessária para prover os benefícios nutracêuticos conferidos a esses ácidos graxos de acordo com a Organização Mundial da Saúde (Simopoulos, 2008). Por sua vez, os filé dos peixes que foram alimentados com a dieta controle apresentaram relações n-3:n-6 inferiores a 0,20 durante todo o experimento.

**Tabela 3.** Perfil de ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup> do total de lipídeos) do filé de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas de origem vegetal, não suplementadas e suplementadas com 5% de farinha de microalga derivada de *Schizochytrium* sp.

Ácidos graxos (mg g <sup>-1</sup> do total de lipídeos) <sup>1</sup>	Dieta <sup>2</sup>	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 45	Dia 60	Dia 75	Dia 90	P valor <sup>3</sup>		
									D	T	D × T
ΣAGS <sup>4</sup>	CO	286,49±13,37 <sup>ab</sup>	367,69±20,46 <sup>de</sup>	339,61±3,07 <sup>abcde</sup>	368,98±3,59 <sup>de</sup>	278,03±60,91 <sup>a</sup>	348,84±9,27 <sup>bcde</sup>	281,26±21,64 <sup>ab</sup>	***	***	***
	FA	295,30±42,93 <sup>abc</sup>	329,32±10,49 <sup>abcd</sup>	358,13±2,27 <sup>cde</sup>	379,05±3,07 <sup>de</sup>	384,46±1,18 <sup>de</sup>	401,28±14,25 <sup>e</sup>	317,44±13,30 <sup>abcd</sup>			
16:00	CO	178,33±8,21 <sup>a</sup>	232,59±16,55 <sup>abc</sup>	216,45±1,66 <sup>ab</sup>	227,31±9,22 <sup>abc</sup>	187,27±52,7 <sup>a</sup>	229,18±8,15 <sup>abc</sup>	183,00±24,89 <sup>a</sup>	***	***	***
	FA	184,82±30,04 <sup>a</sup>	212,72±9,49 <sup>ab</sup>	233,59±1,21 <sup>abc</sup>	260,25±0,87 <sup>bc</sup>	263,89±2,77 <sup>bc</sup>	274,38±8,84 <sup>c</sup>	213,91±8,62 <sup>ab</sup>			
18:00	CO	90,83±4,96 <sup>ab</sup>	115,79±3,42 <sup>de</sup>	107,04±2,26 <sup>cdef</sup>	125,48±5,67 <sup>e</sup>	78,51±7,55 <sup>a</sup>	105,67±3,18 <sup>cde</sup>	86,89±2,57 <sup>ab</sup>	n.s	***	***
	FA	93,35±12,33 <sup>ab</sup>	97,14±0,70 <sup>ab</sup>	103,43±3,53 <sup>bc</sup>	99,64±2,55 <sup>bc</sup>	100,48±3,84 <sup>bc</sup>	105,01±4,65 <sup>cde</sup>	87,13±6,00 <sup>ab</sup>			
ΣAGMI <sup>5</sup>	CO	263,11±4,86 <sup>ab</sup>	357,27±14,43 <sup>d</sup>	322,04±14,70 <sup>abcd</sup>	352,11±3,76 <sup>cd</sup>	285,19±28,92 <sup>abc</sup>	353,47±18,99 <sup>d</sup>	255,11±45,41 <sup>a</sup>	n.s	***	***
	FA	291,17±52,36 <sup>abcd</sup>	284,08±4,44 <sup>ab</sup>	312,64±2,82 <sup>abcd</sup>	326,90±9,91 <sup>bcd</sup>	303,18±14,11 <sup>abcd</sup>	318,09±12,59 <sup>abcd</sup>	255,99±17,45 <sup>a</sup>			
18:1n-9	CO	198,58±3,83 <sup>a</sup>	290,08±7,81 <sup>c</sup>	260,93±9,52 <sup>bc</sup>	290,94±1,87 <sup>c</sup>	237,44±17,44 <sup>abc</sup>	291,42±14,10 <sup>c</sup>	208,82±41,84 <sup>ab</sup>	***	***	***
	FA	227,23±43,97 <sup>ab</sup>	216,07±8,16 <sup>ab</sup>	246,95±2,96 <sup>abc</sup>	262,94±4,83 <sup>bc</sup>	247,19±11,50 <sup>abc</sup>	255,37±7,59 <sup>bc</sup>	208,45±13,45 <sup>ab</sup>			
ΣAGPI <sup>6</sup>	CO	216,80±30,18 <sup>Aab</sup>	222,78±10,13 <sup>Ab</sup>	191,31±9,40 <sup>Aac</sup>	184,64±2,62 <sup>Aac</sup>	179,91±3,02 <sup>Aac</sup>	165,64±2,64 <sup>Ac</sup>	122,60±10,96 <sup>Ad</sup>	n.s	***	n.s
	FA	215,25±24,80 <sup>Aa</sup>	213,06±12,86 <sup>Aa</sup>	201,95±11,88 <sup>Ab</sup>	169,63±7,48 <sup>Abc</sup>	164,20±4,69 <sup>Acd</sup>	174,69±4,68 <sup>Abc</sup>	135,76±2,67 <sup>Ad</sup>			
18:2n-6	CO	138,80±12,83 <sup>de</sup>	150,90±9,02 <sup>e</sup>	135,37±5,17 <sup>de</sup>	138,07±1,98 <sup>de</sup>	140,00±4,99 <sup>de</sup>	120,55±2,19 <sup>cd</sup>	82,24±4,25 <sup>ab</sup>	***	***	***
	FA	133,41±27,68 <sup>de</sup>	118,34±3,66 <sup>cd</sup>	105,17±5,66 <sup>bc</sup>	99,79±4,51 <sup>bc</sup>	94,55±5,72 <sup>abc</sup>	94,86±2,52 <sup>bc</sup>	66,98±1,87 <sup>a</sup>			
18:3n-6	CO	2,19±0,34 <sup>bc</sup>	2,75±0,11 <sup>c</sup>	2,70±0,09 <sup>c</sup>	2,75±0,13 <sup>c</sup>	2,01±0,78 <sup>bc</sup>	2,81±0,07 <sup>c</sup>	1,73±0,23 <sup>ab</sup>	***	***	***
	FA	2,71±0,71 <sup>c</sup>	1,94±0,04 <sup>bc</sup>	1,72±0,10 <sup>ab</sup>	1,50±0,01 <sup>ab</sup>	1,29±0,15 <sup>ab</sup>	1,37±0,04 <sup>ab</sup>	0,80±0,08 <sup>a</sup>			
18:3n-3	CO	8,10±0,66 <sup>def</sup>	10,02±0,52 <sup>f</sup>	8,81±0,50 <sup>ef</sup>	9,27±0,19 <sup>f</sup>	6,91±0,52 <sup>cde</sup>	7,25±0,52 <sup>cde</sup>	4,96±0,52 <sup>ab</sup>	***	***	***
	FA	8,33±0,57 <sup>def</sup>	7,14±0,05 <sup>cde</sup>	7,07±0,34 <sup>cde</sup>	6,57±0,92 <sup>abcd</sup>	6,89±1,43 <sup>bcde</sup>	5,86±0,42 <sup>abc</sup>	4,77±0,79 <sup>a</sup>			

Continuação (Tabela 1)

20:4n-6	CO	23,27±6,77 <sup>Aa</sup>	18,18±1,10 <sup>Aab</sup>	13,99±1,59 <sup>Abc</sup>	10,58±0,33 <sup>AcD</sup>	8,82±1,68 <sup>Ad</sup>	10,69±1,53 <sup>AcD</sup>	9,97±2,73 <sup>AcD</sup>	n.s	***	n.s
	FA	22,32±2,81 <sup>Aa</sup>	22,14±5,05 <sup>Aa</sup>	19,52±1,07 <sup>Aa</sup>	8,89±1,19 <sup>Abc</sup>	7,13±0,87 <sup>Abc</sup>	8,00±0,23 <sup>Abc</sup>	5,69±0,59 <sup>Ac</sup>			
20:5n-3	CO	3,05±1,11 <sup>Aa</sup>	2,25±0,59 <sup>Aab</sup>	1,09±0,04 <sup>Abc</sup>	0,85±0,02 <sup>Ac</sup>	0,71±0,12 <sup>Ac</sup>	0,78±0,04 <sup>Ac</sup>	0,70±0,11 <sup>Ac</sup>	n.s	***	n.s
	FA	2,72±1,52 <sup>Aab</sup>	2,98±0,51 <sup>Aa</sup>	2,56±0,75 <sup>Aab</sup>	1,18±0,14 <sup>Aab</sup>	1,08±0,03 <sup>Ab</sup>	1,40±0,09 <sup>Aab</sup>	1,06±0,04 <sup>Ab</sup>			
22:6n-3	CO	14,88±4,84 <sup>b</sup>	12,04±1,40 <sup>ab</sup>	8,73±1,44 <sup>ab</sup>	5,80±0,14 <sup>a</sup>	6,32±1,09 <sup>a</sup>	6,39±0,94 <sup>a</sup>	6,12±0,94 <sup>a</sup>	***	***	***
	FA	14,74±3,61 <sup>b</sup>	27,98±1,15 <sup>c</sup>	39,18±1,16 <sup>ef</sup>	32,18±2,06 <sup>cd</sup>	34,53±0,97 <sup>de</sup>	42,69±2,04 <sup>f</sup>	38,60±3,22 <sup>def</sup>			
$\Sigma n-6$	CO	189,95±22,31 <sup>Aab</sup>	196,45±11,27 <sup>Ab</sup>	171,18±7,41 <sup>Aabc</sup>	167,47±2,48 <sup>Aabc</sup>	164,81±3,70 <sup>Abc</sup>	150,01±2,21 <sup>Ac</sup>	109,72±9,92 <sup>Ad</sup>	***	***	n.s
	FA	185,44±27,91 <sup>Aa</sup>	172,73±11,20 <sup>Aab</sup>	151,01±9,26 <sup>Abc</sup>	128,59±5,95 <sup>Ac</sup>	120,57±4,73 <sup>AcD</sup>	123,60±3,06 <sup>AcD</sup>	89,88±1,50 <sup>Ad</sup>			
$\Sigma n-3$	CO	28,43±6,39 <sup>bc</sup>	26,33±1,59 <sup>bc</sup>	20,14±2,00 <sup>ab</sup>	17,17±0,36 <sup>a</sup>	15,10±1,04 <sup>a</sup>	15,62±0,60 <sup>a</sup>	12,88±1,14 <sup>a</sup>	***	***	***
	FA	30,19±6,19 <sup>c</sup>	40,33±1,87 <sup>d</sup>	50,94±2,67 <sup>e</sup>	41,04±2,12 <sup>d</sup>	43,63±1,61 <sup>de</sup>	51,10±2,39 <sup>e</sup>	45,87±1,91 <sup>de</sup>			

<sup>1</sup>Médias representam valores de três peixes por tanque (9 peixes por tratamento dieta× tempo de amostragem). A presença de somente letras minúsculas indica que a interação dieta × tempo de amostragem foi significativa ( $P < 0,05$ ). Quando a interação dieta × tempo de amostragem não foi significativa ( $P > 0,05$ ), os fatores foram analisados separadamente, sendo que, letras maiúsculas representam diferença entre as dietas em cada dia de coleta ( $P < 0,05$ ), enquanto que letras minúsculas representam diferença entre os tempos de amostragem por cada tipo de dieta ( $P < 0,05$ ).

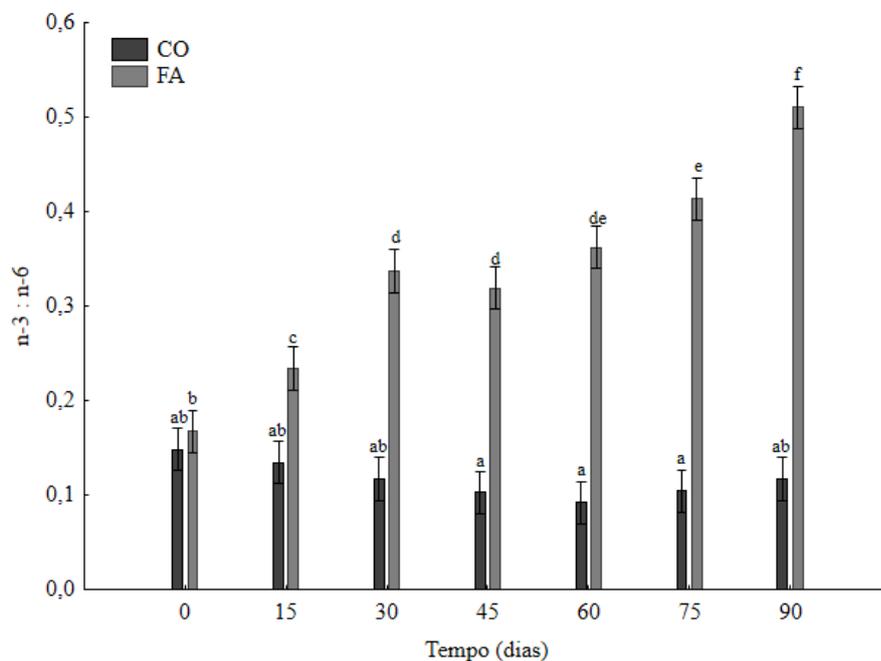
<sup>2</sup>CO = dieta controle; FA = dieta suplementada com 5 % de farinha de microalga da All-G Rich<sup>TM</sup> product/Alltech<sup>®</sup>.

<sup>3</sup> $P$  valor procedentes da ANOVA de dois fatores e o teste de Tukey, onde D = dieta, T = tempo (dias), D × T = interação dieta × tempo de amostragem, \*\*\* indicam  $P < 0,05$ , n.s = não significativo.

<sup>4</sup>Total de ácidos graxos saturados, incluídos 12:0, 14:0, 15:0, 17:0, 18:0, 20:0, 21:0 e 24:0.

<sup>5</sup>Total de ácidos graxos monoinsaturados, incluídos o 14:1n-7, 15:1n-5, 16:1n-9, 17:1n-9, 18:1n-7 e 20: 1n-9.

<sup>6</sup>Total de ácidos graxos poli-insaturados, incluídos o 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:4n-6, 22:5n-6 e 22:5n-3.



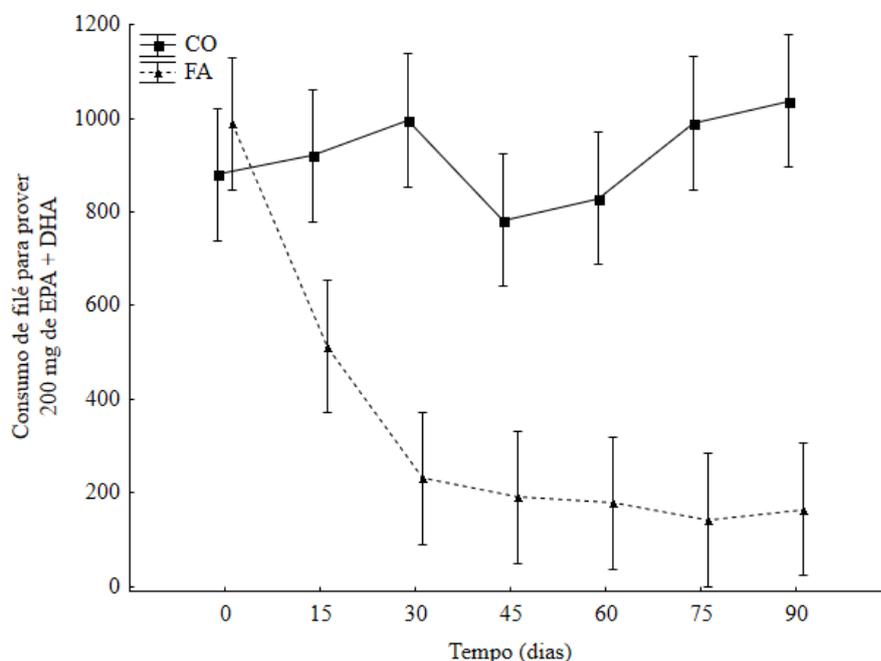
**Figure 11.** Relação n-3:n-6 no filé de tambaqui *Colossoma macropomum*, alimentado com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. As médias representam valores de três peixes por tanque (9 peixes por tratamento dieta × tempo de amostragem). Letras diferentes indicam diferenças significativas na interação dieta × tempo de amostragem ( $P < 0,05$ ) pela ANOVA de dois fatores e teste de Tukey. Barras verticais denotam intervalos de confiança a 0,95.

Por outro lado, em relação ao EPA, a interação dieta × tempo de amostragem não causou efeito diferencial no conteúdo de EPA no filé dos peixes ( $P > 0,05$ ). No entanto, a análise dos fatores separadamente permitiu identificar que o conteúdo de EPA no filé dos peixes diminuiu em função do tempo independente da dieta ( $P < 0,05$ ). Isso pode estar relacionado aos baixos níveis de EPA nas dietas experimentais que não garantiu a deposição deste ácido graxo no filé dos peixes, assim como ao baixo conteúdo de ácido linolênico nas dietas (Tabela 2) que não foi suficiente para promover o alongamento e dessaturação para EPA e DHA, como verificado no baixo conteúdo desses AGPI-CL no músculo (Tabela 3). Outra possível causa é o alto conteúdo de ácido linoleico quando comparado com o ácido linolênico, uma vez que os processos de alongamento e dessaturação desses ácidos graxos são mediados pelas mesmas enzimas, que competem entre si e atuam preferencialmente no substrato de maior disponibilidade (Tocher, 2003; Tocher, 2010; Nelson e Cox, 2011). Nesse sentido, é verificada uma maior deposição de ARA, provavelmente produzido a partir do ácido linoleico, em relação ao EPA no músculo dos peixes avaliados, como possível resposta à preferência de substrato das enzimas alongase e dessaturase.

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015) recomenda o consumo mínimo de 200 mg de EPA + DHA por dia para humanos, a fim de garantir o efeito nutracêutico na prevenção de doenças cardiovasculares, mentais e da retina, além de potencializar a capacidade cognitiva (Tully *et al.*, 2003; Judge *et al.*, 2007; Swanson *et al.*, 2012). Assim, com base nos resultados obtidos, observa-se que seria recomendado consumir 231,35±33,37 g de filé de tambaqui alimentado por 30 dias com dieta vegetal contendo farinha de microalga. Essa quantidade de filé diminuiria se utilizasse peixes alimentados com dietas contendo farinha de microalga durante 90 dias.

Entretanto, nessas mesmas condições seria necessário o consumo entre 995,64±58,05 a 1037,13±70,93 g de filé de tambaqui quando estes são alimentados com a dieta controle para atingir a quantidade 200 mg de EPA + DHA (Figura 12).

Finalmente, com o intuito de melhorar o perfil do DHA e das proporções n-3:n-6 no filé do tambaqui a ser comercializado, recomenda-se a elaboração de dietas específicas para a fase de terminação, com a inclusão de 5% de farinha de microalga derivada de *Schizochytrium* sp. e seu oferecimento aos peixes durante o período de 71 dias previamente ao abate. Assim, os níveis máximos de DHA nos filés do tambaqui estariam garantidos.



**Figure 12.** Consumo de filé de tambaqui *Colossoma macropomum* (g) necessários para prover 200 mg de ácido eicosapentaenoico - EPA + ácido docosahexaenoico – DHA, os quais foram alimentados com dietas não suplementadas (CO) e suplementadas com 5% de farinha de microalga (FA) – rica em DHA e derivada de *Schizochytrium* sp. (All-G Rich™ product/Alltech®), durante 90 dias. Médias representam valores de três peixes por tanque (9 peixes por tratamento dieta × tempo de amostragem). Barras verticais denotam intervalos de confiança a 0,95.

## 7. CONCLUSÃO

A inclusão de farinha de microalga (*Shizochytrium* sp.) em dietas de origem vegetal para tambaqui, incrementa os níveis do ácido docosahexaenoico no filé, melhora a relação n3:n6, consequentemente aumenta o valor nutracêutico do peixe de criação, sem causar detrimento no crescimento nem no estado geral de bem estar dos mesmos.

Seria recomendado consumir  $231,35 \pm 33,37$  g de filé de tambaqui alimentado por 30 dias com dieta vegetal contendo farinha de microalga para atingir os níveis recomendados pela Organização Mundial da Saúde (200 mg de EPA + DHA por dia).

A elaboração de dietas específicas para a fase de terminação, com a inclusão de 5% de farinha de microalga derivada de *Schizochytrium* sp. e seu oferecimento aos peixes durante o período de 71 dias previamente ao abate, seria uma estratégia para melhorar o perfil de DHA no filé dos tambaquis de criação e alimentados com dietas de origem vegetal.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackman, R. G. 1989. Nutritional composition of fats in seafoods. *Progress in Food and Nutrition Science*, 13, 161-241.
- Almeida, N. M.; Franco, M. R. B. 2006. Determination of essential fatty acids in captured and farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*) from the Brazilian Amazonian Area. *Journal of the American Oil and Chemists' Society*, 83, 707-711.
- Almeida, N.M.; Visentainer, J.V.; Bueno-Franco, M.R. 2008. Composition of total, neutral and phospholipids in wild and farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon area. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88:1739-1747.
- AOAC (Association Of Official Analytical Chemistis). 2005. *Official Methods of Analysis of the AOAC International* (18th ed.). Arlington, Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists-AOAC, INC.
- Abeláez-Rojas, G.A.; Fracalossi, D. M.; Fim, J. D. I. 2002. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31 (3), 1059-1069.
- Barrows, F.T.; Bellis, D.; Krogdahl, A.; Silverstein, J.T.; Herman, E.M.; Sealey, W.M.; Rust, M.B.; Gatlin III, D.M. 2008. Report of the plant products in aquafeed strategic planning workshop: An integrated, interdisciplinary research roadmap for increasing utilization of plant feedstuffs in diets for carnivorous fish. *Reviews in Fisheries Science*, 16(4):449-455.
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Calder, P.C. 2004. n-3 fatty acids, inflammation, and immunity-relevance to postsurgical and critically ill patients. *Lipids*. 39:1147-1161.
- Carter, C. G.; Bransden, M. P.; Lewis, T. E.; Nichols, P. D. 2003. Potential of thraustochytrids to partially replace fish oil in Atlantic salmon feeds. *Marine Biotechnology*, 5, 480-492.
- Cartonilho, M.M.; Jesus, R.S. 2011. Qualidade de cortes congelados de tambaqui cultivado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(4): 344-350.
- Cavalier-Smith, T.; Allsopp, M.; Chao, E.E. 1994. Thraustochytrids are chromists, not fungi - 18s ribosomal-RNA signatures of heterokonta. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biologic*, 346(1318):387-397.
- Chauton, M.S.; Reitan, K.I.; Norsker, N.H.; Tveteras, R.; Kleivdal, H.T. 2015. A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. *Aquaculture*, 436:95-103.
- Corrêa, C.F.; Aguiar, L.H.; Lundstedt, L.M.; Moraes, G. 2007. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 147: 857-862.
- FAO. 2016. *The state of world fisheries and aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 204p.

- Feller, S. 2008. Acyl chain conformations in phospholipid bilayers: a comparative study of docosahexaenoic acid and saturated fatty acids. *Chemistry and Physics of Lipids*, 153: 76:80.
- Ganuzza, E.; Benítez-Santana, T.; Atalah, E.; Vega-Orellana, O.; Ganga, R.; Izquierdo, M. S. 2008. *Cryptothecodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. *Aquaculture*, 277, 109-116.
- Gatlin III, D.M.; Barrows, F.T.; Brown, P.; Dabrowski, K.; Gaylord, G.; Hardy, R.W.; Herman, E.; Hu, G.; Krogdahl, A.; Nelson, R.; Overturf, K.; Rust, M.; Sealey, W.; Skonberg, D.; Souza, E.; Stone, D.; Wilson, R.; Wurtele, E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture research*, 38:551-579.
- Gillette-Guyonnet, S.; Andrieu, S.; Dantoine, T.; Dartigues, J.F.; Touchon, J.; Vellas, B. 2008. Commentary on "A roadmap for the prevention of dementia II. Leon Thal Symposium 2008." The Multidomain Alzheimer Preventive Trial (MAPT): a new approach to the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 5:114–121.
- Gonçalves, L. U.; Cyrino, J. E. P. 2014. Digestibility of energy, lipids and fatty acids of vegetable oils and poultry fat by pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). *Aquaculture Nutrition*, 20: 567-573.
- Goulding, M.; Carvalho, M.L. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1(2): 107-133.
- Guimarães, I. G.; Martins, G. P. 2015. Nutritional requirement of two Amazonian aquacultured fish species, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) and *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): a mini review. *Journal of Applied Ichthyology*, 31 (4), 57-66.
- Horrocks, L.A.; Yeo, Y.K. 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological Research*, 40(3):211-225.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2013). *Produção da Pecuária Municipal 2013*. (41th ed.). Brasil.
- Ituassú, D. R.; Santos, G. R. S.; Roubach, R.; Pereira-Filho, M. 2004. Desenvolvimento de tambaqui submetido a períodos de privação alimentar. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 39 (12), 1199-1203.
- Izel, A.C.U.; Melo, L.A.S. 2004. *Criação de tambaqui (Colossoma macropomum) em tanques escavados no Estado do Amazonas*. Boletim Técnico Embrapa Amazônia Occidental, Manaus, AM, Brasil. 24p.
- Jiang, Y.; Fan, K-W.; Wong, R.T-Y.; Chen, F. 2004. Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:1196-1200.
- Joseph, J. D.; Ackman, R. G. 1992. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.

- Judge, M.P.; Harel, O.; Lammi-Keefe, C.J. 2007. Maternal consumption of a docosahexaenoic acid-containing functional food during pregnancy: benefit for infant performance on problem-solving but not on recognition memory tasks at age 9 mo. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85:1572–1577.
- Lewis, T.E.; Nichols, P.D.; McMeekin, T.A. 1999. The biotechnological potencial of Thraustochytrids. *Marine Biotechnology*, 1:580-587.
- Li, M. H.; Robinson, E. H.; Tucker, C. S.; Manning, B. B.; Khoo, L. 2009. Effects of dried algae *Schizochytrium* sp., a rich source of docosahexaenoic acid, on growth, fatty acid composition, and sensory quality of channel catfish. *Aquaculture*, 292, 232-236.
- Lima-Junior, S. E.; Cardone, I. B.; Goiten, R. 2002. Determination of a method for calculation of allometric condition factor fish. *Acta Scientiarum*, 24 (2), 397-400.
- Lim, S-J.; Lee, K-J. 2009. Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture*, 290:283-289.
- Lin, S.; Luo, L. 2011. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology*, 168:80-87.
- Maia, E.L.; Rodríguez-Amaya, D.B. 1992. Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of the Brazilian freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Food Science and Human Nutrition*, 29:633-642.
- Mansur, A.P.; Favarato, D. 2012. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 99(2):755-761.
- Melo Filho, A.A.; Oliveira, H.H.; Santos, R.C. 2013. Omega-6/Omega-3 and PUFA/SFA in *Colossoma macropomum* grown in Roraima, Brazil. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 5(1):30-34.
- Metz, J.G.; Roessler, P.; Facciotti, D.; Levering, C.; Dittrich, F.; Lassner, M.; Valentine, R.; Lardizabal, K.; Domergue, F.; Yamada, A.; Yazawa, K.; Knauf, V.; Browse, J. 2001. Production of polyunsaturated fatty acids by Polyketide Synthases in both prokaryotes and Eukaryotes. *Science*, 293:290-293.
- Miller, M.R.; Nichols, P.D.; Carter, C.G. 2007. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148(2):382-392.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2011. *Princípios de bioquímica de Lehninger*, Porto Alegre, Artmed. 1298p.
- NRC (National Research of Council). 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press: Washington, D.C.
- Saint-Paul, U. 1984. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalminae. *Environmental Biology of Fishes*, 11: 53–62.
- Samuel-Fitwi, B.; Wuertz, S.; Schroeder, J.P.; Schulz, C. 2012. Sustainability assessment tools to support aquaculture development. *Journal of Cleaner Production*, 32: 183-192.

- Santos-Júnior, O. O.; Montanher, P. F.; Bonafe, E. G.; Do Prado, I. N.; Maruyama, S. A.; Matsushita, M.; Visentainer, J. V. 2014. A simple, fast and efficient method for transesterification of fatty acids in foods assisted by ultrasound energy. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25, 1712-1719.
- Sargent, J.R.; Tocher, D.R.; Bell, J.G. 2002. The lipids. p. 181-257. In: Halver, J.E. (ed). *Fish Nutrition*, 3rd ed, Chap. 4. Academic Press, San Diego.
- Swanson, D.; Block, R.; Mousa, S. 2012. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in Nutrition*, 3:1-7.
- Simopoulos, A. P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674-688.
- Sprague, M.; Walton, J.; Campbell, P.J.; Strachan, F.; Dick, J.R.; Bell, J.G. 2015. Replacement of fish oil with a DHA-rich algal meal derived from *Schizochytrium* sp. on the fatty acid and persistent organic pollutant levels in diets and flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) post-smolts. *Food Chemistry*, 185:413-421.
- Tacon, A.G.J.; Metian, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285: 146-158.
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fishiries Science*, 11(2):107-184.
- Tocher, D. R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41, 717-732.
- Tully, A.M.; Roche, H.M.; Doyle, R.; Fallon, C.; Bruce, I.; Lawlor, B.; Coakley, D.; Gibney M.J. 2003. Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study. *British Journal of Nutrition*, 89:483-489.
- Val, A.L. 1995. Oxygen transfer in fishes: morphological and molecular adjustments. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 28: 19-27.
- Visentainer, J. V. 2012. Analytical aspects of the flame ionization detector response of fatty acid esters in biodiesels and foods. *Química Nova*, 35, 274-279.
- Wood, C.M.; Wilson, R.W.; Gonzalez, R.J.; Patrick, M.L.; Bergman, H.L.; Narahara, A.; Val, A.L. 1998. Response on an Amazonian Teleost, the Tambaqui (*Colossoma macropomum*), to Low pH in Extremely Soft Water. *Physiological Zoology*, 71 (6): 658-670.
- Yokoyama, R.; Honda, D. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. non. *Mycoscience*, 48:199-211.
- WHO. 2015. Nutrition. Population nutrient intake goals for preventing diet-related chronic diseases. World Health Organization, [http://www.who.int/nutrition/topics/5\\_population\\_nutrient/en/index13.html](http://www.who.int/nutrition/topics/5_population_nutrient/en/index13.html) (accessed 12.12.15).