

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**CARLA LOURENÇO FERREIRA**

**BIOEFICÁCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA SINTÉTICA EM DIETAS  
PARA JUVENIS DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

**FORTALEZA**

**2018**

CARLA LOURENÇO FERREIRA

BIOEFICÁCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA SINTÉTICA EM DIETAS  
PARA JUVENIS DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar-Labomar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Orientador(a): Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F44b Ferreira, Carla Lourenço.  
Bioeficácia da suplementação de metionina sintética em dietas para juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei* / Carla Lourenço Ferreira. – 2018.  
48 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes.
1. *Litopenaeus vannamei*. 2. metionina. 3. DL-Metionina. 4. desempenho zootécnico. 5. Met-Met. I.  
Título.

CDD 551.46

---

CARLA LOURENÇO FERREIRA

BIOEFICÁCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA SINTÉTICA EM DIETAS  
PARA JUVENIS DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar – Labomar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Pedro Carlos Cunha Martins  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

---

Dr. Hassan Sabry Neto  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais Eduardo e Laiz, por toda educação e por sempre me apoiarem em minhas escolhas.

A minha irmã Júlia que mesmo estando longe sempre esteve na torcida.

Ao meu orientador, Professor Dr. Alberto Nunes, por todo apoio, ensinamento e ótima orientação em todos os momentos do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, Sandra, Júnior, Felipe e Hassan, e também aos amigos estagiários que tanto me ajudaram e contribuíram para a execução deste projeto.

A Evonik Degussa do Brasil Ltda. e Evonik Industries AG pelo apoio e realização das análises químicas das dietas e dos ingredientes utilizados no presente estudo.

Aos Professores da Universidade Federal do Ceará pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de pesquisa concedida.

A Evonik Nutrition & Care GmbH (Hanau-Wolfgang, Alemanha) e sua filial a Evonik Degussa Brasil Ltda. (São Paulo, SP) pelo fornecimento dos aminoácidos cristalinos e realização das análises químicas das dietas experimentais e material biológico (cauda e glândula digestiva dos camarões).

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo comparar a bioeficácia de dietas suplementadas com duas fontes de metionina sintética, DL-Metionina e DL-Metionil-DL-Metionina em dietas para juvenis do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. Foram avaliados oito tratamentos, havendo variação no tipo de metionina livre (DL-Met e Met-Met), e na suplementação (0,10, 0,19, 0,29, 0,38% da dieta na base seca para DL-Met e 0,11, 0,20, 0,30, 0,39% da dieta para Met-Met), além de uma dieta controle, sem suplementação, com um conteúdo total de metionina de 0,43% proveniente apenas de fontes intactas. O cultivo dos camarões ocorreu durante 63 dias, tendo sido empregado 50 tanques experimentais, operando em regime contínuo de recirculação de água salgada, a uma taxa de 20% por dia, sem filtragem. O peso corporal final foi maximizado com suplementações de DL-Met e Met-Met de 0,19% e 0,20%, equivalente a um total de 0,66% e 0,64% de metionina (1,11% e 1,02% de metionina+cistina), respectivamente. O presente estudo mostrou que dietas suplementadas com as duas fontes de metionina cristalina levam a um aumento no desempenho zootécnico quando comparados à dieta sem suplementação. O desempenho zootécnico de juvenis do *L. vannamei* não apresentou diferenças significativas quando alimentados com dietas suplementadas com DL-Met e Met-Met. Entretanto, o nível de suplementação e a fonte de metionina cristalina afeta a composição proteica e aminoacídica do músculo caudal e da glândula digestiva dos camarões. Níveis mais elevados com uso da Met-Met levam a um maior conteúdo de proteína bruta, aminoácidos essenciais e não essenciais, em particular metionina, lisina e cistina, na glândula digestiva e no músculo caudal dos camarões.

**Palavras-chave:** *Litopenaeus vannamei*, metionina, DL-Metionina, desempenho zootécnico, Met-Met.

## ABSTRACT

The present study aimed at comparing the bioefficacy of diets supplemented with two sources of synthetic methionine, DL-Methionine and DL-Methionyl-DL-Methionine in diets for the juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Eight treatments were evaluated, varying the free methionine source (DL-Met and Met-Met), and supplementation levels (0.10, 0.19, 0.29, 0.38% on a dry matter basis for DL- Met and 0.11, 0.20, 0.30, 0.39% on a dry matter basis for Met-Met). A diet without methionine supplementation, was used as a control with a total dietary methionine content of 0.43% originating only from intact sources. Shrimp were reared for 63 days, in 50 tanks of 0.5 m<sup>3</sup>, operating under a continuous water recirculation regime, at a rate of 20% per day, without filtration. Shrimp final body weight was maximized with DL-Met and Met-Met supplemented at 0.19% and 0.20%, equivalent to 0.66% and 0.64% of total dietary methionine (1.11% and 1.02% methionine + cystine), respectively. The present study demonstrated that diets supplemented with both sources of crystalline methionine lead to an increase in shrimp growth performance when compared to a diet without supplementation. No statistical differences were observed on the shrimp growth performance between diets supplemented with DL-Met and Met-Met. However, the level of dietary supplementation and the source of crystalline methionine affected the protein and amino acid composition of the caudal muscle and the digestive gland of shrimp. Higher supplementation levels using Met-Met lead to a higher content of crude protein, essential and non-essential amino acids, in particular methionine, lysine and cystine, in the digestive gland and in the caudal muscle of shrimp.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, methionine, DL-Methionine, growth performance, Met-Met.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Tanques experimentais em galpão coberto utilizados no estudo. Fonte: Alberto Nunes (2016). ..... 10
- Figura 2 - Modelo de regressão quadrática entre a suplementação dietética de duas fontes de metionina e o ganho de produtividade do camarão *L. vannamei*. DL-Met, DL-Metionina; Met-Met, DL-Metionil-DL-Metionina. .... 22
- Figura 3 - Consumo diário de metionina dietética por camarão estocado (mg/camarão/dia). Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre fontes de metionina dentro de um mesmo nível de suplementação e entre níveis de suplementação para uma mesma fonte, respectivamente. Asteriscos (\*) indicam diferença significativa em relação a dieta CTL (0,00%). ..... 23



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Composição das dietas (% , base natural) produzidas em laboratório para avaliação do desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei*. ..... 12
- Tabela 2 – Conteúdo de matéria seca, proteína bruta e perfil de aminoácidos (% da dieta, base seca) das 9 dietas utilizadas neste estudo. CV, coeficiente de variação (%). ..... 16
- Tabela 3 – Tabela de alimentação utilizada no presente estudo com juvenis do *L. vannamei* (Façanha *et al.*, 2016). ..... 17
- Tabela 4 – Concentração de compostos nitrogenados (mg/L) na água ao longo de 63 dias de cultivo. As médias ( $\pm$  desvio padrão) representam valores de três tanques de cultivo selecionados aleatoriamente. Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) segundo o teste a posteriori de Tukey HSD. NS, diferença não significativa ao nível de  $\alpha = 0,05$ . ..... 19
- Tabela 5 - Desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei* cultivado ao longo de 63 dias em tanques de 0,5 m<sup>3</sup> alimentado com dietas suplementadas com duas fontes de metionina cristalina. Valores representam a média ( $\pm$  desvio padrão). Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) segundo o teste a posteriori de Tukey HSD. NS, diferença não significativa ao nível de  $\alpha = 0,05$ . Asterisco (\*) indica diferença significativa entre a dieta controle (CTL) e demais dietas segundo o teste t de Student..... 21
- Tabela 6 - Composição proteica e aminoacídica do músculo caudal e da glândula digestiva dos camarões após período experimental. Valores (%) dados na matéria seca. Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão de três amostras ..... 22

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.1	Camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	3
2.2	Proteínas e aminoácidos.....	4
2.3	Aminoácidos cristalinos.....	6
2.4	Metionina.....	8
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
3.1	Objetivo geral.....	9
3.2	Objetivos específicos.....	9
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
4.1	Local do estudo e desenho experimental.....	10
4.2	Sistema de cultivo e estocagem de pós-larvas.....	10
4.3	Dietas experimentais.....	12
4.4	Fabricação das dietas.....	14
4.5	Análises físicas e químicas das dietas.....	15
4.6	Alimentação e sistema de manejo.....	17
4.7	Desempenho zootécnico.....	18
4.8	Análises estatísticas.....	18
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
5.1	Qualidade da água.....	19
5.2	Aspectos físicos das dietas.....	20
5.3	Desempenho zootécnico.....	20
5.4	Consumo de metionina.....	23
5.5	Absorção de proteínas e aminoácidos.....	23
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com a produção pesqueira relativamente estática desde o final dos anos 80, a aquicultura tem sido responsável pelo expressivo crescimento da oferta de pescado para consumo humano. Em 2015, a atividade aquícola gerou um total de 73,8 milhões de toneladas de pescado, sendo 3,9 milhões de toneladas referentes ao cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2016).

O desenvolvimento da aquicultura moderna foi alcançado através de melhorias no manejo, no controle de doenças, além de uma melhor compreensão das necessidades nutricionais de cada espécie cultivada. Com isso, é necessário que as dietas sejam aperfeiçoadas, de modo que as exigências nutricionais sejam atendidas de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento e sistema de cultivo adotado (NUNES *et al.*, 2014).

As rações para peixes e camarões requerem matérias primas ricas em proteínas, sendo a farinha de peixe a fonte proteica mais popularmente utilizada na composição de dietas. Isto se deve ao seu elevado conteúdo de proteína bruta digestível e ao equilibrado perfil de aminoácidos essenciais (NUNES *et al.*, 2014, TACON; METIAN, 2008). Porém, o rápido crescimento da aquicultura resultou em um aumento na demanda pela farinha e óleo de peixe, tornando-os mais caros e com menor disponibilidade para uso na alimentação de organismos aquáticos (FAO, 2016).

Por esta razão, uma maior atenção tem sido dada à identificação de ingredientes alternativos mais baratos, renováveis e com uma maior disponibilidade (NRC, 2011; NUNES *et al.*, 2014). Por se tratar de uma fonte rica em nutrientes essenciais, esta substituição requer estratégias adequadas de formulação de dietas (FOX; HUMES, 2011). Uma solução que tem sido adotada é a substituição de uma grande parte da farinha de peixe por fontes de proteína vegetal com suplementação de aminoácidos essenciais sintéticos (FAÇANHA *et al.*, 2016; FOX; HUMES, 2011; KOBLER, 2014; NUNES *et al.*, 2014).

Dentre os aminoácidos essenciais, a metionina é considerada o aminoácido mais limitante em dietas para peixes e camarões cultivados, desempenhando um papel importante na estrutura e síntese proteica (BROSNAN; BROSNAN 2006; FAÇANHA *et al.*, 2016). Dietas com baixos níveis de metionina resultam em um crescimento lento e em uma baixa eficiência alimentar (NRC, 2011; SIMMONS *et al.*, 1999), deficiência esta que pode ser

evitada por meio da suplementação com metionina cristalina (BROWDY *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2014).

A metionina sintética mais utilizada na suplementação de dietas para alimentação animal é a DL-Metionina (GOFF; GATLIN, 2004). Além disso, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com objetivo de desenvolver novas formas químicas de metionina a fim de reduzir seus custos, a solubilidade em água e aumentar a biodisponibilidade através de uma ação retardada no trato digestivo durante sua absorção (ALAM *et al.*, 2004, BROWDY *et al.*, 2012).

Um dos isômeros que vem sendo testado é o dipeptídeo da DL-Metionina ou DL-Metionil-DL-Metionina (AQUAVI<sup>®</sup> DL-Met-Met, Evonik Nutrition & Care GmbH, Hanau, Alemanha). Trata-se de um isômero significativamente menos hidrossolúvel que o aminoácido livre, permitindo um melhor aproveitamento do peptídeo para a síntese proteica (KOBLER, 2014). Com isso, o objetivo do presente estudo foi comparar a bioeficácia de dietas suplementadas com duas fontes de metionina sintética, DL-Metionina (MetAMINO<sup>®</sup> DL-Met, Evonik Nutrition & Care GmbH, Hanau, Alemanha) e DL-Met-Met em dietas para juvenis do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Camarão *Litopenaeus vannamei*

O camarão cinza ou camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) também conhecido como *Penaeus vannamei* (FLEGEL, 2008), é um crustáceo meroplancctônico, nativo da costa do Oceano Pacífico (do norte do México ao sul do Peru), região cujas águas possuem temperaturas normalmente superiores a 20° C ao longo do ano (BRIGGS, 2006). Trata-se de uma espécie eurihalina, possuindo, portanto, elevada tolerância a uma grande variedade de salinidade (BRAY *et al.*, 1994; ROY *et al.*, 2007).

Além da tolerância a uma ampla variação de salinidade e temperatura, e de sua capacidade de crescimento e sobrevivência nesse tipo de ambiente, o *L. vannamei* tornou-se uma espécie popular de crustáceos para a aquicultura em todo o mundo devido ao seu valor econômico e rápida taxa de crescimento (ROY *et al.*, 2010; WICKINS; LEE, 2007).

Em todo o mundo o cultivo de crustáceos é uma atividade econômica rentável. Em 2015 o cultivo do *L. vannamei* gerou um total de 3,9 milhões de toneladas (FAO, 2016). A produção de sementes é bastante simples, sendo possível produzir grandes quantidades de pós-larvas prontamente disponíveis no mercado, tornando-se uma espécie muito atraente para a aquicultura comercial em grande escala (SILVA, 2013).

O *L. vannamei* é uma espécie que vive em habitats marinhos tropicais, sendo que os adultos vivem no oceano aberto, enquanto as pós-larvas migram para a costa para passar seus estágios juvenis e subadultos em estuários costeiros, lagoas ou áreas de manguezais. Os machos tornam-se maduros a partir de 20 g e as fêmeas a partir de 28 g (BRIGGS, 2006).

O sistema digestivo dos camarões é primitivo, com a presença de um proventrículo que age em condições de pH próximo a neutralidade. A digestão de proteína ocorre de forma lenta, através de uma glândula digestiva compacta (DALL *et al.*, 1991). Dessa forma, os aminoácidos podem não estar disponíveis no sistema digestivo e nas células animais no mesmo momento, o que seria importante para um crescimento mais rápido (KOBLE, 2014).

Em sistemas de cultivo, os camarões são alimentados com dietas formuladas contendo diferentes percentuais de proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais. Os percentuais proteicos variam entre as espécies, de acordo com os requisitos nutricionais. O nível de proteína digestível recomendada para juvenis do *L. vannamei* é de 30% (NRC, 2011)

podendo este valor ser influenciado por fatores bióticos como estado fisiológico e fase de desenvolvimento da espécie, pelas características da proteína empregada ou por fatores abióticos, como temperatura e salinidade da água (HARDY, 2010; KURESHY; DAVIS, 2002).

## **2.2 Proteínas e aminoácidos**

Proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas, componentes essenciais para o funcionamento do metabolismo de todos os organismos. (BRODY, 1998; NELSON; COX, 2002). Milhares de proteínas diferentes são produzidas por organismos e cada uma possui uma estrutura específica, função e uma sequência única de aminoácidos (BUXBAUM, 2007; NELSON; COX, 2002).

Dentre as inúmeras funções estruturais e metabólicas, as proteínas conferem rigidez, conexão de tecidos, além de função mecânica como as contrações musculares. Algumas proteínas são enzimas que catalisam reações bioquímicas ou de transporte permitindo a entrada e saída de moléculas através das células. Além disso, algumas proteínas são importantes na sinalização celular, respostas imunes, adesão celular e funcionamento do ciclo celular (BUXBAUM, 2007). Proteína é, portanto, um componente essencial para todo tipo de célula no organismo (NRC, 2011).

Todas as proteínas são construídas por um conjunto de vinte aminoácidos ligados através de ligações peptídicas covalentes em sequências lineares características (NELSON; COX, 2002). Os aminoácidos são, portanto, moléculas formadoras de proteínas que contém grupos funcionais amino e carboxil, com a fórmula geral  $H_2N-C-H-R-COOH$ , onde R é uma cadeia lateral (BRODY, 1998). Eles diferem entre si por suas cadeias laterais, as quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica e influenciam a solubilidade do aminoácido em água (BUXBAUM, 2007; NELSON; COX, 2002).

Os vinte aminoácidos primários que são utilizados para a síntese proteica são classificados em essenciais e não essenciais. Os aminoácidos essenciais são aqueles que o organismo não é capaz de sintetizar, logo sua única forma de obtenção é através da ingestão de determinados alimentos. São eles: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Já os aminoácidos não essenciais são aqueles capazes de serem sintetizados pelo próprio organismo (NRC, 2011).

Os aminoácidos desempenham um papel importante no alcance da exigência energética de peixes e camarões e servem como combustíveis metabólicos para a maioria das espécies (NRC, 2011). No entanto, peixes e camarões não são capazes de sintetizar todos os aminoácidos, sendo necessário adquirirem alguns deles a partir da dieta através do consumo de proteínas ou misturas de aminoácidos de acordo com aspectos como qualidade da fonte proteica, estado fisiológico e fase do ciclo de vida do animal e condições de cultivo (D'ABRAMO; SHEEN, 1994; NRC, 2011).

O valor nutritivo de uma dieta proteica é influenciado principalmente pela composição de aminoácidos essenciais assim como sua biodisponibilidade (WATANABE, 2002; WILSON; POE, 1985). Nem todas as proteínas em um ingrediente estão disponíveis para uma determinada espécie de peixe e camarão. Dessa forma, a digestibilidade e o perfil de aminoácidos são o que determinam o valor nutricional e econômico de uma proteína (NUNES *et al.*, 2014)

O conteúdo proteico de uma dieta de camarões é uma consideração nutricional importante, pois a proteína é o principal nutriente limitante para o crescimento e é um dos principais componentes no custo de rações (DAVIS; ARNOLD, 2000; SAMOCHA *et al.*, 2004; TACON; AKIYAMA, 1997). Por se tratar de um componente importante e de custo elevado, os estudos nutricionais de camarão geralmente começam com a investigação do nível ótimo de proteína dietética, baseada na exigência de aminoácidos da espécie cultivada, reduzindo desta forma os custos de produção (MILLAMENA *et al.*, 1997; SHIAU, 1998).

A condição mais desejável para dietas de uma determinada espécie é que todos os aminoácidos essenciais estejam presentes em níveis equilibrados e biologicamente disponíveis atendendo os requisitos nutricionais da mesma. No caso de dietas para peixes e camarões essa condição nem sempre ocorre, pois, a maioria dos ingredientes alternativos utilizados é deficiente em um ou mais dos dez aminoácidos essenciais (NUNES *et al.*, 2014).

A farinha de peixe é o ingrediente mais comumente utilizado na alimentação de organismos aquáticos, pois além de ser excelente fonte proteica e de equilibrado perfil de aminoácidos essenciais, fornece também importantes nutrientes como ácidos graxos, vitaminas e minerais (CRUZ-SUÁREZ *et al.*, 2009; DAVIS; ARNOLD, 2000; SAMOCHA *et al.*, 2004). Porém, o rápido crescimento da aquicultura resultou em um aumento na demanda pela farinha e óleo de peixe, tornando-os mais caros e com menor disponibilidade para compor rações industriais (FAO, 2016; NUNES *et al.*, 2014).

Com isso, esforços em todo o mundo estão sendo direcionados à busca de fontes proteicas alternativas de qualidade, mais baratas, renováveis e com maior disponibilidade (DAVIS; ARNOLD, 2000; NRC, 2011; NUNES *et al.* 2014; TACON; AKIYAMA, 1997; WATANABE, 2002). Fontes proteicas de origem vegetal são consideradas economicamente e nutricionalmente viáveis. Porém, devido à deficiência ou desequilíbrio de aminoácidos essenciais, *e.g.*, lisina e metionina, níveis reduzidos de minerais, níveis limitados de ácidos graxos insaturados, presença de fatores anti-nutricionais ou toxinas e baixa palatabilidade, tornam seus níveis de inclusão limitados em rações industriais (DAVIS; ARNOLD, 2000; DAVIS *et al.*, 2004; SAMOCHA *et al.*, 2004; FRANCIS *et al.*, 2001; TACON, 1994).

Por se tratar de uma fonte rica em nutrientes essenciais, a substituição da farinha de peixe requer estratégias adequadas de formulação de dietas (FOX; HUMES, 2011). Os níveis de aminoácidos essenciais em dietas podem ser alcançados através de duas formas: aumentando os níveis de inclusão de ingredientes que contenham fontes intactas do aminoácido visado, ou suplementando com aminoácidos cristalinos. Na primeira forma, o aumento do uso de ingredientes proteicos pode elevar o nível de proteína bruta para níveis excessivos, aumentando o custo e o risco de poluição da água, através da liberação de compostos nitrogenados no meio. Devido a esses efeitos, a suplementação tem sido mais adotada, pois utiliza baixos níveis de aminoácidos cristalinos para atingir concentrações específicas com um menor custo de formulação (NUNES *et al.*, 2014).

### **2.3 Aminoácidos cristalinos**

Há mais de 40 anos, aminoácidos sintéticos, ou cristalinos, têm sido utilizados comercialmente com o objetivo de atingir os requisitos de aminoácidos essenciais das espécies cultivadas. A DL-Metionina, produzida por fermentação, foi um dos primeiros aminoácidos a serem utilizados na alimentação animal, no início da década de 1960, seguida por L-Treonina e L-Triptofano, que começaram a ser utilizados posteriormente nas décadas seguintes (NRC, 2011).

Os avanços na biotecnologia permitiram uma redução no custo da produção de aminoácidos em larga escala, importante fator para a expansão na suplementação de aminoácidos na alimentação animal. Os aminoácidos cristalinos estão, portanto, tornando-se componentes chaves nas formulações de rações para peixes e camarões de forma economicamente viável (NRC, 2011).



A eficiência no uso de aminoácidos cristalinos pode ser influenciada pela matriz de ingredientes e estabilidade em água das dietas, estágio de vida dos animais, além do comportamento alimentar das diferentes espécies (NANG-THU *et al.*, 2007).

Diversos estudos já demonstraram que aminoácidos cristalinos podem ser utilizados de forma eficiente para atender as exigências dietéticas de aminoácidos essenciais de peixes (ALAM *et al.*, 2002b; LALL *et al.*, 1994; LI; ROBINSON, 1998) e camarões (FOX *et al.*, 1995; HUAI *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2015).

No entanto, no caso dos crustáceos, os estudos nutricionais enfrentam dificuldade devido à lixiviação dos aminoácidos cristalinos em água (ALAM *et al.*, 2004; FOX *et al.*, 1995, NUNES *et al.*, 2014;). Isto pode ser explicado, pois diferentemente dos peixes que se alimentam de forma rápida, os camarões detectam e consomem o alimento de forma mais lenta. Esse longo tempo de alimentação faz com que não apenas os aminoácidos, mas também os outros componentes hidrossolúveis presentes na dieta como vitaminas e minerais sejam lixiviados do pellet para a água (ALAM *et al.*, 2004; KOBLEK, 2014; NUNES *et al.*, 2014). Além disso, os aminoácidos cristalinos possuem uma taxa de absorção relativamente rápida no trato digestivo dos camarões, enquanto os aminoácidos provenientes de fontes intactas são liberados mais lentamente (DABROWSKI *et al.*, 2010; KOBLEK, 2014).

Algumas técnicas voltadas para reduzir a solubilidade e a taxa de absorção de aminoácidos cristalinos podem ser adotadas. O uso de revestimentos, encapsulação ou polimerização têm se mostrado como alternativas para reduzir perdas e melhorar a eficiência de utilização de aminoácidos em dietas para peixes e camarões (NRC, 2011).

Dentre os aminoácidos cristalinos utilizados na indústria como DL-metionina e seus análogos, L-lisina, L-treonina, L-triptofano, L-isoleucina e L-valina, a metionina e a lisina são os aminoácidos essenciais mais limitantes em dietas baseadas em fontes de proteínas vegetais para peixes e camarões (AKIYAMA *et al.*, 1991; GATLIN *et al.*, 2007).

Dietas deficientes em aminoácidos essenciais podem levar a uma redução no crescimento e utilização de alimentos pelos animais. Dessa forma, a suplementação em dietas é importante, pois permite a formulação de alimentos com nutrientes equilibrados, atendendo as exigências de cada espécie (FOX *et al.*, 1995; MILLAMENA *et al.*, 1998). Com uma nutrição ideal balanceada, os camarões permanecem mais saudáveis, a carga ambiental é reduzida e uma menor demanda de farinha de peixe conserva os estoques pesqueiros reduzindo o custo das rações (NAYLOR *et al.*, 2000).

## 2.4 Metionina

A metionina é um dos dez aminoácidos essenciais utilizados em rações para peixes e camarão, particularmente aquelas formuladas com altos níveis de proteína vegetal (MILLAMENA *et al.*, 1996; SOOKYING *et al.*, 2013). É considerado como um dos aminoácidos mais limitantes, exigido por todos os animais, incluindo peixes e crustáceos, desempenhando um importante papel na síntese, estrutura e função proteica animal (ALAM *et al.*, 2005; BROSNAN; BROSNAN, 2006; KETOLA, 1982; TESHIMA *et al.*, 2002).

Dietas com deficiência em metionina podem resultar em crescimento lento e redução da eficiência alimentar (SIMMONS *et al.*, 1999). Com isso, a suplementação é frequentemente utilizada para ajustar a metionina dietética de modo a satisfazer os requisitos da espécie alvo, maximizando, assim, o desempenho da produção (EFSA, 2012). Além disso, o conteúdo apropriado de metionina pode reduzir a oxidação de outros aminoácidos levando a uma maior taxa de crescimento (NRC, 2011).

Diversos isômeros de metionina são produzidos industrialmente por processos químicos para o uso na alimentação animal (NRC, 2011). A metionina cristalina mais utilizada na suplementação de dietas animais é a DL-metionina (DL-Met), uma mistura racêmica de D- e L-isômeros (GOFF; GATLIN, 2004). Outros isômeros também têm chamado atenção na suplementação de dietas de peixes e camarões, como o ácido DL-2-hidroxi-metilbutanoico ou metionina análoga (BAKER, 2006; BROWDY *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2014).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com objetivo de desenvolver novas formas de metionina a fim de atingir baixos custos de produção, baixa solubilidade em água e alta biodisponibilidade atendida através de uma menor solubilidade em água e ação retardada da absorção (ALAM *et al.*, 2004; BROWDY *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2014).

Um dos isômeros que vem sendo testado é o dípeptídeo da DL-Metionina ou DL-Metionil-DL-Metionina (Met-Met). Trata-se de um isômero significativamente menos hidrossolúvel que o aminoácido livre, permitindo um melhor aproveitamento do peptídeo para a síntese proteica, com taxa de absorção 1,8 vezes superior à DL-Metionina em dietas do camarão *L. vannamei* (EFSA, 2015; KOBLER, 2014; NIU *et al.*, 2018). Além disso, as enzimas do camarão podem clivar o peptídeo no momento certo para que o animal utilize o aminoácido livre de forma perfeita para a síntese de proteína (KOBLER, 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo geral comparar a bioeficácia de dietas suplementadas com duas fontes de metionina sintética (DL-Met e Met-Met) em dietas para o camarão *Litopenaeus vannamei*, em diferentes níveis de suplementação.

#### 3.2 Objetivos específicos

- formular e fabricar em laboratório nove dietas experimentais suplementadas com fontes e níveis diferentes de metionina.
- avaliar o desempenho zootécnico (sobrevivência, crescimento semanal, produtividade, biomassa e fator de conversão alimentar) de juvenis do *L. vannamei*, alimentado com diferentes fontes e níveis de metionina.
- determinar a composição proteica e aminoacídica do músculo caudal e da glândula digestiva após o período experimental.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local do estudo e desenho experimental

O estudo foi realizado no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA), do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), da Universidade Federal do Ceará (UFC). O laboratório situa-se no Centro de Estudos em Aquicultura Costeira (CEAC), no entorno do Rio Pacoti, localizado no município de Eusébio, Estado do Ceará.

Foram avaliados oito tratamentos, havendo variação no tipo de metionina livre (DL-Met e Met-Met), e na suplementação (0,10, 0,19, 0,29, 0,38% da dieta na base seca para DL-Met e 0,11, 0,20, 0,30, 0,39% da dieta para Met-Met), além de uma dieta controle, sem suplementação. Esta última apresentou um conteúdo total de metionina de 0,43% da dieta, proveniente apenas de fontes intactas. O cultivo dos camarões ocorreu por 63 dias, tendo sido empregado 50 tanques experimentais, distribuídos de forma aleatória.

### 4.2 Sistema de cultivo e estocagem de pós-larvas

O sistema de cultivo utilizado no presente estudo foi composto de 50 tanques circulares de polipropileno de cor azul (Plastsan Plásticos do Nordeste Ltda., Caucaia, Ceará), com volume individual de 0,5 m<sup>3</sup> e área útil de fundo de 0,57 m<sup>2</sup>. Os tanques foram mantidos em um galpão coberto (sistema *indoor*) onde a influência de variáveis ambientais como temperatura, chuvas e radiação solar foi reduzida permitindo um maior controle dos parâmetros estudados (Figura 1).



Figura 1 – Tanques experimentais em galpão coberto utilizados no estudo. Fonte: Alberto Nunes (2016).

Os tanques operaram em regime contínuo de recirculação de água salgada, a uma taxa de 20% por dia, porém sem filtragem. O sistema foi servido por um sistema com capacidade

total de armazenamento de 40.000 L de água. A água utilizada para o cultivo foi captada a partir do estuário do Rio Pacoti, sendo previamente filtrada através de um filtro de areia de 240 kg. A preparação da água de cultivo consistiu na inoculação de 6.000 L de água remanescente de um sistema de berçários de camarões. A fertilização da água ocorreu durante três dias consecutivos com a aplicação de 5 g/m<sup>3</sup> de ração moída de camarões e melaço de cana de açúcar em pó. Para controle dos compostos nitrogenados, foi aplicado melaço semanalmente, mantendo a proporção de 5 g/m<sup>3</sup>.

A oxigenação da água de cultivo foi realizada por meio de difusores de ar, compostos por duas mangueiras siliconadas com pedras porosas, posicionadas em lados opostos de cada tanque, distantes cerca de 10 cm do fundo. A aeração foi provida por dois compressores radiais de 2,0 cv de potência (Ibram Indústria Brasileira de Máquinas e Equipamentos, São Paulo, São Paulo).

Para o estudo, foram utilizados camarões juvenis da espécie *L. vannamei*, obtidos como pós-larva 10 (PL10) de uma larvicultura comercial (Aquatec Aquacultura Ltda., Canguaretama, Rio Grande do Norte). No laboratório, as PL10 foram mantidas e aclimatadas com ração comercial em sistemas de berçários, compostos por três tanques circulares com volume útil de 23 m<sup>3</sup> (área de fundo de 15,9 m<sup>2</sup>), onde permaneceram por cerca de 60 dias quando se alcançou um peso médio corporal de 1 a 3 g.

Para início do estudo, um total de 2.500 camarões juvenis com  $1,20 \pm 0,12$  g (CV = 7%;  $P > 0,05$ , ANOVA) foram pesados individualmente e estocados nos tanques experimentais na densidade de 88 camarões/m<sup>2</sup> (50 camarões por tanque) e aclimatados durante 7 dias com ração comercial. Nos três primeiros dias após a estocagem foi ofertada uma ração comercial desintegrada com o mínimo de 40% de proteína bruta (Camanutri 40CR2, Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda., São Lourenço da Mata, Pernambuco). Nos três dias seguintes, foi realizada uma transição gradual para uma ração comercial peletizada (Camanutri 35 HP, Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda., São Lourenço da Mata, Pernambuco). A partir do oitavo dia, os animais passaram a ser alimentados com suas respectivas dietas experimentais.

### 4.3 Dietas experimentais

Para o estudo foram elaboradas nove dietas isocalóricas e isoproteicas através de um *software* de formulação de rações, Optimal Fórmula 2000 (Optimal Informatica Ltda, Campinas, São Paulo). As dietas foram formuladas e fabricadas em laboratório utilizando matérias primas comercialmente disponíveis, com uma mínima variação possível nos ingredientes (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição das dietas (% , base natural) produzidas em laboratório para avaliação do desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei*.

Ingredientes	Composição/Dietas (% , base natural)								
	CTL	DL-Met				Met-Met			
		0,10	0,19	0,29	0,38	0,11	0,20	0,30	0,39
Farinha de trigo <sup>1</sup>	33,29	34,73	33,92	34,15	34,67	34,70	33,85	33,30	34,70
Farelo de soja <sup>2</sup>	32,72	32,33	32,41	32,23	32,00	32,34	32,41	32,43	32,00
Fécula de mandioca <sup>3</sup>	9,12	8,31	9,08	9,02	8,70	8,35	9,15	9,71	8,71
Farelo de trigo <sup>4</sup>	4,00	3,52	3,50	3,50	3,49	3,50	3,50	3,50	3,43
Glúten de trigo <sup>5</sup>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Lecitina de soja <sup>6</sup>	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29	3,29
Farinha de salmão <sup>7</sup>	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Óleo de salmão	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Fosfato bicálcico <sup>8</sup>	2,12	2,20	2,20	2,15	2,15	2,20	2,20	2,15	2,16
L-Lisina, 50,7% <sup>9</sup>	1,10	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13
Sulfato de magnésio <sup>10</sup>	1,00	1,00	0,88	0,84	0,79	1,00	0,87	0,79	0,79
Premix vitamínico-mineral <sup>11</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Farinha de lula <sup>12</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Aglutinante sintético <sup>13</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
L-Treonina 98,5% <sup>14</sup>	0,36	0,36	0,36	0,37	0,37	0,36	0,36	0,36	0,36
Óleo de soja	0,24	0,24	0,25	0,25	0,25	0,24	0,25	0,26	0,25
L-Arginina, 90,5% <sup>15</sup>	0,17	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Colesterol, 91% <sup>16</sup>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Vitamina C, 35% <sup>17</sup>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
DL-Metionina <sup>18</sup>	0,00	0,10	0,19	0,29	0,38	0,00	0,00	0,00	0,00
DL-Metionil-DL-Metionina <sup>19</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,20	0,30	0,39

<sup>1</sup> Farinha de trigo Rosa Branca (Moinhos Cruzeiro do Sul S/A, Olinda, Pernambuco). 11,03% proteína bruta (PB, base natural), 1,50% lipídeos, 0,60% fibra, 1,80% cinzas, 13,34% umidade. <sup>2</sup> Farelo de soja 48. (Bunge Alimentos S.A., Luiz Eduardo Magalhães, Bahia). 46,95% PB, 2,20% lipídeos, 5,30% fibra, 6,30% cinzas, 11,12% umidade. <sup>3</sup> 15,71% PB, 3,39% cinzas, 2,75% lipídeos, 7,53% fibra, 9,99% umidade. <sup>4</sup> 0,26% PB, 0,03% lipídeos, 0,70% fibra, 13,39% umidade. <sup>5</sup> Amytex 100 (Tereos Syral S.A.S., Marckolsheim, França). 78,71% PB, 1,69% lipídeos, 0,56% fibra, 0,79% cinzas, 6,75% umidade. <sup>6</sup> Bunge Alimentos S.A. (Luiz Eduardo Magalhães, Bahia). <sup>7</sup> Pesquera Pacific Star S.A. (Puerto Montt, Chile). 59,38% PB, 9,40% lipídeos, 0,50% fibra, 22,90% cinzas, 15,77% umidade. <sup>8</sup> Serrana Fosfócio20 (Bunge Fertilizantes S/A., Cubatão, São Paulo). 20,5% cálcio, 20,2% fósforo total, 19,1% de fósforo disponível. <sup>9</sup> AQUAVI® Lys, L-Lisina 54,6% (Evonik Nutrition & Care GmbH, Hanau, Alemanha). <sup>10</sup> 9% magnésio, 11% enxofre. <sup>11</sup> Rovimix® Camarões Intensivo (DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, São Paulo). Níveis de garantia por kg do produto: vitamina A, 1.000.000 UI; vitamina D3, 300.000 UI; vitamina E, 15.000 UI; vitamina K3, 300,0 mg; vitamina B1, 3.000,0 mg; vitamina

B2, 2.500,0 mg; vitamina B6, 3.500,0 mg; vitamina B12, 6,0 mg; ácidos nicotínico, 10.000,0 mg; ácido pantotênico, 5.000,0 mg; biotina, 100,0 mg; ácido fólico, 800,0 mg; vitamina C, 25.000,0 mg; colina, 40.000,0 mg; inositol, 20.000,0 mg; ferro 2.000,0 mg; cobre, 3.500,0 mg; cobre quelatado, 1.500,0 mg; zinco, 10.500,0 mg; zinco quelatado, 4.500,0 mg; manganês, 4.000,0 mg; selênio, 15,0 mg; selênio quelatado, 15,0 mg; iodo, 150,0 mg; cobalto, 30,0 mg; crômio, 80,0 mg; *filler*, 1.000,0 g. <sup>12</sup>.83,13% PB, 5,65% lipídeos, 9,75% umidade. <sup>13</sup>Nutri-Bind Aqua Veg Dry, Nutri-Ad International NV (Dendermonde, Bélgica). Aglutinante sintético consistindo de cálcio lignosulfonado (94,00%) e goma de guar (6,00%). <sup>14</sup>ThreAMINO®, L-Treonina 98,5% (Evonik Nutrition & Care GmbH, Hanau, Alemanha). <sup>15</sup>L-Arginina HCl 99% (Sigma-Aldrich do Brasil Ltda., São Paulo, São Paulo). <sup>16</sup>Cholesterol SF, mínimo de 91% de colesterol (Dishman Netherlands B.V., Veenendaal, Holanda). <sup>17</sup>Rovimix® Stay C® 35, %, ácido L-ascórbico 2-monofosfatado. Mínimo de 35% de atividade de vitamina C fosforilada (DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, São Paulo). <sup>18</sup>MetAMINO®, DL-Metionina 99,0% (Evonik Nutrition and Care GmbH, Hanau, Alemanha). <sup>19</sup>AQUAVI® DL-Met-Met, DL-Metionil-DL-Metionina 90,0% (Evonik Nutrition and Care GmbH, Hanau, Alemanha).

Para obter níveis graduais de metionina, foi desenhada uma dieta de controle com 0,43% Met (0,87% Met+Cis), proveniente apenas de fontes intactas. A partir da dieta controle, outras oito dietas foram suplementadas com 0,11, 0,20, 0,30 e 0,39% de Met-Met e 0,10, 0,19, 0,29 e 0,38% de DL-Met.

A fim de alcançar uma menor quantidade possível de metionina intacta, a inclusão de farinha de salmão foi fixada em 3% (base natural). Para maximizar a utilização de proteínas, todas as dietas foram formuladas seguindo o conceito de proteína ideal, utilizando a lisina como o primeiro aminoácido limitante e de referência. Com isso, todas as dietas também foram suplementadas com L-Lisina (Biolys®, Evonik Industries AG), L-Treonina (ThreAMINO®, Evonik Industries AG) e L-Arginina HCl (Sigma-Aldrich do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). Foram utilizados os seguintes valores de Lys:AAE (NRC, 2011): 100 Lys: 67 Thr e 100 Lys: 95 Arg.

O glúten de trigo foi utilizado como aglutinante natural e como fonte de proteína digestível. A fécula de mandioca e o farelo de trigo foram utilizados para o preenchimento da fórmula, sendo a inclusão variada de acordo com os diferentes níveis de aminoácidos suplementados. Da mesma forma, a quantidade de farinha de trigo alterou-se ligeiramente entre as dietas experimentais devido às diferentes inclusões de aminoácidos cristalinos. A farinha de lula foi adicionada a 1,0% para conferir atratividade às dietas. A lecitina de soja, o colesterol e o óleo de peixe foram incluídos para atender adequadamente as exigências nutricionais de fosfolipídios, colesterol e n-3 LC-PUFA (ácidos graxos altamente poliinsaturados da série omega-3), respectivamente. Os níveis formulados na dieta para fosfolipídios, colesterol e n-3 LC-PUFA foram de 2,23, 0,09 e 1,69% (matéria seca), respectivamente. Todas as dietas foram formuladas para conter um mínimo de 445 mg/kg de ácido ascórbico, 0,56% de fósforo disponível e 0,88% de cálcio.

#### 4.4 Fabricação das dietas

Primeiramente, os ingredientes farelo de soja, farelo de trigo e farinha de peixe, ao chegarem no laboratório, foram moídos em um moinho centrífugo, com potência de 5 cv (modelo MCS 280, Máquinas Vieira Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, São Paulo). Após a moagem, os ingredientes foram estocados separadamente em recipientes fechados, os quais foram mantidos em câmara fria a uma temperatura de -13°C.

Com as dietas formuladas, os ingredientes foram pesados em uma balança eletrônica de precisão (Ohaus Adventurer, modelo ARA520, Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda., São Bernardo do Campo, São Paulo). Após a pesagem, todas as matérias primas secas (macro ingredientes) foram misturadas em um misturador planetário durante 10 min. Uma amostra de 1 kg desta mistura foi recolhida para incorporar micro ingredientes (vitaminas, minerais, aglutinante sintético e aminoácidos cristalinos) em um misturador em Y, a uma velocidade de 30 RPM, durante 10 minutos. Em seguida, fez-se a mistura dos macro e micro ingredientes e a adição dos óleos e de água doce em temperatura ambiente, sendo este último adicionado lentamente, na proporção de 2,5 L para cada 10 kg, até a obtenção de uma mistura homogênea.

Posteriormente foi realizado o processo de cozimento e extrusão através do uso de uma extrusora de laboratório (modelo Extrusora EX MICRO, Exteec Máquinas, Ribeirão Preto, São Paulo), ajustada para operar com uma temperatura de 90°C. O diâmetro e o comprimento dos *pellets* foi regulado utilizando uma matriz e facas, respectivamente. Em seguida, lotes de cerca de 2 kg das dietas foram transferidos para cozimento à vapor durante 3 minutos sob 95°C.

Por fim, as dietas foram submetidas a um processo de secagem através do uso de estufa com circulação contínua de ar (estufa de secagem especial, Modelo MA-035/3, Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, São Paulo), por um período máximo de 3 horas, sob temperatura de 60°C, até atingir umidade entre 10 e 12%. Para alcançar este valor, amostras das dietas foram coletadas a cada 15 minutos para determinação de umidade em um analisador rápido de umidade com lâmpada alógena (MB35 Moisture Analyzer, Ohaus Corporation, New Jersey, EUA). No final do processo de produção, as dietas foram embaladas, etiquetadas e estocadas em câmara fria a uma temperatura de -13°C, até sua utilização.



#### 4.5 Análises físicas e químicas das dietas

Após a fabricação das dietas, foram realizadas as seguintes análises físicas: comprimento e diâmetro dos *pellets*, dureza, umidade e estabilidade física em água.

O comprimento e o diâmetro foram medidos com um paquímetro eletrônico (Starret 799, Itu, São Paulo). A dureza, que avalia a resistência dos *pellets* ao esmagamento, foi determinada com um medidor de dureza Kahl (Amandus Kahl GmbH & Co, Hamburgo, Alemanha), operado manualmente. Ambas as medidas foram obtidas a partir de amostragem de 30 *pellets*, a partir dos quais foram obtidos média e desvio padrão.

A umidade foi determinada a partir da secagem de amostras de 3 g de cada dieta em estufa com circulação e renovação de ar (estufa de secagem especial, Modelo MA-035/3, Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, São Paulo), a 105°C durante o período de 72 h. Para cada dieta, foram realizadas 5 repetições e o resultado obtido em porcentagem.

Para obter a estabilidade física das dietas em água, primeiramente foram pesados 25 g de cada dieta, transferidos para frascos do tipo *Erlenmeyer* de 250 mL, e então adicionados 100 mL de água estuarina com salinidade 35. O *Erlenmeyer* foi posicionado no agitador orbital (Incubadora Shaker, Láctea Científica, São Paulo, São Paulo), este ajustado para funcionar a  $200 \pm 15$  rpm por 30 min. Após este período, a amostra foi transferida para uma peneira com malha *Tyler* # 20 (equivalente a 0,86 mm). A amostra retida na peneira foi submetida a secagem a 130°C durante 24 h em uma estufa para esterilização e secagem (Modelo MD 1.2, Medicate-Dorja, Itu, São Paulo). A estabilidade da dieta em água foi determinada a partir da divisão entre o peso final da amostra seca pelo peso inicial da amostra (25 g). Para ajustar a umidade inicial, o valor final obtido foi multiplicado pelo teor de umidade inicial de cada dieta. Para cada dieta foram realizadas 5 repetições e o resultado obtido em porcentagem.

Após a fabricação das dietas, as amostras foram analisadas quanto ao conteúdo de matéria seca (secagem em estufa durante 24 h a 105°C) e proteína bruta (método de Kjeldahl para estimativa do nitrogênio) seguindo métodos padrões (AOAC, 2002). A concentração de aminoácidos nas dietas experimentais foi determinada seguindo os procedimentos descritos por Figueiredo-Silva *et al.*, (2015). A variação na concentração de todos os aminoácidos

essenciais entre as dietas experimentais foi inferior a 2% exceto para os níveis de metionina que foram intencionalmente manipulados (Tabela 2).

Tabela 2 – Conteúdo de matéria seca, proteína bruta e perfil de aminoácidos (% da dieta, base seca) das 9 dietas utilizadas neste estudo. CV, coeficiente de variação (%).

Nutrientes/ Dietas	Composição de Aminoácidos <sup>1</sup> (% da dieta, base seca)									CV%
	CTL	DL-Met				Met-Met				
		0,10	0,19	0,29	0,38	0,11	0,20	0,30	0,39	
Matéria seca	86,90	86,85	87,20	87,55	85,94	87,98	87,90	86,55	87,17	0,7
Proteína bruta	27,77	27,48	27,40	28,19	27,41	27,91	27,62	27,28	27,53	1,0
<b>Aminoácidos Essenciais (AAE)</b>										
Arginina	1,95	1,93	1,92	1,97	1,96	1,96	1,92	1,94	1,94	0,9
Fenilalanina	1,39	1,36	1,35	1,39	1,39	1,37	1,36	1,36	1,36	1,1
Histidina	0,70	0,70	0,68	0,70	0,70	0,70	0,69	0,69	0,69	1,0
Isoleucina	1,21	1,19	1,18	1,22	1,22	1,20	1,19	1,18	1,20	1,3
Leucina	2,11	2,08	2,06	2,12	2,12	2,09	2,06	2,06	2,06	1,2
Lisina	1,98	1,99	1,97	2,03	2,00	2,03	1,99	1,98	1,99	1,1
Metionina	0,43	0,55	0,66	0,79	0,85	0,54	0,64	0,73	0,84	21,7
Met+Cis <sup>2</sup>	0,87	1,02	1,11	1,24	1,30	0,87	1,02	1,11	1,24	12,9
Treonina	1,40	1,40	1,38	1,39	1,33	1,41	1,38	1,39	1,39	1,8
Valina	1,29	1,29	1,27	1,32	1,32	1,29	1,29	1,28	1,30	1,3
∑ AAE	13,33	13,51	13,58	14,17	14,19	13,46	13,54	13,72	14,01	2,4
<b>Aminoácidos Não-Essenciais (AANE)</b>										
Cisteína	0,44	0,47	0,45	0,45	0,45	0,46	0,45	0,46	0,45	1,7
Glicina	1,31	1,31	1,29	1,32	1,32	1,30	1,30	1,30	1,31	0,7
Serina	1,42	1,40	1,38	1,40	1,41	1,40	1,37	1,39	1,37	1,4
Prolina	2,00	1,95	1,94	1,96	2,04	2,00	1,96	1,97	1,97	1,5
∑ AANE	5,17	5,13	5,06	5,13	5,22	5,16	5,08	5,12	5,10	1,0
Total AA	18,5	18,64	18,64	19,30	19,41	18,62	18,62	18,84	19,11	1,8
<b>Aminoácidos Livres</b>										
Metionina	0,01	0,10	0,20	0,29	0,38	<0,01	0,02	0,02	0,02	109,58
Lisina	0,59	0,62	0,58	0,58	0,59	0,58	0,60	0,57	0,56	2,97
Treonina	0,38	0,39	0,38	0,38	0,38	0,37	0,38	0,37	0,29	8,20
Valina	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	-
DL-Met-Met	0,09	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,26	0,17	0,32	49,59

<sup>1</sup>Analisado por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Precisão). Fonte: Evonik Industries AG (Hanau, Alemanha). <sup>2</sup>TSAA, aminoácido total sulfurado.

As dietas contendo Met-Met alcançaram um conteúdo total de metionina (Met+Cis) de 0,84 (1,24), 0,73 (1,11), 0,64 (1,02) e 0,54% (0,87%), respectivamente. As dietas suplementadas com DL-Met alcançaram um conteúdo total de metionina (Met+Cis) de 0,85 (1,30), 0,79 (1,24), 0,66 (1,11) e 0,55% (1,02%), respectivamente. As dietas apresentaram, em média,  $27,6 \pm 0,29\%$  de proteína bruta (base seca).

Para a determinação da composição proteica e aminoacídica do músculo caudal e da glândula digestiva, foi realizada, após a despesca, a coleta de amostras de 50 camarões de cada tratamento dietético. Os animais foram sacrificados uma hora após alimentação, sendo os músculos caudais e glândulas digestivas coletadas e armazenadas à temperatura de -20° C. Posteriormente o material foi liofilizado e moído para análise de proteína bruta e aminoácidos seguindo método padrão (AOAC, 2002).

#### 4.6 Alimentação e sistema de manejo

Durante todo o cultivo dos camarões, as dietas experimentais foram ofertadas diariamente, quatro vezes ao dia, exclusivamente em bandejas de alimentação (14,3 x 3,5 cm; diâmetro x altura) sendo uma unidade em cada tanque. A oferta das dietas e o recolhimento de sobras ocorreram nos seguintes horários: 1ª refeição: 07:00 h; 2ª refeição: 10:00 h; 3ª refeição: 13:00 h; 4ª refeição: 16:00 h. As refeições foram distribuídas de forma que a primeira, a segunda, a terceira e a quarta refeição representassem 25, 15, 15 e 45% do total diário distribuído, respectivamente, calculadas a partir de uma tabela de alimentação (Tabela 3).

Tabela 3 – Tabela de alimentação utilizada no presente estudo com juvenis do *L. vannamei* (Façanha *et al.*, 2016).

Peso Corporal (g)		Taxa Alimentar (% do peso corporal)	Ganho de Peso (mg/dia)	Dias de Cultivo		Sobrevivência Estimada (%)
Inicial	Final			Inicial	Final	
1,00	3,00	7,41%	80	1	7	99,9
3,00	4,00	5,83%	90	8	14	99,5
4,00	5,00	5,29%	100	15	22	99,1
5,00	6,00	4,89%	110	23	30	98,7
6,00	7,00	4,59%	120	31	38	98,3
7,00	8,00	4,34%	130	39	46	97,9
8,00	9,00	4,14%	140	47	54	97,5
9,00	10,00	3,97%	150	55	62	97,1
10,00	11,00	3,82%	160	63	70	96,7
11,00	12,00	3,69%	170	-	-	-

Diariamente foram realizadas observações quanto à presença de sobras nas bandejas. Inicialmente, as refeições foram ajustadas com base em uma sequência diária de ganho de peso estimado de 100 mg/dia/camarão e uma redução diária de 0,5% na sobrevivência para todos os tratamentos experimentais.

Além disso, foram mensurados diariamente os parâmetros de qualidade de água (pH, temperatura e salinidade), sempre às 14:00 h. O pH e a temperatura foram determinadas através de um pHmetro portátil com termômetro acoplado e a salinidade através de um refratômetro. Foram realizadas também medições de amônia não ionizada dissolvida, nitrito dissolvido e nitrato, quinzenalmente, em três tanques aleatórios utilizando um espectrofotômetro (DR 2800 Spectrophotometer, Hach Company, Loveland, EUA).

#### 4.7 Desempenho zootécnico

O desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei* foi avaliado ao final do cultivo, a partir dos dados de contagem e pesagem de cada indivíduo na estocagem e na despesca, em uma balança eletrônica de precisão (Ohaus Adventurer, modelo ARA520, Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda., São Bernardo do Campo, São Paulo). Desta forma, foram determinados os seguintes índices de desempenho zootécnico: sobrevivência (%) = (número de camarões despescados ÷ número de camarões estocados) x 100; crescimento semanal (g/semana) = (peso corporal final – peso corporal inicial) ÷ número de dias de cultivo x 7; ganho de biomassa (g) = biomassa final – biomassa inicial; ganho de produtividade (g/m<sup>2</sup>) = biomassa adquirida por tanque ÷ área de fundo do tanque; consumo aparente de ração (g de ração/camarão estocado) = quantidade total de ração seca ingerida ÷ número inicial de camarões; Fator de conversão alimentar = consumo de ração aparente por tanque ÷ biomassa adquirida por tanque.

#### 4.8 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa IBM® SPSS® Statistics 23.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). A análise de variância bifatorial (ANOVA) foi aplicada para comparar o desempenho do camarão em função da fonte de metionina e dos níveis de inclusão nas dietas. Quando observadas diferenças significativas, foi utilizado o teste *posteriori* de Tukey HSD para comparar os valores médios entre os tratamentos individualmente. O nível de significância foi fixado em 5% ( $P < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Qualidade da água

Ao longo do período de cultivo, a salinidade, o pH e a temperatura foram mantidos dentro de limites considerados normais para cultivo de camarões ( $P > 0,05$ , ANOVA). Durante os 63 dias de cultivo o valor de salinidade foi de  $38,0 \pm 3,40$  ( $n = 2.300$ ), pH de  $7,7 \pm 0,2$  ( $n = 2200$ ) e temperatura de  $29,4 \pm 0,4^\circ\text{C}$  ( $n = 2.200$ ). Os compostos nitrogenados, amônia total e nitrato apresentaram variações estatísticas ao longo do cultivo ( $P < 0,05$ , ANOVA; Tabela 4). A amônia apresentou uma queda de 0,16 mg/L no 12º dia de cultivo para 0,11 e 0,09 mg/L nos 27º e 42º dias de cultivo, aumentando novamente próximo a despesca dos camarões. O nitrato manteve-se abaixo de 1 mg/L durante todo cultivo, exceto no 57º dia quando a leitura alcançou uma média de 2,03 mg/L. Não houve variações significativas nas concentrações de nitrito. Tendo alcançado uma média de 3,33 mg/L. Todas as concentrações observadas dos compostos nitrogenados mantiveram-se dentro de limites considerados adequados para o cultivo do camarão *L. vannamei* em sistemas de cultivo cobertos, com regime de reuso de água (SAMOCHA *et al.*, 2017).

Tabela 4 – Concentração de compostos nitrogenados (mg/L) na água ao longo de 63 dias de cultivo. As médias ( $\pm$  desvio padrão) representam valores de três tanques de cultivo selecionados aleatoriamente. Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) segundo o teste a posteriori de Tukey HSD. NS, diferença não significativa ao nível de  $\alpha = 0,05$ .

Dia de Cultivo	Amônia Total (mg/L)	Nitrito (mg/L)	Nitrato (mg/L)
12	0,16 $\pm$ 0,03a	4,00 $\pm$ 1,73	0,73 $\pm$ 0,06a
27	0,11 $\pm$ 0,02ab	2,33 $\pm$ 0,58	< 0,001a
42	0,09 $\pm$ 0,02b	4,33 $\pm$ 3,21	0,37 $\pm$ 0,55a
57	0,15 $\pm$ 0,02a	2,67 $\pm$ 0,58	2,03 $\pm$ 0,15b
Média $\pm$ sd	-	3,33 $\pm$ 1,83	-
P ANOVA	0,011	NS	< 0,0001

## 5.2 Aspectos físicos das dietas

O comprimento dos *pellets* foi de  $5,26 \pm 0,57$  cm, o diâmetro de  $2,29 \pm 0,10$  e a dureza de  $2,6 \pm 0,56$  kg obtidos através da medição de 30 *pellets*. A estabilidade das dietas foi alta, acima de 80%, com média de  $84,19 \pm 0,02\%$ , não apresentando diferença significativa entre as dietas ( $P > 0,05$ , ANOVA). Já a umidade, variou entre  $9,2 \pm 0,4\%$  e  $11,1 \pm 0,5\%$ .

## 5.3 Desempenho zootécnico

De um total de 50 tanques, três tanques foram excluídos da análise de desempenho zootécnico por apresentarem uma sobrevivência final entre 58 e 68%. A sobrevivência final, após os 63 dias de cultivo, foi superior a 80% em todos os tratamentos (Tabela 5). Os camarões alimentados com as dietas DL-Met 0,38 e Met-Met 0,39 apresentaram diferença estatística na sobrevivência final, com valores de  $94,3 \pm 4,1$  e  $81,0 \pm 8,7\%$ , respectivamente. A dieta DL-Met 0,38 também proporcionou uma maior sobrevivência aos camarões comparado com a dieta CTL. Não houve diferença entre os demais tratamentos, inclusive com a CTL.

Durante todo período de cultivo, os camarões cresceram continuamente, com peso final variando entre  $10,31 \pm 1,36$  g (DL-Met 0,10) e  $10,95 \pm 1,39$  g (Met-Met 0,20). A suplementação com Met-Met teve efeito significativo no peso corporal dos camarões quando comparado com a dieta CTL, levando a um aumento em todos os níveis de suplementação. No entanto, o nível de suplementação de Met-Met equivalente a 0,20% maximizou o peso final dos camarões, não tendo sido observado um ganho de peso significativo acima desse nível. Já para a suplementação com DL-Met, a diferença em relação à dieta CTL só ocorreu no nível de 0,29%, havendo diferença significativa entre alguns níveis desta fonte. O máximo peso corporal dos camarões foi alcançado com uma suplementação de DL-Met equivalente a 0,19% (total de 0,66% Met e 1,11% Met+Cis).

Não houve diferença estatisticamente significativa no crescimento semanal dos camarões. Os camarões cresceram a uma taxa entre  $1,01 \pm 0,03$  g (DL-Met 0,10) e  $1,09 \pm 0,06$  g por semana (Met-Met 0,39). Ao se comparar o crescimento dos camarões com a dieta CTL, apenas os animais alimentados com a dieta contendo Met-Met 0,20 exibiram um crescimento mais elevado.

Tabela 5 - Desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei* cultivado ao longo de 63 dias em tanques de 0,5 m<sup>3</sup> alimentado com dietas suplementadas com duas fontes de metionina cristalina. Valores representam a média ( $\pm$  desvio padrão). Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) segundo o teste a posteriori de Tukey HSD. NS, diferença não significativa ao nível de  $\alpha = 0,05$ . Asterisco (\*) indica diferença significativa entre a dieta controle (CTL) e demais dietas segundo o teste t de Student.

Dieta	Sobrevivência final (%)	Peso corporal final (g)	Crescimento semanal (g)	Ganho de produtividade (g/m <sup>2</sup> )	Consumo alimentar (g/camarão)	FCA
CTL	86,7 $\pm$ 4,5*	10,38 $\pm$ 1,43*	1,02 $\pm$ 0,03*	684 $\pm$ 56*	12,4 $\pm$ 1,1*	1,59 $\pm$ 0,01
DL-Met 0,10	87,3 $\pm$ 5,0ab	10,31 $\pm$ 1,36a	1,01 $\pm$ 0,03	685 $\pm$ 61ab	12,3 $\pm$ 1,2	1,57 $\pm$ 0,02
DL-Met 0,19	88,4 $\pm$ 5,4ab	10,64 $\pm$ 1,56abc	1,05 $\pm$ 0,02	721 $\pm$ 40ab	13,0 $\pm$ 0,9	1,59 $\pm$ 0,02
DL-Met 0,29	89,2 $\pm$ 4,1ab	10,79 $\pm$ 1,39bc*	1,07 $\pm$ 0,05	739 $\pm$ 19ab	13,4 $\pm$ 0,4	1,59 $<$ 0,001
DL-Met 0,38	94,3 $\pm$ 4,1a*	10,49 $\pm$ 1,26ab	1,03 $\pm$ 0,02	762 $\pm$ 36a*	13,9 $\pm$ 0,7*	1,60 $<$ 0,001
Met-Met 0,11	90,3 $\pm$ 3,9ab	10,64 $\pm$ 1,51ab*	1,05 $\pm$ 0,05	738 $\pm$ 17ab	13,3 $\pm$ 0,4	1,58 $\pm$ 0,01
Met-Met 0,20	88,0 $\pm$ 4,7ab	10,95 $\pm$ 1,39c*	1,08 $\pm$ 0,05*	740 $\pm$ 24ab	13,4 $\pm$ 0,5	1,59 $\pm$ 0,01
Met-Met 0,30	86,0 $\pm$ 4,9ab	10,84 $\pm$ 1,45abc*	1,06 $\pm$ 0,03	704 $\pm$ 39ab	12,7 $\pm$ 0,8	1,58 $\pm$ 0,01
Met-Met 0,39	81,0 $\pm$ 8,7b	10,93 $\pm$ 1,51c*	1,09 $\pm$ 0,06	671 $\pm$ 46b	12,2 $\pm$ 1,0	1,60 $\pm$ 0,02
Tukey HSD	$<$ 0,05	$<$ 0,05	NS	$<$ 0,05	NS	NS

O ganho de produtividade teve o maior valor com a dieta DL-Met 0,38 com  $762 \pm 36$  g/m<sup>2</sup>, e menor valor com a dieta Met-Met 0,39 com  $671 \pm 46$  g/m<sup>2</sup>. Ao comparar com a dieta CTL, o aumento na produtividade só foi alcançado com a suplementação de 0,38% de DL-Met. A relação entre a suplementação dietética de DL-Met e Met-Met e o ganho de produtividade dos camarões foi expresso através de equações de regressão quadrática (Figura 2). Uma suplementação de Met-Met equivalente a 0,18% levou a um máximo ganho de produtividade equivalente a 739 g/m<sup>2</sup>, sendo expresso pela equação  $y = -1.621,55x^2 + 577,06x + 687,40$  ( $R^2 = 0,948$ ,  $P = 0,052$ ). Já para as dietas suplementadas com DL-Met, quanto maior a suplementação de metionina cristalina, maior foi o ganho de produtividade, não sendo detectado um ponto de inflexão.

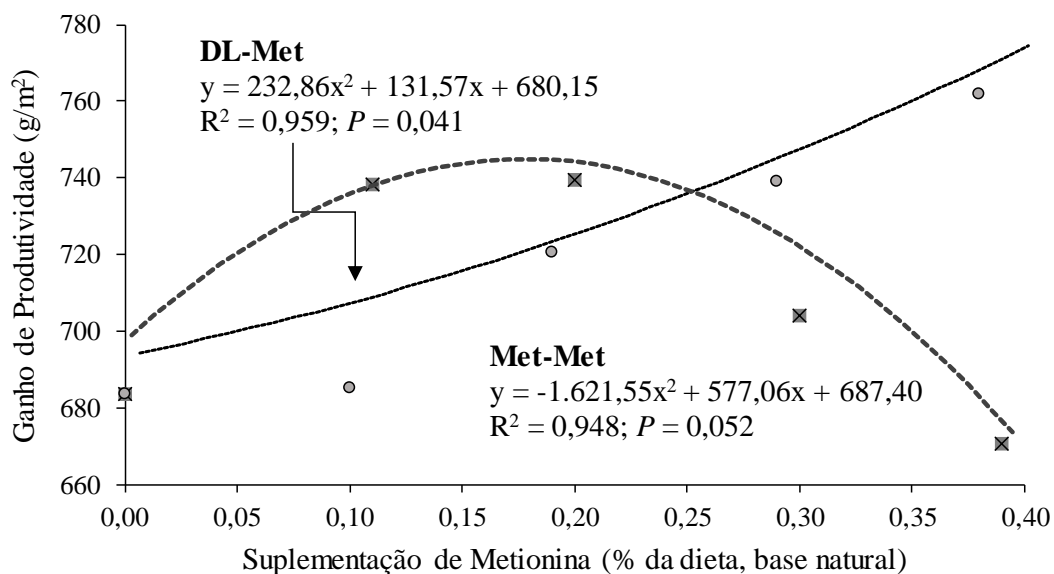


Figura 2 - Modelo de regressão quadrática entre a suplementação dietética de duas fontes de metionina e o ganho de produtividade do camarão *L. vannamei*. DL-Met, DL-Metionina; Met-Met, DL-Metionil-DL-Metionina.

O consumo alimentar dos camarões variou entre  $12,2 \pm 1,0$  e  $13,9 \pm 0,7$  g/camarão. Contudo, não foi detectado diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos experimentais. Porém, comparado ao CTL, foi observado um maior consumo de ração quando as dietas foram suplementadas com 0,38% de DL-Met.

O fator de conversão alimentar (FCA) alcançou uma média de  $1,59 \pm 0,02$ , não exibindo diferença significativa entre os tratamentos experimentais ou com a dieta CTL.



#### 5.4 Consumo de metionina

O consumo de metionina mostrou um aumento progressivo entre as dietas, havendo diferença significativa entre a dieta CTL quando comparada com as demais. Apenas para os maiores níveis de suplementação (0,3 e 0,4%) houve diferença significativa entre fontes de metionina dentro do mesmo nível de suplementação. Para as dietas com DL-Met, houve um aumento progressivo com um incremento da suplementação. Dessa forma, quanto maior a quantidade de metionina suplementada, maior foi o consumo diário por camarão (Figura 3). O consumo de metionina também respondeu a um aumento na suplementação de Met-Met até um nível de 0,30%.

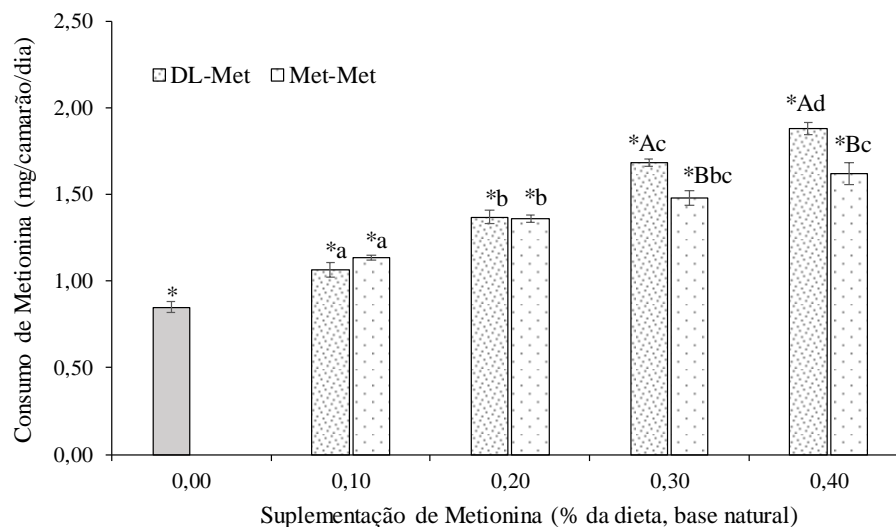


Figura 3 - Consumo diário de metionina dietética por camarão estocado (mg/camarão/dia). Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre fontes de metionina dentro de um mesmo nível de suplementação e entre níveis de suplementação para uma mesma fonte, respectivamente. Asteriscos (\*) indicam diferença significativa em relação a dieta CTL (0,00%).

#### 5.5 Absorção de proteínas e aminoácidos

O conteúdo de proteína bruta no músculo caudal foi superior a 89% em todos os tratamentos, enquanto que na glândula digestiva apresentou valores inferiores, entre  $31,19 \pm 1,59$  e  $36,21 \pm 0,74$  %, ambos apresentando diferenças significativas entre as fontes e níveis de suplementação (Tabela 6). O maior teor total de metionina e met+cis no músculo caudal ( $2,28 \pm 0,01$ % e  $0,98 \pm 0,01$ , respectivamente) foi encontrado na dieta suplementada com Met-Met 0,39. Os maiores níveis de suplementação com Met-Met levaram a um maior conteúdo de proteína bruta e aminoácidos essenciais e não essenciais.

Tabela 6 - Composição proteica e aminoacídica do músculo caudal e da glândula digestiva dos camarões após período experimental. Valores (%) dados na matéria seca. Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão de três amostras

Dieta/ Músculo	Nutrientes (% base seca)						
	Proteína Bruta	AAE	AANE	Metionina	Cistina	Met+Cis	Lisina
CTL	89,57 $\pm$ 0,07ab	37,31 $\pm$ 0,08cde	44,33 $\pm$ 0,20abcd	2,21 $\pm$ 0,01a	0,94 $\pm$ <0,001bc	3,15 $\pm$ 0,01ab	6,40 $\pm$ 0,01cd
DL-Met 0,10	89,11 $\pm$ 0,30a	36,40 $\pm$ 0,17a	43,69 $\pm$ 0,10a	2,20 $\pm$ 0,01a	0,90 $\pm$ 0,01a	3,10 $\pm$ 0,01a	6,19 $\pm$ 0,03a
DL-Met 0,19	90,03 $\pm$ 0,10b	36,54 $\pm$ 0,46ab	43,81 $\pm$ 0,52ab	2,22 $\pm$ 0,02a	0,93 $\pm$ 0,02ab	3,14 $\pm$ 0,04ab	6,25 $\pm$ 0,08ab
DL-Met 0,29	89,66 $\pm$ 0,54ab	36,78 $\pm$ 0,15abc	44,08 $\pm$ 0,11abc	2,21 $\pm$ 0,01a	0,92 $\pm$ <0,001ab	3,13 $\pm$ 0,01ab	6,32 $\pm$ 0,05bc
DL-Met 0,38	89,88 $\pm$ 0,11ab	37,06 $\pm$ 0,07abcd	44,24 $\pm$ 0,12abcd	2,23 $\pm$ <0,001ab	0,94 $\pm$ 0,01bc	3,17 $\pm$ 0,01bc	6,37 $\pm$ 0,01bcd
Met-Met 0,11	89,44 $\pm$ 0,43ab	37,21 $\pm$ 0,05bcde	44,50 $\pm$ 0,22bcde	2,22 $\pm$ 0,01a	0,94 $\pm$ 0,01bc	3,16 $\pm$ 0,02ab	6,35 $\pm$ 0,01bc
Met-Met 0,20	90,04 $\pm$ 0,13b	37,67 $\pm$ 0,36de	44,89 $\pm$ 0,45de	2,27 $\pm$ 0,01bc	0,96 $\pm$ 0,01cd	3,23 $\pm$ 0,03cd	6,44 $\pm$ 0,07cd
Met-Met 0,30	90,12 $\pm$ 0,25b	37,21 $\pm$ 0,09cde	44,64 $\pm$ 0,12cde	2,23 $\pm$ <0,001ab	0,96 $\pm$ <0,001cd	3,19 $\pm$ 0,02bc	6,40 $\pm$ 0,01cd
Met-Met 0,39	90,18 $\pm$ 0,19b	37,75 $\pm$ 0,28e	45,15 $\pm$ 0,24de	2,28 $\pm$ 0,01c	0,98 $\pm$ 0,01d	3,26 $\pm$ 0,02d	6,49 $\pm$ 0,05d
<i>P</i> ANOVA	0,002	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<b>Glândula Digestiva</b>							
CTL	35,48 $\pm$ 0,30b	11,66 $\pm$ 0,11abc	13,44 $\pm$ 0,12abc	0,54 $\pm$ 0,03a	0,54 $\pm$ 0,03a	1,08 $\pm$ 0,06a	1,06 $\pm$ 0,01abc
DL-Met 0,10	32,92 $\pm$ 0,56ab	11,72 $\pm$ 0,47abc	13,40 $\pm$ 0,53abc	0,58 $\pm$ 0,03ab	0,65 $\pm$ 0,03c	1,24 $\pm$ 0,06b	1,58 $\pm$ 0,07ab
DL-Met 0,19	31,19 $\pm$ 1,59a	11,11 $\pm$ 0,36ab	12,69 $\pm$ 0,46ab	0,56 $\pm$ 0,01ab	0,61 $\pm$ 0,03bc	1,17 $\pm$ 0,05ab	1,49 $\pm$ 0,03a
DL-Met 0,29	31,66 $\pm$ 0,47a	10,82 $\pm$ 0,21a	12,56 $\pm$ 0,38a	0,56 $\pm$ 0,01ab	0,60 $\pm$ 0,02abc	1,15 $\pm$ 0,02ab	1,50 $\pm$ 0,04a
DL-Met 0,38	33,33 $\pm$ 1,22abc	10,92 $\pm$ 0,32ab	12,60 $\pm$ 0,36a	0,54 $\pm$ 0,02a	0,55 $\pm$ 0,02ab	1,09 $\pm$ 0,04a	1,50 $\pm$ 0,03a
Met-Met 0,11	34,71 $\pm$ 1,28bc	11,39 $\pm$ 0,21ab	13,35 $\pm$ 0,13abc	0,58 $\pm$ 0,01ab	0,60 $\pm$ <0,001abc	1,18 $\pm$ 0,02ab	1,58 $\pm$ 0,04ab
Met-Met 0,20	34,75 $\pm$ 1,56bc	11,71 $\pm$ 0,42abc	13,52 $\pm$ 0,46abc	0,58 $\pm$ 0,02ab	0,60 $\pm$ 0,04abc	1,19 $\pm$ 0,06ab	1,62 $\pm$ 0,06abc
Met-Met 0,30	34,85 $\pm$ 0,10bc	11,90 $\pm$ 0,23bc	13,75 $\pm$ 0,21bc	0,60 $\pm$ 0,02b	0,56 $\pm$ 0,01ab	1,16 $\pm$ 0,01ab	1,69 $\pm$ 0,06bc
Met-Met 0,39	36,21 $\pm$ 0,74c	12,55 $\pm$ 0,53c	14,30 $\pm$ 0,50c	0,61 $\pm$ 0,02b	0,58 $\pm$ 0,02ab	1,19 $\pm$ 0,01ab	1,75 $\pm$ 0,12c
<i>P</i> ANOVA	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,004	0,001	0,007	< 0,0001

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que juvenis da espécie *L. vannamei* quando alimentados com dietas suplementadas com metionina cristalina apresentam um maior ganho de peso corporal e produtividade. Outros trabalhos realizados com o camarão *L. vannamei* também indicaram que a suplementação de dietas com metionina cristalina é efetiva para corrigir deficiências deste aminoácido.

Browdy *et al.* (2012) em estudo com juvenis do *L. vannamei* com peso corporal inicial de 2,2 g demonstraram um aumento do peso corporal e do crescimento semanal de camarões alimentados com dietas suplementadas com 0,1 e 0,2% de um análogo da metionina (HMTBa). Huai *et al.* (2010) trabalharam com a suplementação de 0,14% de metionina análoga (MHA-Ca) juntamente com L-Lisina e L-Treonina em dietas para o *L. vannamei* com peso corporal inicial de 0,14 g. Os autores reportaram um aumento significativo no peso corporal final, ganho de peso e taxa de crescimento específica dos camarões alimentados com a dieta com em comparação a dieta sem suplementação. Outras fontes de metionina cristalina (L-Metionina, DL-Metionina) assim como o HMTBa também demonstraram ser eficientes em dietas para o *L. vannamei* com peso entre 1,41 e 1,65 g (FORSTER & DOMINY, 2006). Segundo os autores, apesar das três fontes utilizadas não terem apresentado diferença significativa entre si em termos de eficácia, observou-se que os camarões necessitam de uma fonte dietética de metionina para um melhor desempenho zootécnico em dietas deficientes nesse aminoácido. Da mesma forma, Lin *et al.* (2015) ao avaliarem a suplementação de DL-Metionina em seis níveis de suplementação (0,10 a 0,60%), em dietas para o *L. vannamei* com três diferentes pesos corporais iniciais (0,55, 4,18 e 9,77 g), demonstraram que o crescimento corporal dos camarões sofreu um aumento ao suplementar as dietas com metionina cristalina, confirmando a importância de seu uso para esta espécie.

No presente estudo, a suplementação dietética com o dipetídeo DL-Metionil-DL-Metionina (Met-Met) também promoveu um melhor desempenho zootécnico do *L. vannamei*. Outras pesquisas já demonstraram a bioeficácia desta forma de metionina em dietas para esta espécie (FAÇANHA *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2017).

Por outro lado, a alimentação dos camarões com uma dieta deficiente em metionina, sem suplementação (CTL, total de 0,43% Met e 0,87% Met+Cis), teve um efeito deletério na sobrevivência final ( $86,7 \pm 4,5\%$ ), peso corporal final ( $10,38 \pm 1,43\text{g}$ ), crescimento semanal ( $1,02 \pm 0,03\text{ g}$ ), ganho de produtividade ( $684 \pm 56\text{ g/m}^2$ ) e consumo alimentar aparente ( $12,4$

± 1,1 g/camarão) quando comparado com dietas suplementadas com DL-Met e Met-Met. Muito embora a exigência dietética de metionina para juvenis do camarão *L. vannamei* não tenha sido claramente definida, valores inferiores a 0,44% podem resultar em um menor desempenho zootécnico (FORSTER; DOMINY, 2006). Esses autores, em estudo com juvenis do *L. vannamei* com peso inicial de 1,53 g, observaram após dez semanas um peso corporal final de 10,8 e 11,6 g em dietas contendo 0,44 e 0,90% de metionina total, respectivamente.

No presente estudo, um aumento progressivo na suplementação dietética com DL-Met, de 0,10 até 0,38% (base natural, total de 0,55 até 0,85% de Met e 1,02 até 1,30% de Met+Cis, respectivamente), promoveu um aumento progressivo no peso corporal dos camarões e no ganho de produtividade. O peso final dos camarões alcançou um pico quando alimentado com dietas suplementadas com 0,19% de DL-Met (total de 0,66% Met e 1,11% Met+Cis). Entretanto, houve uma resposta praticamente linear no ganho de produtividade dos camarões com um aumento nas suplementações de DL-Met, não tendo sido detectado um ponto de inflexão. Façanha *et al.* (2018) observaram uma resposta linear no peso corporal do *L. vannamei* em relação a suplementação de Met-Met quando os camarões foram cultivados em regime contínuo de troca de água (14,4% ao dia). Os autores reportaram que o peso corporal dos camarões foi maximizado quando estes foram cultivados com uma troca mínima de água, equivalente a 1,4 a 2,9%. No presente estudo, os tanques de cultivo operaram com uma troca de água de 20% ao dia, superior aos valores utilizados por Façanha *et al.* (2018) no regime contínuo de troca de água. Portanto, é provável que a resposta linear observada quando da suplementação dietética com DL-Met tenha sido influenciada por uma alta renovação de água, associado com uma provável lixiviação deste aminoácido livre.

Da mesma forma, o peso corporal dos camarões foi maximizado com uma suplementação de 0,20% de Met-Met (0,64 de Met, 1,02% de Met+Cis). Porém, a resposta máxima no ganho de produtividade dos camarões foi alcançada com um valor de 0,18% de Met-Met. Xie *et al.* (2017) realizaram estudo com o *L. vannamei*, alimentado durante oito semanas com dietas contendo uma suplementação de 0,1, 0,2 e 0,3% de DL-Met (total de 0,83, 0,92 e 1,01% de Met e 1,19, 1,29 e 1,39% de Met+Cis) e 0,1% de Met-Met (total de 0,83% de Met e 1,19% de Met+Cis). Os autores observaram que o peso corporal dos camarões foi maximizado com apenas 0,1% de suplementação de DL-Met e Met-Met. Niu *et al.* (2018) trabalharam com o *L. vannamei* durante 63 dias de cultivo, utilizando dietas com suplementação de 0,06, 0,12, 0,18, 0,24 e 0,30% de DL-Met e Met-Met. Os autores observaram que o peso corporal dos camarões foi maximizado com dietas contendo 0,12%

DL-Met ou Met-Met (total de 0,73% de Met e 1,12% de Met+Cis e 0,71% de Met e 1,07% Met+Cis, respectivamente). Comparativamente, Façanha *et al.* (2016) trabalhando com o *L. vannamei* em água verde, observaram que em dietas contendo 5% de farinha de peixe, os valores de suplementação de Met-Met para maximizar o peso corporal variou entre 0,21 e 0,31% (total de 0,72% de Met e 1,19% de Met+Cis e 0,81% de Met e 1,28% de Met+Cis, respectivamente).

Lin *et al.* (2015), reportaram o nível ótimo de metionina dietética total para maximizar o ganho de peso do camarão *L. vannamei* com 0,5, 4,18 e 9,77 g de 0,91, 0,67 e 0,66%, respectivamente. As dietas semi-purificadas foram suplementadas com DL-Met e os camarões foram cultivados em água clara com fluxo contínuo. Para outras espécies de camarões peneídeos criados comercialmente, os valores de metionina exigidos são superiores ao encontrado no presente estudo, sendo de 0,89% para o *Penaeus monodon* (MILLAMENA *et al.*, 1996) e 0,70% para o *Marsupenaeus japonicus* (TESHIMA *et al.*, 2002).

No presente estudo não foi observada uma melhoria no peso corporal final do *L. vannamei* quando alimentado com dietas contendo níveis totais de metionina dietética suplementadas com Met-Met e DL-Met acima de 0,64 (1,02% de Met+Cis) e 0,66% de Met (1,11% de Met+Cis), respectivamente. Dietas contendo excesso deste aminoácido em relação ao requisito da espécie pode ocasionar um efeito tóxico devido ao estresse gerado pelo excesso de metionina corporal, levando a gastos extras de energia para sua excreção (CHOO *et al.*, 1991; WALTON, 1985). O impacto negativo no crescimento e os mecanismos de toxicidade da metionina a nível de tecido foram detalhados para espécies terrestres (KATZ; BAKER, 1975; MITCHELL; BENEVENGA, 1978). Espe *et al.* (2008) em estudo com o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) demonstraram que a metionina dietética em excesso pode afetar negativamente a ingestão de alimentos, o crescimento e a sobrevivência em função de efeitos tóxicos.

A bioeficácia de análogos da metionina cristalina, como é o caso da metionina hidroxianáloga (MHA) vem sendo avaliada em diversos estudos principalmente com espécies terrestres. Em dietas de suínos e aves, por exemplo, estudos demonstraram uma maior bioeficácia da MHA em relação à DL-Met (JANSMAN *et al.*, 2003; LEMME *et al.*, 2002; SAUER *et al.*, 2008). Por outro lado, Hoehler *et al.* (2005) também em estudo com dietas para frango, observaram uma maior bioeficácia das dietas suplementadas com DL-Met em relação à suplementada com MHA.

No caso das fontes utilizadas no presente estudo, alguns trabalhos buscaram estabelecer a bioeficácia entre DL-Met e Met-Met. Mencalha (2016) ao trabalhar com frango de corte determinou a bioeficácia relativa das fontes dietéticas de L-metionina e Met-Met em comparação com a DL-metionina durante duas fases distintas de crescimento. Com relação ao rendimento, uma maior bioeficácia foi observada para Met-Met na primeira fase, enquanto que na fase final de crescimento, a L-Met apresentou maior bioeficácia. Segundo a autora, a maior bioeficácia da L-Met observada na fase final pode ter ocorrido devido a diferenças na velocidade de absorção entre as fontes, e uma vez que o composto que apresenta apenas o isômero L, está prontamente disponível para o animal. Essa diferença entre as fontes, por outro lado, não foi observada em estudo com peixes (MAMAUAG *et al.*, 2012). Os autores demonstraram que a Met-Met foi igualmente eficaz a DL-Met para a melhoria do crescimento e utilização eficiente do aminoácido por larvas e juvenis do *Pagrus major* quando alimentados com dietas contendo proteínas vegetais.

Já para estudos com camarão, Fox *et al.* (2012) em experimento com o *L. vannamei*, ao comparar três fontes de metionina (DL-Met, Met-Met e uma forma cíclica de metionina) observaram, após cinco semanas de cultivo, que o ganho de peso foi 24% superior em dietas suplementadas com 0,5% de Met-Met. Resultados semelhantes foram reportados por Niu *et al.* (2018) em estudo com o *L. vannamei* cultivado durante nove semanas. Baseados em resultados de ganho de peso, taxa de crescimento específico e eficiência alimentar, os autores demonstraram uma maior biodisponibilidade relativa da Met-Met em relação à DL-Met, em 285,8%, 276,4% e 300,4%, respectivamente. Contudo, os resultados absolutos de desempenho zootécnico dos camarões (peso corporal final, biomassa final, taxa de crescimento específico e ganho de peso corporal) do trabalho de Niu *et al.* (2018) não mostram diferenças estatísticas entre as duas fontes de metionina. Muito embora, no presente estudo, não tenha sido possível comparar a bioeficácia das duas fontes de metionina avaliadas utilizando os métodos estatísticos adotados por Niu *et al.* (2018), o presente estudo corroborou os resultados alcançados por estes autores no quesito de desempenho zootécnico. Portanto, semelhante ao estudo de Niu *et al.* (2018), o desempenho zootécnico de juvenis do *L. vannamei* não apresentou diferenças quando alimentado com dietas suplementadas com DL-Met e a Met-Met. Da mesma forma, Xie *et al.* (2017) não conseguiram estabelecer diferença estatística significativa sobre os parâmetros de desempenho zootécnico do *L. vannamei* alimentado com as duas fontes de metionina cristalina, DL-Met e Met-Met. Porém, os autores demonstraram que a metionina na forma dipeptídica (Met-Met) pode ser utilizada

de forma mais eficiente do que a DL-Met, melhorando a atividade proteolítica e acelerando a digestibilidade proteica.

No presente estudo, a composição proteica e aminoacídica do músculo caudal e da glândula digestiva foram afetadas pelo nível de suplementação e fonte de metionina cristalina. O uso da Met-Met levou a um maior conteúdo de proteína bruta, aminoácidos essenciais e não essenciais em particular metionina, lisina e cistina. Outros estudos com *L. vannamei* também determinaram a composição proteica e aminoacídica ao suplementarem dietas com aminoácidos cristalinos, porém nenhuma relação entre os níveis dietéticos de aminoácidos e a composição de tecidos foi determinada (FAÇANHA *et al.*, 2016; HUAI *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2013). Já no estudo realizado por Niu *et al.* (2018), ao suplementarem dietas para o *L. vannamei* com DL-Met e Met-Met, foi observado, para as duas fontes, um aumento do conteúdo proteico no músculo caudal, conforme o aumento dos conteúdos de metionina das dietas.

As variações nas condições experimentais, como temperatura e salinidade, frequência alimentar, densidade de estocagem, tipo de espécie cultivada, além do uso de diferentes ingredientes nas dietas basais, podem influenciar na ocorrência de diferenças entre as fontes de metionina utilizadas (XIE *et al.*, 2017). Além disso, as diferenças observadas entre a bioeficácia de fontes de metionina pode estar relacionada à dinâmica de absorção de cada um desses compostos (NRC, 2011). Diferenças metabólicas de aminoácidos livres individuais e na forma dipeptídica e sua disponibilidade para síntese proteica, pode levar uma maior taxa de crescimento da última forma (DABROWSKI *et al.*, 2005).

Outro fator que pode contribuir na eficiência de diferentes formas de metionina suplementadas em dietas para camarão é a lixiviação. Uma baixa bioeficiência de aminoácidos cristalinos já foi reportada em estudos com camarão, devido à lixiviação, podendo ser explicada pelo hábito de alimentação desses animais, uma vez que respondem de forma relativamente lenta à presença de alimento (NUNES *et al.*, 2014). Xie *et al.* (2017) avaliaram a perda de duas fontes de metionina (DL-Met e Met-Met) por lixiviação quando suplementadas em dietas para o *L. vannamei*. Conforme previsto pelos autores, a perda de metionina por lixiviação em água salgada foi maior para a DL-Met. Dentro de um intervalo de 30 minutos dietas suplementadas com Met-Met apresentaram entre 9,39 e 16,18% menos lixiviação em água salgada comparada a DL-Met. A forma dipeptídica Met-Met é caracterizada por ser menos solúvel em água quando comparada a outras fontes de metionina cristalina, com valor de solubilidade em água de 21 g/L (20°C) enquanto que para outras

fontes pode variar entre 29 e 34 g/L (EFSA, 2015). Por ser formada como uma mistura de isômeros de metionina, o dipeptídeo Met-Met pode ser efetivamente clivado por enzimas digestivas em suas formas livres D- e L-, melhorando, dessa forma, a síntese proteica pelos camarões (XIE *et al.*, 2017). Com isso, o desenvolvimento de dietas estáveis em água para camarões é primordial para um melhor aproveitamento da mesma, levando a melhores resultados de desempenho zootécnico.



## 7 CONCLUSÃO

Através do presente trabalho foi possível concluir:

- Dietas suplementadas com as formas de metionina livre, DL-Metionina (DL-Met) e DL-Metil-DL-Metionina (Met-Met) levam a um aumento no desempenho de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei*.
- O peso corporal final é maximizado com suplementações de DL-Met e Met-Met de 0,19% e 0,20%, equivalente a um total de 0,66% e 0,64% de metionina (1,11% e 1,02% de metionina+cistina), respectivamente.
- O desempenho zootécnico de juvenis do *L. vannamei* não apresenta diferenças quando alimentados com dietas suplementadas com DL-Met e Met-Met.
- Nível de suplementação e fonte de metionina cristalina afeta a composição proteica e aminoacídica do músculo caudal e da glândula digestiva dos camarões. Níveis mais elevados com uso da Met-Met levam a um maior conteúdo de proteína bruta, aminoácidos essenciais e não essenciais, em particular metionina, lisina e cistina, na glândula digestiva e no musculo caudal dos camarões.

## REFERÊNCIAS

AKIYAMA, D. M.; DOMINY, W. G.; LAWRENCE, A. L. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry – revised. **American Soybean Association** AQ32, 35. 1991.

ALAM, M. S.; TESHIMA, S.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M. Arginine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* estimated by growth and biochemical parameters. **Aquaculture**, 205, 127–140. 2002b.

ALAM, M. S.; TESHIMA, S.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M. Effects of supplementation of coated crystalline amino acids on growth performance and body composition of juvenile kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 10, n. 5, p. 309–316, 2004.

ALAM, M. S.; TESHIMA, S.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; UYAN, O.; HERNANDEZ, L. H. H.; MICHAEL, F. R. Supplemental effects of coated methionine and/or lysine to soy protein isolate diet for juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Aquaculture** 248, 13–19. 2005.

AOAC. 2002. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.

BAKER, D. H. Comparative Species Utilization and Toxicity of Sulfur Amino Acids. **The Journal of Nutrition**, p. 1670–1675, 2006.

BRAY, W.; LAWRENCE, A. L.; LEUNGTRUJILLO, J. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHVN virus and salinity. **Aquaculture**, 122, 133–146, 1994.

BRIGGS, M. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. In: **Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO**. Roma, 2006.

BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. 2. ed. Berkeley: Academic Press, 1998.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. The sulfur-containing amino acids: an overview. **J. Nutr.**, 136, p. 1636S–1640S. 2006.

BROWDY, C. L.; BHARADWAJ, A. S.; VENERO, J. A.; NUNES, A. J. P. Supplementation with 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid (HMTBa) in low fish meal diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 4, p. 432–440, 2012.

BUXBAUM, Engelbert. **Fundamentals of Protein Structure and Function**. 1. ed. Portsmouth: Springer, 351 p., 2007.

CHOO, P. S.; SMITH, T. K.; CHO, C. Y.; FERGUSO, H. W. Dietary excesses of leucine influence growth and body composition of rainbow trout. **J. Nutr.**, 121: 1932-1939, 1991.

CRUZ-SUÁREZ, L. E.; TAPIA-SALAZAR, M.; VILLARREAL-CAVAZOS, D.; BELTRAN-ROCHA, J.; NIETO-LÓPEZ, M. G.; LEMME, A.; RICQUE-MARIE, D. Apparent dry matter, energy, protein and amino acid digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**, 292, p. 87–94, 2009.

D'ABRAMO, L. R.; SHEEN, S. S. Nutritional requirements, feed formulation, and feeding practices for intensive culture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Reviews Fisheries Science**. v. 21, p. 1–21, 1994.

DABROWSKI, K.; TERJESEN, B. F.; ZHANG, Y.; PHANG, J. M.; LEE, K. J. A concept of dietary dipeptides: a step to resolve the problem of amino acid availability in the early life of vertebrates. **Journal of Experimental Biology** 208, p. 2885–2894, 2005.

DABROWSKI, K.; ZHANG, Y.; KWASEK, K.; HLIWA, P.; OSTASZEWSKA, T. Effects of protein-, peptide- and free amino acid-based diets in fish nutrition. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 5, p. 668–683, 2010.

DALL, W.; HILL, B. J.; ROTH LISBERG, P. C.; SHARPLES, D.J. The Biology of the Penaeidae. In: \_\_\_\_\_. **Advances in Marine Biology**, v. 27, p. 7-54, 1991.

DAVIS, D. A.; ARNOLD, A. C. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** 185, p. 291–298, 2000.

DAVIS, D. A.; SAMOCHA, T. M.; BULLIS, R. A.; PATNAIK, S.; BROWDY, C.; STOKES, A.; ATWOOD, H. Practical diets for *Litopenaeus vannamei*, (Boone. 1931): working towards organic and/or all plant production diets. Avances en Nutricion Acuicola VII. In: **VII Simposium Internacional de Nutricion Acuicola**. Hermosillo, Sonora, Mexico, 2004. p. 16–19.

EFSA (European Food Safety Authority). 2012. **Scientific Opinion on DL-methionine, DL-methionine sodium salt, the hydroxy analogue of methionine and the calcium salt of methionine hydroxy analogue in all animal species; on the isopropyl ester of methionine hydroxy analogue and DL-methionine technically pure protected with copolymer vinylpyridine/styrene in dairy cows; and on DL-methionine technically pure protected with ethylcellulose in ruminants**. EFSA Journal, v. 10, n. 3, 2012.

EFSA (European Food Safety Authority). **Scientific Opinion on the safety and efficacy of DL-methionyl-DL-methionine for all aquatic animal species**. EFSA Journal, v. 13, n. 2, 2015.

ESPE, M., HEVRØY, E.M., LIASET, B., LEMME, A., EL-MOWAFI, A. Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture** 274, p. 132–141, 2008.

FAÇANHA, F. N.; OLIVEIRA-NETO, A. R.; FIGUEIREDO-SILVA, C.; NUNES, A. J. P. Effect of shrimp stocking density and graded levels of dietary methionine over the growth performance of *Litopenaeus vannamei* reared in a green-water system. **Aquaculture**, v. 463, p. 17 – 21, 2016.

FAÇANHA, F. N.; SABRY-NETO, H.; FIGUEIREDO-SILVA, C.; OLIVEIRA-NETO, A. R.; NUNES, A. J. P. Minimum water exchange spares the requirement for dietary methionine for juvenile *Litopenaeus vannamei* reared under intensive outdoor conditions. **Aquaculture Research**, 00, p. 1-8, 2018.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. 2016. ed. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. 200 p.

FIGUEIREDO-SILVA, C.; LEMME, A.; SANGSUE, D.; KIRIRATNIKOM, S. Effect of DL-methionine supplementation on the success of almost total replacement of fish meal with soybean meal in diets for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*). **Aquac. Nutr.**, 21, p. 234–241. 2015.

FLEGEL, T. W. Confirmation of the right to refuse revision in the genus *Penaeus*. **Aquaculture**, 280, p. 1–4. 2008.

FORSTER, I, P.; DOMINY, W. G. Efficacy of Three Methionine Sources in Diets for Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 37, No. 4, 2006.

FOX, J. M.; HUMES, M. Evaluation of Methionine Supplements and Their Use in Grain-based Feeds for *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the world aquaculture society**, v. 42, p. 676-686, 2011.

FOX, J. M.; LAWRENCE, A. L.; LI-CHAN, E. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. **Aquaculture**, 131, p. 279–290, 1995.

FOX, J. M.; LAWRENCE, A. L.; LEMME, A.; PATNAIK. Effect of methionine source and dietary inclusion level on growth and survival of juvenile *Litopenaeus vannamei*. In: The National Conference & Exposition Of National Aquaculture Association, **Anais**..2012. Las Vegas, Nevada, United States, 2012.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture** 199, p. 197–227, 2001.

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

GOFF, J. B.; GATLIN, D. M. Evaluation of different sulfur amino acid compounds in the diet of red drum, *Sciaenops ocellatus*, and sparing value of cystine for methionine. **Aquaculture**, v. 241, n. 1-4, p. 465–477, 2004.

HARDY, R. W. Worldwide fishmeal production outlook and the use alternative protein meals for aquaculture. In: **VIII Simposium Internacional de Nutricion Acuicola**, 17, Monterey, Nuevo León, México. 2006. p. 410 – 419.

HOEHLER, D.; LEMME, A.; JENSEN, S. K.; VIEIRA, S. L. Relative Effectiveness of Methionine Sources in Diets for Broiler Chickens. **J. Appl. Poult**, v. 14, p. 679–693, 2005.

HUAI, M. Y.; TIAN, L. X.; LIU, Y. J.; XU, A. L.; LIANG, G. Y.; YANG, H. J. Quantitative dietary threonine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. **Aquacult. Res.**, 40, p. 904–914, 2009.

HUAI, M-Y.; LIU, Y-J.; TIAN, L-X.; DENG, S-X.; XU, A-L.; GAO, W.; YANG, H-J. Effect of dietary protein reduction with synthetic amino acids supplementation on growth performance, digestibility, and body composition of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquacult Int**, v. 18, p. 255–269, 2010.

JANSMAN, A. J. M.; KAN, C. A.; WIEBENGA, J. 2003. Comparison of the biological efficacy of DL-methionine and hydroxy-4-methylthiobutanoic acid (HMB) in pigs and poultry. CVB, **Central Bureau for Livestock Feeding**: Documentation Rep. No. 29. Lelystad, the Netherlands: Central Veevoederbureau. 2003.

KATZ, R. S.; BAKER, D. H. Methionine toxicity in the chick : Nutritional and metabolic implications. **Journal of Nutrition**, 105, p. 1168-1175, 1975.

KETOLA, H. G. 1982. **Amino acid nutrition of fish: requirement and supplementation of diets**. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 17–24.1982.

KOBLER, D. Dieta para aumentar o vigor de camarões. **Revista ABCC**, v. 16, n. 3, p. 60-64, 2014.

KURESHY, N.; DAVIS, D. A. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, 204, p. 125-143, 2002.

LALL, S. P.; KAUSHIK, S. J.; LE-BAIL, P. Y.; KEITH, R.; ANDERSON, J. S.; PLISETSKAYA, E. Quantitative arginine requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in sea water. **Aquaculture**, 124, p. 13–25, 1994.

LEMME, A.; HOEHLER, D.; BRENNAN, J. J.; MANNION, P. F. Relative effectiveness of Methionine Hydroxy Analog Compared to DL-Methionine in Broiler Chickens. **Poultry Science**, 81, p. 838–845, 2002.

LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Effects of supplemental lysine and methionine in low protein diets on weight gain and body composition of young channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, 163, p. 295–305, 1998.

LIN, H.; CHEN, Y.; NIU, J.; ZHOU, C.; HUANG, Z.; DU, Q.; ZHANG, J. Dietary Methionine Requirements of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*, of Three Different Sizes. **The Israeli Journal of Aquaculture**, 2015.

MAMAUAG, R. E. P.; GAO, J.; NGUYEN, B. T.; RAGAZA, J. A. Supplementations of dl-Methionine and Methionine Dipeptide in Diets are Effective for the Development and

Growth of Larvae and Juvenile Red Sea Bream, *Pagrus major*. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 43, n. 3., 2012.

MENCALHA, R. **Bioeficácia de fontes de metionina em dietas de frangos de corte**. 2016, 54 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

MILLAMENA, O. M.; BAUTISTA, M. N.; REYES, O. S.; KANAZAWA, A. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, 15, p. 9-14, 1997.

MILLAMENA, O. M.; BAUTISTA-TERUEL, M. N.; KANAZAWA, A. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture**, v. 143, p. 403-410, 1996.

MILLAMENA, O. M.; BAUTISTA-TERUEL, M. N.; REYES, O. S.; KANAZAWA, A. Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) for lysine and arginine. **Aquaculture**, 164, p. 95-104, 1998.

MITCHELL, A. D.; BENEVENGA, N. J. The role of transamination in methionine oxidation in the rat. **Journal of Nutrition**, 108, p. 67-78, 1978.

NANG-THU, T. T.; PARKOUDA, C.; SAEGER, S. D.; LARONDELLE, Y.; ROLLIN, X. Comparison of the lysine utilization efficiency in different plant protein sources supplemented with L-lysine HCl in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. **Aquaculture**, 272, p. 477-488, 2007.

NAYLOR, R. L.; GOLDBURG, R. J.; PRIMAVERA, J. H.; KAUTSKY, N.; BEVERIDGE, M. C. M.; CLAY, J.; FOLKE, C.; LUBCHENCO, J.; MOONEY, H.; TROELL, M. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, 405, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. 2002. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NIU, J.; LEMME, A.; HE, J-Y.; LI, H-Y.; XIE, S-W.; LIU, Y-J.; YANG, H-J.; FIGUEIREDO-SILVA, C.; TIAN, L-X. Assessing the bioavailability of the Novel Met-Met product (AQUAVI® Met- Met) compared to DL-methionine (DL-Met) in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, 484, p. 322-332, 2018.

NRC. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. 2011. 3. ed. Washington: The National Academies Press, 2011. 376 p.

NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; BROWDY, C. L.; VAZQUEZ-ANON, M. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. **Aquaculture**, v. 431, p. 20-27, 2014.

ROY, L. A.; DAVIS, D. A.; SAOUD, I. P.; BOYD, C. A.; HARVEY, J. P.; BOYD, C. E. Shrimp culture in inland low salinity waters. **Reviews in Aquaculture** 2, p. 191-20, 2010.

ROY, L. A.; DAVIS, D. A.; SAOUD, I. P.; HENRY, R. P. Supplementation of potassium, magnesium and sodium chloride in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. **Aquaculture Nutrition**, 13, n. 2, p. 104–113, 2007.

SAMOCHA, T. M.; DAVIS, D. A.; SAOUD, I. P.; DEBAULT, K. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, 23, p. 197–203, 2004.

SAMOCHA, T. M.; PRANGNELL, D. I.; HANSON, T. R.; TREECE, G. D.; MORRIS, T. C.; CASTRO, L. F.; STARESINIC, N. 2017. **Design and Operation of Super Intensive, Biofloc-Dominated Systems for Indoor Production of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*** – The Texas A&M AgriLife Research Experience. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana USA, 2017.

SAUER, N.; EMRICH, K.; PIEPHO, H-P.; LEMME, A.; REDSHAW, M. S.; MOSENTHIN, R. Meta-analysis of the relative efficiency of methionine-hydroxy-analogue-free-acid compared with dl-methionine in broilers using nonlinear mixed models. **Poultry Sci**, v. 87, p. 2023-2031, 2008.

SHIAU, S. Nutrient requirements of penaeid shrimps. **Aquaculture**, v. 164, p. 77–93, 1998.

SILVA, S. F. D. **Development and Application of Non Marine Ingredients Based Diets for Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Examining the Suitability of Alternative Lipid Sources**. 2013. 156 f. Tese (Doutorado em Filosofia) – Faculty of Auburn University. Auburn, Alabama, 2013.

SIMMONS, L.; MOCCIA, R. D.; BUREAU, D. P.; SIVAK, J. G.; HERBERT, K. Dietary methionine requirement of juvenile Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.). **Aquaculture Nutrition**, v. 5, p. 93-100, 1999.

SOOKYING, D.; DAVIS, D. A.; SILVA, F. S. D. A review of the development and application of soybean-based diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquacult. Nutr.**, 19, p. 441-448, 2013.

TACON, A. G. J., 1994. Feed ingredients for carnivorous fish species: alternatives to fishmeal and other dietary resources. **FAO Fish. Circ.** 881, 35 p., 1994.

TACON, A. G. J.; AKIYAMA, A. G. J. Feed ingredients. 1997 In: \_\_\_\_. D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), Crustacean Nutrition, **Advances in World Aquaculture**, 6, p. 411–472. 1997.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**, v. 285, n. 1-4, p. 146–158, 2008.

TESHIMA, S.; ALAM, M. S.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; KANAZAWA, A. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). **Aquaculture Research**, v. 33, n. 6, p. 395–402, 2002.

WALTON, M. J. 1985. Aspects of amino acid metabolism in teleost fish. In: Cowey C.R., Mackie A.M. and Bell J.G. (Eds.), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, UK, pp. 47-68. 1985.

WATANABE, T. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science*, 68, p. 242–252, 2002.

WICKINS J. F., LEE, D. O. 2007 Frontmatter. In:\_\_\_\_\_. **Crustacean Farming: Ranching and Culture**, Second Edition, (eds), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2007.

WILSON, R. P.; POE, W. E. Relationship of whole body and egg essential amino acid pattern to aminoacid requirement patterns in channel catfish, *Zctaulurus punotatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80B, p. 385-388, 1985.

XIE, J. J.; LEMME, A.; HE, J-E.; YIN, P.; FIGUEIREDO-SILVA, C.; LIU, Y-J.; XIE, S-W.; NIU, J.; TIAN, L-X. Fishmeal levels can be successfully reduced in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) if supplemented with DL-Methionine (DL-Met) or DL-Methionyl-DL-Methionine (Met-Met). *Aquaculture Nutrition*, 00, p. 1–9, 2017.

ZHOU, Q. C.; WANG, Y. L.; WANG, H. L.; TAN, B. P. 2013. Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 392–395, 142–147.