



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

FELIPE NOBRE FAÇANHA

**ANÁLISE DA EXIGÊNCIA DO AMINOÁCIDO ESSENCIAL METIONINA PARA
JUVENIS DO CAMARÃO BRANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), COM
ÊNFASE SOBRE OS EFEITOS DO SISTEMA DE CULTIVO, ALIMENTAÇÃO E
ESTRATÉGIAS NUTRICIONAIS**

FORTALEZA

2018

FELIPE NOBRE FAÇANHA

ANÁLISE DA EXIGÊNCIA DO AMINOÁCIDO ESSENCIAL METIONINA PARA JUVENIS DO CAMARÃO BRANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), COM ÊNFASE SOBRE OS EFEITOS DO SISTEMA DE CULTIVO, ALIMENTAÇÃO E ESTRATÉGIAS NUTRICIONAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Marinhas Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes.

Coorientador: Dr. Adhemar Rodrigues de Oliveira Neto.

FORTALEZA

2018

FELIPE NOBRE FAÇANHA

ANÁLISE DA EXIGÊNCIA DO AMINOÁCIDO ESSENCIAL METIONINA PARA
JUVENIS DO CAMARÃO BRANCO *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), COM
ÊNFASE SOBRE OS EFEITOS DO SISTEMA DE CULTIVO, ALIMENTAÇÃO E
ESTRATÉGIAS NUTRICIONAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em
Ciências Marinhas Tropicais.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Adhemar Rodrigues de Oliveira Neto (Coorientador)
Evonik Degussa do Brasil LTDA

Prof. Dra. Oscarina Viana Sousa (Interno)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Esaú Aguiar Carvalho (Externo)
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Dr. Ricardo Camurça Correia Pinto (Externo)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

À minha mãe Ângela e esposa Adrielly.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, paz e alegria que me proporciona diariamente.

Ao meu orientador, prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes, que sempre esteve disposto a ajudar, pela confiança depositada e pelos valiosos ensinamentos que contribuíram na minha formação profissional e pessoal.

À minha mãe Ângela, por todo apoio, amor, força, investimentos, ensinamentos e por toda educação, a qual serei grato por toda minha vida.

À minha linda esposa Adrielly, pelo amor, amizade, e por continuar me dando força para correr atrás dos nossos sonhos.

Ao meu amigo Michel Bronstein, por todo apoio, pelos excelentes conselhos carregados de conhecimento e por todo investimento e suporte na minha vida.

Aos meus familiares Rita, Julia, Hikaro, Rocha e Maria José, que sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos - LANOA: Alann, Andrei, Arthur, Caio, Carla, Daniel, Esaú, Hassan, Junior, Lucas, Luís Paulo, Matheus, Natália, Ricardo, Sandra, Severino, Simone, Thiago e Zaine pela amizade e por contribuir diretamente para o sucesso deste projeto.

À Dra. Cláudia Figueiredo Silva, ao Dr. Karthik Masagounder e ao Dr. Adhemar Rodrigues de Oliveira Neto pelo apoio, recomendações e discussão sobre os achados deste trabalho.

À Evonik Degussa do Brasil Ltda. e Evonik Industries AG pelo apoio e realização das análises químicas dos ingredientes e das dietas utilizadas neste experimento.

À Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP), pela bolsa de pesquisa concedida.

E a todos, que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta jornada.

RESUMO

O cultivo de camarões é diversificado em todo o mundo, sendo realizado sob influência de muitas variáveis que resultam em um grande número de métodos existentes de cultivo e de níveis de intensificação. Assim, muitas são as fontes de variação ambiental que podem influenciar as exigências nutricionais dos camarões cultivados. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos das variáveis de produção como regimes de troca de água, oferta alimentar, densidade de estocagem e estratégias nutricionais sobre o requerimento dietético de metionina de juvenis do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. O estudo foi dividido em três diferentes fases realizadas de forma consecutiva. A primeira fase avaliou o efeito do regime de troca de água, do conteúdo dietético de metionina e suas interações no desempenho de crescimento do *L. vannamei* cultivado em um sistema de água verde. Foi observado que a diminuição das taxas de renovação de água reduz a dependência por níveis mais elevados de metionina dietética para maximizar o crescimento dos camarões. A segunda fase avaliou os efeitos da densidade de estocagem, do regime de alimentação, do conteúdo dietético de metionina e suas interações sobre o desempenho zootécnico de *L. vannamei* cultivado em sistema de água verde. Foi observado que com o aumento da densidade de estocagem os camarões se tornam mais dependentes de fontes extrínsecas de alimento e maiores quantidades de metionina na dieta são necessárias para promover o máximo crescimento. No entanto, os requerimentos dietéticos de metionina podem ser reduzidos a medida que as taxas alimentares são aumentadas. A terceira fase teve como objetivo determinar o requerimento dietético de metionina de juvenis de *L. vannamei*, através de dietas formuladas com base no conceito de proteína ideal. Foi observado, com base nas análises de regressão, que o valor ótimo de metionina dietética para o máximo crescimento de *L. vannamei* encontra-se no intervalo entre 9,4 e 10,5 g kg⁻¹ da dieta (2,48 a 2,77% da proteína bruta), correspondente à relação ideal de metionina/lisina de 43 e 48%, respectivamente. Os resultados desse trabalho são evidências que as exigências dietéticas de metionina de juvenis *L. vannamei*, respondem de acordo com as variáveis de produção, tais como as condições de cultivo, a densidade de estocagem, o regime alimentar e as relações entre os aminoácidos essenciais das rações.

Palavras chave: *Litopenaeus vannamei*. Metionina. Exigência dietética. Variáveis de cultivo.

ABSTRACT

The shrimp production is diversified around the world; being carried out under different variables resulted from large number of rearing methods and levels of intensification. Thus, there are many environmental variables that can influence the nutritional requirements of farmed shrimps. The present study aimed evaluate the effects of rearing variables such as water exchange regime, feed allowance, stocking density and nutritional strategies over dietary methionine requirement of juveniles Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. The study was divided into three consecutive phases. The first phase evaluated the effect of water exchange regime, dietary methionine content and their interactions on the growth performance of *L. vannamei* reared in green water conditions. It was observed that decreasing water exchange rates reduces dependence on higher levels of dietary methionine to maximize shrimp growth. The second phase evaluated the effects of stocking density, feed allowance, dietary methionine content and their interactions on the growth performance of *L. vannamei* reared in green water conditions. It was observed that with increasing stocking density the shrimp become more dependent on extrinsic food sources and higher amounts of methionine in the diet are required to promote maximum growth. However, dietary requirements for methionine may be reduced as feed rates are increased. The third phase aimed to determine the dietary methionine requirement of *L. vannamei* juvenile fed with diets formulated based on the ideal protein concept. It was observed from the regression analysis that the optimal dietary methionine value for maximum growth of *L. vannamei* range from 9.4 to 10.5 g kg⁻¹ of the diet (2.48 to 2.77% of the crude protein), corresponding to the ideal methionine/lysine ratio of 43 and 48%, respectively. The results of the present study evidence that the dietary methionine requirement of juvenile *L. vannamei* respond according to the production variables, such as rearing conditions, stocking density, and essential amino acids ratios.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*. Methionine. Dietary requirement. Rearing variables.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
Requerimentos de aminoácidos essenciais de camarões.....	14
Exigência de aminoácidos sulfurados.....	16
Fatores que influenciam a exigência de aminoácidos.....	18
Conceito de proteína ideal.....	19
HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	21
OBJETIVOS.....	21
Geral.....	21
Específicos.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO I.....	28
Mínimas taxas de renovação de água reduz a dependência por níveis mais elevados de metionina dietética para juvenis do camarão branco do Pacífico (<i>L. vannamei</i>).....	28
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
1.1 INTRODUÇÃO.....	31
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
1.2.1 Dietas experimentais.....	32
1.2.2 Sistema de cultivo e pós larvas.....	34
1.2.3 Análises químicas.....	35
1.2.4 Desempenho de crescimento e análises estatísticas.....	35
1.3 RESULTADOS.....	36
1.3.1 Desempenho de crescimento e utilização alimentar.....	36
1.4 DISCUSSÃO.....	39
1.5 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
CAPÍTULO II.....	46
Efeitos da densidade de estocagem e do regime alimentar sobre os requerimentos dietéticos de metionina de juvenis de <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado em sistema de água verde.....	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48

2.1 INTRODUÇÃO.....	49
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.2.1 Local do estudo e desenho experimental.....	51
2.2.2 Dietas experimentais.....	51
2.2.3 Sistema de cultivo e pós larvas.....	53
2.2.4 Desempenho de crescimento e análises estatísticas.....	55
2.2.5 Análises químicas.....	55
2.3 RESULTADOS.....	56
2.3.1 Qualidade de água.....	56
2.3.2 Desempenho de crescimento e utilização alimentar.....	57
2.4 DISCUSSÃO.....	63
2.5 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	67
CAPÍTULO III.....	70
Requerimento dietético de metionina de juvenis de camarão branco do Pacífico, <i>Litopenaeus vannamei</i>	70
RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	72
3.1 INTRODUÇÃO.....	73
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	74
3.2.1 Local do estudo e desenho experimental.....	74
3.2.2 Sistema de cultivo e pós larvas.....	74
3.2.3 Dietas experimentais.....	75
3.2.4 Fabricação das dietas.....	76
3.2.5 Alimentação e sistema de manejo.....	78
3.2.6 Coleta de amostras e análises químicas.....	79
3.2.7 Teste de lixiviação.....	80
3.2.8 Parâmetros de crescimento.....	80
3.2.9 Análises estatísticas.....	81
3.3 RESULTADOS.....	81
3.3.1 Qualidade de água.....	81
3.3.2 Composição centesimal e perfil aminoacídico dos tecidos corporais.....	82
3.3.3 Teste de lixiviação.....	85
3.3.4 Desempenho de crescimento e utilização alimentar.....	86

3.4 DISCUSSÃO	90
3.5 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	94
CONCLUSÕES	97
CONSIDERAÇÕES FINAIS	98

INTRODUÇÃO

Em 2014, a produção mundial de camarões marinhos cultivados gerou uma receita direta de aproximadamente 24 bilhões de dólares, com uma produção de 4,58 milhões de toneladas, da qual 80,1% foi representada pelo camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2016). A carcinicultura é uma das atividades que mais cresce na produção de pescados, apresentando uma taxa de crescimento médio anual de 9,2% no período entre 2000-2014. Esse crescimento vem sendo caracterizado pelo aumento dos preços, do consumo e do nível de intensificação dos cultivos (FAO, 2016).

A indústria de nutrição animal e os setores paralelos se beneficiaram com o aumento e a intensificação da produção de camarão (DEUTSCH *et al.*, 2007; TACON; METIAN 2008). Desde então, a produção aquícola do crustáceo é dependente do fornecimento de rações industriais (NAYLOR *et al.*, 2009).

As rações para camarões marinhos contavam com grandes quantidades de farinha de peixe como fonte de proteína digestível e aminoácidos intactos (TACON; METIAN 2008); no entanto, fatores econômicos e ambientais começaram a limitar a disponibilidade desse ingrediente em nível global. Em consequência das frequentes oscilações anuais causadas principalmente por fenômenos naturais como o *El Niño*, a produção de farinha de peixe tem diminuído gradualmente desde 2005 (FAO, 2016). Isso, juntamente com uma rápida expansão da produção aquícola, aumentou a demanda global por esse ingrediente, levando os preços para os maiores níveis históricos já registrados. Os preços da farinha de peixe aumentaram significativamente entre o período de 2006 e 2013, atingindo um pico de US\$ 1.747 por tonelada em 2013 (FAO, 2016).

Com os preços voláteis e a disponibilidade instável da farinha de peixe durante a última década, várias pesquisas foram iniciadas com o objetivo de viabilizar a substituição desse ingrediente por fontes proteicas alternativas como subprodutos e concentrados de origem vegetal (AMAYA *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-FÉLIX *et al.*, 2010; BAUER *et al.*, 2012; YUE *et al.*, 2012).

Embora seja uma possibilidade para atender parte das exigências nutricionais dos camarões, a utilização das fontes proteicas de origem vegetal pode causar grandes mudanças na composição nutricional das rações, afetando a quantidade, a qualidade e o equilíbrio de aminoácidos essenciais e ácidos graxos altamente insaturados de cadeia longa (GOFF; GATLIN, 2004). A maioria das fontes vegetais possui perfil de aminoácidos inadequado para promover a síntese de novos tecidos e proporcionar o crescimento animal (NRC, 2011).

Atualmente, a principal fonte proteica vegetal utilizada para substituir a farinha de peixe nas rações para camarões é a soja. O farelo de soja é considerado um dos mais nutritivos ingredientes vegetais, apresentando o melhor perfil de aminoácidos dentre todas as fontes de proteínas vegetais (NRC, 2011; FRACALOSSI; CYRINO, 2013). Apesar de possuir todos os 10 aminoácidos essenciais para camarões, o farelo de soja apresenta quantidades insuficientes de aminoácidos sulfurados; *e.g.* metionina e cisteína (GATLIN *et al.*, 2007; NRC, 2011). Esses aminoácidos possuem grande importância metabólica, atuando como doadores de grupos metil para uma infinidade de substâncias, sendo necessários para deposição de tecido muscular e formação de componentes corporais importantes (*e.g.* glutatona) (OLIVEIRA-NETO, 2014). A metionina é considerada o primeiro aminoácido limitante em dietas à base de farelo de soja (FURUYA *et al.*, 2001).

Como forma de solucionar possíveis problemas relacionados com a deficiência de alguns aminoácidos essenciais, vários estudos citam a importância da utilização de fontes cristalinas de aminoácidos (CHI *et al.*, 2011; NRC, 2011; NUNES *et al.*, 2014; FAÇANHA *et al.*, 2016). A suplementação correta de dietas com aminoácidos cristalinos representa uma oportunidade para reduzir os custos de produção e tornar nutricionalmente viável a utilização de fontes proteicas alternativas em rações para camarões (NUNES *et al.*, 2014).

A formulação de dietas que forneça nutrientes em níveis adequados e que proporcione a expressão do máximo desempenho para uma espécie cultivada, demanda o conhecimento de suas exigências nutricionais (NRC, 2011). Estudos de determinação das exigências nutricionais objetivam, basicamente, quantificar as necessidades de nutrientes essenciais para os organismos cultivados (*e.g.* aminoácidos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais) (SHEARER, 2000; NRC, 2011).

Para o camarão *L. vannamei*, vários estudos de determinação da exigência de diversos nutrientes têm sido reportados na literatura científica (LI *et al.*, 2017). Na maioria desses estudos, as exigências nutricionais são determinadas através de ensaios de dose-resposta, que consistem na oferta de níveis graduais do nutriente-teste, a partir de uma dieta basal balanceada, deficiente apenas em relação ao nutriente em questão (FRACALOSSI; CYRINO, 2013).

O ambiente aquático apresenta alguns desafios que podem limitar a investigação dos aspectos relacionados a nutrição e alimentação dos organismos cultivados (NRC, 2011). A água pode afetar negativamente a integridade das rações, ocasionando a perda dos nutrientes por lixiviação (ZHOU *et al.*, 2012); ou positivamente, quando nela estão disponíveis outros importantes nutrientes (*e.g.* minerais) e fontes de alimento natural (*e.g.*

organismos planctônicos) (ROY *et al.*, 2007; CARDONA *et al.*, 2015). Em grande parte das pesquisas de determinação de exigências nutricionais, as condições experimentais em que são submetidos os camarões são as mais controladas possíveis, normalmente na presença de água clara e ausência de fontes intrínsecas de alimento (ZHOU *et al.*, 2012, 2013; LIU *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2015). Os resultados dessas pesquisas são de fundamental importância para os avanços no campo da nutrição animal, no entanto, as condições em que são realizadas não refletem os ambientes aos quais são submetidos os camarões em cultivos convencionais.

O cultivo de camarões é diversificado em todo o mundo, sendo realizado sob influência de muitas variáveis que resultam em um grande número de métodos existentes de cultivo e de níveis de intensificação (AVNIMELECH *et al.*, 2008; RAY; LOTZ, 2014; XU; PAN, 2014). Assim, muitas são as fontes de variação ambiental que podem influenciar as exigências nutricionais dos camarões cultivados (NRC, 2011). Em outras áreas da produção animal, onde as pesquisas de exigências nutricionais estão mais avançadas, foi observado que fatores não dietéticos (*e.g.* desafio sanitário e temperatura ambiental) podem influenciar as exigências de aminoácidos sulfurados dos animais (STAHLY, 1998; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2007).

O metabolismo dos camarões é diretamente afetado pela temperatura (BUREAU, 2003) e por outros fatores ambientais (PONCE-PALAFIX; MARTINEZ-PALACIOS; ROSS, 1997; BETT; VINATEA, 2009), por conta disso, pode-se assumir que as condições de cultivo têm um efeito significativo sobre as exigências nutricionais dos organismos cultivados (NRC, 2011). Embora já tenha sido reportado que fatores não dietéticos (*e.g.* estágio do ciclo de vida, densidade de estocagem, salinidade) têm potencial para afetar as exigências de metionina de camarões (DAVIS *et al.*, 2002; DUY *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; FAÇANHA *et al.*, 2016), a quantidade de estudos ainda é insuficiente.

Sendo assim, se faz necessário a realização de pesquisas que objetivem a determinação das exigências nutricionais de organismos submetidos a diferentes condições de cultivo. Essas pesquisas, certamente, irão contribuir para o desenvolvimento de dietas eficientes, que atendam às necessidades das espécies cultivadas e proporcionem o máximo desempenho de crescimento.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das variáveis de produção como regimes de troca de água, oferta alimentar, densidade de estocagem e estratégias nutricionais sobre o requerimento dietético de metionina de juvenis do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os aminoácidos são os componentes constituintes das proteínas, caracterizados pela presença de dois grupos funcionais: amina e carboxil, com fórmula geral de $H_2N-C-H-R-COOH$, onde R é uma cadeia lateral (BRODY, 1999). Esses compostos podem se ligar um ao outro através de ligações peptídicas covalentes, podendo ser ligados em várias sequências que podem formar uma vasta variedade de proteínas. As proteínas são moléculas orgânicas essenciais para todos os organismos vivos. Essas moléculas possuem inúmeras funções metabólicas e estruturais, podendo desempenhar o papel de enzimas que catalisam reações bioquímicas, ou mesmo de agentes transportadores que permitem a entrada e saída de moléculas através das células (BUXBAUM, 2007). As proteínas constituem todos os tipos de células corporais, perfazendo de 65 a 75% do total de matéria seca dos organismos.

Os aminoácidos tornam-se disponíveis ao organismo pela digestão das proteínas dietéticas (fontes exógenas) ou pela degradação das proteínas corporais (fontes endógenas) (KAUSHIK; SEILIEZ, 2010). As moléculas de proteínas são expostas a ação de enzimas secretadas no interior do trato gastrointestinal, sendo degradadas em moléculas menores, tais como aminoácidos livres, dipeptídeos e tripeptídeos (FRACALOSSO; CYRINO, 2013). A disponibilidade dessas moléculas ao organismo, após o processo de digestão das proteínas, possibilita a síntese de proteína corporal e de outras substâncias metabólicas (WILSON; HALVER, 1986).

Existem vinte aminoácidos principais que compõem as principais moléculas proteicas corporais (NAKAGAWA; SATO; GATLIN, 2007). Esses aminoácidos podem ser sintetizados por diversos microrganismos e plantas. No entanto, os animais só conseguem sintetizar dez dos vinte aminoácidos principais. Os aminoácidos são classificados em dois tipos, essenciais e não essenciais (NRC, 2011). Aqueles que são classificados como essenciais necessitam ser fornecidos pela dieta em quantidades adequadas, pois não podem ser sintetizados pelo organismo por meio de vias metabólicas (OLIVEIRA-NETO, 2014). Os aminoácidos não essenciais podem ser sintetizados a partir de precursores metabólicos, não sendo necessária sua aquisição por meios dietéticos (NRC, 2011). São considerados essenciais para camarões os seguintes aminoácidos: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (NRC, 2011). A ordem de limitância dos aminoácidos essenciais para camarões marinhos cultivados depende principalmente da composição de ingredientes das rações (OLIVEIRA-NETO, 2014). Em

dietas com baixa inclusão de farinha de peixe e com elevado nível de farelo de soja, o primeiro aminoácido limitante é a metionina (FURUYA *et al.*, 2001).

Somente o consumo regular de proteína é capaz de fornecer quantidades adequadas de aminoácidos essenciais para o crescimento (CUZON *et al.*, 2004). Dietas com níveis insuficientes de proteína ocasionam a diminuição ou estagnação da síntese de novos tecidos e de substâncias de importância vital para o metabolismo animal (FRACALOSSI; CYRINO, 2013). Quando os níveis de proteína estão acima das necessidades do animal, somente parte da proteína fornecida na dieta será utilizada na produção de novos tecidos, sendo o excesso convertido em reserva energética ou eliminado por meio dos processos de excreção (OLIVEIRA-NETO, 2014). O grupo amino derivado do aminoácido é eliminado na água na forma de amônia (NH_4^+). O acúmulo de compostos nitrogenados nos ambientes de cultivo pode afetar seriamente o metabolismo dos camarões, provocando dificuldades de excreção e redução ou paralisação da atividade alimentar (ROWLAND *et al.*, 1995; LIANG *et al.*, 2016). Sendo assim, a eliminação excessiva de amônia, ocasionada por níveis dietéticos excessivos de proteína bruta e aminoácidos, pode afetar negativamente o desempenho de crescimento dos camarões.

A deposição de proteína é um dos principais determinantes para a utilização de aminoácidos com objetivo de atender as exigências nutricionais dos organismos cultivados. A grande maioria das espécies de peixes e camarões alimentadas com dietas de alta qualidade apresentam taxa de deposição de aminoácidos em proteína corporal entre 25 e 55% do total de aminoácidos ingeridos (NRC, 2011). Quando o perfil de aminoácidos na ração não está devidamente balanceado conforme as exigências da espécie, o animal não consegue utilizar os outros aminoácidos para a síntese proteica (FRACALOSSI; CYRINO, 2013). Portanto, para que haja eficiência na utilização da proteína, faz-se necessário o balanceamento exato de aminoácidos, de forma a atender os requerimentos de todos os aminoácidos essenciais.

Requerimentos de aminoácidos essenciais de camarões

O requerimento de aminoácidos essenciais (AAE) tem sido objetivo de um grande número de estudos de nutrição de camarões cultivados, sendo tópico de investigação por mais de 20 anos. Um dos estudos iniciais foi conduzido por Chen e colaboradores e publicado no ano de 1992, o qual quantificou o requerimento dietético de arginina para a espécie *Penaeus monodon*, usando aminoácidos cristalinos microencapsulados (CHEN; LEU; ROELANTS, 1992).

Na década de 1990, a produção de camarões marinhos era representada pelo camarão tigre *P. monodon*. Por conta disso, a maioria das pesquisas objetivavam a determinação das exigências de aminoácidos dessa espécie. No período entre 1992 e 1999 foram publicados estudos que determinaram 8 dos 10 aminoácidos essenciais para *P. monodon* (CHEN; LEU; ROELANTS, 1992; MILLAMENA; BAUTISTA-TERUEL; KANAZAWA, 1996; MILLAMENA; BAUTISTA-TERUEL, 1996; MILLAMENA *et al.*, 1998, 1999).

Com o aumento da produção do camarão branco do Pacífico *L. vannamei* a partir de 2003, houve um aumento no número de estudos desenvolvidos para determinar as exigências de AAE para esta espécie. Até esse período, apenas 1 dos 10 aminoácidos essenciais para *L. vannamei* havia sido determinado (FOX; LAWRENCE; LI-CHANB, 1995). A partir de então, com o *L. vannamei* sendo a espécie mais cultivada mundialmente, houve a necessidade de aprimorar as rações balanceadas para que atendessem as necessidades da espécie, proporcionando máximo desempenho e eficiência alimentar. Atualmente, estão disponíveis na literatura científica informações das exigências de 8 dos 10 aminoácidos essenciais para *L. vannamei* (HUAI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2015).

As estimativas dos requerimentos dos AAE dos camarões peneídeos variam significativamente entre os estudos publicados. Essa variação ocorre por diversos fatores que podem ser atribuídos às diferenças entre as espécies, desenho experimental, número de tratamentos/repetições, ingredientes utilizados nas dietas experimentais, estágio do ciclo de vida, manejo alimentar, dentre outros.

As exigências de aminoácidos podem ser determinadas por diversas abordagens metodológicas, dentre elas: análise dose-resposta (base no crescimento), análise da concentração de aminoácidos livres no plasma ou nos tecidos corporais, relações de oxidação de aminoácidos e proteína ideal (NRC, 2011).

Dentre estas, a análise dose-resposta é a mais utilizada para a determinação dos requerimentos de aminoácidos dos camarões peneídeos (NRC, 2011). Esse método consiste na oferta de níveis graduais do nutriente-teste, a partir de uma dieta basal balanceada, deficiente apenas em relação ao nutriente em questão (FRACALOSSO; CYRINO, 2013), com alguns parâmetros de desempenho zootécnico (*e.g.* ganho de peso, peso final) usados como critério de resposta (NRC, 2011). O menor nível do aminoácido-teste presente na dieta experimental que proporciona o melhor resultado zootécnico é considerado o requerimento dietético mínimo.

Diversos tipos de ingredientes práticos, semi-purificados e purificados têm sido utilizados nas dietas experimentais dos ensaios de determinação das exigências de AAE de camarões marinhos (MILLAMENA *et al.*, 1997; ALAM *et al.*, 2004; FAÇANHA *et al.*, 2016). Normalmente, esses ingredientes são de elevada qualidade, com baixos níveis de fatores antinutricionais e elevado coeficiente de digestibilidade (NUNES *et al.*, 2014). A maioria das dietas experimentais têm como principais componentes proteicos a caseína, a gelatina e uma mistura de aminoácidos que são combinados para alcançar um perfil muito semelhante ao encontrado em uma proteína de referência, normalmente estabelecida a partir da análise de tecidos corporais (*e.g.* músculo caudal, corpo inteiro) (NRC, 2011).

A maioria dos estudos com espécies de interesse comercial foram realizados com a utilização de ingredientes purificados ou semi-purificados (MILLAMENA; BAUTISTA-TERUEL; KANAZAWA, 1996; MILLAMENA *et al.*, 1997, 1998, 1999; TESHIMA *et al.*, 2002; ALAM *et al.*, 2004; PALMA *et al.*, 2013). A utilização de ingredientes de elevada qualidade e biodisponibilidade reduzem os erros na determinação das exigências de AAE, possibilitando o estabelecimento de estimativas mais confiáveis e próximas ao requerimento exato do animal (CHO; BUREAU, 1997). No entanto, em um cenário prático, onde os ingredientes disponíveis no mercado apresentam quantidades significativas de fatores antinutricionais (*e.g.* baixo coeficiente de digestibilidade e desequilíbrio no perfil de aminoácidos), o requerimento de AAE pode variar, sendo necessária sua correção conforme cada condição específica. Por conta disso, a utilização de ingredientes práticos em estudos de determinação do requerimento de AAE para camarões vem se tornando uma prática comum.

Quase todos os estudos recentes de determinação do requerimento de AAE de *L. vannamei* utilizaram dietas experimentais compostas por ingredientes práticos que se aproximam daqueles utilizados comercialmente (HUAI *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2015; FAÇANHA *et al.*, 2016;). Isso revela que os estudos de determinação das exigências de AAE estão cada vez mais direcionados a obtenção de estimativas e resultados que se aproximem das condições práticas.

Exigência de aminoácidos sulfurados

Os aminoácidos sulfurados são aqueles que contêm enxofre em sua estrutura química (LEWIS, 2003). Dentre os 20 aminoácidos envolvidos na formação de proteína animal apenas metionina e cisteína podem ser classificados como sulfurados (NELSON; COX, 2009). A metionina é um aminoácido essencial para todas as espécies de camarões

cultivados (LIN *et al.*, 2015; MILLAMENA; BAUTISTA-TERUEL; KANAZAWA, 1996; TESHIMA *et al.*, 2002). A molécula desse AAE é caracterizada por ser apolar e hidrofóbica, podendo atuar no reconhecimento ou ligação de outras substâncias hidrofóbicas, tais como os lipídios (GUEDES *et al.*, 2011). A cisteína, por sua vez, pode ser sintetizada a partir da metionina ou de outros precursores metabólicos, sendo considerada como aminoácido não essencial (BROSNAN; BROSNAN, 2006). De forma geral, a cisteína é muito instável, sendo rapidamente oxidada em cistina, que se configura como um dímero formado por dois moles de cisteína (NRC, 2011; OLIVEIRA-NETO, 2014). Esse aminoácido não essencial é um importante componente estrutural e funcional de diversas enzimas e proteínas (NRC, 2011).

A metionina utilizada para a síntese proteica é obtida principalmente por meios dietéticos (NRC, 2011). A degradação das proteínas obtidas através da alimentação ou da utilização do *pool* de aminoácidos, formado pela quebra das proteínas endógenas, disponibiliza diversos aminoácidos (dentre eles a metionina) para o metabolismo (OLIVEIRA NETO, 2014). A metionina possui baixa taxa de excreção corporal, sendo reabsorvida e reutilizada pelo organismo dos camarões, com taxa de absorção variando entre 95 a 99% (STIPANUK, 2004; BROER, 2008). A absorção da metionina ocorre no intestino, onde os produtos da digestão proteica são metabolizados a partir da mucosa, sendo transferida através do sistema circulatório para as demais células corporais (WU, 2010). Dentro das células, a principal fonte energética para manutenção das altas taxas metabólicas é derivada do processo de oxidação dos aminoácidos (WU, 2013).

A utilização de metionina pelo organismo não se limita apenas a formação de novas proteínas corporais, mas também a formação de substâncias de grande importância metabólica como a glutatona peroxidase, um dos mais importantes sistemas antioxidativos corporais (OLIVEIRA-NETO, 2014). Além disso, a metionina participa de várias outras reações metabólicas incluindo a produção de S-adenosilmetionina (BAKER, 2006), L-cisteína, taurina, sulfato e outros fosfolipídios (BROSNAN; BROSNAN, 2006). A metionina também é um aminoácido glicogênico, podendo participar da formação de D-glicose e glicogênio (NRC, 2011).

Devido sua grande importância biológica, a metionina é exigida em significativas concentrações nas dietas de camarões (LI *et al.*, 2017). Assim como em outros aminoácidos essenciais, dietas com baixos níveis de metionina resultam em baixas taxas de crescimento e eficiência alimentar (NRC, 2011). A metionina é o mais tóxico dentre os principais aminoácidos. A utilização de dietas contendo níveis duas ou três vezes maiores que as exigências nutricionais, podem causar efeitos deletérios aos organismos aquáticos (BAKER,

2006; ESPE *et al.*, 2008; POPPI *et al.*, 2011). A toxicidade da metionina pode ser caracterizada pelo acúmulo de seus derivados nos tecidos hepáticos. Dietas contendo níveis excessivos de metionina afetam negativamente as taxas de crescimento de camarões peneídeos (LIN *et al.*, 2015; FAÇANHA *et al.*, 2016).

Devido a capacidade do organismo de converter a metionina em cisteína, estimativas precisas do requerimento deste AAE são mais difíceis de serem determinadas. Por conta disso, em alguns estudos, a exigência dietética é expressa como aminoácidos sulfurados totais ou metionina + cisteína (RICHARD *et al.*, 2011). As exigências de metionina das principais espécies de camarões peneídeos com importância comercial já foram determinadas. O camarão Kuruma, *Marsupenaeus japonicus*, possui exigência de metionina em 0,7% da dieta ou 1,4% da proteína bruta (TESHIMA *et al.*, 2002), enquanto que o camarão tigre, *Penaeus monodon*, apresenta exigência em torno de 0,89% da dieta ou 2,4% da proteína bruta (MILLAMENA; BAUTISTA-TERUEL; KANAZAWA, 1996).

Para o camarão branco do Pacífico, *L. vannamei*, alguns estudos têm mostrado que o requerimento dietético de metionina pode variar entre 1,9 e 2,9% da proteína bruta (FOX *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2015). Essa variação nos níveis de exigência de *L. vannamei* mostra que o requerimento de metionina para essa espécie ainda não está totalmente estabelecido. Alguns aspectos podem ser associados às diferenças nos trabalhos publicados, dentre eles: (1) desenho experimental, (2) número de tratamentos/repetições, (3) ingredientes utilizados nas dietas experimentais, (4) níveis dietéticos diferentes, (5) estágio do ciclo de vida e (6) manejo alimentar. Isso revela que fatores dietéticos e não dietéticos podem influenciar as exigências de aminoácidos sulfurados dos camarões. Assim, para que se possa alcançar estimativas mais precisas do requerimento de metionina para *L. vannamei* faz-se importante a realização de novos estudos que investiguem as interações entre esses fatores.

Fatores que influenciam a exigência de aminoácidos

Estudos realizados em diversas áreas da produção animal revelam que os requerimentos nutricionais podem ser afetados por: (1) fatores dietéticos (*e.g.*, presença ou ausência de outras substâncias, relação de proteína ideal, consumo energético etc); (2) estado de sanidade; (3) características fisiológicas (*e.g.*, idade, sexo, herança genética e hábito alimentar); (4) fatores ambientais (*e.g.*, temperatura, salinidade e pH) e (5) manejo (*e.g.*, densidade de estocagem, frequência alimentar e desafio sanitário) (DAVIS *et al.*, 2002; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2007; WU, 2010; NRC, 2011).

A exemplo dos peixes, o metabolismo dos camarões é diretamente afetado pela temperatura (BUREAU, 2003) e por outros fatores ambientais (PONCE-PALAFIX; MARTINEZ-PALACIOS; ROSS, 1997; BETT; VINATEA, 2009). Esses fatores atuam direta ou indiretamente sobre o metabolismo, modificando as vias metabólicas e, conseqüentemente, alterando a exigência de aminoácidos ou qualquer outro nutriente dos organismos cultivados (OLIVEIRA-NETO, 2014). Comparado ao número de pesquisas encontradas em outras áreas da produção animal (*e.g.* suinocultura e avicultura), existe um número limitado de estudos avaliando as interações dos fatores não dietéticos e as exigências nutricionais de camarões cultivados.

Estudos realizados com frangos de corte mostraram que animais mantidos em alto desafio sanitário apresentam maior exigência de treonina (CORZO *et al.*, 2007) e que animais mantidos sob estresse por calor apresentaram maior exigência de aminoácidos sulfurados em relação aqueles mantidos no conforto térmico (OLIVEIRA-NETO, 2003). O mesmo foi observado em suínos, onde a condição sanitária influenciou a exigência de aminoácidos (STAHLY, 1998). Estudos com peixes também mostraram que os requerimentos nutricionais de alguns nutrientes foram afetados pela temperatura da água e por outros fatores ambientais (*e.g.* salinidade) (LUPATSCH; KISSIL, 2005).

Estudos recentes indicam que fatores como estágio do ciclo de vida, densidade de estocagem, salinidade e regime de troca de água têm potencial para afetar as exigências de aminoácidos de camarões peneídeos (DAVIS *et al.*, 2002; DUY *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; FAÇANHA *et al.*, 2016). Exemplo pode ser visto no trabalho realizado por Façanha *et al.* (2016), que verificaram uma relação entre a exigência de metionina e a densidade de estocagem de *L. vannamei* cultivado em água verde.

Portanto, fatores dietéticos e não dietéticos devem ser levados em consideração durante a determinação das exigências de aminoácidos de camarões peneídeos.

Conceito de proteína ideal

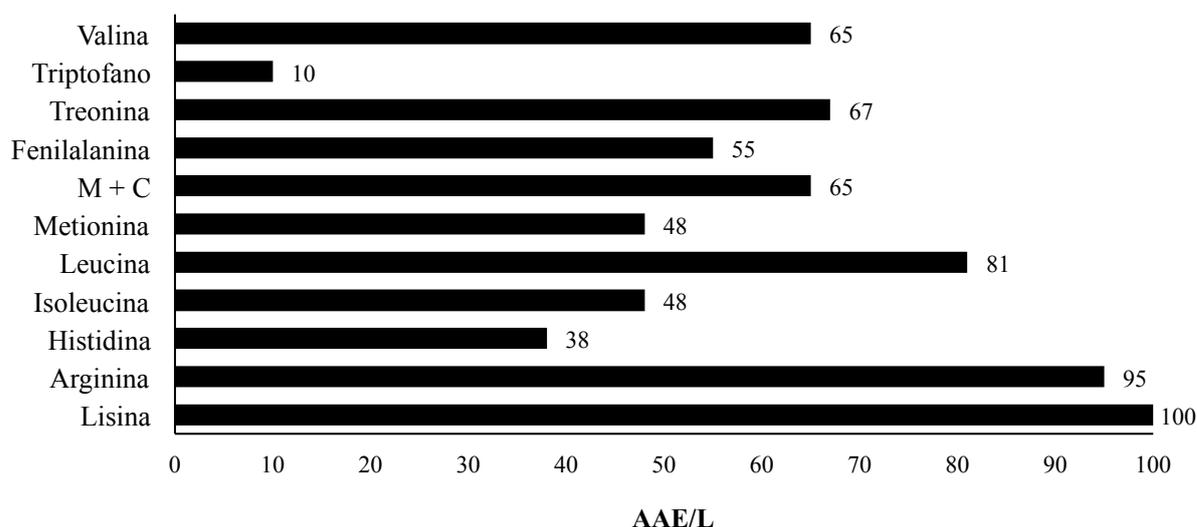
Um dos principais fatores dietéticos que pode influenciar a determinação das exigências de AAE de camarões peneídeos é a relação estabelecida pelo conceito de proteína ideal. Esse conceito é definido como o perfil de aminoácido que atende exatamente o requerimento do animal para que esse possa sintetizar novos tecidos e substâncias metabólicas (NRC, 2011).

O conceito de proteína ideal está baseado na lei do mínimo, que foi idealizada pelo químico alemão Justus Von Liebig, em que nela enfatiza a importância de todos os nutrientes essenciais. De acordo com o conceito de proteína ideal, basta que haja limitação de apenas um AAE para que o animal não consiga utilizar eficientemente os demais AAE, comprometendo a síntese de proteína e, portanto, o crescimento.

O conceito de proteína ideal considera um aminoácido de referência (AAR) com o qual é estabelecida uma relação ideal. A escolha do AAR está associada à sua ordem de limitância. Atualmente, o AAE considerado referência para camarões peneídeos é a lisina (MITCHELL, 1962; NRC, 2011). Portanto, a relação entre os aminoácidos no conceito de proteína ideal ocorre entre os nove outros AAE e lisina. Para o AAR é atribuído arbitrariamente o valor de 100.

Apesar de uma limitada quantidade de informações a respeito das exigências dos diferentes AAE, recentemente foi publicada uma relação de proteína ideal para camarões peneídeos (NRC, 2011). Essa relação foi estabelecida com base em 15 estudos conduzidos com aproximadamente 10 espécies de camarões peneídeos (Figura 1).

Figura 1 - Relação aminoácido essencial (AAE), em relação à lisina (L) para camarões peneídeos.



Fonte: NRC (2011)

A aplicação correta do conceito de proteína ideal resulta na diminuição de excretas nitrogenadas e maior eficiência na utilização proteica, possibilitando a obtenção de resultados satisfatórios com a utilização de dietas com baixo teor de proteína bruta (NRC,

2011). No entanto, esse conceito não é isento de falhas, uma vez que outros fatores (dietéticos e não dietéticos) podem afetar tanto a exigência de lisina quanto dos demais aminoácidos.

Dessa forma, há necessidade iminente de estudos que investiguem as interações entre as exigências nutricionais e os diversos fatores inerentes ao cultivo de organismos aquáticos, a fim de possibilitar a formulação de dietas mais eficientes.

HIPÓTESE CIENTÍFICA

As exigências de metionina do camarão branco do Pacífico, *L. vannamei*, respondem de acordo com as variáveis de produção, tais como as condições de cultivo, a densidade de estocagem, as relações entre os aminoácidos essenciais, o regime alimentar, os ingredientes alimentares e a composição dos nutrientes das rações.

OBJETIVOS

Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das variáveis de produção como regimes de troca de água, oferta alimentar, densidade de estocagem e estratégias nutricionais sobre o requerimento dietético de metionina de juvenis do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*.

Específicos

1. Avaliar o efeito do regime de troca de água, do conteúdo dietético de metionina e suas interações no desempenho de crescimento do *L. vannamei* cultivado em um sistema de água verde.
2. Avaliar os efeitos da densidade de estocagem, do regime de alimentação, do conteúdo dietético de metionina e suas interações sobre o desempenho zootécnico de *L. vannamei* cultivado em sistema de água verde.
3. Determinar o requerimento dietético de metionina de juvenis de camarão branco do Pacífico, *L. vannamei*.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. S. et al. 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.
- AMAYA, E.; DAVIS, D. A.; ROUSE, D. B. Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 262, n. 2–4, p. 419–425, 2007.
- AVNIMELECH, Y. et al. Sustainable Land-based Aquaculture: Rational Utilization of Water, Land and Feed Resources. **Mediterranean Aquaculture Journal**, v. 1, n. 1, p. 45–54, 2008.
- BAKER, D. H. Comparative Species Utilization and Toxicity of Sulfur Amino Acids. **The Journal of Nutrition**, p. 1670–1675, 2006.
- BAUER, W. et al. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 342–343, p. 112–116, 2012.
- BETT, C.; VINATEA, L. Combined effect of body weight, temperature and salinity on shrimp *Litopenaeus vannamei* oxygen consumption rate. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 57, n. 4, p. 305–314, 2009.
- BRODY, T. Classification of Biological Structures. **Nutritional Biochemistry**. Second ed. Berkeley: Academic Press, 1999. p. 1–56.
- BROER, S. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 1, p. 249–286, 2008.
- BROSNAN, J.; BROSNAN, M. The sulfur-containing amino acids: an overview. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 6, p. 16365–16405, 2006.
- BUREAU, D. P. Bioenergetics. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Eds.). **Fish Nutrition**. Third ed. San Diego: Academic Press, 2003. p. 1–59.
- BUXBAUM, E. **Fundamentals of Protein Structure and Function**. Portsmouth: Springer, 2007.
- CARDONA, E. et al. Relative contribution of natural productivity and compound feed to tissue growth in blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) reared in biofloc: Assessment by C and N stable isotope ratios and effect on key digestive enzymes. **Aquaculture**, v. 448, p. 288–297, 2015.
- CHEN, H. Y.; LEU, Y. T.; ROELANTS, I. Quantification of arginine requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon*, using microencapsulated arginine. **Marine Biology**, v. 114, n. 2, p. 229–233, 1992.
- CHI, S. Y. et al. Effects of supplementation of crystalline or coated methionine on growth performance and feed utilization of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 2, p. e1–e9, 2011.

- CHO, C. Y.; BUREAU, D. P. Reduction of waste output from salmonid aquaculture through feeds and feedings. **The Progressive Fish-Culturist banner**, v. 59, p. 155-160, 1997.
- CORZO, A. et al. Dietary threonine needs for growth and immunity of broilers raised under different litter conditions. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, n. 4, p. 574-582, 2007.
- CUZON, G. et al. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v. 235, n. 1-4, p. 513-551, 2004.
- DAVIS, D. A. et al. Considerations for *Litopenaeus vannamei* Reared in Inland Low Salinity Waters. Avances en Nutrición Acuicola VI. **Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola**, n. 3-6, 2002.
- DEUTSCH, L. et al. Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. **Global Environmental Change**, v. 17, n. 2, p. 238-249, 2007.
- DUY, H. N. et al. Effect of water exchange, salinity regime, stocking density and diets on growth and survival of domesticated black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) reared in sand-based recirculating systems. **Aquaculture**, v. 338-341, p. 253-259, 2012.
- ESPE, M. et al. Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 132-141, 2008.
- FAÇANHA, F. N. et al. 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. 16-21, 2016.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome: FAO, 2016.
- FOX, J. M.; LAWRENCE, A. L.; LI-CHANB, E. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. **Aquaculture**, v. 1, n. 94, p. 279-290, 1995.
- FOX, J. M. et al. Estimation of feed level of methionine by *Litopenaeus vannamei* (Boone) using covalently-attached and crystalline sources in low- protein semi-purified diets. **Avances en Nutrición Acuicola X**, p. 232-249, 2010
- FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. **Nutriaqua - Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013. 375 p.
- FURUYA, W. M.; et al. Exigências de metionina + cistina total e digestível para alevinos revertidos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), baseadas no conceito de proteína ideal. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 885-889, 2001.

- GATLIN, D. M. et al. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 6, 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.
- GONZÁLEZ-FÉLIX, M. L. et al. Replacement of fish oil in plant based diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 309, n. 1–4, p. 152–158, 2010.
- GUEDES, R. L. M. et al. Amino acids biosynthesis and nitrogen assimilation pathways: a great genomic deletion during eukaryotes evolution. **BMC genomics**, v. 12, n. 4, p. 2–13, 2011.
- HUAI, M. Y. et al. Quantitative dietary threonine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 8, p. 904–914, 2009.
- KAUSHIK, S. J.; SEILIEZ, I. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: Current knowledge and future needs. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 3, p. 322–332, 2010.
- LEWIS, A. J. Methionine-Cystine relationships in pig nutrition. In: D’MELLO, J. P. F. (Ed.). **Amino acids in animal nutrition**. 2. ed. Wallingford, UK: Cabi Publishing, 2003. p. 2003.
- LI, E. et al. Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. **Reviews in Aquaculture**, v. 9, p. 57-75, 2017.
- LIANG, Z. et al. Ammonia exposure induces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatopancreas of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 54, p. 523–528, 2016.
- LIN, H. et al. Dietary Methionine Requirements of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*, of Three Different Sizes. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 67, p. 1–10, 2015.
- LIU, F. J. et al. Quantitative dietary isoleucine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. **Aquaculture International**, v. 22, n. 4, p. 1481–1497, 2014.
- LIU, F. J. et al. Quantitative dietary leucine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 3, p. 332–340, 2014.
- LUPATSCH, I.; KISSIL, G. W. Feed formulations based on energy and protein demands in white grouper (*Epinephelus aeneus*). **Aquaculture**, v. 248, p. 83-95, 2005.
- MILLAMENA, O. M.; BAUTISTA-TERUEL, M. N. Valine requirement of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture Nutrition**, v. 2, p. 129–132, 1996.
- 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. et al. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 151, n. 1–4, p. 9–14, 1997.

MILLAMENA, O. M. et al. Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) for lysine and arginine. **Aquaculture**, v. 164, p. 95–104, 1998.

MILLAMENA, O. M. et al. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. **Aquaculture**, v. 179, p. 169–179, 1999.

MITCHELL, H. H. **Comparative nutrition of man and domestic animals**. Illinois: Academic Press, 1962. 724 p.

NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. **Dietary supplements for the health and quality of culture fish**. Cambridge: CABI North American Office, 2007.

NAYLOR, R. L. et al. Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 36, p. 15103–15110, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: principles of biochemistry*. 5th ed. New York: H. W. Freeman and Company, 2009.

NRC. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D.C.: The National Academic Press, 2011.

NUNES, A. J. P. et al. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. **Aquaculture**, v. 431, p. 20–27, 2014.

OLIVEIRA NETO, A. R. **Níveis de aminoácidos sulfurosos para frangos de corte, criados em diferentes ambientes térmicos**. 2003. 72f. Tese (doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

OLIVEIRA-NETO, A. R. et al. Níveis de metionina + cistina total para frangos de corte de 22 a 42 dias de idade mantidos em ambiente termoneutro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1359–1364, 2007.

OLIVEIRA-NETO A. R. Metabolismo e Exigência de Metionina. In: SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de Não Ruminantes**. São Paulo: Editora Funep, 2014. cap. 2, p. 187-214.

PALMA, J. et al. Quantitative dietary requirement of juvenile Atlantic ditch shrimp *Palaemonetes varians* for lysine, methionine and arginine. **Aquaculture Research**, p. 1–9, 2013.

PONCE-PALAFOX, J.; MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; ROSS, L. G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus*

vannamei, Boone, 1931. **Aquaculture**, v. 157, n. 1–2, p. 107–115, 1997.

POPPI, D. A. et al. Development of a test diet for assessing the bioavailability of arginine in feather meal fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 314, n. 1–4, p. 100–109, 2011.

RAY, A. J.; LOTZ, J. M. Comparing a chemoautotrophic-based biofloc system and three heterotrophic-based systems receiving different carbohydrate sources. **Aquacultural Engineering**, v. 63, p. 54–61, 2014.

RICHARD, L. et al. The effect of choline and cystine on the utilisation of methionine for protein accretion, remethylation and trans-sulfuration in juvenile shrimp *Penaeus monodon*. **The British journal of nutrition**, v. 106, p. 825–835, 2011.

ROWLAND, S. J. et al. Production of the Australian freshwater silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), at two densities in earthen ponds. **Aquaculture**, v. 130, n. 4, p. 317–328, 1995.

ROY, L. A. et al. Supplementation of potassium, magnesium and sodium chloride in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, n. 2, p. 104–113, 2007.

SHEARER, K. D. Experimental design, statistical analysis and modelling of dietary nutrient requirement studies for fish: a critical review. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, p. 91–102, 2000.

STAHLY, T. S. Impact of immune system activation on growth and optimal dietary regimes of pigs. **The Pig Journal**, v. 41, p. 65–74, 1998.

STIPANUK, M. H. Sulfur Amino Acid Metabolism: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine. **Review Literature And Arts Of The Americas**, v. 24, p. 72–81, 2004.

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. et al. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). **Aquaculture Research**, v. 33, n. 6, p. 395–402, 2002.

WILSON, R. P.; HALVER, J. E. Protein and Amino Acid Requirements of Fishes. **Annual Review of Nutrition**, 1986. p. 143–179.

WU, G. Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health. **Advances in Nutrition**, v. 1, n. 4, p. 31–37, 2010.

WU, G. **Amino acids - Biochemistry and Nutrition**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2013.

XIE, F. et al. Dietary lysine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 358–359, p. 116–121, 2012.

XIE, S.W. et al. Effect of proline supplementation on anti-oxidative capacity, immune response and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 448, p. 105–111, 2015.

XU, W. J.; PAN, L. Q. Dietary protein level and C/N ratio manipulation in zero-exchange culture of *Litopenaeus vannamei*: Evaluation of inorganic nitrogen control, biofloc composition and shrimp performance. **Aquaculture Research**, v. 45, p. 1842–1851, 2014.

YUE, Y. R. et al. Effects of replacing fish meal with soybean meal and peanut meal on growth, feed utilization and haemolymph indexes for juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 11, p. 1687–1696, 2012.

ZHOU, Q. C. et al. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 364–365, p. 252–258, 2012.

ZHOU, Q. C. et al. Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 392–395, p. 142–147, 2013.

CAPÍTULO I

Mínimas taxas de renovação de água reduz a dependência por níveis mais elevados de metionina dietética para juvenis do camarão branco do Pacífico (*L. vannamei*)

Felipe Nobre Façanha¹, Hassan Sabry-Neto¹, Claudia Figueiredo-Silva², Adhemar Rodrigues Oliveira-Neto³, Alberto Jorge Pinto Nunes^{1*}

¹LABOMAR – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Avenida da Abolição, 3207 – Meireles, Fortaleza, Ceará, Brasil

²Evonik Nutrition & Care GmbH. NC, Rodenbacher Chausse 4, 63404, Hanau, Germany

³Evonik Degussa Ltda. Alameda Campinas, 579 - 10º andar. São Paulo, São Paulo, Brasil

Artigo publicado no periódico *Aquaculture Research*, em 29/01/2018

<https://doi.org/10.1111/are.13624>

RESUMO

Esse estudo avaliou o efeito do regime de troca de água (fluxo contínuo (FC) e estático (ET)), do conteúdo dietético de metionina (Met) e suas interações sobre o desempenho de crescimento de juvenis de *Litopenaeus vannamei* cultivados em um sistema de água verde. Cinco dietas foram formuladas para conter níveis graduais de Met (4,8, 6,2, 7,2, 8,1 e 9,4 g kg⁻¹, matéria seca) através da suplementação de uma dieta basal de baixo nível de inclusão de farinha de peixe (5%), contendo níveis graduais (0, 1,1, 2,1, 3,1 e 4,1 g kg⁻¹, base úmida) de DL-metionil-DL-metionina, um dipeptídeo da Met. As dietas foram ofertadas quatro vezes ao dia, durante 70 dias, em cinco repetições, com camarões com peso corporal inicial de 1,98 ± 0,13 g. Os resultados indicaram que os níveis de metionina e o regime de troca de água influenciaram significativamente sobrevivência (%), produtividade (g m⁻²), consumo alimentar aparente (g de ração camarão⁻¹), FCA e peso final (g) ($P < 0,05$). Com base nas análises de regressão entre o peso final e os níveis dietéticos de metionina, o requerimento dietético de Met de juvenis de camarão branco do Pacífico dos regimes de troca de água FC e ET, foram 9,4 g kg⁻¹ (26,1 g kg⁻¹ da proteína dietética) e 8,0 g kg⁻¹ (22,2 g kg⁻¹ da proteína dietética), respectivamente. Os diferentes resultados de desempenho de crescimento nos regimes FC e ET indicam que variáveis exógenas têm impacto no requerimento dietético de metionina.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*. Metionina. Regimes de troca de água. Desempenho de crescimento.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of water exchange regimes, dietary methionine (Met) content and their interaction on the growth performance of juveniles of *Litopenaeus vannamei* reared under two water exchanged regimes, flow-through (FL) and static (ST) in a green-water system. Five diets were formulated to contain increasing levels of Met (4.8, 6.2, 7.2, 8.1 or 9.4 g kg⁻¹ on a dry matter basis, DM) by supplementing a basal diet low (5%) in fishmeal with graded levels (0, 1.1, 2.1, 3.1, and 4.1 g kg⁻¹ as fed basis) of DL-methionyl-DL-methionine, a dipeptide of Met. Each of the five diets were fed four times daily for 70 days to five replicate groups of 1.98 ± 0.13 g initial body weight shrimp. The results indicated that dietary methionine levels and water exchange regime significantly influenced survival (%), gained yield (g m⁻²), apparent feed intake (g of feed shrimp⁻¹), FCR and final weight (g) (P < 0.05). Based on regression analysis of the final weight against the dietary Met levels, the optimal dietary requirement for juvenile Pacific white shrimp in FL and ST regime, was estimated to be 9.4 g kg⁻¹ (corresponding to 26.1 g kg⁻¹ of dietary protein) and 8.1 g kg⁻¹ (corresponding to 22.2 g kg⁻¹ of dietary protein), respectively. The different shrimp performance outcomes in the FL and ST regime indicate that exogenous variables, other than the animal itself, has an impact on dietary methionine requirement.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*. Methionine. Water exchange regime. Growth performance.

1.1 INTRODUÇÃO

Nos tanques e viveiros de aquicultura, os camarões marinhos podem ser cultivados sob diferentes níveis de intensificação, os quais podem apresentar densidades de estocagem variando de 10 a mais de 120 camarões m⁻². Em ambientes de cultivo intensivo, um dos fatores ecológicos dominantes é a presença da produtividade natural (GAMBOA-DELGADO, 2014). As populações naturais estabelecidas nos tanques de aquicultura podem representar a base da cadeia alimentar nesses sistemas, contribuindo para a abundância e variedade de itens alimentares que podem ser utilizados pelos camarões (NUNES; GESTEIRA; GODDARD, 1997; GAMBOA-DELGADO; MOLINA-POVEDA; CAHU, 2003; BURFORD *et al.*, 2004).

O grupo dos itens alimentares utilizados pelos camarões são representados pelos organismos autotróficos (fitoplânctons, algas bentônicas e plantas vasculares), organismos heterotróficos (zooplânctons e zoobentos) e outros tipos de matéria orgânica em diferentes estágios de decomposição, incluindo os materiais constituídos por microrganismos floculados (MOORTHY; ALTAFF, 2002; CARDONA *et al.*, 2015).

Embora a contribuição relativa das fontes intrínsecas de alimentos nos viveiros de aquicultura ainda não seja completamente entendida, sabe-se que o alimento natural é um componente de grande importância para a performance dos camarões cultivados. Os camarões podem filtrar, ingerir e digerir diversos itens alimentares derivados da produtividade natural durante todos os estágios de crescimento (KENT; BROWDY; LEFFLER, 2011).

Em diversos sistemas de cultivo os itens alimentares disponíveis naturalmente podem ser considerados como uma fonte confiável de nutrientes essencial para os camarões (IZQUIERDO *et al.*, 2006; KHATOON *et al.*, 2016). Quando considerados, podem favorecer a utilização de dietas de menor custo, decorrente de uma formulação de menor densidade nutricional, com níveis abaixo das exigências determinadas para o animal (*e.g.* redução de 10% (dietas de 35% PB) ou mais dependendo do desempenho alimentar desejável, sistema de cultivo e dos objetivos de produção).

Informações acerca dos requerimentos de aminoácidos de camarões peneídeos são de grande importância, principalmente, para a indústria de nutrição de camarões cultivados. No entanto, existem apenas alguns estudos que associam e consideram que fatores exógenos (*e.g.* regime alimentar, densidade de estocagem, regimes de trocas de água) têm o potencial de afetar os requerimentos nutricionais de camarões peneídeos (XIE *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014).

O objetivo desse estudo foi verificar o efeito do regime de troca de água, do conteúdo dietético de metionina e suas interações no desempenho de crescimento do *L. vannamei* cultivado em um sistema de água verde.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Dietas experimentais

As dietas foram formuladas para variar o conteúdo de metionina dietética (4,8, 6,2, 7,2, 8,1 e 9,4 g kg⁻¹ da dieta, na base seca). Com o objetivo de variar a presença de alimento natural na água, cada tratamento dietético foi avaliado sob dois regimes de troca de água, sistema de fluxo contínuo (FC) e sistema estático (ET). Cinco tanques foram designados para cada tratamento, totalizando 50 unidades experimentais, distribuídas de forma inteiramente casual.

As dietas experimentais foram elaboradas com um mínimo de inclusão de farinha de peixe e outros ingredientes de origem marinha (TABELA 1). A inclusão dietética de farinha de subprodutos de salmão, farinha de *krill*, hidrolisado de sardinha, e óleo de salmão foram fixadas em 50,0, 5,0, 20,0 e 31,8 g kg⁻¹ da dieta (base natural), respectivamente. Farelo de soja foi o principal componente proteico, de origem vegetal, nas formulas, o qual foi incluído a níveis que variaram de 345,2 a 351,3% g kg⁻¹. Farinha de trigo variou ligeiramente de 366,4 a 367,5 g kg⁻¹. O óleo de soja foi utilizado entre 0,1 a 0,2 g kg⁻¹, para manter os níveis de extrato etéreo consistentes entre todas as dietas.

A suplementação de metionina seguiu níveis definidos previamente por um protocolo experimental. Uma dieta controle foi formulada para conter 4,8 g kg⁻¹ de metionina total, proveniente apenas de fontes intactas. A partir desta dieta, quatro dietas quase semelhantes foram formuladas para conter DL-metionil-DL-metionina (AQUAVI®Met-Met, Evonik Industries AG, Hanau, Alemanha) em 1,1, 2,1, 3,1 e 4,1 g kg⁻¹, da dieta (base natural, TABELA 1). As dietas foram fabricadas com equipamentos laboratoriais como descrito por Nunes, Sá e Sabry-Neto (2011).

Tabela 1 - Formulação e composição centesimal das dietas experimentais (g kg⁻¹, base natural).

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Dietas / Níveis de metionina (g kg ⁻¹)				
	4,8	6,2	7,2	8,1	9,4
Farelo de soja ¹	351,3	349,7	348,2	346,7	345,2
Farinha de trigo ²	366,4	366,8	367	367,3	367,5
Farinha de salmão ³	50	50	50	50	50
Concentrado proteico de soja ⁴	41,2	41,2	41,2	41,2	41,2
Farelo de trigo	45	45	45	45	45
Farinha de <i>krill</i> ⁵	5	5	5	5	5
Hidrolisado de sardinha ⁶	20	20	20	20	20
Óleo de salmão ³	31,8	31,8	31,8	31,8	31,8
Óleo de soja ¹	0	0	0,1	0,1	0,1
Lecitina de soja	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3
Fosfato monobicálcico	20	20	20	20	20
Premix vitamínico-mineral ⁷	10	10	10	10	10
L-Lisina, 50.7% ⁸	13,9	13,9	14	14,1	14,2
DL-Met-Met, 99.0% ⁹	0	1,1	2,1	3,1	4,1
L-Treonina, 98.5% ¹⁰	4,7	4,8	4,8	4,8	4,9
L-Arginina, 90.5% ¹¹	3,2	3,2	3,3	3,4	3,4
Aglutinante sintético ¹²	5	5	5	5	5
Colesterol, 91% ¹³	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Ácido ascórbico, 35% ¹⁴	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Composição centesimal					
Matéria seca	894,9	907,4	906,0	909,7	915,8
Proteína bruta	360,2	367,5	362,7	352,9	359,1

¹Bunge Alimentos S.A. (Luiz Eduardo Magalhães, Brasil). ²J. Macedo (Fortaleza, Brasil).

³Pesquera Pacific Star S.A. (Puerto Montt, Chile). ⁴Sementes Selecta S.A. (Goiânia, Brasil).

⁵Qrill™ meal (AkerBiomarine ASA, Oslo, Norway); ⁶AP50 295 (Aquativ, Descalvado, Brasil).

⁷Rovimix® Camarões Intensivo (DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, Brasil).

⁸AQUAVI® Lys (Evonik Industries AG, Hanau, Germany). ⁹AQUAVI® Met-Met,

DL-methionyl-DL-methionine (Evonik Industries AG, Hanau, Germany). ¹⁰ThreAMINO®

(Evonik Industries AG, Hanau, Germany). ¹¹Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). ¹²Nutri-

Bind Aqua Veg Dry, Nutri-Ad International NV (Dendermonde, Belgium). ¹³Cholesterol SF,

Dishman Netherlands B.V. (The Netherlands). ¹⁴Rovimix® Stay C® 35 (DSM Produtos

Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, Brasil).

1.2.2 Sistema de cultivo e pós larvas

As pós-larvas (PL) de *L. vannamei* foram obtidas de uma larvicultura comercial e aclimatadas em sistema de pré-berçários, composto por três tanques de 23 m³ (15,9 m² de área inferior, cada), onde foram cultivados a partir da fase de PL10 até o estágio juvenil. Durante esse período, os camarões foram alimentados com dieta comercial contendo 400 g kg⁻¹ de proteína bruta. Após essa fase, foram utilizados camarões de 1,98 ± 0,13 g (média ± desvio padrão; n = 3.600, CV = 6,8%), os quais foram estocados em densidade de 70 camarões m⁻² nas unidades experimentais.

O sistema de cultivo utilizado neste estudo foi composto de tanques independentes, mantidos ao ar livre, cada um equipado individualmente com uma entrada e saída de água e sistema de aeração. Os tanques apresentavam formato circular, produzidos em polipropileno com 1,14 m de diâmetro interno na parte inferior, 0,74 m de altura, área de fundo de 1,02 m² e volume nominal de 1m³. Os camarões foram alimentados quatro vezes ao dia, exclusivamente em bandejas de alimentação (14,3 x 3,5 cm; diâmetro x altura), posicionadas em cada tanque. A oferta das dietas ocorreu nos seguintes horários: 07:00h, 10:00h, 13:00h e 16:00h. As ofertas diárias foram divididas em partes iguais para cada refeição, sendo calculada a partir de uma tabela de alimentação. As taxas de alimentação variaram de 4 – 12% de acordo com o peso corporal dos camarões. Toda ração não consumida observada nas bandejas de alimentação foi coletada, secada e pesada para calcular o consumo alimentar aparente.

O sistema de cultivo utilizado nesse estudo foi descrito por Nunes, Sá e Sabry-Neto (2011). Inicialmente, não foi necessário realizar fertilização da água de cultivo para a obtenção das condições de água verde. As sobras de ração e as excretas dos camarões atuaram como fertilizadores naturais. Portanto, todas as fontes de alimento natural disponível na água de cultivo derivaram do crescimento natural ou das trocas de água. Ambos os tratamentos com diferentes taxas de troca de água seguiram um protocolo pré-estabelecido. No regime estático (ET) as trocas de água ocorreram uma vez a cada semana, a uma taxa de 10 a no máximo 20% do total do volume do tanque. No regime de fluxo contínuo (FC) as trocas de água ocorreram continuamente (24h por dia) a uma taxa de 100 mL segundo⁻¹. Os tanques de cultivo estavam equipados com sistema de aeração contínua ajustado para alcançar valores próximos ao nível de saturação de oxigênio dissolvido. Temperatura da água, salinidade e pH permaneceram relativamente estáveis durante todo o cultivo com valores médios de 30,1 ± 1,7 °C (n = 2.600), 32 ± 3,7 g L⁻¹ (n = 2.600) e 8,15 ± 0,22 (n = 2.600), respectivamente.

1.2.3 Análises químicas

A composição centesimal das dietas experimentais foi determinada pelo método padrão AOAC (1995). As concentrações dos aminoácidos das dietas experimentais foram analisadas seguindo os procedimentos descritos por Figueiredo-Silva *et al.* (2015) (TABELA 2).

Tabela 2 – Composição de aminoácidos das dietas experimentais (g kg⁻¹, matéria seca)

Aminoácidos	Dietas / Níveis de Metionina (g kg ⁻¹)				
	4,8	6,2	7,2	8,1	9,4
<i>Aminoácidos essenciais</i>					
Arginina	23,8	24,5	24,4	23,6	23,9
Histidina	7,4	7,6	7,6	7,3	7,3
Isoleucina	13,7	14,3	14	13,4	13,6
Leucina	23,6	24,5	24,1	23,1	23,4
Lisina	23,7	24,6	24,4	23,7	24,1
Metionina	4,8	6,2	7,2	8,1	9,4
Met + Cis*	9,6	10,9	11,9	12,8	14
Fenilalanina	15,9	16,3	16,1	15,5	15,7
Treonina	16,4	17,1	16,8	16,3	16,6
Triptofano	3,7	3,9	3,8	3,7	3,7
Valina	15	15,6	15,3	14,7	15
<i>Aminoácidos não essenciais</i>					
Alanina	14,6	15,1	14,9	14,4	14,5
Cistina	4,8	4,7	4,6	4,5	4,6
Glicina	16,2	16,8	16,6	16,2	16,4
Serina	15,4	16	15,7	15,1	15,3
Prolina	19,2	19,5	19,3	18,9	19,1
Aspartato	31,6	32,7	32,2	30,7	31,3
Glutamina	62,2	64,1	63,1	60,9	61,8

*AAST, aminoácidos sulfurados totais.

1.2.4 Desempenho de crescimento e análises estatísticas

A coleta de dados de peso corporal (g) dos camarões foi realizada no povoamento e na despesa para determinar parâmetros como peso inicial e final (g), sobrevivência (%), ganho de produtividade (g m⁻²) e consumo alimentar aparente (g de ração camarão estocado⁻¹). O fator de conversão alimentar (FCA) foi calculado com base no consumo alimentar aparente determinado na base seca, de acordo com Nunes *et al.* (2006).

Os níveis de inclusão de metionina e os regimes de troca de água foram avaliados como variáveis de classe com interação, através de uma análise de variância pelo teste ANOVA bi fatorial. Os dados de qualidade de água foram submetidos a análise de variância pelo teste ANOVA uni fatorial. O nível de significância foi fixado em $P < 0,05$, e foi utilizado o teste de Tukey HSD para comparar os valores médios entre os tratamentos individuais. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Ilinóis, EUA).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Desempenho de crescimento e utilização alimentar

Os resultados de crescimento e utilização alimentar dos juvenis de camarão branco do Pacífico cultivados com diferentes níveis de metionina dietética e regimes de troca de água estão dispostos na Tabela 3. Os níveis de metionina dietética e os regimes de troca de água influenciaram significativamente sobrevivência (%), ganho de produtividade (g m^{-2}), consumo alimentar aparente ($\text{g de ração camarão estocado}^{-1}$), FCA e peso final (g) ($P < 0,05$).

O regime FC promoveu maior sobrevivência ($95,4 \pm 1,1\%$, média \pm erro padrão) para *L. vannamei* quando comparado com o regime ET ($86,4 \pm 1,7\%$); no entanto, diferenças significativas foram observadas apenas em $7,2 \text{ g kg}^{-1}$ de metionina dietética, quando o regime FC foi comparado com o regime ET ($P < 0,05$).

O ganho de produtividade foi significativamente afetado pelo nível dietético de metionina e pelo regime de troca de água ($P < 0,05$). Embora tenha sido observado um aumento progressivo no ganho de produtividade com o aumento dos níveis de metionina dietética, diferenças significativas foram encontradas apenas em regime FC, quando o nível de metionina dietética alcançou $6,2 \text{ g kg}^{-1}$, não havendo diferenças significativas para os demais níveis de inclusão ($P < 0,05$). Diferenças significativas entre os regimes de troca de água foram observadas apenas em $7,2 \text{ g kg}^{-1}$ de metionina dietética, quando o regime FC apresentou valores superiores ao regime ET ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Desempenho de crescimento e utilização alimentar de *Litopenaeus vannamei* cultivados sob diferentes regimes de troca de água e níveis dietéticos de metionina.

Item	Regime de troca de água	Dietas experimentais (nível de metionina g kg ⁻¹ da dieta, base seca)					Média ± DP
		4,8	6,2	7,2	8,1	9,4	
Sobrevivência ¹	Fluxo contínuo	94,4 ± 2,6	93,1 ± 4,4	97,8 ± 1,1 A	96,7 ± 0,8	95,0 ± 2,0	95,4 ± 1,1
	Estático	85,6 ± 4,0	85,3 ± 3,9	84,7 ± 4,0 B	89,6 ± 4,6	87,5 ± 4,2	86,4 ± 1,7
Peso final ²	Fluxo contínuo	11,48 ± 0,93 aA	12,03 ± 1,42 bA	11,92 ± 0,36 bA	12,14 ± 0,30 bcA	12,42 ± 0,73 cA	12,0 ± 0,34
	Estático	11,98 ± 0,76 aB	12,58 ± 0,60 bB	12,81 ± 1,29 bA	12,82 ± 1,41 bB	12,65 ± 1,21 bA	12,6 ± 0,34
Cresc. semanal ³	Fluxo contínuo	1,06 ± 0,05	1,13 ± 0,07	1,11 ± 0,02	1,13 ± 0,01	1,16 ± 0,04	1,12 ± 0,02
	Estático	1,12 ± 0,04	1,18 ± 0,03	1,21 ± 0,06	1,20 ± 0,08	1,20 ± 0,06	1,18 ± 0,02
Ganho de prod. ⁴	Fluxo contínuo	626 ± 10 a	651 ± 15 b	684 ± 7 bA	688 ± 12 b	693 ± 6 b	668 ± 29
	Estático	583 ± 23	618 ± 24	626 ± 12 B	664 ± 11	642 ± 25	625 ± 10
CAA ⁵	Fluxo contínuo	16,4 ± 0,24 a	16,7 ± 0,06 abA	16,8 ± 0,19 ab	17,2 ± 0,11 b	16,8 ± 0,11 ab	16,8 ± 0,29
	Estático	16,8 ± 0,20	17,1 ± 0,11 B	17,1 ± 0,15	17,3 ± 0,15	16,9 ± 0,18	17,1 ± 0,07
FCA ⁶	Fluxo contínuo	1,85 ± 0,03 a	1,82 ± 0,05 ab	1,73 ± 0,01 abA	1,76 ± 0,03 ab	1,71 ± 0,01 b	1,77 ± 0,06
	Estático	2,05 ± 0,09	1,96 ± 0,07	1,94 ± 0,04 B	1,84 ± 0,03	1,87 ± 0,08	1,94 ± 0,03

Valores representam média ± D.P. de cinco repetições. Letras minúsculas e maiúsculas indicam diferenças estatísticas significativas entre tratamentos dietéticos e os regimes de troca de água, respectivamente ($P < 0,05$).

¹ Sobrevivência final (%) = (número final de camarões ÷ número inicial de camarões) × 100;

² Peso final (g) = \sum Pesos individuais dos camarões ÷ N;

³ Crescimento semana (g semana⁻¹) = [(peso corporal final – peso corporal inicial) ÷ dias de cultivo] × 7;

⁴ Ganho de produtividade (g m⁻²) = Biomassa adquirida (g) ÷ área do tanque (m²);

⁵ CAA: consumo alimentar aparente (g de ração por camarão) = (quantidade total de ração seca ingerida ÷ número inicial de camarões);

⁶ FCA: fator de conversão alimentar = consumo de ração aparente por tanque ÷ biomassa adquirida por tanques.

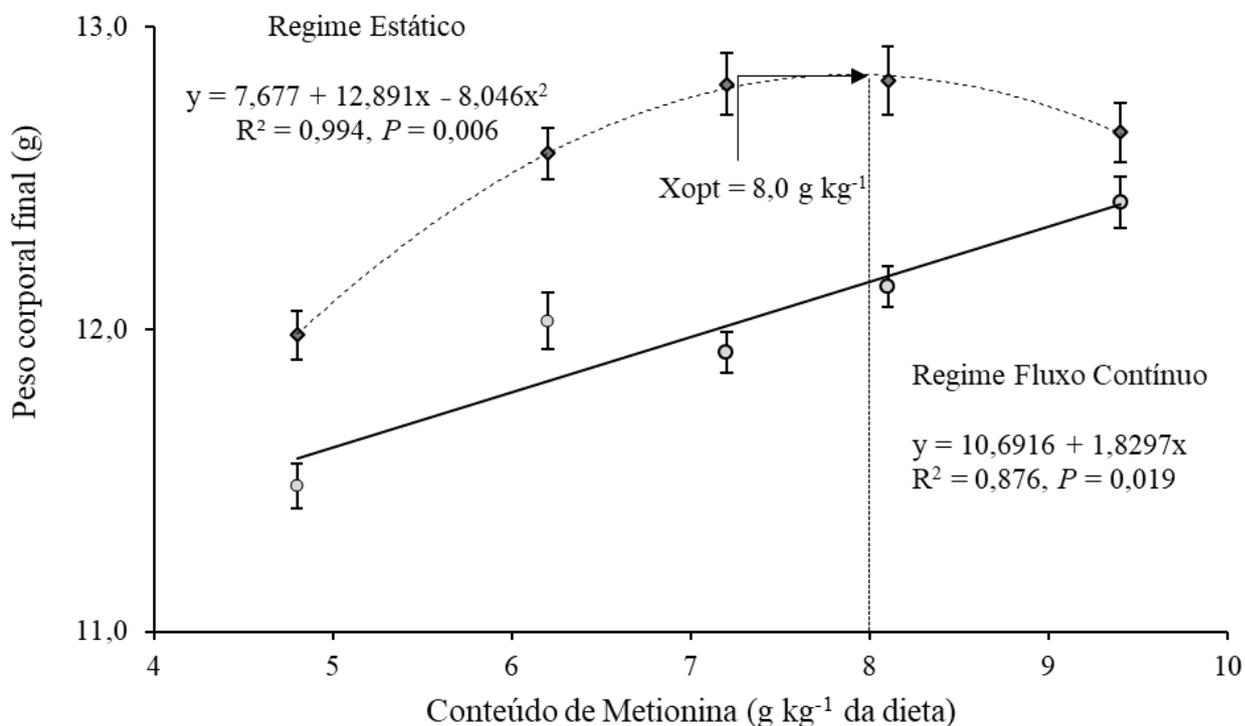
O consumo alimentar aparente aumentou significativamente com o aumento dos níveis de metionina dietética a partir de $4,8 \text{ g kg}^{-1}$ a $8,1 \text{ g kg}^{-1}$, em regime FC ($P < 0,05$), não havendo diferenças significativas para os demais níveis de inclusão. O regime FC promoveu um consumo alimentar aparente inferior ($16,8 \pm 0,12$, média \pm desvio padrão) quando comparado com o regime ET ($17,1 \pm 0,07$, média \pm desvio padrão); no entanto, diferenças significativas foram observadas apenas na dieta com $6,2 \text{ g kg}^{-1}$ de metionina dietética, quando o regime FC foi comparado ao regime ET ($P < 0,05$).

O FCA diminuiu significativamente com o aumento dos níveis de metionina dietética a partir de $4,8 \text{ g kg}^{-1}$ a $9,4 \text{ g kg}^{-1}$ em regime FC ($P < 0,05$). Em regime ET, a média de FCA de $1,94 \pm 0,03$ foi maior do que o maior valor de FCA em regime FC, alcançado por camarões alimentados com dieta contendo $4,8 \text{ g kg}^{-1}$ de metionina. No entanto, diferenças significativas foram observadas apenas em $7,2 \text{ g kg}^{-1}$ de metionina dietética, quando o regime FC foi comparado ao regime ET ($P < 0,05$).

O peso corporal final (g) dos camarões foi a única variável de desempenho que foi influenciada por ambas as variáveis experimentais (níveis de metionina e regimes de troca de água), através de um efeito combinado ($P < 0,05$). Em regime FC, com base no efeito dose resposta, foi possível observar um aumento do peso corporal final (g) a partir de $4,8 \text{ g kg}^{-1}$ até $6,2 \text{ g kg}^{-1}$ (base seca); permanecendo sem grandes variações em $7,2 \text{ g kg}^{-1}$ de metionina dietética (Met), e então aumentando novamente no nível de $8,1 \text{ g kg}^{-1}$ Met.

Os valores de peso corporal final (g) dos camarões cultivados sob regime FC responderam linearmente ao aumento dos níveis de suplementação de metionina, apresentando peso máximo no nível de $9,4 \text{ g kg}^{-1}$ da dieta (base seca). Uma análise de regressão linear foi usada para relacionar os valores de peso corporal final e os níveis de metionina dietética ($Y = 10,6916 + 1,8297*X$; $R^2 = 0,876$) (FIGURA 2) para camarões cultivados em regime FC. Comparativamente, sob regime ET, peso corporal final (g) dos camarões aumentaram de $4,8 \text{ g kg}^{-1}$ até $6,2 \text{ g kg}^{-1}$ de metionina dietética e então permaneceram consistentes ao longo dos demais níveis de inclusão. Uma análise de regressão quadrática ($Y = 7,677 + 12,891*X - 8,046*X^2$; $R^2 = 0,994$) foi usada para estimar o nível ótimo de metionina dietética para camarões cultivados em regime ET. Neste regime de troca de água, o nível ótimo de metionina dietética baseado no peso corporal final (g) foi determinado para ser $8,0 \text{ g kg}^{-1}$ da dieta (base seca) (FIGURA 2).

Figura 2 – Relação entre o peso corporal final (g) e os níveis de metionina dietética em regime estático e de fluxo contínuo baseado em uma análise de regressão quadrática e linear, respectivamente. X_{opt} representa o nível ótimo de metionina dietética para o máximo valor de peso corporal final de *Litopenaeus vannamei*.



Fonte: Elaborada pelos autores.

1.4 DISCUSSÃO

O desempenho de crescimento de *L. vannamei* foi significativamente afetado pelo regime de troca de água e pelo conteúdo dietético de metionina, possivelmente como resultado da disponibilidade do alimento natural. O melhor desempenho de crescimento e utilização alimentar em regime FC e ET foi observado em camarões alimentados com dieta contendo 9,4 g kg⁻¹ e 8,1 g kg⁻¹ de metionina dietética, respectivamente. Uma análise de regressão linear e quadrática entre o peso corporal final e os níveis dietéticos de metionina indicaram que o nível dietético para o máximo crescimento em regime FC e ET é de 9,4 g kg⁻¹ (26,1 g kg⁻¹ da proteína dietética) e 8,0 g kg⁻¹ (22,5 g kg⁻¹ da proteína dietética) da dieta (base seca), respectivamente.

Os valores encontrados em regime FC correspondem aqueles reportados em outros estudos com camarões, como 26,0 g kg⁻¹ da proteína dietética para camarão Kuruma (*Marsupenaeus japonicus*) (TESHIMA *et al.*, 2002) e 24,0 g kg⁻¹ da proteína dietética para

camarão tigre (*Penaeus monodon*) (MILLAMENA; BAUTISTA-TERUEL; KANAZAWA, 1996). Os resultados em regime ET correspondem a outros reportados sob condições limitadas de troca de água, como 19,8 a 22,9 g kg⁻¹ da proteína dietética para camarão branco do Pacífico (*L. vannamei*) (FAÇANHA *et al.*, 2016). A variabilidade observada entre os trabalhos realizados pode ser atribuída as diferenças entre as espécies, diferenças de tamanho, condições de cultivo e dietas experimentais (*e.g.* utilização de ingredientes purificados ou práticos).

Com base em estudos anteriores, o requerimento de metionina de *L. vannamei* tende a ser menor em condições de água verde quando comparado a condições de água clara. Isso pode ser explicado pela disponibilidade do alimento natural que pode atuar como uma fonte de nutrientes essenciais, incluindo metionina. Em experimento realizado por Façanha *et al.* (2016), o alimento natural em sistema de água verde contém 247 g kg⁻¹ de proteína bruta (PB), 77,8 a 96,0 g kg⁻¹ do conteúdo total de aminoácidos essenciais (Σ AAE), $2,7 \pm 0,2$ g kg⁻¹ de metionina e $6,2 \pm 0,3$ g kg⁻¹ de metionina + cisteína (base seca).

O regime ET tende a acumular uma maior biomassa fitoplanctônica nos tanques de cultivo e, conseqüentemente, uma maior quantidade de matéria orgânica acumulada no fundo dos tanques devido as limitadas trocas de água. De fato, isso pode ter corroborado para maiores valores de peso corporal final dos camarões cultivados sob regime ET ($12,57 \pm 0,34$ g) quando comparados aqueles cultivados em regime FC ($12,00 \pm 0,34$ g). Kaweekityota *et al.* (2007) analisaram o número de plâncton (células cm⁻³) sob dois regimes de troca de água: baixo (10% do volume do tanque uma vez por semana) e alto (10% do volume do tanque duas vezes por semana). Os autores reportaram que sob baixo regime de troca de água, o número de células planctônicas foram 44% superiores aos valores encontrados em alto regime de troca de água. Portanto, o regime de troca de água contribui para determinar os níveis de disponibilidade de alimento natural na água de cultivo. Sendo assim, no presente estudo, a menor exigência de Met assinala a contribuição do alimento natural para o máximo crescimento em regime ET (8.0 g kg⁻¹ Met e 12.6 g kg⁻¹ Met+Cis).

Tacon *et al.* (2002) encontraram que camarões cultivados na presença de alimento natural crescem 3,4 vezes mais rápido do que aqueles privados de alimento natural. Porchas-Cornejo *et al.* (2011) concluíram que a promoção do crescimento da biota natural em tanques de cultivo de camarões em regime semi-intensivo melhora os índices de produtividade. Esses resultados e observações sugerem que os camarões têm habilidade de filtrar, ingerir e digerir o alimento natural presente na água de cultivo, quando são cultivados em sistemas de água verde (KENT; BROWDY; LEFFLER, 2011; ROY *et al.*, 2012; ANAND *et al.*, 2014;

GAMBOA-DELGADO, 2014) reduzindo a dependência por metionina oriunda de fontes extrínsecas (e.g. ração).

No entanto, não está totalmente claro se o maior peso corporal final dos camarões em regime ET comparado ao regime FC, ocorreu devido uma maior disponibilidade de alimento natural na água ou devido uma menor densidade de camarões. Sob menores densidades de estocagem, os camarões tendem a crescer mais rapidamente e alcançar maiores valores de peso corporal (WYBAN *et al.*, 1987; ARANEDA; PÉREZ; GASCA-LEVYA, 2008; SOOKYING *et al.*, 2011). A possibilidade de uma maior biomassa final, como observado em regime FC, ter resultado em restrição alimentar e consequentemente ter limitado o crescimento, não pode ser eliminada, merecendo considerações futuras.

O regime FC promoveu uma maior sobrevivência (95,4%) quando comparado com o regime ET (86,4%). Essa diferença na sobrevivência pode ser considerada como um fator crucial por trás dos resultados de desempenho observados entre ambos os regimes de troca de água. Apesar do regime FC não representar uma condição de água clara, este operou sob taxas de renovação contínua, o que resultou em uma maior transparência de água, quando comparado com o regime ET. Esses resultados sugerem que o regime FC possivelmente promoveu um ambiente de cultivo menos desafiador para os camarões estocados. Resultados similares foram reportados por Roy *et al.* (2012), os quais observaram que camarões cultivados em sistema de fluxo contínuo apresentaram melhores valores de sobrevivência e FCA do que aqueles cultivados em sistema estático. Nunes, Sá e Sabry-Neto (2011) compararam o desempenho de crescimento de *L. vannamei* alimentado com dietas suplementadas com farinha de *Krill* contendo 9,6 g kg⁻¹ de metionina dietética, durante 10 semanas, em sistema de cultivo em água clara *versus* água verde. Os autores observaram que o sistema de cultivo em água clara e ambiente controlado (renovação contínua durante o período da noite), promoveu um ambiente de cultivo mais desafiador aos organismos cultivados. Os camarões apresentaram crescimento mais lento (1,00 ± 0,06 vs. 1,04 ± 0,09 g semana⁻¹) e menor sobrevivência (81,4 ± 7,3 vs. 91,4 ± 5,4%) quando comparados com aqueles cultivados em água verde.

No presente estudo, a suplementação de DL-metionil-DL-metionina (DL-Met-Met) em qualquer nível na dieta com 50 g kg⁻¹ de farinha de subprodutos de salmão e cerca de 348,0 g kg⁻¹ de farelo de soja, contendo 4,8 g kg⁻¹ de metionina total não melhorou o desempenho quando os camarões foram cultivados sob regime ET. No entanto, neste regime, houve um efeito positivo no aumento do peso corporal final quando DL-Met-Met foi suplementada a 1,1 g kg⁻¹ (base natural), o que resultou em uma dieta com 6,2 g kg⁻¹ de

metionina total (base seca). Em níveis adicionais, a suplementação de DL-Met-Met não se mostrou necessária em regime ET. Por outro lado, em regime FC, onde o alimento natural estava menos disponível, a suplementação de DL-Met-Met em $1,1 \text{ g kg}^{-1}$ foi efetiva em promover melhores valores de produtividade, consumo alimentar, peso corporal final e FCA. Uma melhoria adicional foi detectada no peso corporal final dos camarões quando DL-Met-Met foi suplementada a $3,1 \text{ g kg}^{-1}$, resultando em uma dieta com $8,1 \text{ g kg}^{-1}$ de metionina total. Esses resultados corroboraram com outros resultados que identificaram a capacidade de juvenis de *L. vannamei* em utilizar metionina na forma de dipeptídeos cristalinos (XIE *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2015).

1.5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo, obtidos sob condições de cultivo intensivo indicam uma interação entre o conteúdo dietético de metionina e os regimes de troca de água. A diminuição das taxas de renovação de água reduz a dependência por níveis mais elevados de metionina dietética para maximizar o crescimento do camarão branco do Pacífico (*L. vannamei*). Sendo assim, respeitando os parâmetros ideais de qualidade de água inerentes a cada espécie, uma redução das taxas de troca de água é desejável, pois leva a uma menor necessidade de metionina dietética. Por outro lado, frente à exigências de um maior regime de troca de água, ressalta-se a importância da suplementação dietética com metionina sintética na melhor relação custo/benefício.

REFERÊNCIAS

- ANAND, P. S. S. et al. Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 418-419, n. 108-115, 2014.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- ARANEDA, M.; PÉREZ, E. P.; GASCA-LEYVA, E. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: condition state based on length and weight. **Aquaculture**, v. 283, n. 13–18, 2008.
- BURFORD, M. A. et al. Contribution of the natural biota associated with substrates to the nutritional requirements of the post-larval shrimp, *Penaeus esculentus* (Haswell), in high-density rearing systems. **Aquaculture Research** v. 35, n. 508–515, 2004.
- CARDONA, E. et al. Relative contribution of natural productivity and compound feed to tissue growth in blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) reared in biofloc: Assessment by C and N stable isotope ratios and effect on key digestive enzymes. **Aquaculture**, v. 448, p. 288–297, 2015
- FAÇANHA, F. N. et al. 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, n. 16-21, 2016.
- FIGUEIREDO-SILVA, C. et al. 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*). **Aquaculture Nutrition**, v. 21, n. 234-241, 2015.
- GAMBOA-DELGADO, J.; MOLINA-POVEDA, C.; CAHU, C. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 1403–1411, 2003.
- GAMBOA-DELGADO, J. Nutritional role of natural productivity and formulated feed in semi-intensive shrimp farming as indicated by natural stable isotopes. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 36-47, 2014.
- IZQUIERDO, M. et al. Effect of green and clear water and lipid source on survival, growth and biochemical composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition** n. 12, v. 192-202, 2006.
- KAWEEKIETYOTA, T. et al. A comparison study on production and plankton between two water exchange rates of recirculating shrimp culture (*Penaeus monodon*) system using low salinity water. **Kasetsart University Fisheries Research Bulletin**, v. 31, n. 24–31, 2007.

KENT, M.; BROWDY, C. L.; LEFFLER, J. W. Consumption and digestion of suspended microbes by juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 319, n. 363–368, 2011.

KHATOON, H. et al. Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, n. 304-309, 2016.

LIN, H. Z. et al. Dietary methionine requirements of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* of three different sizes. **The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh**, n. 67, v. 1–10, 2015.

LIU, F. J. et al. Quantitative dietary isoleucine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. **Aquaculture International**, n. 22, v. 1481-1497, 2014.

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

MOORTHY, M. S.; ALTAF, K. Role of natural productivity in modified extensive shrimp pond growing *Penaeus monodon* (Penaeidae, Crustacea). **Indian Journal of Marine Sciences**, n. 31, v. 195–200, 2002.

NUNES, A. J. P.; GESTEIRA, T. C. V.; GODDARD, S. Food ingestion and assimilation by the southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. **Aquaculture**, n. 149, v. 121–136, 1997.

NUNES, A. J. P. et al. Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, n. 260, v. 244–254, 2006.

NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; SABRY-NETO, H. Growth performance of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed on practical diets with increasing levels of the Antarctic krill meal, *Euphausia superba*, reared in clear- versus green-water culture tanks. **Aquaculture Nutrition**, n. 17, v. 511-520, 2011.

PORCHAS-CORNEJO, M. A. et al. Effect of promoted natural feed on the production, nutritional, and immunological parameters of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) semi-intensively farmed. **Aquaculture Nutrition**, n. 17, v. 622-628, 2011.

ROY, A. L.; DAVIS, D. A.; WHITIS, G. N. Effect of feeding rate and pond primary productivity on growth of *Litopenaeus vannamei* reared in inland saline waters of west Alabama. **North American Journal of Aquaculture**, n. 74, v. 20-26, 2012.

SOOKYING, D. et al. Effects of stocking density on the performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured under pond and outdoor tank conditions using a high soybean meal diet. **Aquaculture**, n. 319, v. 232-239, 2011.

TACON, A. G. J. et al. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. **Aquaculture Nutrition**, n. 8, v. 121–137, 2002.

TESHIMA, S. et al. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). **Aquaculture Research**, n. 33, v. 297–304, 2002.

WYBAN, J. A. et al. Effect of stocking density on shrimp growth rates in manure-fertilized ponds. **Aquaculture**, n. 61, v. 23–32, 1987.

XIE, F. J. et al. Dietary lysine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, n. 358-359, v. 116-121, 2012.

ZHOU, Q. C. et al. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, n. 364-365, v. 252-258, 2012.

ZHOU, Q. C. et al. Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, n. 392-395, v. 142-147, 2013.

CAPÍTULO II

Efeitos da densidade de estocagem e do regime alimentar sobre os requerimentos dietéticos de metionina de juvenis de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema de água verde

Felipe Nobre Façanha¹, Hassan Sabry Neto¹, Claudia Figueiredo Silva², Adhemar Rodrigues Oliveira Neto³, Alberto Jorge Pinto Nunes¹

¹LABOMAR – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Avenida da Abolição, 3207 – Meireles, Fortaleza, Ceará, 60.165-081, Brasil.

²Evonik Nutrition & Care GmbH. NC, 10-B531, Postfach 1345, Rodenbacher Chausse 4, 63404, Hanau, Alemanha.

³Evonik Degussa Ltda. Alameda Campinas, 579 - 10º andar. São Paulo, São Paulo, 01.404-000, Brasil.

Artigo submetido ao periódico *Journal of the World Aquaculture Society*, em 17/05/2018.

RESUMO

Esse estudo avaliou o efeito da densidade de estocagem e do regime alimentar sobre os requerimentos dietéticos de metionina e suas interações sobre o desempenho zootécnico de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema de água verde. Cinco dietas foram formuladas para conter níveis crescentes de metionina (4,6, 5,6, 6,9, 7,9 e 9,2 g kg⁻¹ da dieta, na base seca) através da suplementação de uma dieta basal de baixo nível de inclusão de farinha de peixe (30 g kg⁻¹), contendo níveis graduais (0,1, 1,2, 2,2, 3,2 e 4,2 g kg⁻¹, base úmida) de DL-metionil-DL-metionina, um dipeptídeo da Met. As dietas foram ofertadas quatro vezes ao dia, durante 70 dias, em quatro repetições (exceto para o grupo que recebeu a dieta contendo 4,6 g kg⁻¹ de Met, $n = 5$), com camarões com peso corporal inicial de $1,82 \pm 0,14$ g. Os camarões foram povoados sob duas densidades de estocagem (75 e 120 animais m⁻²) e alimentados sob dois regimes de alimentação (regular e em excesso). Os resultados indicaram que o conteúdo dietético de metionina, o regime alimentar e a densidade de estocagem afetaram significativamente o desempenho de crescimento e a utilização alimentar de *L. vannamei* ($P < 0,05$). Os níveis de metionina e a densidade de estocagem influenciaram o peso final e o consumo alimentar aparente. O regime de alimentação e a densidade de estocagem afetaram sobrevivência, crescimento semanal, ganho de produtividade e consumo alimentar aparente. Apenas a densidade de estocagem influenciou o FCA.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*. Metionina. Densidade de estocagem. Regime de alimentação. Desempenho zootécnico.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of shrimp stocking density and feed allowance over dietary methionine requirement and their interaction on the growth performance of juveniles of *Litopenaeus vannamei* reared in a green-water system. Five diets were formulated to contain increasing levels of Met (4.6, 5.6, 6.9, 7.9 or 9.2 g kg⁻¹ on a dry matter basis, DM) by supplementing a basal diet low (30 g kg⁻¹) in fishmeal with graded levels (0.1, 1.2, 2.2, 3.2 e 4.2 g kg⁻¹ as fed basis) of DL-methionyl-DL-methionine, a dipeptide of Met. Each of the five diets was fed four times daily for 70 days to four replicate groups (except to 4.6 g kg⁻¹ Met group, $n = 5$) of 1.82 ± 0.14 g initial body weight shrimp. Shrimp were stocked under two initial stocking densities (75 and 120 animals m⁻²) and fed under two feeding regimes (regular and in excess). Findings indicate that dietary methionine levels, feed allowance and stocking density significantly affected growth and feed utilization of *L. vannamei* ($P < 0.05$). Dietary methionine levels and stocking density significantly influenced final weight and AFI. Feed allowance and stocking density affected survival, weekly growth, gained yield and AFI. Only stocking density influenced FCR.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*. Methionine. Shrimp stocking density. Feed allowance. Growth performance.

2.1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos publicados revelam que os requerimentos nutricionais dos organismos aquáticos cultivados podem ser afetados por fatores como alimentação, saúde, genética, meio ambiente e condições de manejo (DAVIS *et al.*, 2002; NRC, 2011; WU, 2013). Assim como em peixes, o metabolismo dos camarões é diretamente influenciado por fatores dietéticos e não dietéticos (PONCE-PALAFIX; MARTINEZ-PALACIOS; ROSS, 1997; BUREAU *et al.*, 2002; BETT; VINATEA, 2009). Esses fatores atuam direta e indiretamente no metabolismo, modificando as vias metabólicas e, conseqüentemente, alterando o requerimento de aminoácidos e outros nutrientes (OLIVEIRA-NETO, 2014). Estudos recentes indicam que estágio de crescimento, densidade de estocagem, salinidade e regimes de troca de água têm potencial para afetar os requerimentos de aminoácidos de camarões peneídeos (DAVIS *et al.*, 2002; DUY *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; FAÇANHA *et al.*, 2016). No entanto, comparado com outros animais (*e.g.* suínos e aves), existe um número limitado de estudos que avaliam as interações entre fatores não dietéticos e os requerimentos nutricionais dos camarões cultivados.

O cultivo de camarões marinhos é diversificado em todo mundo e pode ser realizado sob diferentes níveis de intensificação (MARTIN *et al.*, 1998; WAHAB; BERGHEIM; BRAATEN, 2003). A densidade de estocagem é o fator determinante para definir o nível de intensificação (FAO, 2016). Basicamente, esse fator define a forma que o sistema de cultivo precisa operar em termos de trocas de água, aeração mecânica, biossegurança, manejo e qualidade alimentar (CHEN; LEU; ROELANTS, 1992; FUNGE-SMITH; BRIGGS, 1998; THAKUR; LIN, 2003; MA *et al.*, 2013). A medida que os camarões são confinados e adensados, o nível de estresse aumenta; isso ocorre devido a deterioração das condições de qualidade de água, levando a uma depressão da imunidade e da resistência a doenças (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; DUY *et al.*, 2012).

Em condições intensivas, as fontes de alimento natural tendem a se esgotar rapidamente, exacerbando a competição alimentar. Como resultado disso, as dietas utilizadas para atender as exigências nutricionais dos camarões cultivados apresentam elevada densidade nutricional, sendo muitas vezes superdimensionadas.

Previamente, Façanha *et al.* (2016) identificaram uma interação entre o requerimento de metionina dietética e variáveis de produção, como densidade de estocagem e disponibilidade de alimento natural. Os autores observaram que em sistemas onde o alimento natural é escasso ou as densidades de estocagem são mais elevadas, um aumento no conteúdo

dietético de metionina parece ser necessário para sustentar o máximo crescimento de juvenis de *Litopenaeus vannamei*. Os mesmos autores também relataram que o aumento da densidade de estocagem pode reduzir o ganho de peso dos camarões, possivelmente por consequência de uma restrição alimentar. Assim, parece que as taxas alimentares também têm potencial para interagir com os requerimentos dietéticos de metionina de *L. vannamei*.

As taxas de alimentação são estimadas para proporcionar a saciedade aparente dos camarões a fim de evitar competição alimentar e promover máximo crescimento, possibilitando diversos ciclos de produção ao ano (NUNES; PARSONS, 2006; NRC, 2011). A taxa de alimentação é definida como a porcentagem de alimento ofertado por dia em função do peso corporal do camarão cultivado (MOHANTY, 2001). Os percentuais das taxas alimentares tendem a decrescer a medida que os camarões vão alcançando maiores valores de peso corporal, isso ocorre em resposta a redução da síntese proteica e consequente redução das taxas de crescimento (NRC, 2011). As taxas devem ser calculadas diariamente através de tabelas de alimentação combinadas com estimativas de crescimento, de sobrevivência e de conversão alimentar para calcular a oferta de ração diária (NUNES; PARSONS, 2000).

Em ambientes de cultivos extensivo ou semi-intensivo, onde as fontes de alimento natural são mais abundantes, uma restrição na oferta alimentar pode ser uma estratégia adotada para reduzir o fator de conversão alimentar e os custos com ração (NUNES; GESTEIRA; GODDARD, 1997; CHO; JO; KIM, 2001; CHO; LOVELL, 2002; VENERO; DAVIS; ROSE, 2007). Já em condições intensivas, onde o alimento natural é escasso, os camarões dependem predominantemente das fontes extrínsecas de alimento.

Quando uma ração é selecionada e ofertada a um sistema de produção, sabe-se que a utilização alimentar pelos organismos varia de acordo com a densidade nutricional da dieta utilizada (DAVIS; VENERO, 2005). De maneira geral, a oferta alimentar deve ser ajustada proporcionalmente. Quando as concentrações de nutrientes são maiores na dieta que será ofertada, deve haver uma redução na sua oferta. Portanto, devemos considerar a relação oferta alimentar e densidade nutricional como uma relação inversamente proporcional. Assim, podemos presumir que um aumento nas taxas de alimentação poderá reduzir as exigências dietéticas dos organismos cultivados.

Esse estudo foi conduzido para avaliar os efeitos da densidade de estocagem, do regime de alimentação, do conteúdo dietético de metionina e suas interações sobre o desempenho zootécnico de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema de água verde.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Local do estudo e desenho experimental

O estudo foi realizado no Centro de Estudos em Aquicultura Costeira (CEAC, Eusébio, Ceará), do Instituto de Ciências do Mar (Labomar), da Universidade Federal do Ceará nas instalações de cultivo em área aberta do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos.

Foram avaliados vinte tratamentos para os quais foram designadas três variáveis experimentais: níveis analisados de metionina (Met) nas dietas (4,6; 5,6; 6,9; 7,9 e 9,2 g kg⁻¹ da dieta, na base seca), densidades iniciais de estocagem de camarões (75 e 120 animais m⁻²) e regimes de alimentação (regular e 30% em excesso). As unidades experimentais foram designadas para cada tratamento de uma forma inteiramente casual. Quatro tanques de 1 m³ foram distribuídos para cada tratamento, exceto aqueles que receberam dieta contendo 4,6 g kg⁻¹ de Met, os quais operaram com cinco tanques, totalizando 84 unidades de cultivo.

2.2.2 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram elaboradas com um mínimo de inclusão de farinha de peixe e outros ingredientes de origem marinha (TABELA 1). A inclusão dietética de farinha de subprodutos de salmão, hidrolisado de sardinha, farinha de lula e óleo de salmão foram fixadas em 30,0, 20,0, 10,0 e 31,2 g kg⁻¹ da dieta (base natural), respectivamente. O farelo de soja foi o principal componente proteico, de origem vegetal, o qual foi incluído a níveis que variaram de 335,0 a 341,0% g kg⁻¹. Farinha de trigo variou ligeiramente de 438,3 a 439,2 g kg⁻¹. O óleo de soja foi utilizado entre 0,8 a 1,0 g kg⁻¹, para manter os níveis de extrato etéreo consistentes entre todas as dietas.

A suplementação de metionina seguiu níveis definidos previamente por um protocolo experimental. Uma dieta controle foi formulada para conter 4,6 g kg⁻¹ de metionina total. A partir desta dieta, quatro dietas quase semelhantes foram formuladas para conter DL-metionil-DL-metionina (AQUAVI® Met-Met, Evonik Industries AG, Hanau, Alemanha) em 1,2, 2,2, 3,2 e 4,2 g kg⁻¹, da dieta (base natural, TABELA 1). As dietas foram fabricadas com equipamentos laboratoriais como descrito por Nunes, Sá e Sabry-Neto (2011).

Tabela 1 - Formulação e composição centesimal das dietas experimentais (g kg⁻¹, base natural).

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Dietas / Níveis de metionina (g kg ⁻¹)				
	4,6	5,6	6,9	7,9	9,2
Farelo de soja ¹	341	339,5	338	336,5	335
Farinha de trigo ²	438,3	438,4	438,6	438,9	439,2
Farinha de salmão ³	30	30	30	30	30
Farelo de trigo	30	30	30	30	30
Hidrolisado de sardinha	20	20	20	20	20
Farinha de lula	10	10	10	10	10
Óleo de salmão ³	31,2	31,2	31,2	31,2	31,2
Óleo de soja ¹	0,8	0,9	0,9	0,9	1
Lecitina de soja	36,9	36,9	36,9	36,9	36,9
Fosfato monobásico	20	20	20	20	20
Premix vitamínico-mineral ⁴	10	10	10	10	10
L-Lisina, 50.7% ⁵	11,4	11,5	11,6	11,7	11,8
DL-Met-Met, 99.0% ⁶	0,1	1,2	2,2	3,2	4,2
L-Treonina, 98.5% ⁷	3,6	3,7	3,7	3,7	3,7
L-Arginina, 90.5% ⁸	2,1	2,1	2,2	2,3	2,3
Agglutinante sintético ⁹	5	5	5	5	5
Colesterol, 91% ¹⁰	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Ácido ascórbico, 35% ¹¹	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Composição centesimal					
Proteína bruta	319,1	314,6	317,3	318,4	318,6

¹Bunge Alimentos S.A. (Luiz Eduardo Magalhães, Brasil). ²J. Macedo (Fortaleza, Brasil).

³Pesquera Pacific Star S.A. (Puerto Montt, Chile). ⁶AP50 295 (Aquativ, Descalvado, Brasil).

⁴Rovimix[®] Camarões Intensivo (DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, Brasil).

⁵AQUAVI[®] Lys (Evonik Industries AG, Hanau, Germany). ⁶AQUAVI[®] Met-Met, DL-methionyl-DL-methionine (Evonik Industries AG, Hanau, Germany). ⁷ThreAMINO[®] (Evonik Industries AG, Hanau, Germany).

⁸Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). ⁹Nutri-Bind Aqua Veg Dry, Nutri-Ad International NV (Dendermonde, Belgium).

¹⁰Cholesterol SF, Dishman Netherlands B.V. (The Netherlands).

¹¹Rovimix[®] Stay C[®] 35 (DSM Produtos Nutricionais Brasil Ltda., São Paulo, Brasil).

2.2.3 Sistema de cultivo e pós larvas

As pós-larvas (PL) de *L. vannamei* foram obtidas de uma larvicultura comercial e aclimatadas em sistema de pré-berçários, composto por três tanques de 23 m³ (15,9 m² de área inferior, cada), onde foram cultivados a partir da fase de PL10 até o estágio juvenil. Durante esse período, os camarões foram alimentados com dieta comercial contendo 400 g kg⁻¹ de proteína bruta. Após essa fase, se utilizou camarões de 1,82 ± 0,14 g (média ± desvio padrão; n = 8.610, CV = 7,4%), os quais foram estocados em densidade de 75 ou 120 camarões m⁻² nas unidades experimentais.

O sistema de cultivo utilizado neste estudo foi composto de tanques independentes, mantidos ao ar livre, cada um equipado individualmente com uma entrada e saída de água e sistema de aeração. Os tanques apresentavam formato circular, produzidos em polipropileno com 1,14 m de diâmetro interno na parte inferior, 0,74 m de altura, área de fundo de 1,02 m² e volume nominal de 1m³. O sistema operou em regime de água verde, onde foram realizadas trocas periódicas de água, com médias de 10-14% do volume total por dia. Os camarões foram alimentados quatro vezes ao dia, exclusivamente em bandejas de alimentação (14,3 x 3,5 cm; diâmetro x altura), posicionadas em cada tanque.

Os camarões foram alimentados sob dois regimes de alimentação, regular e em excesso (TABELA 2). O regime de alimentação em excesso assumiu um aumento de 30% nos valores estimados para o regime de alimentação regular. Os regimes de alimentação foram baseados na fórmula $QM = 0,0931BW^{0,6200}$, onde QM é a quantidade máxima de ração que pode ser consumida diariamente por um indivíduo com base em seu peso corporal (NUNES; PARSONS, 2000).

Tabela 2 - Tabela de alimentação utilizada para ajustar as ofertas alimentares de juvenis de *Litopenaeus vannamei* submetidos a dois regimes de alimentação.

Peso corporal (g)		Regime alimentar (% peso corporal)		Ganho de peso diário (mg dia ⁻¹)
Inicial	Final	Regular	Excesso ¹	
1,50	3,00	7,42	9,65	100
3,00	4,00	6,30	8,19	110
4,00	5,00	5,74	7,46	120
5,00	6,00	5,04	6,55	130
6,00	7,00	4,76	6,19	140
7,00	8,00	4,34	5,64	150
8,00	9,00	4,06	5,28	160
9,00	10,00	3,92	5,10	170
10,00	11,00	3,78	4,91	180
11,00	12,00	3,50	4,55	190

¹30% de aumento nas taxas alimentares em relação ao regime de alimentação regular.

Nos primeiros 14 dias de cultivo, as refeições foram ajustadas com base em uma estimativa diária de ganho de peso de 100 mg por dia por camarão e uma queda semanal na sobrevivência de 0,5%. Quinzenalmente, as taxas de alimentação foram corrigidas com base em dados de peso corporal, obtidos através da coleta aleatória de 15 animais de cada unidade de cultivo. Esse intervalo de tempo entre as coletas foi estabelecido com base nas práticas adotadas no centro de pesquisa. No intervalo entre as coletas, as taxas de alimentação foram ajustadas de acordo com os valores calculados de ganho de peso diário dos camarões, para cada unidade experimental, ainda considerando uma queda semanal de 0,5% na sobrevivência. A oferta das dietas ocorreu nos seguintes horários: 07:00h, 10:00h, 13:00h e 16:00h. As ofertas diárias foram divididas em partes iguais para cada refeição. Toda ração não consumida observada nas bandejas de alimentação foi coletada, secada e pesada para calcular o consumo alimentar aparente. As bandejas também foram inspecionadas diariamente para verificar se haviam animais mortos. Neste caso, os camarões mortos foram contabilizados, recolhidos e subtraídos a partir da população inicial estocada, a fim de corrigir a próxima oferta alimentar.

Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados diariamente (pH, temperatura e salinidade), a partir das 13:00 h em todos os tanques. Quinzenalmente, foram realizadas análises dos compostos nitrogenados (nitrogênio amoniacal total, nitrito e nitrato), a partir de duas amostras obtidas de cada tratamento ($n = 40$). O oxigênio dissolvido foi mantido em concentrações de saturação durante todo o período de cultivo.

2.2.4 Desempenho de crescimento e análises estatísticas

A coleta de dados de peso corporal (g) dos camarões foi realizada no povoamento e na despesca para determinar parâmetros como peso inicial e final (g), sobrevivência (%), ganho de produtividade (g m^{-2}) e consumo alimentar aparente (g de ração camarão estocado¹). O fator de conversão alimentar (FCA) foi calculado com base no consumo alimentar aparente determinado na base seca, de acordo com Nunes *et al.* (2006).

As variáveis experimentais (níveis de inclusão de metionina, taxas de alimentação e densidades de estocagem) foram avaliadas como variáveis de classe com interação, através de uma análise de variância pelo teste ANOVA bi fatorial. Os dados de qualidade de água foram submetidos a análise de variância pelo teste ANOVA uni fatorial. O nível de significância foi fixado em $P < 0,05$, e foi utilizado o teste de Tukey HSD para comparar os valores médios entre os tratamentos individuais. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Ilinóis, EUA).

2.2.5 Análises químicas

A composição centesimal das dietas experimentais foi determinada pelo método padrão AOAC (1995). As concentrações dos aminoácidos das dietas experimentais foram analisadas seguindo os procedimentos descritos por Figueiredo-Silva *et al.* (2015) (TABELA 3).

Tabela 3 – Composição de aminoácidos das dietas experimentais (g kg⁻¹, matéria seca)

Aminoácidos	Dietas / Níveis de Metionina (g kg ⁻¹)				
	4,6	5,6	6,9	7,9	9,2
<i>Aminoácidos essenciais</i>					
Arginina	20,6	20,4	20,5	20,9	20,5
Histidina	6,7	6,6	6,7	6,7	6,6
Isoleucina	12,4	12,1	12,1	12,3	12
Leucina	21,3	21	21,1	21,2	20,8
Lisina	19,3	19,4	19,7	20	20,1
Metionina	4,6	5,6	6,9	7,9	9,2
Met + Cis*	8,9	10	11,2	12,1	13,5
Fenilalanina	14,5	14,4	14,5	14,5	14,2
Treonina	13,9	13,7	13,9	14	13,9
Triptofano	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
Valina	13,3	13,1	13	13,1	13
<i>Aminoácidos não essenciais</i>					
Alanina	12,2	12	12,1	12,1	11,9
Cistina	4,4	4,4	4,3	4,2	4,3
Glicina	13,7	13,6	13,6	13,7	13,4
Serina	14	13,7	13,9	13,9	13,7
Prolina	19,8	19,6	19,6	19,7	19,2
Aspartato	26,3	25,7	25,9	26,1	25,7
Glutamina	61,7	61,1	61	61,5	60,4

*AAST, aminoácidos sulfurados totais.

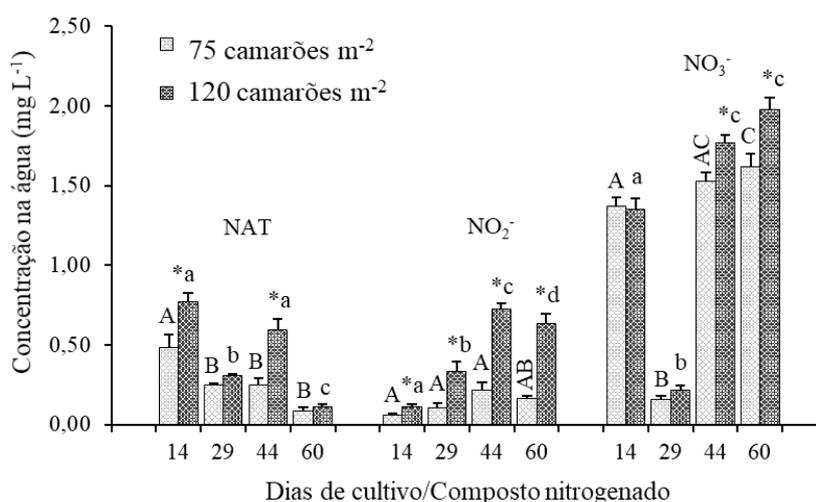
2.3 RESULTADOS

2.3.1 Qualidade de água

Ao longo do período de cultivo, a salinidade, o pH e a temperatura da água foram mantidos dentro de limites considerados normais para cultivo de camarões peneídeos. Durante os 70 dias de cultivo os valores de salinidade, pH e temperatura atingiram $36 \pm 0,9$ g L⁻¹ ($n = 4.452$), $8,23 \pm 0,19$ pH ($n = 4.452$) e $27,4 \pm 0,56$ °C ($n = 4.452$), respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos para estes parâmetros de qualidade de água ($P > 0,05$; ANOVA). Os valores médios obtidos através das análises dos compostos nitrogenados estão dispostos na Figura 1. As médias de nitrogênio amoniacal total (NAT) não excedeu 1,0 mg L⁻¹ e reduziu significativamente ao longo do período de cultivo em ambas densidades de estocagem. Uma tendência oposta foi observada para nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) que aumentaram ao longo do período de cultivo. Uma menor concentração de

NAT e NO_2^- foi detectada quando foram comparadas as densidades de estocagem de 75 e 120 camarões m^{-2} . As concentrações de NO_3^- aumentaram progressivamente até o fim do período de cultivo em ambas as densidades de estocagem.

Figura 1 - Concentração (mg L^{-1}) de nitrogênio amoniacal total (NAT), nitrito (NO_2^-), e nitrato (NO_3^-) na água de cultivo. Asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas significativas entre as densidades de estocagem dentro de cada dia de cultivo, de acordo com o teste t de Student ($P < 0,05$). Letras maiúsculas e minúsculas se referem às diferenças estatísticas significativas ao longo do período de cultivo para as densidades de estocagem 75 e 120 camarões m^{-2} , respectivamente, de acordo com o teste de Tukey HSD ($P < 0,05$).



Fonte: Elaborada pelos autores.

2.3.2 Desempenho de crescimento e utilização alimentar

Os camarões cresceram continuamente ao longo do período de cultivo, atingindo mais de 12,0 g de peso corporal no momento da despesca, representando um aumento médio no peso corporal de 642%.

A sobrevivência final dos camarões foi significativamente impactada pela densidade de estocagem ($P < 0,05$, teste t). Com poucas exceções, o aumento da densidade de estocagem de 75 a 120 camarões m^{-2} levou a uma queda na sobrevivência final, independentemente do regime de alimentação. Os maiores declínios foram observados quando os camarões foram alimentados com dietas contendo 6,9 e 7,9 g kg^{-1} de Met em regime de alimentação regular e com 5,6 g kg^{-1} de Met quando alimentados em excesso ($P < 0,05$, teste t). A sobrevivência final dos camarões variou de $81,8 \pm 14,1\%$ a $94,8 \pm 3,2\%$ (TABELA 4).

O crescimento semanal foi significativamente afetado pelos diferentes regimes de alimentação e densidades de estocagem ($P < 0,05$, TABELA 4). Menores valores de crescimento semanal foram observados quando as dietas foram ofertadas em regime de alimentação regular, independentemente das densidades de estocagem. Sob 75 camarões m^{-2} , as médias de crescimento semanal dos camarões submetidos ao regime de alimentação regular e em excesso foram de $0,75 \pm 0,08$ e $0,98 \pm 0,07$ g semana⁻¹, respectivamente. Sob 120 camarões m^{-2} , as médias de crescimento semanal dos camarões submetidos ao regime de alimentação regular e em excesso foram de $0,59 \pm 0,08$ g e $0,78 \pm 0,09$ g semana⁻¹, respectivamente. Assim como para os regimes de alimentação, o aumento da densidade de estocagem também influenciou negativamente no crescimento semanal dos camarões ($P < 0,05$, ANOVA). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes níveis de metionina dietética.

O ganho de produtividade foi significativamente deteriorado quando o regime de alimentação em excesso foi comparado ao regime de alimentação regular, em ambas as densidades de estocagem ($P < 0,05$, TABELA 4). Maiores taxas de alimentação não promoveram maior produtividade quando as densidades de estocagem foram aumentadas de 75 para 120 camarões m^{-2} . Em 75 camarões m^{-2} , sob regime de alimentação regular, o ganho de produtividade atingiu seu valor máximo no nível de $6,9$ g kg^{-1} de Met. Na mesma densidade de estocagem, porém sob regime de alimentação em excesso, o valor máximo de ganho de produtividade só foi alcançado no nível de $7,9$ g kg^{-1} de Met. Uma resposta similar foi alcançada sob 120 camarões m^{-2} . No entanto, o valor máximo no nível de $7,9$ g kg^{-1} de Met foi alcançado sob regime de alimentação regular e no nível de $6,9$ g kg^{-1} de Met sob regime de alimentação em excesso.

O consumo alimentar aparente foi significativamente afetado pelo regime de alimentação ($P < 0,05$, TABELA 4). Sob ambas as densidades de estocagem, maiores valores de consumo alimentar foram observados quando as dietas foram ofertadas em excesso (+30%). Por outro lado, um aumento na densidade de estocagem resultou em menores valores de consumo alimentar ($P < 0,05$). O conteúdo dietético de metionina não afetou significativamente o consumo alimentar quando os camarões foram alimentados sob regime de alimentação regular, independentemente da densidade de estocagem ($P > 0,05$). No entanto, diferenças estatísticas no consumo alimentar aparente foram detectadas quando os camarões foram alimentados em excesso. Sob 75 camarões m^{-2} , foi observado uma queda no consumo alimentar no nível de $5,6$ g kg^{-1} de Met. Comparativamente, sob 120 camarões m^{-2} , a

dieta contendo $4,6 \text{ g kg}^{-1}$ de Met apresentou menor consumo do que a dieta com $6,9 \text{ g kg}^{-1}$ de Met ($P < 0,05$).

O fator de conversão alimentar (FCA) foi significativamente impactado pela densidade de estocagem ($P < 0,05$, TABELA 4). O aumento da densidade de estocagem de 75 para 120 camarões m^{-2} deteriorou o FCA, independentemente, do regime alimentar ou do nível de metionina dietética adotado.

Ao longo do ciclo de cultivo, quando os camarões foram alimentados sob regime de alimentação regular, não puderam ser observadas diferenças estatísticas com relação aos valores de peso corporal entre os tratamentos dietéticos. No entanto, quando os camarões foram alimentados em excesso, diferenças no peso corporal final como resultado dos tratamentos dietéticos puderam ser observadas em ambas as densidades de estocagem. Enquanto sob 75 camarões m^{-2} , diferenças no peso corporal puderam ser observadas apenas em estágios mais avançados do ciclo de cultivo, sob 120 camarões m^{-2} , diferenças estatísticas puderam ser observadas a partir do trigésimo dia de cultivo. Em ambos os casos, camarões alimentados com dietas contendo $6,9$ e $7,9 \text{ g kg}^{-1}$ de Met apresentaram maiores valores de peso corporal ($P < 0,05$, FIGURA 2).

Tabela 4 – Desempenho de crescimento e utilização alimentar de *Litopenaeus vannamei* cultivados em diferentes densidades de estocagem, regimes de alimentação e níveis dietéticos de metionina.

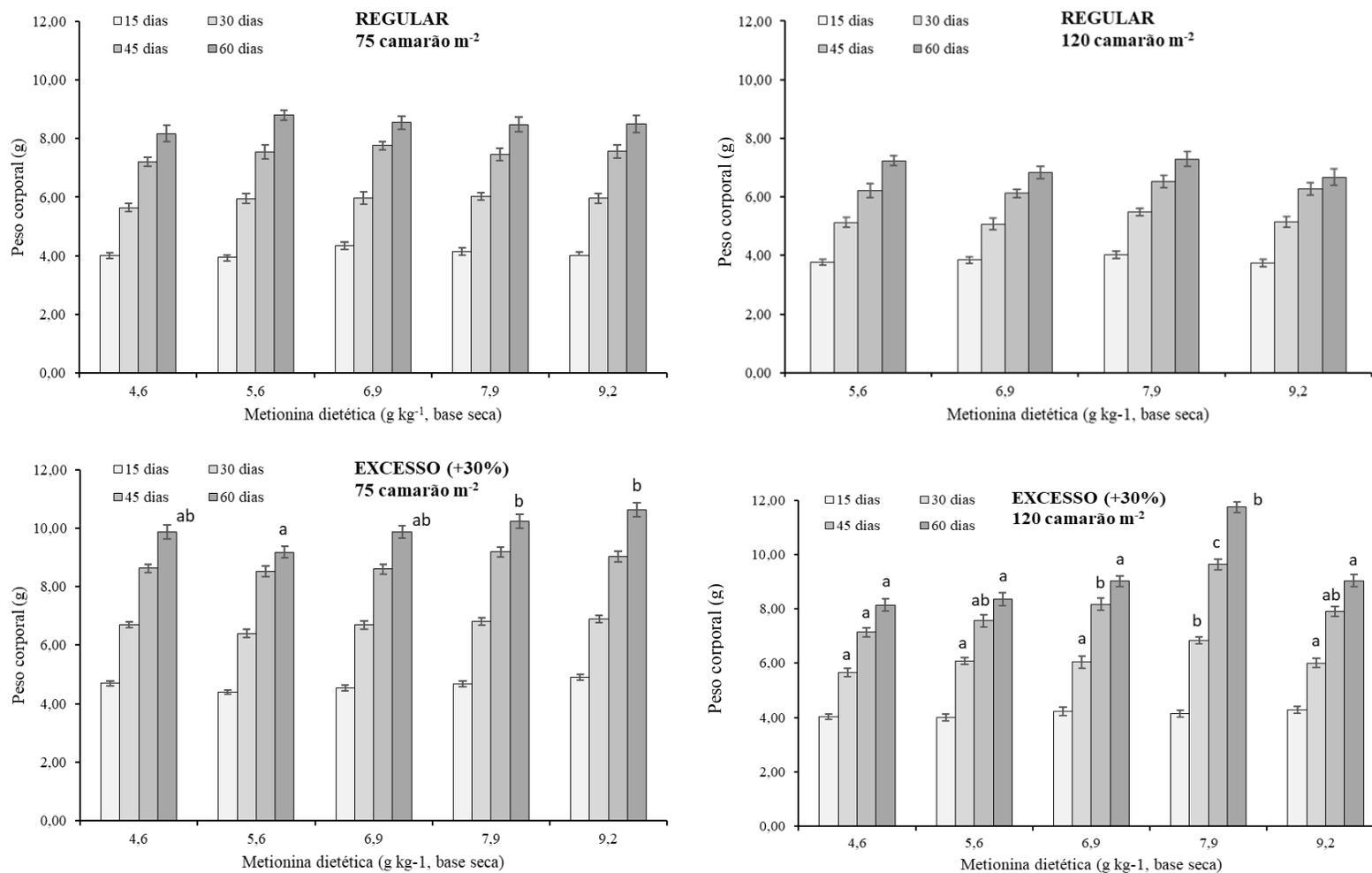
Item	Densidade de estocagem	Regime de alimentação	Conteúdo de metionina dietética (g kg ⁻¹ , base seca)				
			4,6	5,6	6,9	7,9	9,2
Sobrevivência (%)	75 camarões m ⁻²	Regular	94,8 ± 3,9	87,7 ± 2,7*	94,5 ± 3,9A	94,5 ± 3,7A	86,7 ± 10,6
		Excesso	89,1 ± 6,1	94,8 ± 3,2A*	92,5 ± 5,2	91,6 ± 3,4	89,0 ± 8,5
	120 camarões m ⁻²	Regular	87,7 ± 5,5	88,7 ± 6,5	86,9 ± 2,9B	85,4 ± 5,6B	89,3 ± 6,1
		Excesso	91,4 ± 3,7	84,2 ± 7,0B	81,8 ± 14,1	84,4 (n=1)	83,1 ± 7,6
Crescimento semanal (g semana ⁻¹)	75 camarões m ⁻²	Regular	0,70 ± 0,05A*	0,77 ± 0,05A*	0,76 ± 0,09A*	0,73 ± 0,06A*	0,79 ± 0,14A*
		Excesso	0,97 ± 0,08A*	0,90 ± 0,03A*	0,99 ± 0,09A*	1,02 ± 0,06*	1,01 ± 0,03A*
	120 camarões m ⁻²	Regular	0,54 ± 0,07B*	0,57 ± 0,06B*	0,60 ± 0,04B*	0,65 ± 0,12A*	0,58 ± 0,08B*
		Excesso	0,71 ± 0,04B*	0,77 ± 0,05B*	0,84 ± 0,15A*	0,76 (n = 1)	0,80 ± 0,01B*
Ganho de produtividade (g m ⁻²)	75 camarões m ⁻²	Regular	492 ± 34A*	496 ± 48A*	536 ± 65A*	511 ± 29A*	495 ± 68A*
		Excesso	636 ± 40A*	637 ± 17*	680 ± 44A*	690 ± 45*	663 ± 71*
	120 camarões m ⁻²	Regular	566 ± 112B*	608 ± 75B*	628 ± 70B*	662 ± 85B	619 ± 39B*
		Excesso	790 ± 58B*	782 ± 120*	798 ± 61B*	769 (n=1)	791 ± 86*
CAA ¹ (g de ração camarão ⁻¹)	75 camarões m ⁻²	Regular	13,2 ± 0,3A*	13,5 ± 0,2A*	13,9 ± 0,4A*	13,7 ± 0,3A*	13,6 ± 0,5A
		Excesso	18,4 ± 0,4aA*	18,1 ± 0,4bA*	18,9 ± 0,4aA*	18,9 ± 0,3a*	19,0 ± 0,2aA*
	120 camarões m ⁻²	Regular	12,4 ± 0,3B*	12,7 ± 0,3B*	13,0 ± 0,4B*	13,1 ± 0,4A*	12,8 ± 0,4A*
		Excesso	17,2 ± 0,3aA*	17,5 ± 0,5abA*	18,2 ± 0,5bA*	18,0 (n = 1)	17,7 ± 0,2abB*
FCA ²	75 camarões m ⁻²	Regular	2,03 ± 0,10A	2,06 ± 0,18A	1,97 ± 0,19A	2,02 ± 0,08A	2,09 ± 0,22A
		Excesso	2,19 ± 0,12A	2,15 ± 0,09A	2,11 ± 0,12A	2,08 ± 0,12A	2,19 ± 0,23A
	120 camarões m ⁻²	Regular	2,82 ± 0,45B	2,66 ± 0,30B	2,61 ± 0,20B	2,51 ± 0,25B	2,60 ± 0,12B
		Excesso	2,74 ± 0,17B	2,86 ± 0,42B	2,88 ± 0,30B	2,94 (n = 1)	2,84 ± 0,26B

Letras minúsculas e maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos dietéticos e as densidades de estocagem, respectivamente.

Asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas entre os regimes de alimentação em relação a mesma densidade de estocagem ($P < 0,05$)

¹ CAA: consumo alimentar aparente. ² FCA: fator de conversão alimentar.

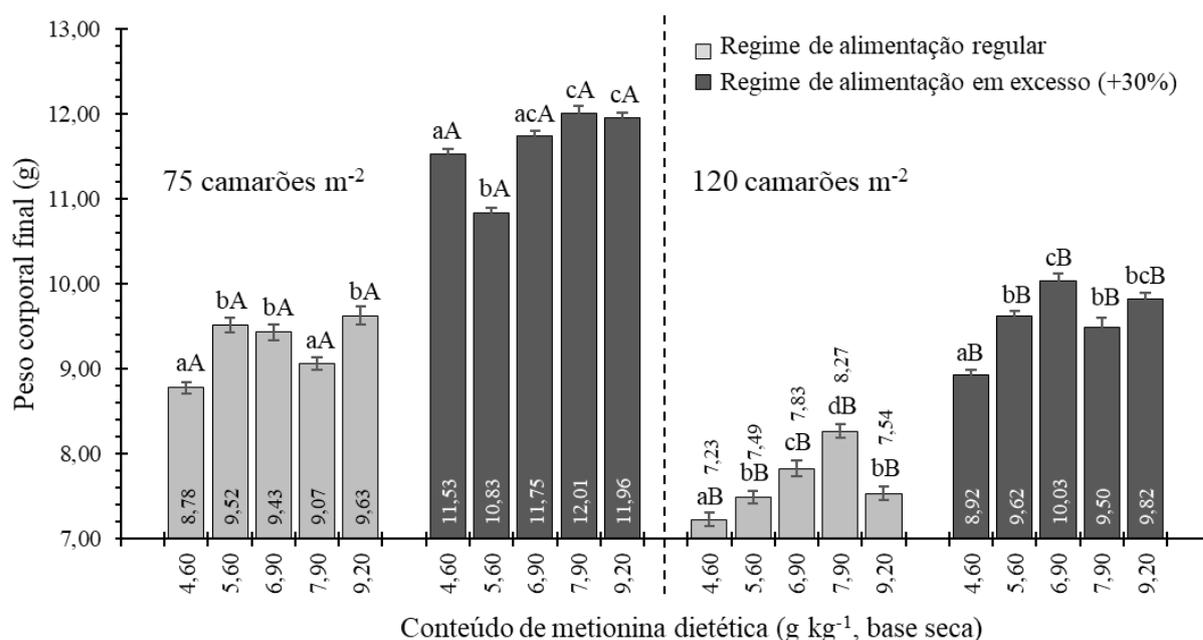
Figura 2 – Ganho de peso corporal (g) de juvenis de *Litopenaeus vannamei* submetidos a diferentes densidades de estocagem e regimes de alimentação. Valores representam média (\pm desvio padrão) referente a 15 camarões pesados individualmente. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os níveis de metionina em relação a mesma densidade de estocagem e regime de alimentação, de acordo com o teste Tukey HSD.



Fonte: Elaborada pelos autores.

Com base nos resultados de peso corporal final dos camarões, é possível observar uma interação entre o conteúdo dietético de metionina (Met), as densidades de estocagem e as taxas de alimentação ($P < 0,05$) (FIGURA 3). Quando os camarões foram cultivados sob 75 animais m^{-2} , e alimentados sob regime regular, o peso corporal final atingiu seu valor máximo no nível de 5,6 $g\ kg^{-1}$ de metionina dietética. Nessa mesma densidade de estocagem, animais alimentados em excesso apresentaram maiores valores de peso corporal final, atingindo seu máximo no nível de 6,9 $g\ kg^{-1}$ de Met. Em 120 camarões m^{-2} e sob regime de alimentação regular, o máximo valor de peso corporal final foi alcançado por camarões alimentados com dieta contendo 7,9 $g\ kg^{-1}$ de Met. Maiores valores de peso corporal final foram observados quando houve um aumento das taxas de alimentação em 30%, atingindo máximo valor no nível de 6,9 $g\ kg^{-1}$ de Met.

Figura 3 - Peso corporal final (g) de juvenis de *Litopenaeus vannamei* submetidos a diferentes densidades de estocagem, regimes de alimentação e níveis dietéticos de metionina. Valores representam média (\pm desvio padrão) referente a todos os camarões pesados individualmente no momento da despesca. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os níveis de metionina em relação a mesma densidade de estocagem e regime de alimentação, de acordo com o teste Tukey HSD. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre diferentes densidades de estocagem para cada nível de metionina dietética e regime de alimentação.



Fonte: Elaborada pelos autores.

2.4 DISCUSSÃO

A suplementação dietética de DL-metionil-DL-metionina (Met-Met), o regime de alimentação e a densidade de estocagem afetaram significativamente os parâmetros de desempenho de crescimento de juvenis de *L. vannamei*.

A sobrevivência final foi significativamente influenciada por ambas as variáveis experimentais: regime de alimentação e densidade de estocagem. Enquanto a sobrevivência foi reduzida em 120 camarões m⁻², camarões alimentados com dieta contendo 5,6 g kg⁻¹ de metionina dietética, sob o regime de alimentação em excesso, alcançaram melhor sobrevivência. Esses resultados discordam daqueles obtidos por Nunes *et al.* (2006), os quais observaram que a sobrevivência não foi afetada por diferentes regimes alimentares. No entanto, Nunes *et al.* (2006) conduziram esse trabalho sob diferentes condições experimentais, incluindo condição de água clara, regime alimentar (em excesso e 25, 50, 75% de restrição), densidade de estocagem (36 camarões m⁻²), taxa de troca de água (129,6% por dia), e composição nutricional das dietas utilizadas.

No presente estudo, dos 84 tanques, seis apresentaram sobrevivência abaixo de 60%, os quais foram excluídos das análises. Esses baixos valores de sobrevivência não parecem estar associados com o conteúdo dietético de metionina, uma vez que ocorreram em diferentes tratamentos dietéticos, independentemente do nível de suplementação. No entanto, todos os tanques excluídos das análises operavam a uma densidade de 120 camarões m⁻². Problemas similares foram enfrentados por Sookying *et al.* (2011), quando investigaram o efeito da densidade de estocagem no desempenho de crescimento de *L. vannamei* em viveiros de cultivo. Devido a elevada taxa de mortalidade os autores excluíram quatro tanques do conjunto de dados. De acordo com os autores, os baixos valores de sobrevivência estavam relacionados com problemas de qualidade de água, decorrentes de elevadas concentrações de NAT e grandes variações de pH. Ao contrário, neste estudo, os valores de NAT permaneceram abaixo dos valores considerados tóxicos para camarões peneídeos, assim como os valores de pH, que permaneceram sem grandes alterações durante todo o período de cultivo, variando de no mínimo 7,70 a no máximo 8,96 ($n = 4,452$).

Não houve efeitos estatísticos na sobrevivência final dos camarões como resultado do conteúdo dietético de metionina. O alimento natural disponível no sistema de cultivo pode ter atuado como uma fonte de nutrientes essenciais para os camarões cultivados (inclusive Met) (FAÇANHA *et al.*, 2016), o que explica esses resultados. Estudos anteriores com *L. vannamei* também não observaram uma interação entre os níveis de aminoácidos dietéticos e

a sobrevivência final (MILLAMENA; BAUTISTA-TERUEL; KANAZAWA, 1996; XIE *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; FAÇANHA *et al.*, 2016).

Como deve ser esperado para um sistema de cultivo em água verde, fontes adicionais de alimento natural disponíveis irão promover melhores resultados de eficiência alimentar (VENERO; DAVIS; ROSE, 2007). No presente estudo, a densidade de estocagem foi a única variável experimental que influenciou significativamente o FCA. O aumento das taxas alimentares e dos níveis de metionina dietética não impactou o FCA. No entanto, o aumento da densidade de estocagem de 75 para 120 camarões m⁻² deteriorou o FCA, independentemente do regime alimentar e do nível dietético de Met adotado. Resultados similares foram obtidos por Façanha *et al.* (2016) e Sookying *et al.* (2011), onde o aumento da densidade ocasionou um efeito negativo no FCA de camarões cultivados em água verde. De acordo com Façanha *et al.* (2016), o aumento da densidade de estocagem, normalmente, leva a uma menor sobrevivência, que por sua vez deteriora o FCA.

Os camarões peneídeos têm a habilidade de obter nutrientes adicionais a partir de fontes intrínsecas de nutrição (NUNES; GESTEIRA; GODDARD, 1997; KENT; BROWDY; LEFFLER, 2011; CARDONA *et al.*, 2015). Essa capacidade impõe uma pressão trófica no alimento natural presente no sistema de cultivo. Sob elevadas densidades de estocagem, a escassez de alimento natural pode levar a maior dependência de fontes extrínsecas de nutrição (MOORTH; ALTAFF, 2002).

No presente estudo, maiores quantidades de ração ofertadas levaram a um maior consumo alimentar aparente. Sob ambas as densidades de estocagem, maiores valores de consumo alimentar aparente foram observados quando as dietas foram ofertadas em excesso em comparação com aquelas ofertadas em regime regular ($P < 0,05$). Esses resultados são similares aqueles obtidos para *P. monodon* por Allan, Moriarty e Greg (1995). Esses autores reportaram que o consumo alimentar aparente foi significativamente maior quando altas taxas de alimentação foram adotadas. Por outro lado, no presente estudo, foi observado que o aumento da densidade de estocagem de 75 para 120 camarões m⁻² não resulta em maiores valores de consumo alimentar em tratamentos sob regime de alimentação regular. Pelo contrário, o aumento de densidade causou uma redução significativa no consumo alimentar para todos os tratamentos dietéticos ($P < 0,05$). Uma vez que todas as dietas foram ofertadas em uma única bandeja de alimentação por tanque, a redução do consumo alimentar aparente ocorreu como consequência do aumento na densidade de estocagem que acabou promovendo maior competição alimentar entre a população de camarões, limitando o acesso ao alimento. Esses resultados correspondem com as observações de Nunes e Parsons (1999), os quais

examinaram os níveis de alimentação de *Farfantepenaeus vannamei* em resposta ao método de distribuição do alimento (por voleio ou concentrado), sob cultivo semi-intensivo. Os autores relataram que o método concentrado, onde a oferta de ração ocorre em bandejas de alimentação com $0,2 \text{ m}^2$, resultou em menor acesso ao alimento e redução do consumo alimentar entre a população de camarões cultivados. Assim, no presente estudo, a redução significativa no consumo alimentar com o aumento da densidade de estocagem ocorreu, possivelmente, devido ao limitado número de camarões que poderiam ter acesso simultâneo ao alimento em cada bandeja de alimentação.

O regime de alimentação é um fator importante que influencia o consumo e a retenção dos nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento dos camarões (NRC, 2011). No presente estudo, o regime de alimentação impactou significativamente o crescimento semanal dos camarões. Em 75 e 120 camarões m^{-2} , quanto menores as taxas alimentares, menores valores de crescimento semanal foram observados. Esses resultados diferem daqueles reportados por Nunes *et al.* (2006), os quais não observaram diferenças significativas no crescimento dos camarões em relação as taxas alimentares. Assim como para o regime alimentar, o aumento da densidade de estocagem também causou efeitos negativos no crescimento semanal.

No presente estudo, densidade de estocagem, conteúdo dietético de metionina e regime alimentar impactaram significativamente o peso corporal final dos camarões. Quando os camarões foram cultivados sob 75 animais m^{-2} , em regime de alimentação regular, o peso corporal final atingiu seu máximo no nível de $6,9 \text{ g kg}^{-1}$ de Met. Quando submetidos a 120 animais m^{-2} , um valor dietético de $7,9 \text{ g kg}^{-1}$ foi necessário para alcançar o máximo valor de peso corporal, em regime de alimentação regular. Quando maiores quantidades de ração foram ofertadas (+30% excesso), o peso corporal dos camarões aumentou e valores máximos foram alcançados em um nível de metionina dietética inferior ($6,9 \text{ g kg}^{-1}$) aqueles encontrados para camarões cultivados sob regime de alimentação regular. Esses resultados corroboram com as observações de Davis e Venero (2005), onde afirmam que a oferta alimentar deve ser ajustada de acordo com a densidade nutricional da dieta.

2.5 CONCLUSÕES

O aumento da densidade de estocagem aumenta a dependência de metionina dietética para maximizar o crescimento dos camarões. Com o aumento da densidade de estocagem os camarões se tornam mais dependentes de fontes extrínsecas de alimento e

maiores quantidades de metionina na dieta são necessárias para promover o máximo crescimento. No entanto, os requerimentos dietéticos de metionina podem ser reduzidos a medida que as taxas alimentares são aumentadas. Portanto, para juvenis de *L. vannamei* cultivados em condições de água verde, existe interação entre o conteúdo dietético de metionina, a densidade de estocagem e o regime de alimentação.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, G. L.; MORIARTY, D. J. W.; GREG, G. B. Effects of pond preparation and feeding rate on production of *Penaeus monodon* Fabricius, water quality, bacteria and benthos in model farming ponds. **Aquaculture**, v. 130, p. 329–349, 1995.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- BETT, C.; VINATEA, L. Combined effect of body weight, temperature and salinity on shrimp *Litopenaeus vannamei* oxygen consumption rate. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 57, n. 4, p. 305–314, 2009.
- BUREAU, D. P. Bioenergetics. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Eds.). **Fish Nutrition**. Third ed. San Diego: Academic Press, 2003. p. 1–59.
- CARDONA, E. *et al.* Relative contribution of natural productivity and compound feed to tissue growth in blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) reared in biofloc: Assessment by C and N stable isotope ratios and effect on key digestive enzymes. **Aquaculture**, v. 448, p. 288–297, 2015
- CHEN, H. Y.; LEU, Y. T.; ROELANTS, I. Quantification of arginine requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon*, using microencapsulated arginine. **Marine Biology**, v. 114, n. 2, p. 229–233, 1992.
- CHO, S. H.; JO, J. Y.; KIM, D. S. Effects of variable feed allowance with constant energy and ratio of energy to protein in a diet for constant protein input on the growth of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture Research**, v. 32, p. 349–356, 2001.
- CHO, S. H.; LOVELL, R. T. Variable feed allowance with constant protein input for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) cultured in ponds. **Aquaculture**, v. 204, p. 101–112, 2002.
- DAVIS, D. A.; SAOUD, I. P.; MCGRAW, W. J.; ROUSE, D. B. Considerations for *Litopenaeus vannamei* Reared in Inland Low Salinity Waters. In: AVANCES EN NUTRICIÓN ACUÍCOLA VI. MEMORIAS DEL VI SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA 3-6. 2002.
- DAVIS, D. A.; VENERO, J. A. Rethinking Feeding for Cultured Shrimp. **Global Aquaculture Advocate**, p. 40-42, 2005.
- DUY, H. N.; COMAN, G. J.; WILLE, M.; *et al.* Effect of water exchange, salinity regime, stocking density and diets on growth and survival of domesticated black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) reared in sand-based recirculating systems. **Aquaculture**, v. 338–341, p. 253–259, 2012.
- FAÇANHA, F. N. *et al.* 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. 16-21, 2016.

- FIGUEIREDO-SILVA, C. et al. 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*). **Aquaculture Nutrition**, v. 21, p. 234–241, 2015.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**: Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 2016. 200 p.
- FUNGE-SMITH, S. J.; BRIGGS, M. R. P. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: Implications for sustainability. **Aquaculture**, v. 164, p. 117–133, 1998.
- KENT, M.; BROWDY, C. L.; LEFFLER, J. W. Consumption and digestion of suspended microbes by juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 319, p. 363–368, 2011.
- LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, v. 191, p. 121–131, 2000.
- LIU, F. J.; LIU, Y. J.; TIAN, L. X.; LI, X. F.; ZHANG, Z. H.; YANG, H. J.; DU, Z. Y. Quantitative dietary isoleucine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. **Aquaculture International**, v. 22, p. 1481–1497, 2014.
- MA, Z. et al. A modified water quality index for intensive shrimp ponds of *Litopenaeus vannamei*. **Ecological Indicators**, v. 24, p. 287–293, 2013.
- MARTIN, J. L. M. et al. Shrimp rearing: Stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds. **Aquaculture**, v. 164, p. 135–149, 1998.
- MILLAMENA, O. M.; BAUTISTA-TERUEL, M. N.; KANAZAWA, A. Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture**, n. 143, p. 403–410, 1996.
- MOHANTY, R. K. Feeding management and waste production in semi-intensive farming of. **Aquaculture International**, v. 9, p. 345–355, 2001.
- MOORTHY, M. S.; ALTAFF, K. Role of natural productivity in modified extensive shrimp pond growing *Penaeus monodon* (Penaeidae, Crustacea). **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 31, p. 195–200, 2002.
- NRC. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D.C.: The National Academic Press, 2011.
- NUNES, A. J. P.; GESTEIRA, T. C. V.; GODDARD, S. Food ingestion and assimilation by the southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. **Aquaculture**, v. 149, p. 121–136, 1997.

NUNES, A. J. P.; PARSONS, G. J. Feeding levels of the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* in response to food dispersal. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 30, p. 331–348, 1999.

NUNES, A. J. P.; PARSONS, G. J. Size-related feeding and gastric evacuation measures for the Southern brown shrimp *Farfantepenaeus subtilis*. **Aquaculture**, v. 187, p. 133–151, 2000.

NUNES, A. J. P.; PARSONS, G. J. A computer-based statistical model of the food and feeding patterns of the Southern brown shrimp *Farfantepenaeus subtilis* under culture conditions. **Aquaculture**, v. 252, n. 2-4, p. 534-544, 2006.

NUNES, A. J. P. et al. Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 260, p. 244–254, 2006.

NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; SABRY-NETO, H. Growth performance of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed on practical diets with increasing levels of the Antarctic krill meal, *Euphausia superba*, reared in clear- versus green-water culture tanks. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p. 511-520, 2011.

OLIVEIRA-NETO A. R. Metabolismo e Exigência de Metionina. In: SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de Não Ruminantes**. São Paulo: Editora Funep, 2014. cap. 2, p. 187-214.

PONCE-PALAFIX, J.; MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; ROSS, L. G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture**, v. 157, n. 1–2, p. 107–115, 1997.

SOOKYING, D. et al. Effects of stocking density on the performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured under pond and outdoor tank conditions using a high soybean meal diet. **Aquaculture**, v. 319, p. 232-239, 2011.

THAKUR, D. P.; LIN, C. K. Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. **Aquaculture Engineering**, v. 27, p. 159–176, 2003.

VENERO, J. A.; DAVIS, D. A.; ROUSE, D. B. Variable feed allowance with constant protein input for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared under semi-intensive conditions in tanks and ponds. **Aquaculture**, v. 269, p. 490–503, 2007.

WAHAB, M. A.; BERGHEIM, A.; BRAATEN, B. Water quality and partial mass budget in extensive shrimp ponds in Bangladesh. **Aquaculture**, v. 218, p. 413–423, 2003.

WU, G. **Amino acids - Biochemistry and Nutrition**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2013.

XIE, F. J. et al. Dietary lysine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, n. 358-359, p. 116-121, 2012.

ZHOU, Q. C. et al. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, n. 364-365, p. 252-258, 2012.

CAPÍTULO III

**Requerimento dietético de metionina de juvenis de camarão branco do Pacífico,
*Litopenaeus vannamei***

Felipe Nobre Façanha¹, Karthik Masagounder², Adhemar Rodrigues Oliveira Neto³, Alberto
Jorge Pinto Nunes¹

¹LABOMAR – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Avenida da
Abolição, 3207 – Meireles, Fortaleza, Ceará, 60.165-081, Brasil.

²Evonik Nutrition & Care GmbH. NC, 10-B531, Postfach 1345, Rodenbacher Chausse 4,
63404, Hanau, Alemanha.

³Evonik Degussa Ltda. Alameda Campinas, 579 - 10º andar. São Paulo, São Paulo, 01.404-
000, Brasil.

RESUMO

Um experimento alimentar de 8 semanas foi conduzido para avaliar o requerimento dietético de metionina de juvenis de camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Seis dietas práticas isoproteicas e isolipídicas (378 g kg^{-1} de proteína bruta) foram formuladas para conter níveis graduais de metionina dietética variando entre 5,1 a $13,7 \text{ g kg}^{-1}$ (base seca), com aproximadamente $1,7 \text{ g kg}^{-1}$ de incremento. Cada dieta foi distribuída aleatoriamente em grupos com sete repetições, cada uma com 15 juvenis de camarões ($75 \text{ animais m}^{-2}$, $0,80 \pm 0,05 \text{ g}$), 6 vezes diariamente. Dois modelos matemáticos (regressão linear segmentada e regressão quadrática) foram usados para determinar o requerimento de metionina e Met + Cisteína de *L. vannamei*. Os níveis dietéticos de metionina afetam o desempenho de crescimento e a utilização alimentar de *L. vannamei*. Com base nas análises de regressão linear segmentada e regressão quadrática, o valor ótimo de metionina dietética para o máximo crescimento de *L. vannamei* foi estimado para ser 9,4 e $10,5 \text{ g kg}^{-1}$ da dieta (correspondendo a 2,48 a 2,77% da proteína dietética), respectivamente.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*. Metionina. Desempenho zootécnico. Requerimento dietético.

ABSTRACT

An 8-week feeding trial was conducted to evaluate the dietary methionine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Six isonitrogenous and isolipidic practical diets (378 g kg⁻¹ crude protein) were formulated to contain graded dietary methionine levels ranging from 5.1 to 13.7 g kg⁻¹ (dry weight) in approximately 1.7 g kg⁻¹ increments. Each diet was randomly assigned to seven replicates of 15 juvenile shrimp (75 animals m⁻², 0.80 ± 0.05 g) 6 times daily. Two mathematic models (broken-line and quadratic regression) were used to determine the quantitative methionine and Met+Cys requirements of *L. vannamei*. Results from the present study indicate that increased levels of dietary methionine improved the growth performance and feed utilization of juvenile *L. vannamei*. Based on broken-line and quadratic regression analysis of the final shrimp body weight against graded dietary methionine levels, the optimal dietary requirement for juvenile Pacific white shrimp was estimated to be 9.4 g kg⁻¹ and 10.5 g kg⁻¹ (corresponding to 2.48% and 2.77% of the dietary protein), respectively.

Keyword: *Litopenaeus vannamei*. Methionine. Growth performance. Dietary requirement.

3.1 INTRODUÇÃO

A metionina é um aminoácido essencial para todas as espécies de camarões cultivados (MILLAMENA; BAUTISTA-TERUEL; KANAZAWA, 1996; TESHIMA *et al.* 2002; LIN *et al.* 2015). A utilização de metionina pelo organismo não se limita apenas à formação de novas proteínas corporais, mas também à formação de substâncias de grande importância metabólica como a glutatona peroxidase, um dos mais importantes sistemas antioxidativos corporais (OLIVEIRA-NETO, 2014). Além disso, esse aminoácido participa de várias outras reações metabólicas incluindo a produção de S-adenosilmetionina (BAKER, 2006), L-cisteína, taurina, sulfato e outros fosfolipídios (BROSNAN; BROSNAN 2006). A metionina também é um aminoácido glicogênico, podendo participar da formação de D-glicose e glicogênio (NRC, 2011). Dietas com baixos níveis de metionina resultam em baixas taxas de crescimento e eficiência alimentar (NRC, 2011).

A metionina é o mais tóxico dentre os principais aminoácidos. O uso em níveis duas ou três vezes maiores que as exigências nutricionais, pode causar efeitos deletérios aos organismos aquáticos (BAKER, 2006; ESPE *et al.*, 2008; POPPI *et al.*, 2011). A toxicidade da metionina pode ser caracterizada pelo acúmulo de seus derivados nos tecidos hepáticos. Além disso, dietas contendo níveis excessivos de metionina afetam negativamente as taxas de crescimento de camarões peneídeos (LIN *et al.*, 2015; FAÇANHA *et al.*, 2016).

Por ser tão essencial e ao mesmo tempo apresentar potencial de toxicidade, a determinação precisa do requerimento dietético de metionina é necessária e de alta prioridade para os conhecimentos de nutrição de *L. vannamei*.

Alguns estudos têm mostrado que o requerimento dietético de metionina de *L. vannamei* pode variar entre 1,9 e 2,9% da proteína bruta (FOX *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2015). Essa ampla variação nos níveis mostra que a exigência de metionina para essa espécie ainda não está totalmente estabelecida e que os resultados já reportados precisam ser comparados e confirmados.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi determinar o requerimento dietético de metionina de juvenis de *L. vannamei*, e avaliar o efeito dos níveis de metionina dietética no desempenho de crescimento e utilização alimentar.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Local do estudo e desenho experimental

O estudo foi realizado no Centro de Estudos em Aquicultura Costeira (CEAC, Eusébio, Ceará), do Instituto de Ciências do Mar (Labomar), da Universidade Federal do Ceará nas instalações de cultivo em área fechada do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos.

Foram avaliados seis tratamentos para os quais foram designadas uma variável experimental: níveis analisados de metionina (Met) nas dietas (5,1; 6,8; 8,2; 9,9; 12,0 e 13,7 g kg⁻¹ da dieta, na base seca). As unidades experimentais foram designadas para cada tratamento de uma forma inteiramente casual.

Juvenis de camarão branco do Pacífico foram estocados em 42 tanques de água clara, sob uma densidade de 75 animais m⁻² (15 animais tanque⁻¹), os quais foram alimentados em bandejas de alimentação, seis vezes ao dia. Sete tanques de cultivo foram designados para cada tratamento dietético. Os animais foram cultivados por um período de cultivo de 56 dias.

3.2.2 Sistema de cultivo e pós larvas

O sistema de cultivo adotado neste estudo foi composto por 44 tanques, com volume nominal de 61 L cada, operando sob regime de recirculação de água. Cada tanque equipado com sua entrada e saída de água, sistema de aeração e bandeja de alimentação. Todos os tanques tinham formato retangular, de cor azul, feitos de polipropileno com 31,0 cm de altura, 35,5 cm de largura, 55,5 cm de comprimento e área de fundo de 0,19 m². Os animais foram submetidos a um ciclo de luz diária com duração de 12 horas, que iniciava as 06:30h e terminava as 18:30h.

Os tanques experimentais foram inicialmente preparados através da limpeza por escovação de suas paredes e fundo, com utilização de água corrente e solução de hipoclorito de sódio a 100 ppm. A água de todos os tanques foi aerada de forma contínua por um soprador de 7,5 cv de potência. O sistema de difusão de ar era composto por pedras porosas, repousada no fundo de cada tanque. O sistema operou em regime de água clara, onde o fluxo de renovação de água foi em média 20,0% do volume total de cada tanque por dia. A água utilizada para abastecer os tanques de cultivo foi previamente desinfetada com cloro, sendo previamente filtrada através de um filtro de areia de 240 kg.

As pós-larvas (PL) de *L. vannamei* foram obtidas de uma larvicultura comercial e aclimatadas em sistema de pré-berçários, composto por três tanques de 23 m³ (15,9 m² de área inferior, cada), onde foram cultivados a partir da fase de PL10 até o estágio juvenil. Durante esse período, os camarões foram alimentados com dieta comercial.

Para este estudo, foram utilizados camarões de 0,80 ± 0,05 g (média ± desvio padrão; *n* = 630, CV = 6,25%). Após a estocagem dos camarões no sistema de cultivo os mesmos foram submetidos a um período de aclimação de 10 dias. Durante esse período todos os camarões foram alimentados com dieta comercial contendo 400 g kg⁻¹ de proteína bruta.

3.2.3 Dietas experimentais

Seis dietas experimentais foram formuladas em base bruta, de forma isoprotéica e isocalórica, com um mínimo possível de variação em relação a composição de ingredientes. A inclusão dietética de ingredientes marinhos como farinha de subprodutos de salmão, farinha de lula e óleo de salmão foi fixada em 120,0 g kg⁻¹, 30,0 g kg⁻¹ e 26,0 g kg⁻¹ da dieta (base natural), respectivamente. O farelo de soja foi o principal componente proteico de origem vegetal, com nível de inclusão de 230 g kg⁻¹ (base natural). A dextrina foi incluída a 200 g kg⁻¹ da dieta. O óleo de soja foi usado a 6,0 g kg⁻¹ para manter os níveis de extrato etéreo consistentes entre todas as dietas.

A suplementação de aminoácidos seguiu níveis definidos previamente por um protocolo experimental. Uma dieta controle foi formulada para conter 5,1 g kg⁻¹ de metionina total, proveniente apenas de fontes intactas. A partir desta dieta, cinco dietas quase semelhantes foram formuladas para conter metionina sintética (AQUAVI[®] Met-Met, Evonik Industries AG, Hanau, Alemanha) em 1,4, 3,0, 4,6, 6,2 e 7,8 g kg⁻¹, a fim de atender a um nível de metionina de 6,8, 8,2, 9,9, 12,0, 13,7 g kg⁻¹ da dieta total, respectivamente.

Com o objetivo de maximizar a utilização da proteína, todas as dietas foram formuladas para atender as relações de proteína ideal de acordo com o conceito estabelecido por Mitchell (1972), usando lisina como o primeiro aminoácido limitante e de referência. Portanto, todas as dietas foram também suplementadas com L-Lisina HCl 99% (AjiLys[®] 99), L-Treonina, L-Leucina, L-Valina, L-Isoleucina, L-Fenilalanina, L-Histidina, L-Triptofano, L-Alanina, Ácido glutâmico e L-Arginina. Cada aminoácido essencial, exceto metionina, foi suplementado de forma a atender em média 20% a mais das relações recomendadas (NRC, 2011, TABELA 1). Essa abordagem foi adotada para garantir o atendimento das relações

mínimas entre todos os aminoácidos essenciais e evitar perdas por lixiviação, inerentes ao tempo de imersão da ração durante os intervalos de alimentação.

Tabela 1 – Relação entre aminoácido essencial (AAE) e lisina (L) adotada para a formulação das dietas experimentais.

AAE/L	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	NRC (2011)
Metionina/Lisina	22	29	36	43	50	57	48
Treonina/Lisina	97	97	97	97	97	97	67
Triptofano/Lisina	19	19	19	19	19	19	10
Arginina/Lisina	130	130	130	130	130	130	95
Isoleucina/Lisina	75	75	75	75	75	75	48
Leucina/Lisina	130	130	130	130	130	130	81
Valina/Lisina	80	80	80	80	80	80	65
Histidina/Lisina	40	40	40	40	40	40	38
Fenilalanina/Lisina	75	75	75	75	75	75	55

3.2.4 Fabricação das dietas

Todos os ingredientes vegetais e animais foram moídos em um moinho centrífugo, com potência de 5 cv (modelo MCS 280, Máquinas Vieira Indústria e Comércio Ltda., São Paulo) com tela de 600 micra. Após a moagem, os ingredientes foram estocados separadamente em recipientes fechados (60 L), os quais foram mantidos em temperatura ambiente.

Os ingredientes foram pesados em uma balança eletrônica ($\pm 0,01$ g), seguindo as especificações da fórmula (TABELA 2). Após a pesagem, todas as matérias primas secas foram misturadas durante 10 min. em um misturador planetário. Uma amostra de 1 kg da mistura foi recolhida para incorporar microingredientes (vitaminas, minerais, aglutinante e aminoácidos) em um misturador em Y, a uma velocidade de 30 RPM, por 10 min. Subsequentemente, a mistura foi combinada com os ingredientes restantes (secos e líquidos) e com água doce (28-30 °C) adicionada na proporção de 4 L para cada 15 kg de mistura. A água foi incorporada lentamente na medida que o misturador planetário estava em funcionamento, até obter uma mistura homogênea.

Tabela 2 - Formulação e composição centesimal das dietas experimentais (g kg^{-1} , base natural).

Ingredientes (g kg^{-1})	Dietas / Níveis de metionina (g kg^{-1})					
	5,1	6,8	8,2	9,9	12,0	13,7
Farelo de soja	230,0	230,0	230,0	230,0	230,0	230,0
Dextrina	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0
Farinha de trigo	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0
Farinha de salmão	120,0	120,0	120,0	120,0	120,0	120,0
Farinha de lula	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Glúten de trigo	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Lecitina de soja	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0
Óleo de salmão	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0
Óleo de soja	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Celulose	54,2	52,8	51,2	49,6	48,0	46,4
Carboximetilcelulose	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Fosfato bi cálcico	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Premix vitamínico-mineral	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Aglutinante sintético	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Sulfato de magnésio	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Cloreto de potássio	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Ácido ascórbico, 35%	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
DL-metionil-DL-metionina	0,00	1,45	3,03	4,61	6,19	7,77
Premix AAE ¹	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
Premix AANE ²	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Composição centesimal						
Matéria seca	906,2	899,5	898,3	894,8	895,6	900,3
Proteína bruta	377,2	376,0	378,4	379,2	380,4	381,7

¹Premix de aminoácidos essenciais (g kg^{-1}): L-Lisina HCl 99%, 9,1; L-Treonina, 11,3; L-Leucina, 9,8; L-Valina, 5,9; L-Isoleucina, 5,7; L-Fenilalanina, 4,7; L-Histidina, 2,4; L-Triptofano, 1,7 e L-Arginina, 11,9.

²Premix de aminoácidos não essenciais (g kg^{-1}): L-Alanina, 10,0 e ácido glutâmico, 10,0.

A mistura homogênea foi então transferida para um sistema de cozimento à vapor, onde ficou por aproximadamente 20 minutos ou até que a temperatura interna da massa atingisse 95 °C. Após o cozimento à vapor, a massa foi imediatamente transferida para um moinho elétrico para então ser submetida ao processo de peletização, a partir do qual foram obtidas partículas alimentares em formato de espaguete com 2 mm de diâmetro. Todo o material oriundo deste processo foi submetido a um processo de secagem através do uso de estufas com circulação contínua de ar por um período máximo de 3 h, sob temperatura de 60 °C, ou até que o teor de umidade estivesse entre 8 e 10%. Ao final, as partículas ainda em formato de espaguete foram desintegradas em peletes com média de 5 mm de comprimento, através da utilização de um processador de alimentos. As dietas foram embaladas, etiquetadas e estocadas a uma temperatura de -20 °C, até sua utilização.

3.2.5 Alimentação e sistema de manejo

Os camarões foram alimentados seis vezes ao dia, exclusivamente em bandejas de alimentação, posicionadas em cada tanque. A oferta das dietas ocorreram nos seguintes horários: 1ª refeição: 07:00h; 2ª refeição: 09:00h; 3ª refeição: 11:00h; 4ª refeição: 13:00h; 5ª refeição: 15:00h e 6ª refeição: 16:00h. As ofertas diárias foram divididas em partes iguais para cada refeição, sendo calculada a partir de uma tabela de alimentação.

Inicialmente, as refeições foram ajustadas com base em uma sequência diária de ganho de peso estimado de 100 mg/dia/camarão. Semanalmente, foi realizada a contagem de todos os camarões em cada unidade de cultivo. Esta ação foi realizada para corrigir a oferta alimentar em tanques que tiveram redução na sobrevivência, a fim de evitar um possível excesso da oferta de ração, o que poderia causar tendências nos resultados de desempenho zootécnico e influenciar os fatores de utilização alimentar (*e.g.* consumo alimentar aparente e fator de conversão alimentar).

Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados diariamente (pH, temperatura e salinidade), a partir das 13:00 h em todos os tanques. Quinzenalmente, foram realizadas análises dos compostos nitrogenados (nitrogênio amoniacal total, nitrito e nitrato), a partir de três amostras obtidas aleatoriamente do sistema de cultivo (n = 12). O oxigênio dissolvido foi mantido em concentrações de saturação durante todo o período de cultivo.

3.2.6 Coleta de amostras e análises químicas

Na despesca, a população de cada repetição foi coletada para análise. Os animais foram sacrificados e o músculo caudal e o hepatopâncreas retirados, coletados, armazenados a -20 °C, liofilizados e moídos para análise.

A composição centesimal das dietas e das amostras experimentais foram determinadas pelo método padrão AOAC (1995). As concentrações dos aminoácidos das dietas experimentais, dos tecidos e órgãos dos camarões foram analisadas seguindo os procedimentos descritos por Figueiredo-Silva *et al.* (2015) (TABELA 3; TABELA 4).

Tabela 3 – Composição de aminoácidos das dietas experimentais (g kg⁻¹, base seca)

Aminoácidos	Dietas / Níveis de Metionina (g kg ⁻¹)					
	5,1	6,8	8,2	9,9	12,0	13,7
<i>Aminoácidos essenciais</i>						
Arginina	29,9	30,0	30,0	30,1	29,4	29,6
Histidina	7,1	7,0	7,0	7,0	7,2	7,3
Isoleucina	17,2	17,1	17,2	17,1	17,5	17,4
Leucina	30,3	30,1	30,1	30,0	30,3	30,4
Lisina	22,0	21,9	22,1	22,2	21,7	21,8
Metionina	5,1	6,8	8,2	9,9	12,0	13,7
Met + Cis*	8,7	10,4	11,9	13,7	15,7	17,5
Fenilalanina	17,9	17,7	17,6	17,6	17,3	17,1
Treonina	21,4	21,3	21,4	21,5	22,6	22,5
Triptofano	3,8	3,7	3,8	3,8	3,8	3,9
Valina	18,7	18,7	18,6	18,7	18,5	18,7
<i>Aminoácidos não essenciais</i>						
Alanina	23,85	23,76	23,82	23,76	23,75	23,46
Cistina	3,7	3,6	3,7	3,8	3,7	3,8
Glicina	15,80	15,91	15,89	16,08	16,09	15,94
Serina	12,69	12,72	12,74	12,70	12,68	12,73
Prolina	16,35	15,94	16,40	16,01	17,04	16,66
Aspartato	25,28	25,36	25,31	25,32	25,08	25,01
Glutamina	60,30	60,01	60,19	60,44	60,61	60,44

*AAST, aminoácidos sulfurados totais.

3.2.7 Teste de lixiviação

O teste de lixiviação das dietas experimentais foi realizado em condições semelhantes aquelas encontradas durante o período de cultivo. Uma amostra de 3 g de dieta experimental foi pesada e distribuída em uma bandeja de alimentação que foi então submergida em água salgada a 28 °C e 35 g L⁻¹ de salinidade, nos mesmos tanques experimentais, sem a presença de camarões. Para a realização desse teste, foram utilizadas duas rações experimentais contendo 0 e 1,45 g kg⁻¹ de suplementação de DL-metionil-DL-metionina. As dietas foram submetidas a 3 diferentes tempos de imersão: 15, 30 e 60 minutos, sendo estabelecidas 3 repetições para cada tratamento. Após imersão, as bandejas de alimentação ainda com as dietas experimentais foram drenadas por alguns minutos para remoção do excesso de água. As amostras foram submetidas ao processo de secagem em estufas de circulação contínua de ar por um período máximo de 72 h, sob temperatura de 130 °C.

3.2.8 Parâmetros de crescimento

A coleta de dados de peso corporal (g) dos camarões foi realizada no povoamento e na despesca, após 56 dias de cultivo. Os camarões foram contados e pesados individualmente em uma balança eletrônica com precisão de 0,01 g. Com estes dados, foram determinados os seguintes parâmetros:

1. Biomassa adquirida (g) = biomassa final (g) – biomassa inicial (g);
2. Sobrevivência final (%) = (número final de camarões ÷ número inicial de camarões) x 100;
3. Consumo aparente de ração (g de ração/camarão estocado) = (quantidade total de ração seca ingerida ÷ número inicial de camarões);
4. Fator de conversão alimentar = consumo de ração aparente por tanque ÷ biomassa adquirida por tanque;
5. Crescimento semanal (g/semana) = ((peso corporal final – peso corporal inicial) ÷ dias de cultivo) x 7;
6. Produtividade final (g/m²) = Biomassa adquirida (g) ÷ área do tanque (m²).

3.2.9 Análises estatísticas

A análise de variância unifatorial (ANOVA) foi usada para comparar as médias dos parâmetros de desempenho de crescimento, qualidade de água, lixiviação, composição centesimal e perfil aminoacídico do músculo caudal entre os tratamentos dietéticos. O nível de significância foi fixado em $P < 0,05$, e foi utilizado o teste de Tukey HSD para comparar os valores médios entre os tratamentos individuais. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Ilinóis, EUA).

Dois modelos matemáticos foram utilizados para determinar o requerimento dietético de metionina e metionina + cisteína de *L. vannamei*, com base nos dados de peso corporal final.

O primeiro modelo utilizado envolve o uso de duas retas lineares (ROBBINS; NORTON; BAKER, 1979), o qual assume que a resposta de crescimento de um animal que consome níveis crescentes de um nutriente indispensável e limitante aumenta linearmente até que o requerimento seja alcançado (ponto de inflexão). Uma vez alcançado esse ponto, nenhuma resposta crescente será observada, sendo então estabelecido um platô (curva = 0), ou uma reta descendente (resposta negativa). O ponto de quebra é considerado como o nível ideal do nutriente para que se obtenha o melhor desempenho de crescimento (NRC, 2011). Conhecido como regressão linear segmentada, esse método é amplamente utilizado em trabalhos com organismos aquáticos que adotam o método de dose resposta (MILLAMENA; BAUTISTA-TERUEL; KANAZAWA, 1996).

O segundo modelo utilizado envolve o uso de uma equação de regressão quadrática (modelo não linear). Os valores estimados por esse modelo correspondem ao máximo crescimento obtido em relação ao menor nível do nutriente em questão. Diferentemente do primeiro modelo, este tem a tendência de fornecer valores superestimados (NRC, 2011).

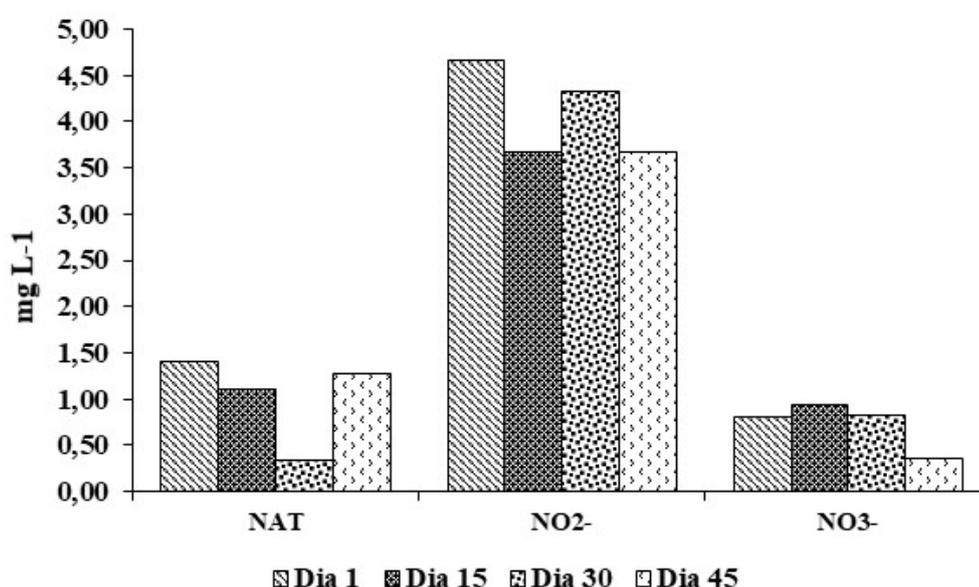
3.3 RESULTADOS

3.3.1 Qualidade de água

Ao longo do período de cultivo, a salinidade, o pH, a temperatura e os compostos nitrogenados (nitrogênio amoniacal total, nitrito e nitrato; FIGURA 1) foram mantidos dentro de limites considerados normais para cultivo de camarões peneídeos. Durante os 56 dias de

cultivo os valores de salinidade, pH, temperatura, nitrogênio amoniacal total, nitrito e nitrato atingiram $36,0 \pm 2,0 \text{ g L}^{-1}$ ($34\text{--}38 \text{ g L}^{-1}$), $7,37 \pm 0,22$ ($6,99\text{--}8,04$), $27,91 \pm 0,29 \text{ }^\circ\text{C}$ ($26,97\text{--}28,53 \text{ }^\circ\text{C}$), $0,02 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ($<0,001\text{--}0,04 \text{ mg L}^{-1}$), $4,08 \pm 1,16 \text{ mg L}^{-1}$ ($3,67\text{--}4,67 \text{ mg L}^{-1}$) e $0,73 \pm 0,48 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,35\text{--}0,93 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas para os parâmetros de qualidade de água entre os tratamentos ($P > 0,05$; ANOVA).

Figura 1 - Concentração (mg L^{-1}) de nitrogênio amoniacal total (NAT), nitrito (NO_2^-), e nitrato (NO_3^-) na água de cultivo, durante o período de cultivo experimental.



3.3.2 Composição centesimal e perfil aminoacídico dos tecidos corporais

Com exceção do teor de lisina, treonina, arginina, isoleucina e valina, diferenças significativas foram observadas na composição do músculo caudal dos camarões ($P < 0,05$, TABELA 4). Houve uma tendência crescente no teor de proteína bruta, metionina e metionina + cistina do músculo caudal de camarões alimentados com dietas suplementadas com DL-metionil-DL-metionina em comparação com a dieta basal (sem suplementação). Os dados da dieta contendo $7,77 \text{ g kg}^{-1}$ de DL-Met-Met foram os maiores, embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre as demais dietas também suplementadas ($P > 0,05$).

Os valores da composição centesimal e do perfil aminoacídico das amostras de hepatopâncreas não foram comparados estatisticamente pois a quantidade de material obtido na coleta ao final do experimento não foi suficiente para realizar as análises em triplicata. O valor médio do teor de proteína bruta, metionina e aminoácidos essenciais totais no

hepatopâncreas de camarões alimentados com dietas contendo níveis graduais de metionina foi 521,8, 10,0 e 200,3 g kg⁻¹, respectivamente (TABELA 4).

Tabela 4 – Composição centesimal e perfil aminoácídico dos tecidos corporais de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas com níveis graduais de metionina.

Item	Dietas / Níveis de Metionina (g kg ⁻¹ , com base na matéria seca)					
	5,1	6,8	8,2	9,9	12,0	13,7
<i>Hepatopâncreas (g kg⁻¹)</i>						
Matéria seca	929,8	927,2	929,8	929,9	928,9	931,1
Proteína bruta	510,2	525,1	527,6	529,9	524,2	513,6
Metionina	9,5	9,9	10,1	10,3	10,1	10,1
ΣAAE*	195,8	200,1	203,9	205,4	200,5	196,0
<i>Músculo caudal (g kg⁻¹)</i>						
Matéria seca	919,7 ± 0,2 a	919,1 ± 0,9 ab	917,5 ± 2,2 ab	919,6 ± 1,0 a	919,0 ± 1,0 ab	916,3 ± 0,8 b
Proteína bruta	897,0 ± 0,6 a	890,3 ± 7,4 b	915,7 ± 2,4 b	915,0 ± 0,5 b	912,7 ± 3,4 b	917,8 ± 1,9 b
Metionina	20,8 ± 0,9 a	22,1 ± 0,1 b	22,2 ± 0,1 b	22,4 ± 0,2 b	22,4 ± 0,1 b	22,7 ± 0,1 b
Cistina	8,1 ± 0,3 a	8,9 ± 0,1 b	9,1 ± 0,1 b	9,3 ± 0,1 b	9,3 ± 0,2 b	9,2 ± 0,1 b
Met + Cis	28,9 ± 1,2 a	31,1 ± 0,1 b	31,4 ± 0,1 b	31,6 ± 0,2 b	31,8 ± 0,1 b	31,8 ± 0,1 b
Lisina	64,2 ± 2,7	66,9 ± 0,9	67,2 ± 0,3	66,6 ± 0,6	66,8 ± 0,3	67,1 ± 0,1
Treonina	29,6 ± 1,0 a	30,7 ± 0,4 ab	30,8 ± 0,1 b	30,7 ± 0,1 ab	30,7 ± 0,2 ab	30,8 ± 0,2 ab
Arginina	78,3 ± 3,2	79,8 ± 0,5	79,3 ± 0,2	78,7 ± 0,1	78,4 ± 0,2	78,8 ± 0,0
Isoleucina	33,6 ± 1,7	35,1 ± 0,2	35,1 ± 0,2	34,8 ± 0,1	34,8 ± 0,0	35,0 ± 0,3
Leucina	59,2 ± 2,4 a	61,9 ± 0,3 b	62,0 ± 0,3 b	61,6 ± 0,3 ab	61,7 ± 0,1 ab	62,0 ± 0,1 b
Valina	34,1 ± 1,9	35,7 ± 0,3	35,7 ± 0,2	35,4 ± 0,1	35,5 ± 0,1	35,7 ± 0,2
Histidina	15,9 ± 0,8 a	16,6 ± 0,1 ab	16,8 ± 0,1 b	16,6 ± 0,1 ab	16,7 ± 0,1 ab	16,8 ± 0,1 b
Fenilalanina	33,1 ± 1,2 a	34,5 ± 0,3 ab	34,7 ± 0,2 b	34,4 ± 0,2 ab	34,5 ± 0,0 ab	34,7 ± 0,1 b
ΣAAE*	385,8 ± 0,7 a	392,3 ± 2,1 b	393,2 ± 1,2 b	390,4 ± 1,7 b	391,1 ± 0,9 b	392,8 ± 0,5 b

ΣAAE* – Aminoácidos essenciais totais.

Os dados representam média (± desvio padrão) de três repetições. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos dietéticos ao nível de $\alpha = 0,05$ segundo o teste a posteriori de Tukey HSD.

3.3.3 Teste de lixiviação

A tabela 5 mostra os resultados de lixiviação das dietas contendo 0 e 1,45 g kg⁻¹ de DL-metionil-DL-metionina em três diferentes tempos de imersão em água salgada. A dieta suplementada com 1,45 g kg⁻¹ de DL-Met-Met mostrou um efeito de lixiviação ao longo do tempo, mas os dados estatisticamente não foram diferentes após 15 minutos de imersão em água. A lixiviação da dieta sem suplementação de metionina sintética diminuiu com o tempo, apresentando taxa de lixiviação de 13,7% após 60 minutos de imersão.

Tabela 5 – Resultados de lixiviação de metionina em dietas submetidas a diferentes tempos de imersão.

Tempo de imersão	Met (g kg ⁻¹ , base seca)	Taxa de lixiviação (%) ¹
<i>0 g kg⁻¹ Met-Met</i>		
0 min	5,1 ± 0,00 a	-
15 min	3,9 ± 0,04 b	22,8
30 min	4,2 ± 0,12 bc	18,2
60 min	4,4 ± 0,23 c	13,7
<i>1,45 g kg⁻¹ Met-Met</i>		
0 min	6,8 ± 0,00 a	-
15 min	4,7 ± 0,14 b	31,3
30 min	4,7 ± 0,15 b	30,6
60 min	5,0 ± 0,28 b	27,1

$$1 - \text{Taxa de lixiviação} = (([\text{Met } 0_{\text{min}}] - [\text{Met } Y_{\text{min}}]) \div [\text{Met } 0_{\text{min}}]) \times 100$$

Os dados representam média (± desvio padrão) de três repetições. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tempos de imersão em relação a mesma dieta experimental ao nível de $\alpha = 0,05$ segundo o teste a posteriori de Tukey HSD.

As concentrações dos demais aminoácidos essenciais presentes nas amostras submetidas ao teste de lixiviação também foram analisadas. A taxa de lixiviação (média ± desvio padrão) calculada foi de 58,4 ± 5,6%, 44,3 ± 2,0%, 42,3 ± 2,6%, 21,4 ± 4,1%, 23,8 ± 3,7%, 18,8 ± 3,7%, 20,6 ± 5,5% e 18,0 ± 4,1%, para lisina, treonina, arginina, isoleucina, leucina, valina, histidina e fenilalanina, respectivamente.

3.3.4 Desempenho de crescimento e utilização alimentar

Os níveis dietéticos de metionina afetaram significativamente o desempenho de crescimento e a utilização alimentar de *L. vannamei* ($P < 0,05$, TABELA 6). Os valores de ganho de produtividade, de peso corporal final, de ganho de peso, de crescimento semanal e de taxa de crescimento específico aumentaram significativamente a medida que os níveis de metionina nas dietas foram aumentados de 5,1 para 9,9 g kg⁻¹. No entanto, nenhum efeito positivo pôde ser percebido para esses parâmetros quando o conteúdo total de metionina nas dietas excedeu 13,7 g kg⁻¹. O FCA diminuiu significativamente com o aumento dos níveis de metionina dietética a partir de 5,1 até 9,9 g kg⁻¹. A sobrevivência final variou de no mínimo 98,33 ± 3,33% a no máximo 100,0 ± 0,00% (TABELA 6). O aumento dos níveis de metionina nas dietas não afetou a sobrevivência final. Nenhum sinal de deficiência aparente foi observado nos camarões submetidos aos tratamentos dietéticos.

Uma análise de regressão linear segmentada foi utilizada para estimar o requerimento dietético de metionina ($Y = 8,202 + 1,250X$; se $X > 9,4$ então $Y = 9,779 - 0,418X$; $R^2 = 0,984$) e metionina + cisteína (Met+Cis) ($Y = 7,809 + 1,192X$; se $X > 13,2$ então $Y = 9,950 - 0,427X$; $R^2 = 0,993$) de *L. vannamei*. O requerimento dietético de metionina e Met + Cis, baseados no peso corporal final dos camarões foram determinados para ser 9,4 g kg⁻¹ (FIGURA 2) e 13,2 g kg⁻¹ (FIGURA 3), respectivamente.

Uma análise de regressão quadrática foi usada para estimar o máximo crescimento alcançado no menor nível dietético de metionina ($Y = 7,126 + 4,304X - 2,052X^2$; $R^2 = 0,997$) e metionina + cisteína ($Y = 5,450 + 5,532X - 1,946X^2$; $R^2 = 0,976$) para *L. vannamei*. O máximo crescimento alcançado no menor nível dietético de metionina e Met + Cis, baseado no peso corporal final dos camarões foram determinados para ser 10,5 g kg⁻¹ (FIGURA 2) e 14,2 g kg⁻¹ (FIGURA 3), respectivamente.

Tabela 6 - Desempenho de crescimento e utilização alimentar de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas contendo diferentes níveis dietéticos de metionina.

Item	Níveis de metionina (g kg ⁻¹)					
	5,1	6,8	8,2	9,9	12,0	13,7
Sobrevivência (%)	98,33 ± 3,33	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
Peso final (g)	8,77 ± 0,22 a	9,11 ± 0,21 ab	9,32 ± 0,24 b	9,36 ± 0,14 b	9,29 ± 0,24 ab	9,20 ± 0,33 ab
Ganho de peso (%)	1098,42 ± 35,00 a	1127,92 ± 5,43 ab	1141,34 ± 29,35 ab	1187,76 ± 40,54 b	1161,44 ± 56,54 ab	1125,45 ± 40,30 ab
Ganho de produtividade	617,62 ± 17,47 a	655,38 ± 15,25 ab	671,42 ± 18,46 b	676,77 ± 11,95 b	670,00 ± 20,45 b	661,64 ± 26,25 b
Crescimento semanal	1,00 ± 0,03 a	1,04 ± 0,02 ab	1,06 ± 0,03 ab	1,07 ± 0,02 b	1,06 ± 0,03 ab	1,05 ± 0,04 ab
TCE ¹	4,28 ± 0,06 a	4,33 ± 0,01 ab	4,35 ± 0,05 ab	4,42 ± 0,06 b	4,38 ± 0,06 ab	4,32 ± 0,06 ab
FCA ²	1,65 ± 0,05 a	1,54 ± 0,03 b	1,51 ± 0,04 b	1,48 ± 0,04 b	1,50 ± 0,06 b	1,54 ± 0,06 b

Valores representam média ± D.P. de sete repetições. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos dietéticos ($P < 0,05$).

¹ Taxa de crescimento específico;

² Fator de conversão alimentar.

Figura 2 – Relação entre peso corporal final (g) e conteúdo dietético de metionina com base em duas regressões, uma regressão linear segmentada, onde X_{opt} representa o requerimento mínimo de metionina dietética, e uma regressão quadrática, onde X_{opt} representa o valor de metionina dietética necessário para o máximo crescimento.

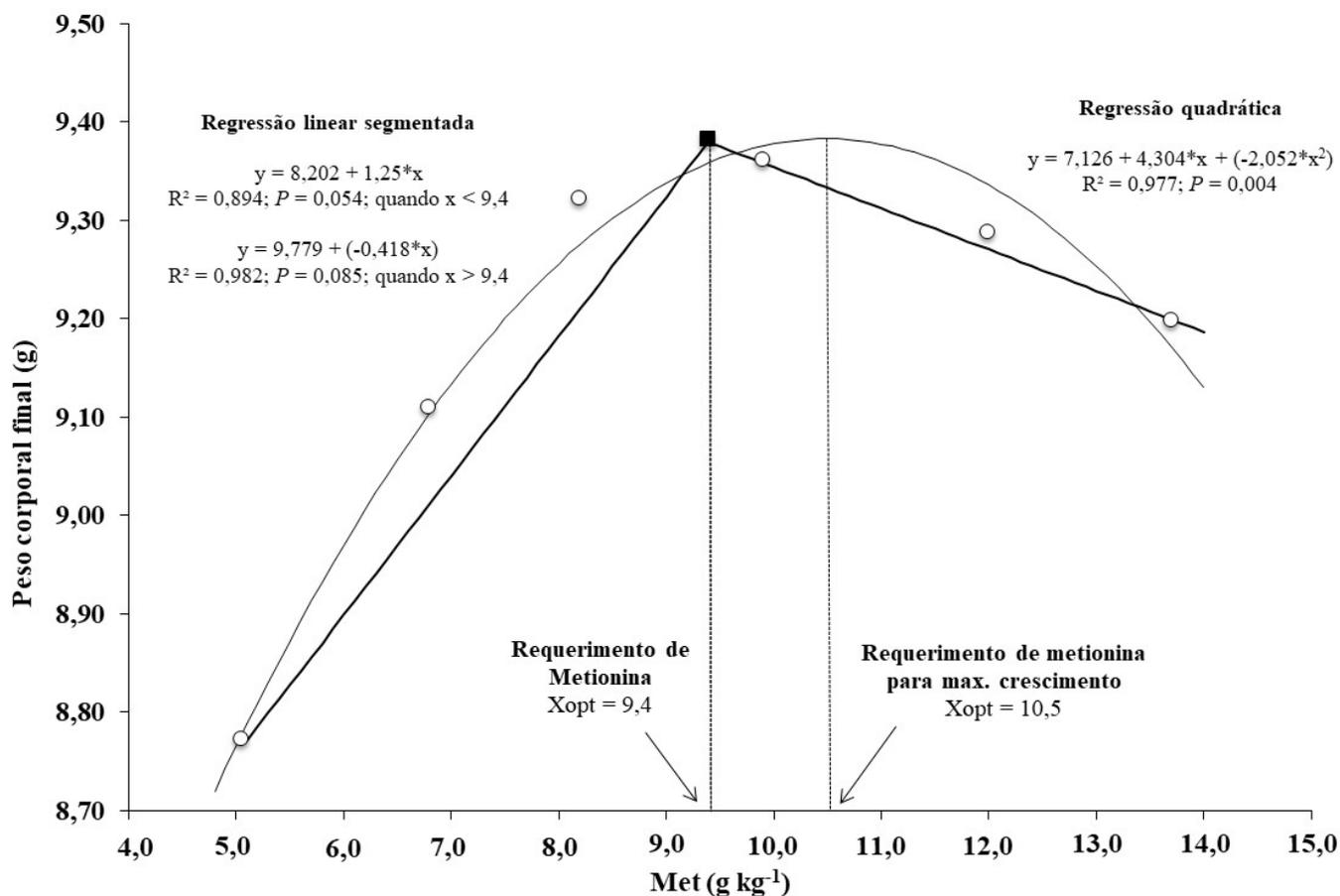
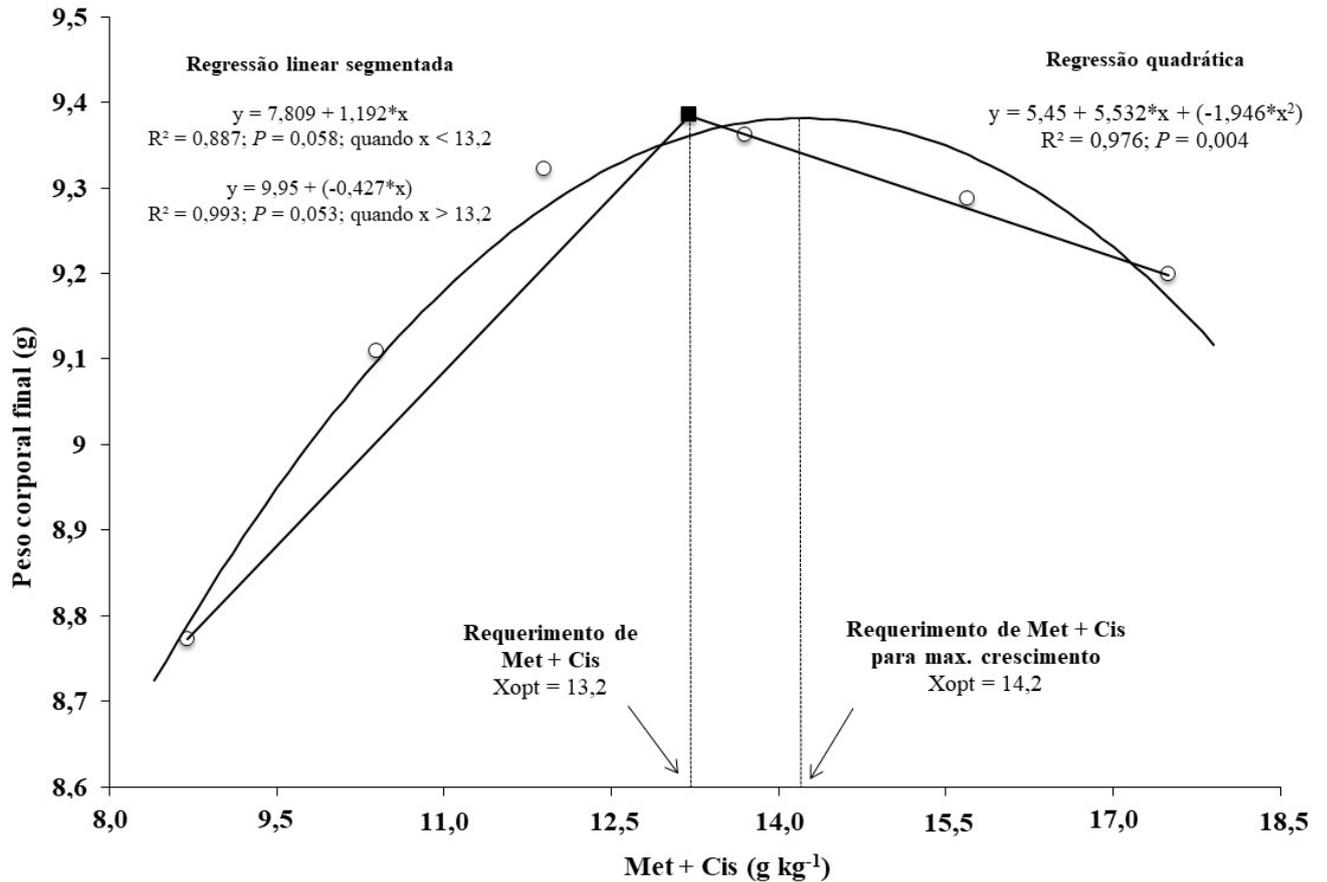


Figura 3 – Relação entre peso corporal final (g) e conteúdo dietético de metionina + cisteína com base em duas regressões, uma regressão linear segmentada, onde X_{opt} representa o requerimento mínimo de metionina + cisteína dietética, e uma regressão quadrática, onde X_{opt} representa o valor de metionina + cisteína dietética necessário para o máximo crescimento.



3.4 DISCUSSÃO

Os níveis dietéticos de metionina afetaram significativamente o desempenho de crescimento e a utilização alimentar de *L. vannamei*. No presente estudo, o melhor desempenho de crescimento e utilização alimentar foi observado em camarões alimentados com dieta contendo 9,9 g kg⁻¹ de metionina dietética (2,61% da proteína bruta).

Os métodos de regressão utilizados para determinação dos requerimentos dietéticos de nutrientes essenciais (*e.g.* metionina) ainda não estão completamente estabelecidos quanto a sua aplicabilidade no campo da nutrição de organismos aquáticos (FRACALLOSSI; CYRINO, 2013). De acordo com Portz, Dias e Cyrino (2000) e Dairiki, Dias e Cyrino (2007), a análise de regressão segmentada possibilita a determinação precisa de um valor mínimo de requerimento dietético exigido para uma máxima performance de crescimento, levando em consideração uma relação de custo benefício. Outros autores, porém, criticam o uso da regressão segmentada, afirmando que esta é inadequada para descrever a resposta de uma população, uma vez que assume uma mudança brusca e não real, ao atingir o ponto de inflexão, sendo que na realidade a mudança é suave (ROBBINS; NORTON; BAKER, 1979; SHEARER, 2000). Isso explica a afirmação feita por outros autores de que a exigência nutricional determinada através de uma regressão linear segmentada está normalmente subestimada (HERNANDES-LLAMAS, 2009). Como tentativa de propor um modelo mais adequado às respostas biológicas e assim estimar valores mais próximos da verdadeira exigência dos organismos, outros trabalhos adotam modelos de regressões não lineares (ROBBINS; NORTON; BAKER, 1979, DAIRIKI; DIAS; CYRINO, 2007; HERNANDES-LLAMAS, 2009). Uma vez que não há consenso em relação às metodologias de análises e suas aplicações, este trabalho utilizou duas metodologias de análises de regressão (linear segmentada e não linear quadrática) para determinar o nível ótimo de metionina dietética para juvenis de *L. vannamei*. A escolha dessas metodologias foi baseada na frequência de utilização por outros trabalhos de determinação do requerimento de nutrientes essenciais para camarões peneídeos. A adoção de duas metodologias se deu com o objetivo de evitar a determinação absoluta de apenas um valor sub ou superestimado, do requerimento dietético de metionina.

A análise de regressão linear segmentada entre o peso corporal final dos camarões e o conteúdo de metionina indicou que o requerimento dietético de metionina foi determinado para ser 9,4 g kg⁻¹ da dieta, correspondendo a 2,48% da proteína bruta (PB). A análise de regressão não linear (modelo quadrático) entre o peso corporal final dos camarões e o

conteúdo dietético de metionina indicou que o máximo crescimento alcançado no menor nível dietético de metionina foi determinado para ser 10,5 g kg⁻¹ da dieta, correspondendo a 2,77% da proteína bruta.

Esses valores são próximos aqueles reportados em outros trabalhos, como 2,4% da proteína dietética para o camarão tigre (*Penaeus monodon*) (MILLAMENA; BAUTISTA-TERUEL; KANAZAWA, 1996) e 2,0-2,61% para *L. vannamei* cultivado em sistema de água verde sob diferentes densidades de estocagem (FAÇANHA *et al.*, 2016). No entanto, os níveis ótimos de metionina dietética para juvenis de camarão branco do Pacífico estimados no presente estudo foram maiores do que aqueles reportados por Lin *et al.* (2015) (2,27% da PB para *L. vannamei*) e por Teshima *et al.* (2002) (1,2-1,6% da PB para *Marsupenaeus japonicus*). Fox *et al.* (2010) encontraram valores superiores aos estabelecidos no presente estudo (3,7% da PB para *L. vannamei*).

A metionina, assim como os demais aminoácidos essenciais, apresenta solubilidade em água. Essa propriedade limita a utilização desse aminoácido em formas cristalinas para rações aquáticas (YUAN *et al.*, 2011), uma vez que são lixiviados a partir do pélete para a água, impedindo que sua molécula seja completamente absorvida no trato gastrointestinal dos camarões. Essa limitação acaba sendo maximizada pelo comportamento alimentar dos peneídeos, que se caracteriza pelo hábito bentônico e pela manipulação do alimento, que ocorre de forma lenta por meio da ingestão de pequenos pedaços (PEÑAFLORES; VIRTANEN, 1996). Estima-se que dentro de um intervalo de 60 minutos, um indivíduo juvenil de *L. vannamei* consuma dois péletes, com cerca de dois milímetros de diâmetro (KOBLE, 2014). Martínez-Rocha (2012) reportou que dentro desse mesmo período de imersão em água ocorre uma perda de 27% de DL-Metionina em dietas comerciais. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, onde foi observado em dieta suplementada com 1,45 g kg⁻¹ de DL-Met-Met uma taxa de lixiviação de 27,1% após 60 minutos de imersão.

Os valores de ganho de produtividade, de peso corporal final, de ganho de peso, de crescimento semanal e de taxa de crescimento específico aumentaram significativamente a medida que os níveis de metionina nas dietas foram aumentados de 1,35 para 2,61% da proteína dietética. Esses resultados, novamente, foram próximos aqueles encontrados por Façanha *et al.* (2016). Utilizando uma densidade de estocagem similar à adotada por esse estudo (75 animais m⁻²), os autores observaram que houve um aumento significativo no peso corporal final quando os níveis de metionina foram aumentados de 1,68 para 2,29% da proteína dietética. No entanto, resultados diferentes foram reportados por Lin *et al.* (2015), em

trabalho realizado para determinar o requerimento de metionina de *L. vannamei* em três diferentes tamanhos. No caso, os autores não observaram efeito do aumento dos níveis de metionina dietética (1,73 - 3,22% da proteína dietética) nos parâmetros de crescimento analisados (exceto sobrevivência) para camarões com peso inicial de $4,18 \pm 0,05$ g. Essa variação dos resultados reportados nos estudos, pode ser atribuída a diferenças entre a qualidade e biodisponibilidade dos ingredientes utilizados nas dietas e a outros fatores inerentes ao sistema de cultivo (*e.g.* densidade, temperatura, regime alimentar).

No presente estudo, o aumento dos níveis de metionina nas dietas não afetou a sobrevivência final e nenhum sinal de deficiência aparente foi observado nos camarões submetidos aos tratamentos dietéticos. Esses resultados são similares aqueles encontrados por outros trabalhos de determinação dos requerimentos dietéticos de aminoácidos essenciais para *L. vannamei* (ZHOU *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014).

No presente estudo, foi observado um efeito positivo no FCA com o aumento dos níveis de metionina dietética a partir de 1,35 até 2,61% da proteína bruta. Efeitos similares foram observados em outros trabalhos de determinação de aminoácidos essenciais para *L. vannamei*. Normalmente, os parâmetros de eficiência alimentar melhoram a medida que os níveis do aminoácido-teste são acrescidos até o nível dietético próximo ao requerimento do animal, sendo verificado então um efeito neutro ou negativo em níveis subsequentes. Esse efeito foi observado em outros aminoácidos essenciais como arginina (ZHOU *et al.*, 2012), isoleucina (LIU *et al.*, 2014) e treonina (ZHOU *et al.*, 2013). Isso indica que o requerimento dietético do aminoácido essencial não afeta apenas os parâmetros de desempenho de crescimento, mas também os índices de eficiência alimentar, o que corrobora com o conceito de proteína ideal, que propõe um perfil de aminoácido que atende exatamente o requerimento do animal para que esse possa sintetizar, da maneira mais eficiente, novos tecidos e substâncias metabólicas (NRC, 2011).

No presente estudo, foi observado uma tendência crescente no teor de proteína bruta, metionina e metionina + cistina do músculo caudal de camarões alimentados com dietas suplementadas com DL-metionil-DL-metionina em comparação com a dieta basal (sem suplementação). Esses resultados são semelhantes aqueles reportados por Lin *et al.* (2015), os quais observaram níveis mais elevados de proteína bruta em camarões alimentados com dietas com suplementação de 4 a 6 g kg⁻¹ de metionina sintética em relação a dietas sem suplementação. Os resultados inferiores do teor proteína bruta dos tecidos corporais de camarões alimentados com dietas deficientes em metionina podem ser atribuídos a perfis de aminoácidos desequilibrados, o que poderia aumentar a oxidação de todos os aminoácidos

essenciais e diminuir a retenção de aminoácidos como relatado em outros organismos aquáticos (TACON; COWEY, 1985).

Com base no valor estimado através da regressão linear segmentada (9,4 g kg⁻¹ da dieta ou 2,48% da PB) e da regressão quadrática (10,5 g kg⁻¹ da dieta ou 2,77% da PB), a relação de proteína ideal metionina/lisina estimada para uma máxima eficiência alimentar é igual a 43 e 48, respectivamente. A relação obtida com base no requerimento estimado através da regressão quadrática confirma o valor recomendado pelo NRC (2011), o qual também estimou uma relação ideal metionina/lisina igual a 48.

Alguns autores consideram a metionina como o primeiro aminoácido limitante ao crescimento de *L. vannamei* (CHI *et al.*, 2011). Sua suplementação ocorre devido a baixas concentrações da forma intacta nas matérias primas de origem vegetal, comumente empregadas na elaboração de rações para organismos aquáticos (NUNES *et al.*, 2014). Nesse estudo, os índices de crescimento e utilização alimentar melhoraram a medida que esse aminoácido foi suplementado a partir da dieta contendo apenas metionina proveniente de fontes intactas, sugerindo uma habilidade dos juvenis de *L. vannamei* em utilizar a forma cristalina DL-metionil-DL-metionina, que é caracterizada por ser um dipeptídeo de menor solubilidade em água e absorção mais lenta pelo organismo. Esses resultados foram similares aqueles obtidos em outros trabalhos que usam outras fontes de metionina cristalina como a metionina análoga ou ácido 2-hidroxi-4-metil-tio butanoico (BROWDY *et al.*, 2012) e DL-metionina (LIN *et al.*, 2015).

3.5 CONCLUSÕES

Os níveis dietéticos de metionina afetam o desempenho de crescimento e a utilização alimentar de *L. vannamei*. Com base nas análises de regressão, o valor ótimo de metionina dietética para o máximo crescimento de *L. vannamei* encontra-se no intervalo entre 9,4 e 10,5 g kg⁻¹ da dieta (2,48 a 2,77% da PB), correspondente à relação ideal de metionina/lisina de 43 e 48%, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- BAKER, D. H. Comparative Species Utilization and Toxicity of Sulfur Amino Acids. **The Journal of Nutrition**, p. 1670–1675, 2006.
- BROWDY, C. L. et al. 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.
- BROSNAN, J.; BROSNAN, M. The sulfur-containing amino acids: an overview. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 6, p. 16365–16405, 2006.
- CHI, S. Y. et al. Effects of supplementation of crystalline or coated methionine on growth performance and feed utilization of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 2, p. e1–e9, 2011.
- DAIRIKI, J. K.; DIAS, C. T. S.; CYRINO, J. E. P. Lysine requirement of largemouth bass, *Micropterus salmoides*: a comparison of methods of analysis of dose-response trials data. **Journal Applied of Aquaculture**, v. 19, n. 4, p. 1-27, 2007.
- ESPE, M. et al. Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 132–141, jan 2008.
- FAÇANHA, F. N. et al. 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. 16-21, 2016.
- FIGUEIREDO-SILVA, C. et al. 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*). **Aquaculture Nutrition**, v. 21, p. 234-241, 2015.
- FOX, J. M. et al. Estimation of feed level of methionine by *Litopenaeus vannamei* (Boone) using covalently-attached and crystalline sources in low- protein semi-purified diets. **Avances en Nutrición Acuicola X**, p. 232-249, 2010
- FRACALOSSI, D. M.; CYRINO, J. E. P. **Nutriaqua - Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013. 375 p.
- HERNANDEZ-LLAMAS, A. Conventional and alternative dose-response models to estimate nutrient requirements of aquaculture species. **Aquaculture**, v. 292, p. 207-213, 2009.
- LIN, H. Z. et al. Dietary methionine requirements of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* of three different sizes. **The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh**, n. 67, v. 1–10, 2015.

LIU, F. J. et al. Quantitative dietary isoleucine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. **Aquaculture International**, v. 22, p. 1481-1497, 2014.

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

MARTÍNEZ-ROCHA, L. **Contribuciones para el estudio del requerimiento de metionina en juveniles del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)**. 2012. 315 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de Los Garza, 2012.

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

MITCHELL, H. H. **Comparative nutrition of man and domestic animals**. Illinois: Academic Press, 1962. 724 p.

NRC. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D.C.: The National Academic Press, 2011.

NUNES, A. J. P. et al. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. **Aquaculture**, v. 431, p. 20-27, 2014.

PEÑAFLORES, V.; VIRTANEN, E. Growth, survival and feed conversion of juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) fed a betaine/amino acid additive. **The Israeli Journal of Aquacultura-Bamidgeh**, v. 48, p. 3-9, 1996.

POPPI, D. A. et al. Development of a test diet for assessing the bioavailability of arginine in feather meal fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 314, n. 1-4, p. 100-109, 2011.

PORTZ, L.; DIAS, C. T. S.; CYRINO, J. E. P. Regressão segmentada como modelo na determinação de exigências nutricionais de peixes. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 601-607, 2000.

ROBBINS, K. R.; NORTON, H. W.; BAKER, D. H. Estimation of nutrient requirements from growth data. **Journal of Nutrition**, v. 109, p. 1710-1714, 1979.

OLIVEIRA-NETO A. R. Metabolismo e Exigência de Metionina. In: SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de Não Ruminantes**. São Paulo: Editora Funep, 2014. cap. 2, p. 187-214.

SHEARER, K. D. Experimental design, statistical analysis and modelling of dietary nutrient requirement studies for fish: a critical review. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, p. 91-102, 2000.

TACON, A. G. J.; COWEY, C. B. **Protein and amino acid requirements**. In: Tytler, P., Calow, P. (Eds.), *Fish Energetics: New Perspectives*. Croom Helm, London, p. 155-183,

1985.

TESHIMA, S. et al. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). **Aquaculture Research**, v. 33, n. 6, p. 395–402, 2002.

YUAN, Y. et al. Effects of supplementation of crystalline or coated lysine and/or methionine on growth performance and feed utilization of the Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. **Aquaculture**, v. 316, n. 1-4, p. 31–36, 2011.

ZHOU, Q. C. et al. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 364–365, p. 252–258, 2012.

ZHOU, Q. C. et al. Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 392–395, p. 142–147, 2013.

CONCLUSÕES

Nossos resultados fornecem evidências que as exigências dietéticas de metionina do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, respondem de acordo com as variáveis de produção, tais como as condições de cultivo, a densidade de estocagem, o regime alimentar e as relações entre os aminoácidos essenciais das rações.

No capítulo 1, os resultados mostraram que em condições de cultivo intensivo existe uma interação entre o requerimento dietético de metionina e os regimes de troca de água. A diminuição das taxas de renovação de água reduz a dependência por níveis mais elevados de metionina dietética para maximizar o crescimento de *L. vannamei*.

No capítulo 2, os resultados mostraram que para juvenis de *L. vannamei* cultivados em condições de água verde existem interações entre o requerimento dietético de metionina, a densidade de estocagem e o regime de alimentação. Com o aumento da densidade de estocagem, aumenta a dependência de metionina dietética para maximizar o crescimento dos camarões. No entanto, os requerimentos dietéticos de metionina podem ser reduzidos à medida que as taxas alimentares são aumentadas.

No capítulo 3, os resultados mostraram que os níveis dietéticos de metionina afetam o desempenho de crescimento e a utilização alimentar de *L. vannamei*. Com base nas análises de regressão, o valor ótimo de metionina dietética para o máximo crescimento dessa espécie encontra-se no intervalo entre 9,4 e 10,5 g kg⁻¹ da dieta (2,48 a 2,77% da PB), correspondente à relação ideal de metionina/lisina de 43 e 48%, respectivamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os resultados derivem de experimentos realizados em ambientes controlados, onde houve domínio das variáveis ambientais e de qualidade da água, os mesmos se diferenciam por apresentar os efeitos combinados e intrínsecos dos nutrientes do alimento natural (água verde) e das dietas testadas, aproximando-se das condições de cultivo encontradas em escala industrial.

As conclusões aqui estabelecidas são importantes para o desenvolvimento de dietas balanceadas com aminoácidos, que sejam eficientes e sustentáveis para cultivo intensivo de juvenis de camarão branco do Pacífico possibilitando a redução do uso de ingredientes de origem marinha e o eficiente uso de fontes proteicas de origem vegetal.